

# Le patologie lisosomiali

# MALATTIE LISOSOMIALI

- **sono gravi malattie genetiche causate da un difetto enzimatico di degradazione delle molecole all'interno della cellula**
- **questo deficit causa un accumulo di prodotti all'interno dei lisosomi, con gravi danni alla cellula stessa.**
- **Sono in generale definite malattie rare (<5:10000),**
- **colpiscono fin dal primo periodo di vita con un decorso progressivo deterioramento delle funzioni vitali ed esito letale.**

**Nella cellula eucariote, il lisosoma è**

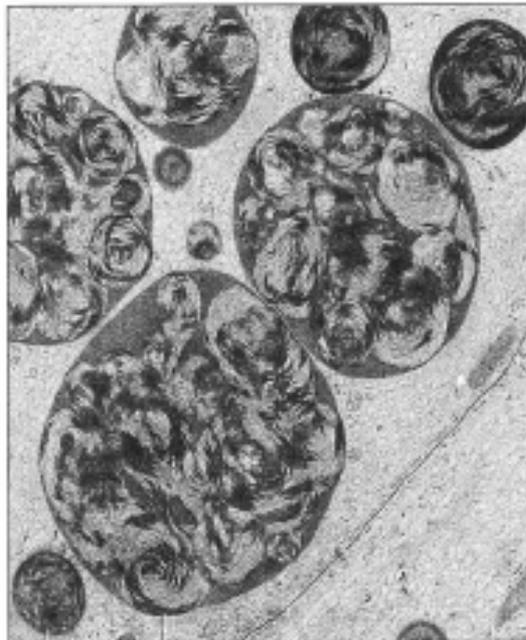
**un organulo presente nel citoplasma, contenente numerosi enzimi ad azione litica, cioè capaci di degradare altre molecole.**

**I lisosomi possiedono forma tondeggianti e un diametro di circa 0,2-0,6  $\mu\text{m}$ ; sono delimitati da uno strato di membrana fosfolipidica.**

**Nel loro interno si possono riconoscere formazioni di diversa natura, come cristalli proteici, granuli di vari composti degradati, frammenti di altri organuli, residui di origine sia endogena (cioè provenienti dalla stessa cellula) sia esogena.**

**I lisosomi sono particolarmente numerosi nei macrofagi e nei granulociti, cellule coinvolte nella DIFESA IMMUNITARIA e capaci di fagocitare elementi estranei**

# I Lisosomi



Lisosoma primario      Lisosoma secondario

5  $\mu$ m

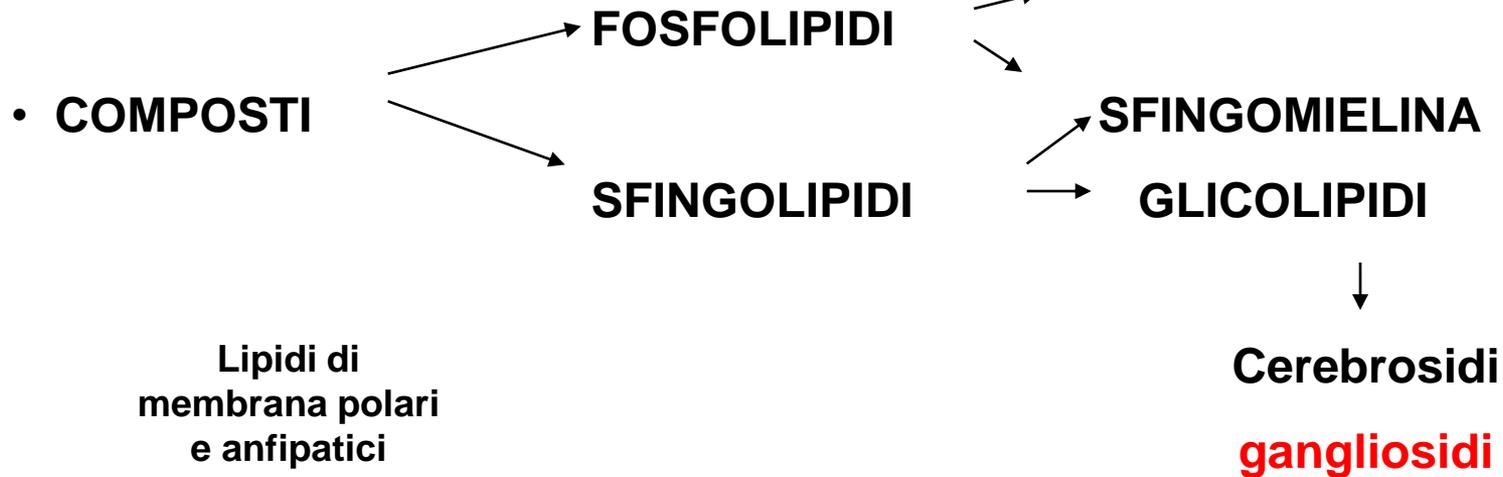
- I lisosomi primari si formano per gemmazione dal Complesso del Golgi
- Questi si fondono con le vescicole fatte dalla membrana plasmatica contenenti il materiale estraneo, ed originano il lisosoma secondario
- Sacche presenti nelle cellule animali contenenti enzimi digestivi ( $\geq 40$ )
- Gli enzimi lisosomiali, sintetizzati nel R.E., sono attivi a pH5 e sono confinati all'interno della membrana lisosomiale
- Gli enzimi lisosomiali intervengono in processi degradativi normali delle cellule
- La carenza di alcuni enzimi lisosomiali porta a malattie da accumulo lisosomiale (es. Sindrome di Tay- Scachs , autosomica recessiva)

Il dosaggio della fosfatasi acida lisosomiale che avete fatto serve per vedere l'efficacia della rottura dei linfociti (tramite sonicazione)

# LIPIDI

- **SEMPLICI (ACIDI GRASSI E ACILGLICEROLI)**

(Trigliceridi sono lipidi neutri di riserva)



## DERIVATI LIPOIDI : STEROIDI ES COLESTEROLO

(LIPIDI NON SAPONIFICABILI )

(perché non hanno cooH e quindi idrolizzati in presenza di basi non possono dare saponi )

# Nei lipidi gli acidi grassi sono legati

**al glicerolo**  
*(con legame estereo)*  
***glicerolipidi***

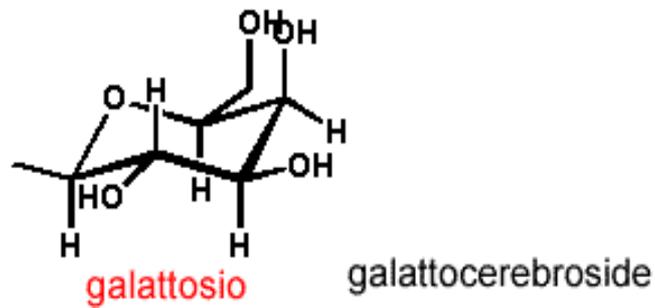
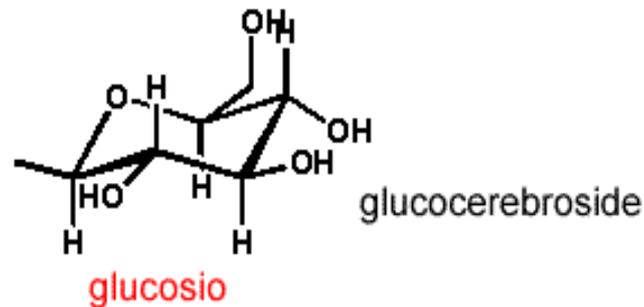
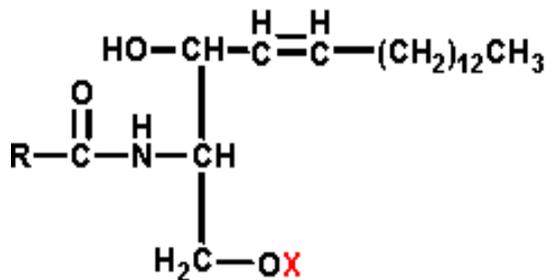
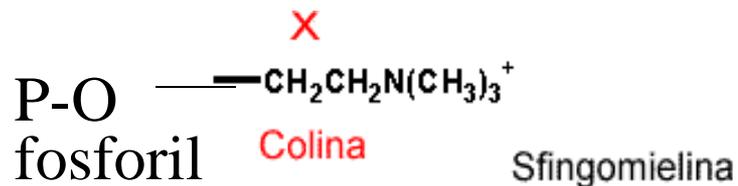
**o alla sfingosina**  
*(con legame ammidico)*  
***sfingolipidi***

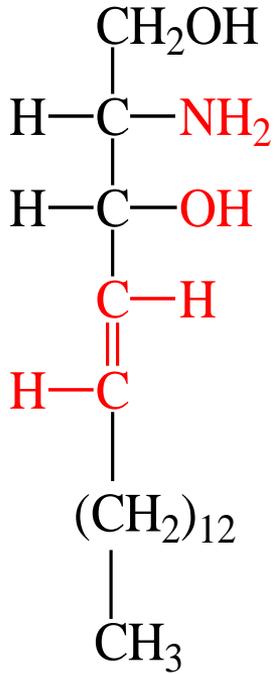
# SFINGOLIPIDI

Entrambi i sfingolipidi e i glicosfingolipidi sono derivati acilici degli acidi grassi con sfingosine a catena lunga chiamate ceramidi

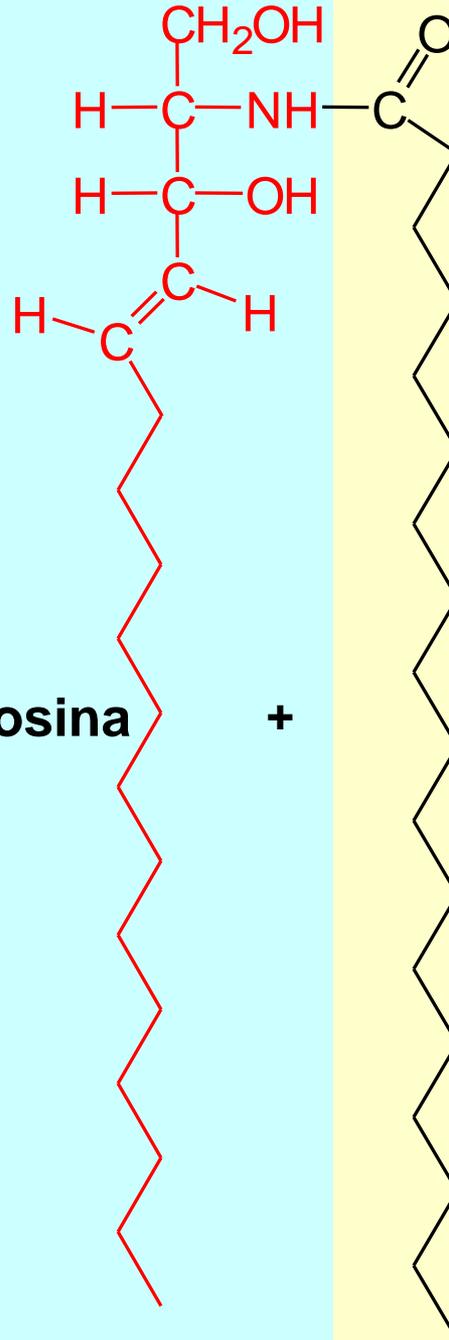
Nella sfingolmielina uno sfingolipide la ceramide è esterificata con la fosforilcolina.

Nei glicosfingolipidi la ceramide è unita ad uno o più zuccheri.





C18-sfingosina



**sfingosina**

**+**

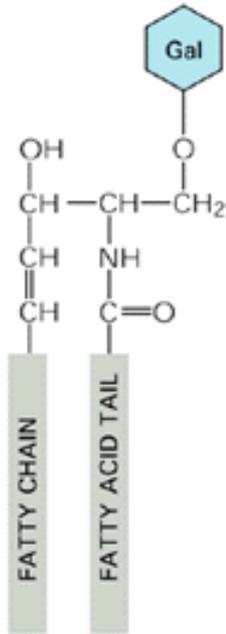
**Acido  
grasso**

**=**

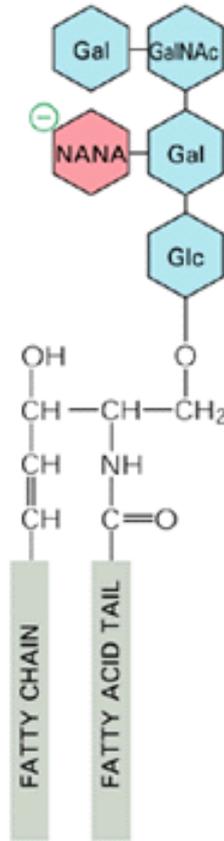
**ceramide**

# I glicolipidi

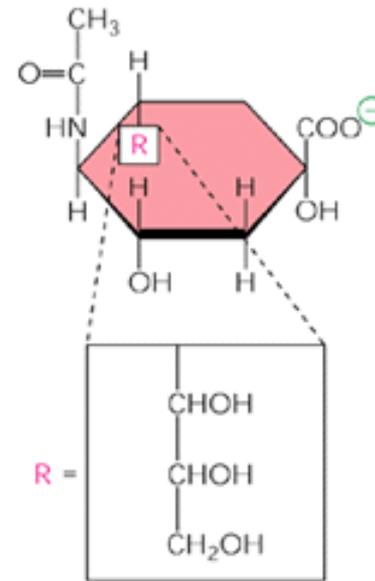
Imp per i  
dosaggi gli  
enzimi che li  
degradano



(A) galactocerebroside



(B) G<sub>M1</sub> ganglioside

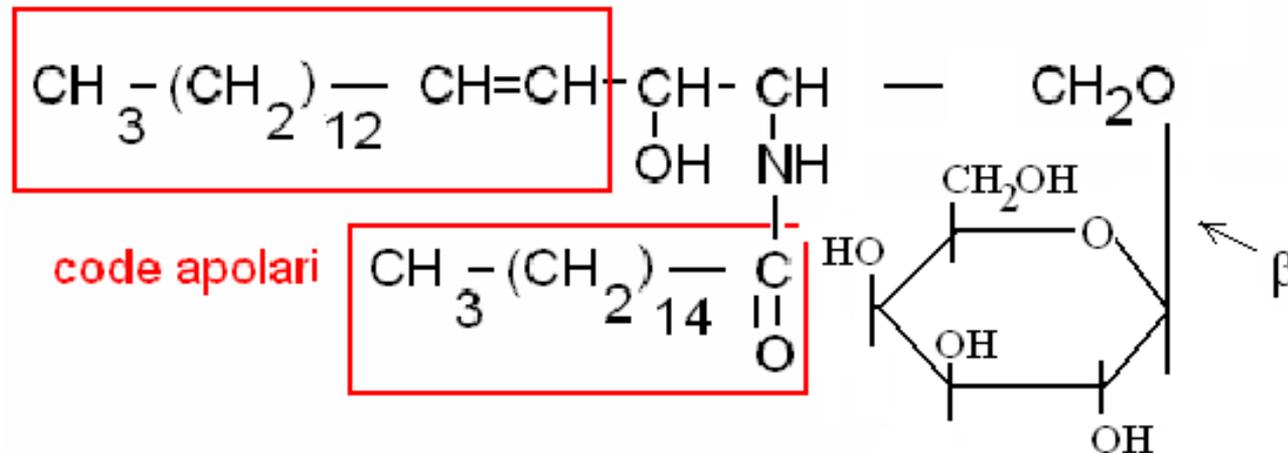


(C) sialic acid (NANA)

# GLICOLIPIDI

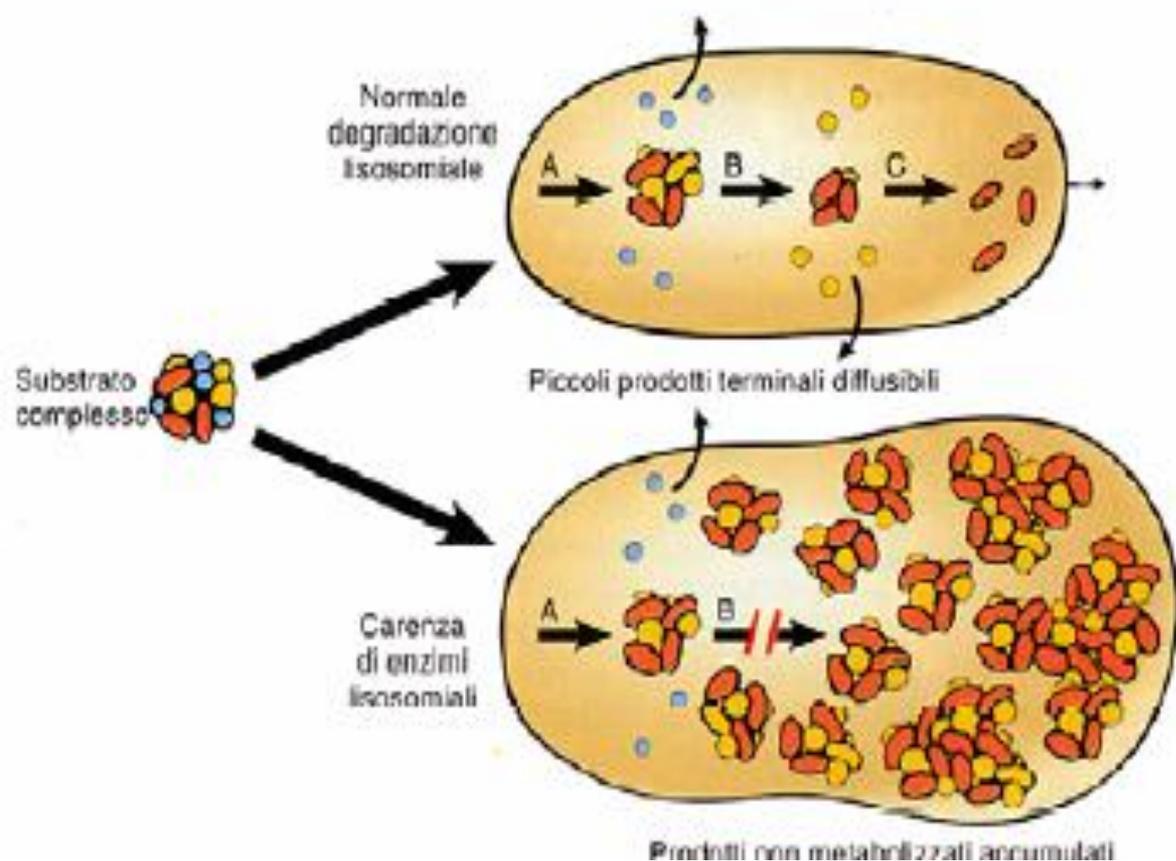
Nei glicolipidi la molecola “portante” è di nuovo il **ceramide** (= **sfingosina + acido grasso**), come nelle sfingomieline, ma la testa polare è rappresentata da un singolo monosaccaride nei **cerebrosidi** o da una catena ramificata di zuccheri nei **gangliosidi**. NON c'è il fosfato!

La “testa polare” è formata dallo zucchero o dalla catena di zuccheri.



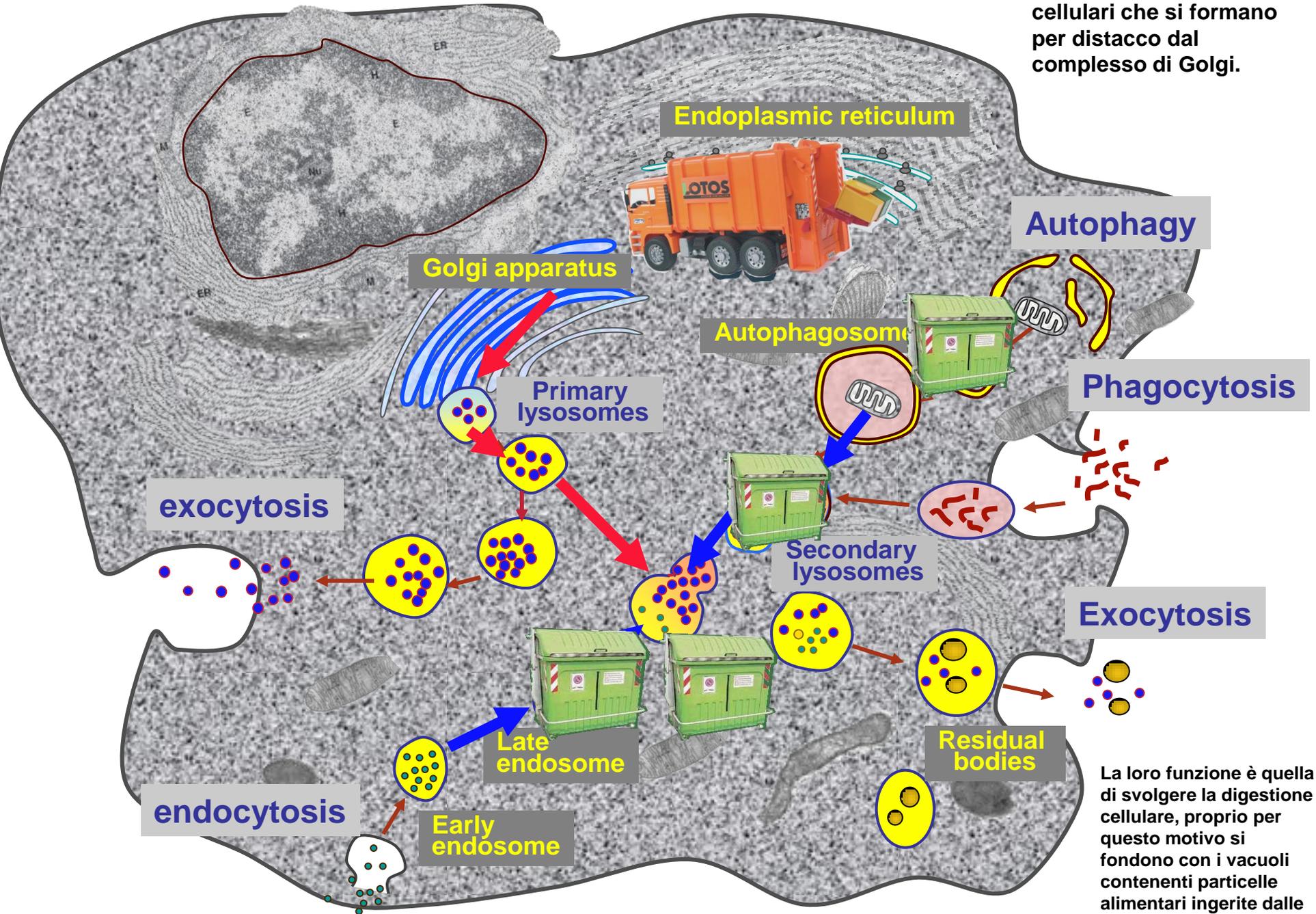
un galatto cerebroside

# Malattie da accumulo lisosomiale



- Recessive, autosomiche o legate all'X
- Danno localizzato in organi o cellule ricchi di substrato o specializzati nella degradazione
- Peggioramento progressivo

I lisosomi sono organuli cellulari che si formano per distacco dal complesso di Golgi.



Autophagy

Phagocytosis

Exocytosis

La loro funzione è quella di svolgere la digestione cellulare, proprio per questo motivo si fondono con i vacuoli contenenti particelle alimentari ingerite dalle cellule

Endoplasmic reticulum

Golgi apparatus

Autophagosome

Primary lysosomes

Secondary lysosomes

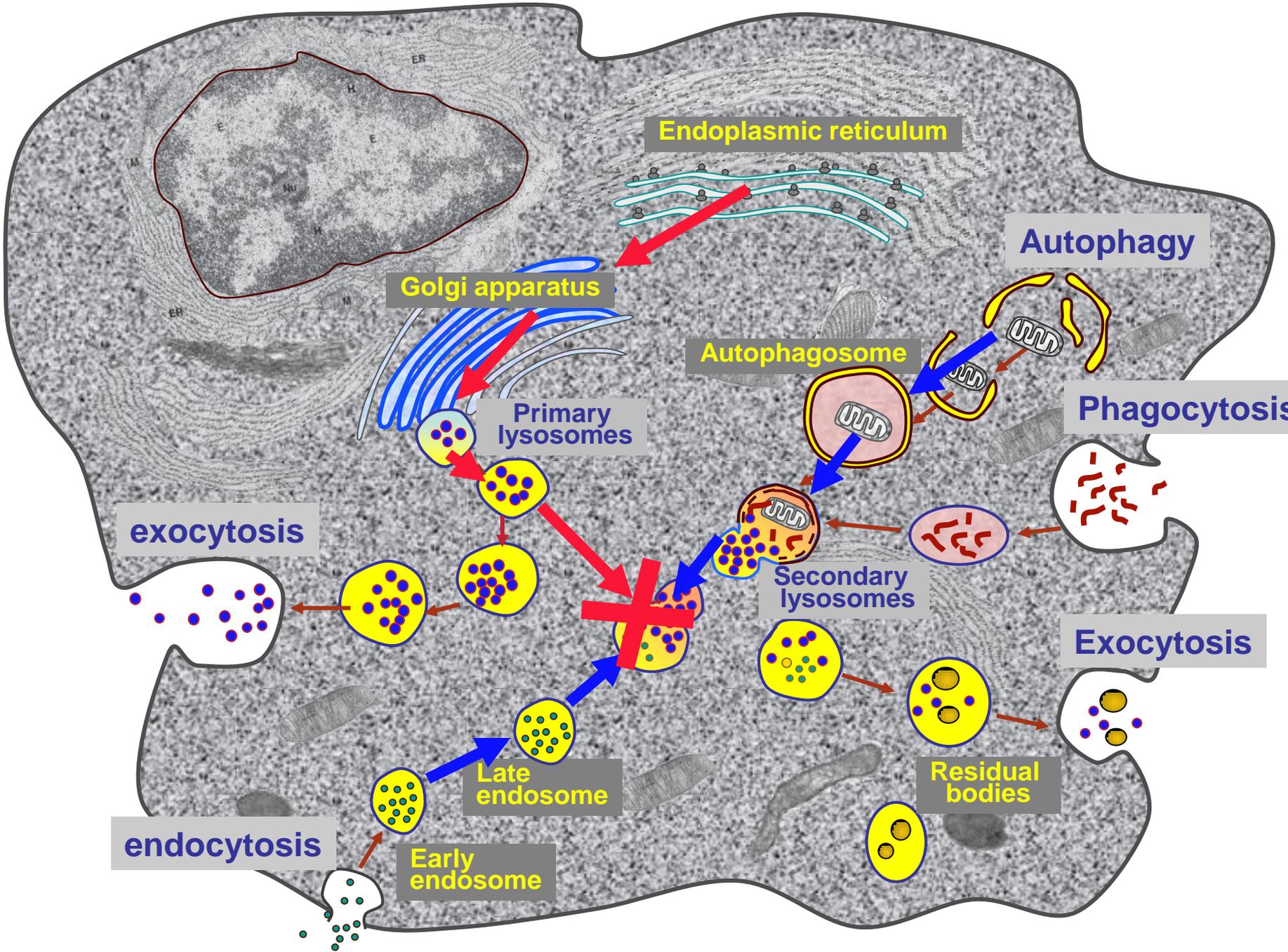
exocytosis

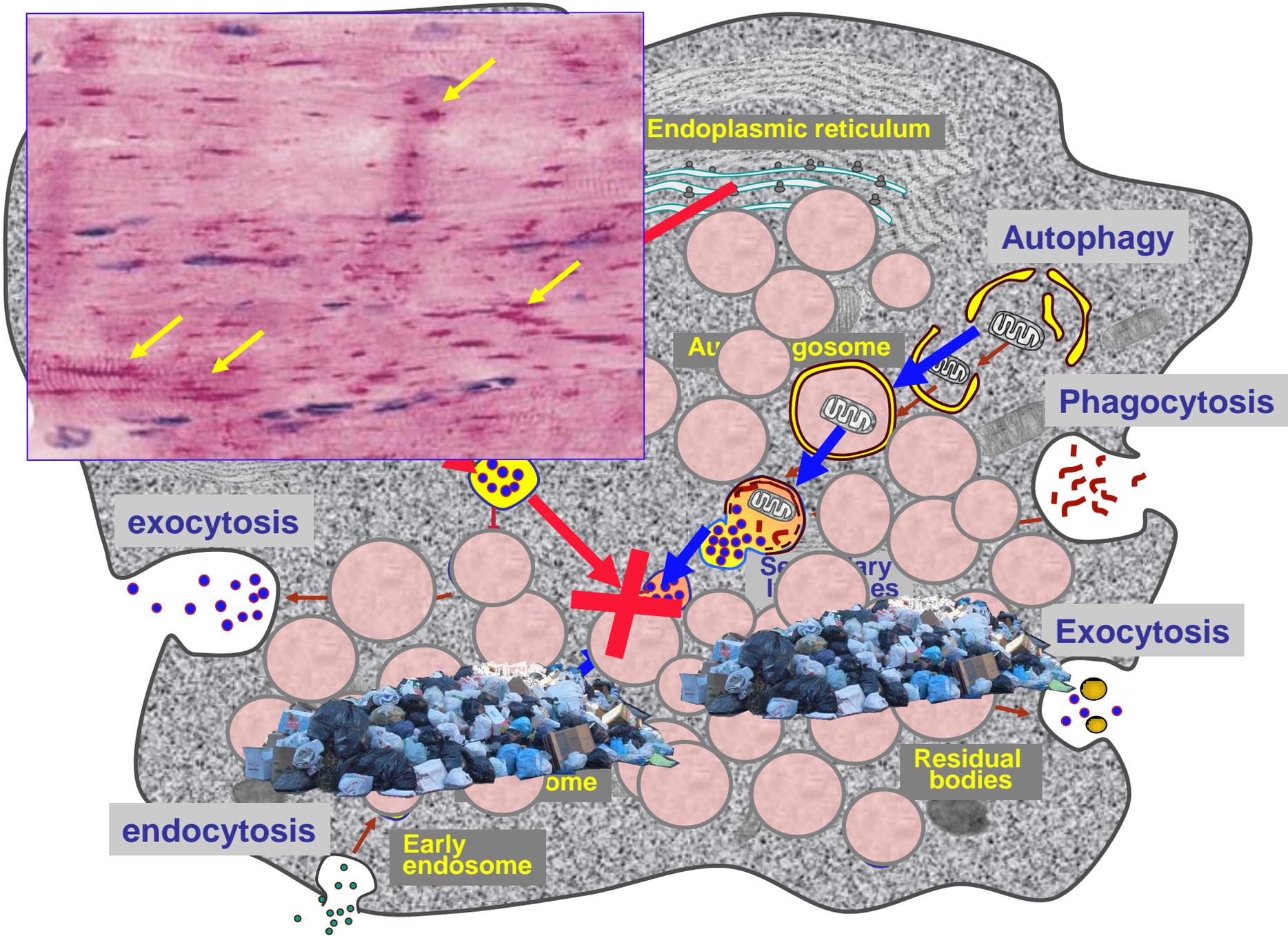
Late endosome

Residual bodies

endocytosis

Early endosome





Quindi in realtà le malattie da accumulo lisosomiale (LSDs) sono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche ciascuna dovuta al deficit singolo o combinato di proteine lisosomiali, enzimi, cofattori, trasportatori o attivatori.

**Il deficit totale o parziale di una proteina lisosomiale** determina un accumulo intralisosomiale di specifici substrati provenienti da diverse vie metaboliche.

È proprio l'accumulo dei substrati non degradati la causa fisiopatologica del danno e morte cellulare.

Le LSDs sono state classificate in base al maggiore prodotto di accumulo in

**Mucopolisaccaridosi, Sfingolipidosi, Glicoproteinosi e altre.**

A seconda dell'enzima che manca, si possono classificare in:

- 1) **Mucopolisaccaridosi (MPS)**, in cui esiste un difetto di degradazione dei mucopolisaccaridi o glicosaminoglicani (lunghe molecole zuccherine presenti in molti tessuti).
- 2) **Sfingolipidosi** in cui esiste un difetto di degradazione delle sfingomieline, dei cerebrosidi e dei gangliosidi (componenti importanti delle cellule nervose). A questo gruppo appartengono anche la leucodistrofia metacromatica e la leucodistrofia di Krabbe.

### 3) Oligosaccaridosi,

in cui esiste un difetto nella degradazione degli zuccheri (oligosaccaridi) e delle proteine legate agli zuccheri (glicoproteine).

### 4) Malattie di trasporto lisosomiale alterato,

in cui alcune sostanze non vengono trasportate correttamente nei lisosomi per la degradazione.

### 5) Da mancato trasporto degli enzimi lisosomiali,

in cui alcuni enzimi non vengono trasportate correttamente nei lisosomi, non assolvendo quindi alla loro funzione.

### 6) Altre malattie lisosomiali

(tra cui, la Ceroidolipofusinosi)

# Malattie da accumulo:

- Difetto enzimatico
- Metabolita in eccesso
- Esordio (infantile-progressivo o late-onset)
- Trasmissione genetica

Disorder <sup>a</sup>	Enzyme Deficiency	Stored Material	Clinical Types (Onset)	Inheri
<b>MUCOPOLYSACCHARIDOSES (MPS)</b>				
MPS I H, Hurler (136)	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan sulfate Heparan sulfate	Infantile	AR
MPS I H/S, Hurler/Scheie			Intermediate	
MPS I S, Scheie			Adult	
MPS II, Hunter (136)	Iduronate sulfatase	Dermatan sulfate Heparan sulfate	Severe infantile Mild juvenile	X-link
MPS III A, Sanfilippo A (136)	Heparan-N-sulfatase	Heparan sulfate	Late infantile	AR
MPS III B, Sanfilippo B	N-Acetyl- $\alpha$ -glucosaminidase	Heparan sulfate	Late infantile	AR
MPS III C, Sanfilippo C	Acetyl-CoA: $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase	Heparan sulfate	Late infantile	AR
MPS III D, Sanfilippo D	N-Acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase	Heparan sulfate	Late infantile	AR
MPS IV A, Morquio (136)	N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	Keratan sulfate Chondroitin-6 sulfate	Childhood	AR
MPS VI B, Morquio (136)	$\beta$ -Galactosidase		Childhood	AR
MPS VI, Maroteaux-Lamy (136)	Arylsulfatase B	Dermatan sulfate	Late infantile	AR
MPS VII (136)	$\beta$ -Glucuronidase	Dermatan sulfate Heparan sulfate	Neonatal Infantile Adult	AR
<b>GM<sub>2</sub> GANGLIOSIDOSES</b>				
Tay-Sachs' disease (153)	$\beta$ -Hexosaminidase A	GM <sub>2</sub> gangliosides	Infantile	AR
Sandhoff's disease (153)	$\beta$ -Hexosaminidases A and B	GM <sub>2</sub> gangliosides	Juvenile Infantile	AR
<b>NEUTRAL GLYCOSPHINGOLIPIDOSES</b>				
Fabry disease (150)	$\alpha$ -Galactosidase A	Globotriaosylceramide	Childhood	X-link
Gaucher disease (146)	Acid $\beta$ -Glucosidase	Glycosylceramide	Type 1 Type 2 Type 3	AR
Niemann-Pick disease (144) A and B	Sphingomyelinase	Sphingomyelin	Neuronopathic, type A Nonneuronopathic, type B	AR
<b>GLYCOPROTEINOSES</b>				
Fucosidosis (140)	$\alpha$ -Fucosidase	Glycopeptides, oligosaccharides	Infantile Juvenile	AR
$\alpha$ -Mannosidosis (140)	$\alpha$ -Mannosidase	Oligosaccharides	Infantile Milder variant	AR
$\beta$ -Mannosidosis (140)	$\beta$ -Mannosidase	Oligosaccharides		AR
Aspartylglucosaminuria (140)	Aspartylglucosaminidase	Aspartylglucosamine, glycopeptides	Young adult onset	AR
Sialidosis (140)	Neuraminidase	Sialyloligosaccharides	Type I, congenital Type II, infantile and juvenile forms	AR
<b>MUCOLIPIDOSES (ML)</b>				
ML-II, I-cell disease (138)	UDP-N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase	Glycoprotein, glycolipids	Infantile	AR
ML-III, pseudo-Hurler polydystrophy (138)	UDP-N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase	Glycoprotein, glycolipids	Late infantile	AR
<b>LEUKODYSTROPHIES</b>				
Krabbe's disease (147)	Galactosylceramidase	Galactosylceramide, Galactosyl sphingosine	Infantile	AR
Metachromatic leukodystrophy (148)	Arylsulfatase A	Cerebroside sulfate	Infantile Juvenile Adult	AR
Multiple sulfatase deficiency (149)	Active site cysteine to C <sub>6</sub> -formylglycine-converting enzyme	Sulfatides, mucopolysaccharides	Late infantile	AR
<b>DISORDERS OF NEUTRAL LIPIDS</b>				
Wolman disease (142)	Acid lysosomal lipase	Cholesterol esters, triglycerides	Infantile	AR
Cholesteryl ester storage disease (142)	Acid lysosomal lipase	Cholesteryl esters	Childhood	AR
Farber disease (142)	Acid ceramidase	Ceramide	Infantile Juvenile	AR

<sup>a</sup> Numbers in parentheses refer to the chapters in Scriver et al, 8th edition, for detailed reviews.

# Sfingolipidosi

**Gli sfingolipidi sono componenti delle membrane plasmatiche delle cellule eucariotiche.**

**Sono tipiche sostanze anfifiliche caratterizzate da una porzione idrofobica e una porzione idrofilica. La struttura base degli sfingolipidi è la ceramide, da cui si originano i fosfosfingolipidi e i glicosfingolipidi. Una volta sintetizzati, gli sfingolipidi raggiungono la membrana plasmatica.**

**In passato si pensava che questi composti fossero semplici componenti strutturali delle membrane, oggi sono riconosciuti come regolatori di una moltitudine di processi cellulari. Infatti alcune porzioni di membrana, ricche di diversi sfingolipidi, colesterolo e/o proteine, definite *lipid rafts*, hanno la funzione non solo di trasporto dei lipidi all'interno della cellula, ma anche di segnale (*signaling*) in processi di riconoscimento cellula-cellula, cellula-substrato, cellula-agente patogeno.**

- Hanno inoltre un ruolo **importante nella proliferazione e nella differenziazione cellulare** e nell'apoptosi.
- Date le loro molteplici funzioni cellulari specifici sfingolipidi vengono sintetizzati in differenti tipi cellulari in relazione allo stadio di sviluppo e alla funzione della cellula.
- In condizioni normali sintesi e catabolismo degli sfingolipidi sono in equilibrio.
- La sintesi avviene nel reticolo endoplasmatico e le modificazioni post-traduzionali nell'apparato del Golgi. Non si conoscono finora malattie genetiche dovute a difetti nella sintesi degli sfingolipidi, mentre sono state identificate **varie patologie** derivanti da **alterazioni nel loro catabolismo**, che vanno sotto il nome di sfingolipidosi.
- Il catabolismo degli sfingolipidi avviene nel compartimento acido delle cellule, gli endosomi e i lisosomi

**Frammenti della membrana plasmatica, contenenti sfingolipidi destinati alla degradazione, si invaginano e, sotto forma di vescicole, attraversano il comparto endosomiale raggiungendo i lisosomi dove vengono internalizzati nel *lumen*.**

**Queste vescicole intralisosomiali sono il luogo dove avviene la degradazione degli sfingolipidi ad opera di diversi enzimi che hanno la capacità di idrolizzare sequenzialmente gli zuccheri dalla parte non riducente del glicolipide.**

**La maggior parte delle sfingolipidosi sono comunque dovute a mancanza di attività di specifiche idrolasi lisosomiali.**

**L'accumulo intracellulare di un determinato sfingolipide interferisce con il traffico lipidico e può generare l'accumulo secondario di colesterolo**

# Malattia di Fabry: glicosfingolipidosi

- Malattia da accumulo lisosomiale
- Trasmissione ereditaria (X-Linked)
- Carezza parziale o totale dell'enzima lisosomiale  $\alpha$ -galattosidasi A ( $\alpha$ -galattoside-galattoidrolasi,  $\alpha$ -GAL-A) o ceramide triosidasi (locus genico Xq22.1).
- La carezza enzimatica porta all'accumulo nei tessuti, specie nell'endotelio vascolare, di glicosfingolipidi neutri (in particolare del globotriaosilceramide e globoside GB-4).

# Malattia di Fabry, malattia ereditaria del metabolismo degli sfingolipidi

La malattia di Fabry, nota anche come malattia di Anderson-Fabry, è una malattia ereditaria multisistemica del metabolismo degli sfingolipidi. E' una patologia legata al cromosoma X, caratterizzata da un deficit dell'enzima lisosomiale alfa-galattosidasi A.

## *Come si trasmette*

La malattia di Fabry è trasmessa attraverso il gene codificante per **l'enzima alfa-galattosidasi A, localizzato sul cromosoma X**. Poiché il gene che è alterato è trasportato da un cromosoma X della madre, i figli maschi hanno una probabilità del 50% di ereditare la malattia, e le figlie femmine hanno una probabilità del 50% di essere portatrici della malattia.

La malattia di Fabry interessa maschi emizigoti ( a singolo allele ) e le femmine eterozigoti ed omozigoti; i maschi tendono a manifestare i più gravi sintomi clinici, mentre le femmine possono risultare asintomatiche o presentare gravi sintomi come i maschi. Questa variabilità sembra essere dovuta all'inattivazione X durante lo sviluppo embrionale delle femmine.

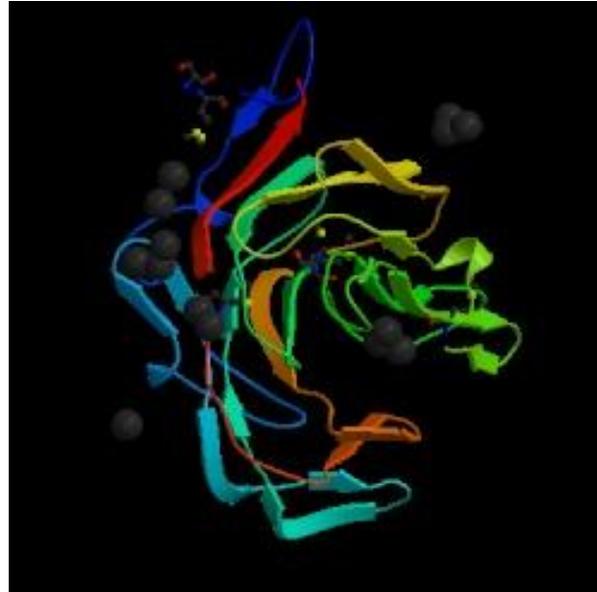
## *Il disturbo metabolico*

La malattia di Fabry è una sfingolipidosi, in cui l'enzima deficitario è l'alfa-galattosidasi A. La carenza di questo enzima causa insufficiente degradazione dei glicosfingolipidi neutri con accumulo di prodotti di scarto, in particolare globotriosilceramide ( Gb3 ) nel plasma, nei lisosomi, nell'endotelio vasale e delle cellule muscolari lisce. Il danno cellulare si manifesta con la compromissione di organi.

# Enzima

- $\alpha$ -GAL-A è un' esoglicosidasi che taglia i residui galattosidici terminali di glicosfingolipidi e glicoproteine tramite una reazione idrolitica.
- Glicoproteina omodimerica: 2 subunità di circa 50 K-dalton (101Kd tot), su ogni subunità ci sono 3 catene oligosaccaridiche.
- La carenza enzimatica causa accumulo di glicosfingolipidi con residui  $\alpha$ -d-galattoside terminali, come il globotriaosil ceramide o il suo metabolita GB3 ed altri glicosfingolipidi.

# Structure of Alpha Galactosidase



SEQUENCE 248 AA; 27774 MW; 7F4B44E3AA59ECE6 CRC64;  
MERASLIQKA KLAEQAERYE DMAAFMKGAV EKGEELSCEE  
RNLLSVAYKN VVGGQRAAWR VLSSIEQKSN EEGSEEKGP  
VREYREKVE ELQGVCDTVL GLLDSHLIKE AGDAESRVFY  
LKMKGDYRY LAEVATGDDK KRIIDSARSA YQEAMDISKK  
EMPPTNPIRL GLALNFSVF YEIANSPEEA ISLAKTTFDE  
AMADLHTLSE DSYKDSTLIM QLLRDNLTLW  
TADNAGEEGG  
EAPQEPQS

# L'enzima $\alpha$ -Gal-A

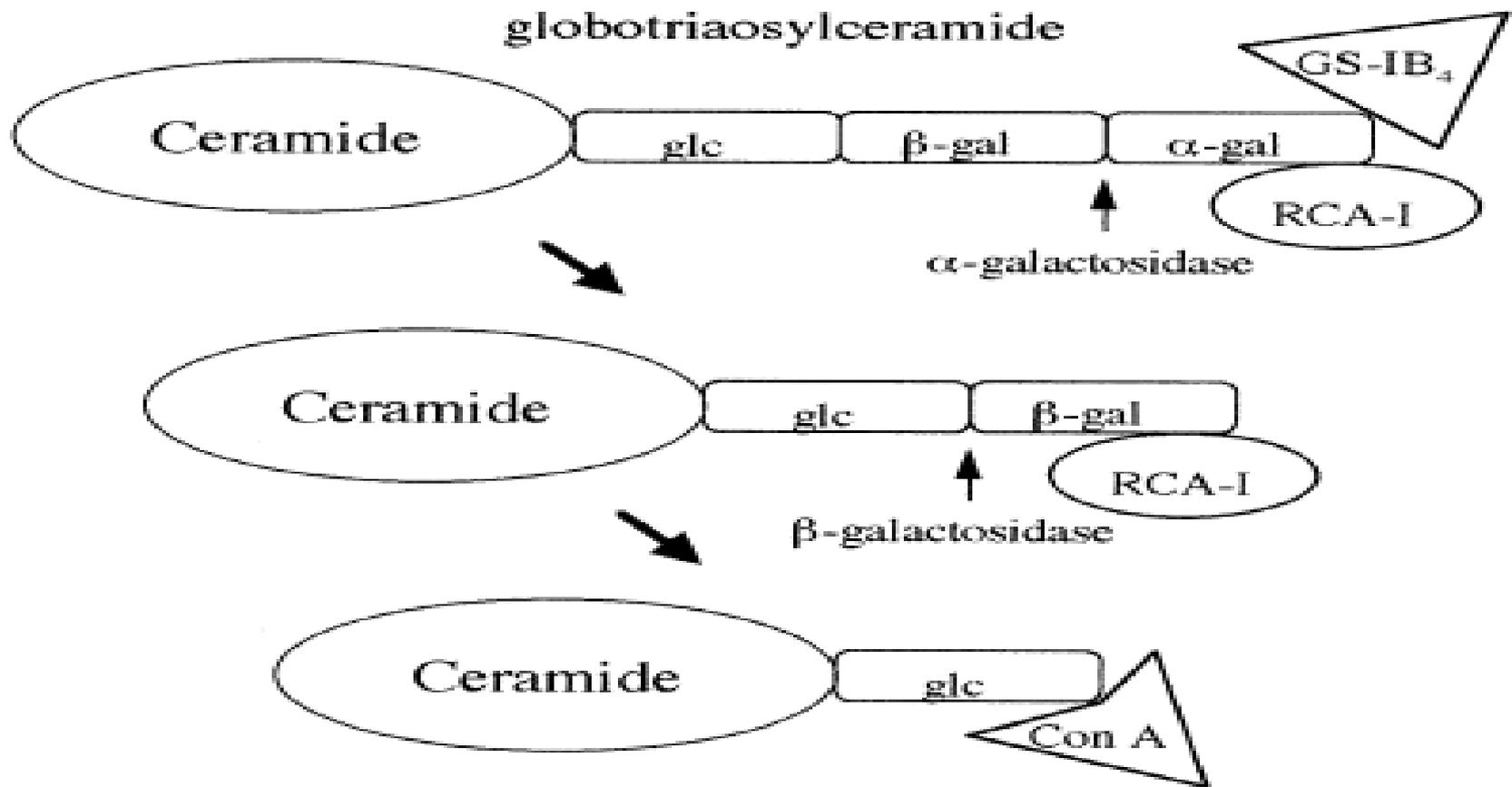
La malattia di Fabry, caratterizzata da difetto del catabolismo dei glicosfingolipidi per una attività deficitaria dell' enzima lisosomiale  $\alpha$ -galattosidasi A ( $\alpha$ -Gal-A).

Il deficit enzimatico causa un progressivo accumulo di globotriaosilceramide (GL-3) e glicosfingolipidi correlati nei lisosomi delle cellule endoteliali e, in minor grado, delle cellule epiteliali, periteliali e cellule muscolari lisce

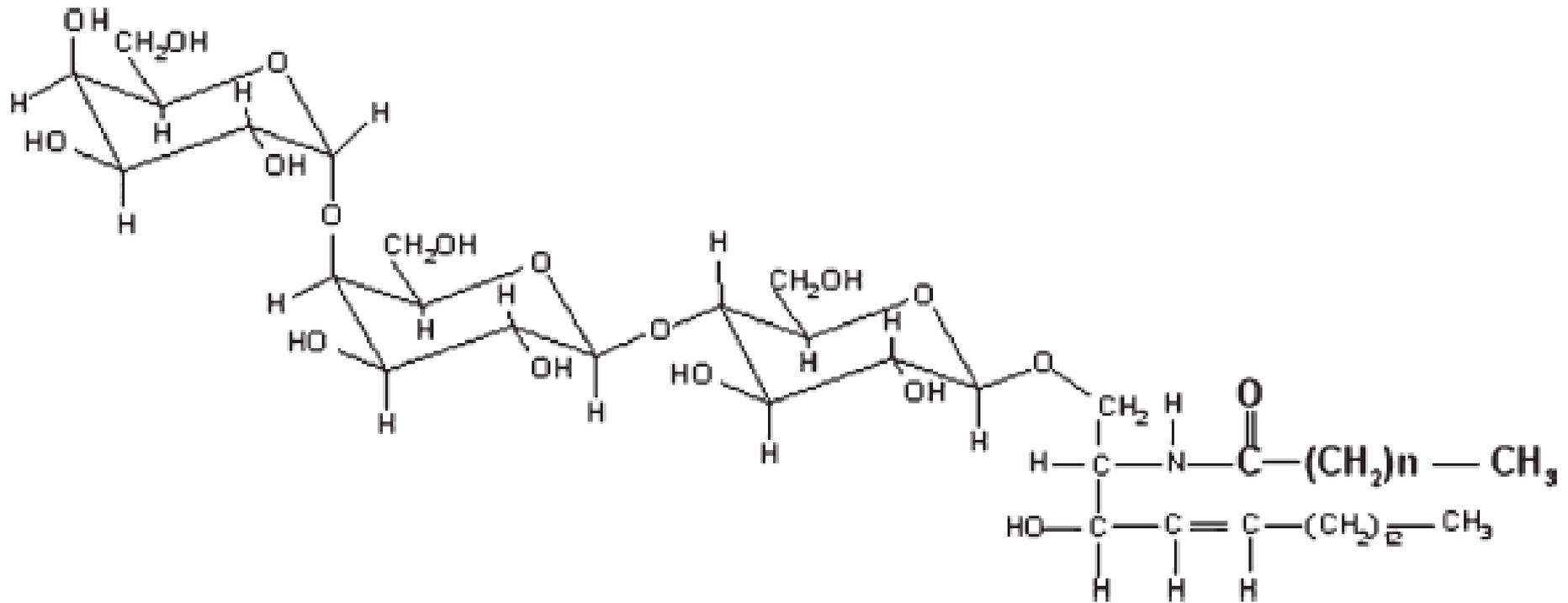
# Attività enzimatica

- 2.88-16.15 nmol/ml di plasma.
- pH ottimale: 4.5-5.0 (lisosomi).
- Inattivazione: 60 °C per 10 ".
- $K_m = 0.55$  mmol,  $V_{max} = 0.80$  micromol/min per mg (a pH = 5 e 50 °C ).

# Globotriaosylceramide (G13)



# Struttura chimica



# Malattia di Fabry

- ✓ La Malattia di Fabry è una malattia da accumulo lisosomiale ad andamento progressivo, determinata dalla carenza, totale o parziale, dell'enzima  $\alpha$ -galattosidasi A.
- ✓ Malattia ereditaria a trasmissione legata al cromosoma X, colpisce prevalentemente gli uomini, ma è possibile che vengano interessate, in misura più modesta, anche le donne.

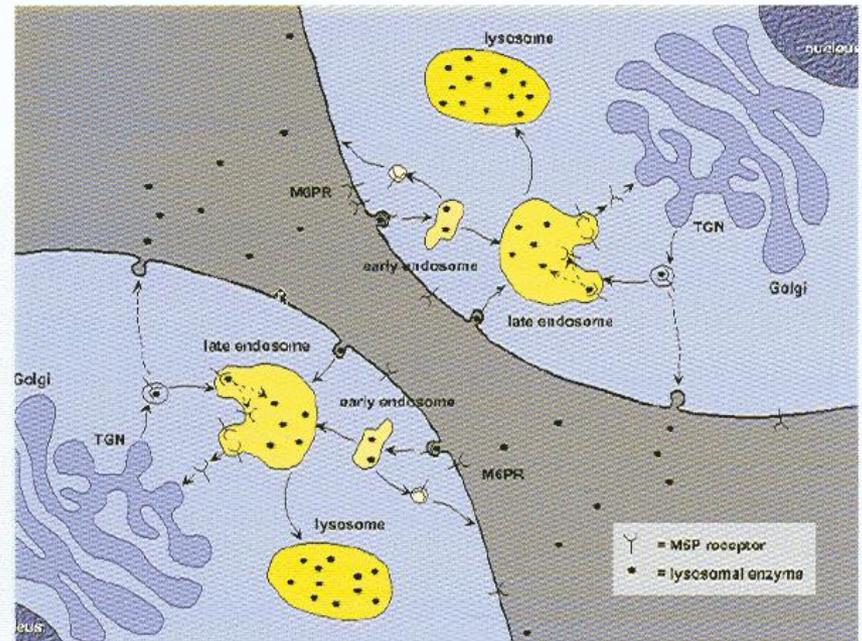
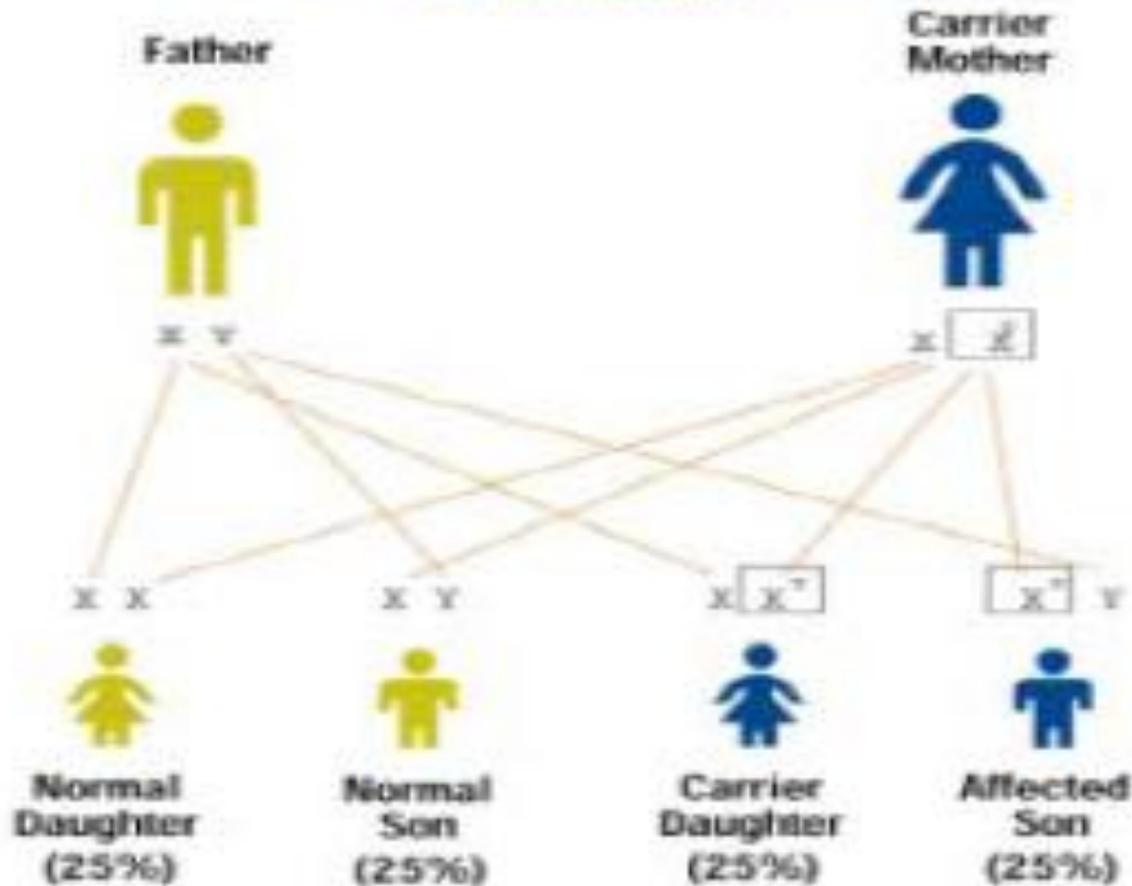


Figura 2. Biosintesi e circolazione degli enzimi lisosomiali

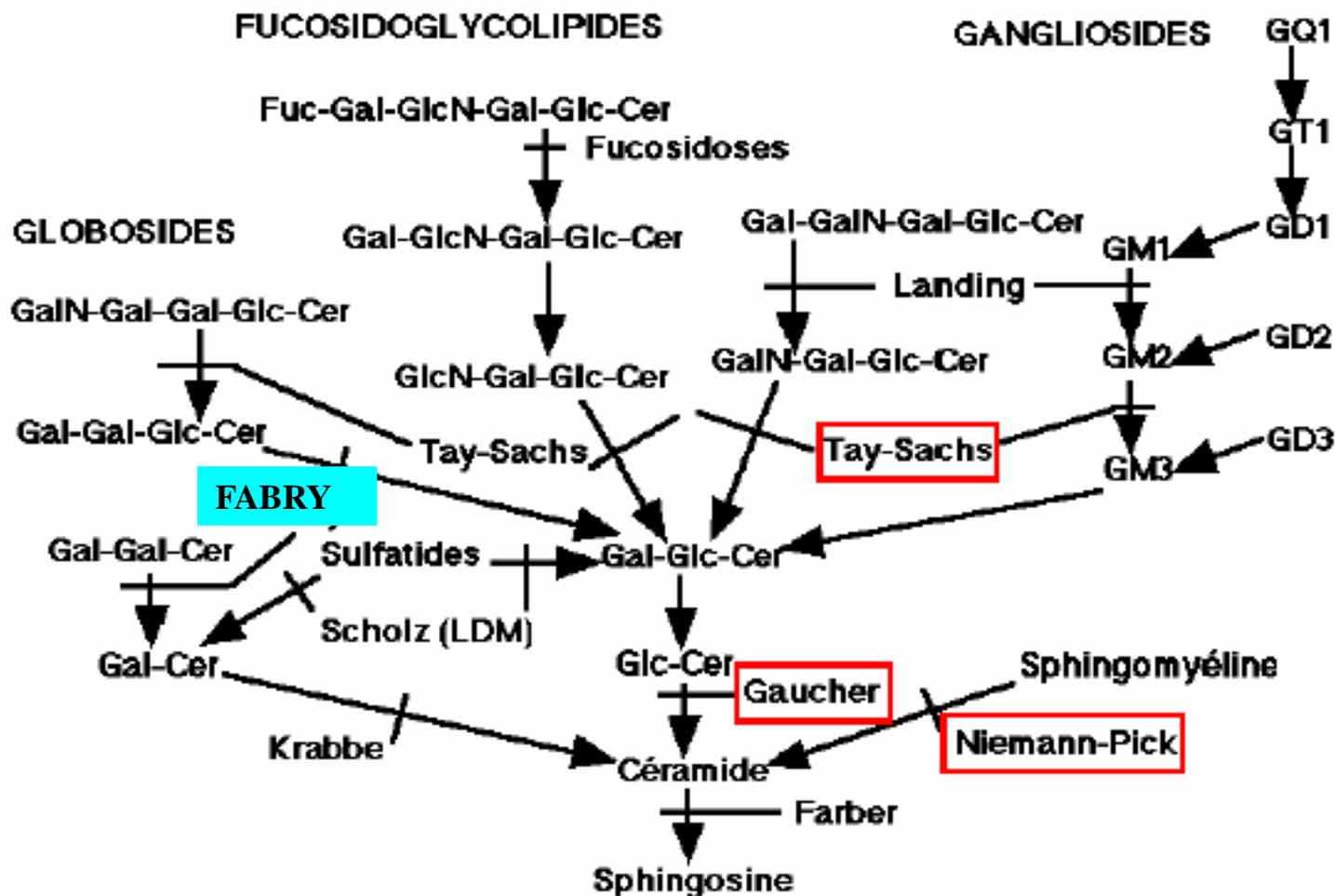
Gli enzimi lisosomiali di più recente sintesi vengono riconosciuti dal recettore mannosio-6-fosfato (M-6-P) sull'apparato del Golgi che a sua volta li trasporta nei lisosomi, loro localizzazione cellulare definitiva. Una parte degli enzimi viene messa anche in circolo e può essere ricatturata da vari recettori e quindi riportata ai lisosomi (TGN = Network Trans Golgi).

### Segregation of X-Linked Recessive Trait (Carrier Mother)



La donna portatrice ha il 50% di probabilità di passare il gene patologico ad ogni figlio, ad ogni gravidanza.

# Sfingolipidosi

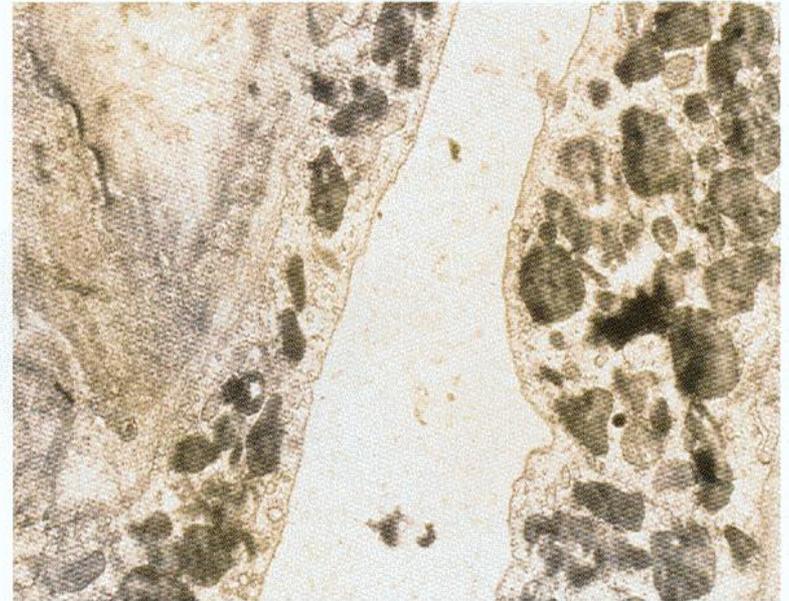


# Accumulo multiorgano

- L'accumulo del substrato non degradato nei tessuti è collegato all'espressività clinica della malattia
- E' Biomarker della severità della malattia ed utilizzato come marcatore di efficacia della ERT (enzyme replacement therapy)
- Analisi quantitativa usando una spettrometria di massa tramite ionizzazione elettrospray del GB3 urinario (confrontato con standard interno GB 3 marcato con destrosio radioattivo)

# Patogenesi

- Metaboliti intermedi GL-3, galabiosilceramide e globotriaosilceramide si accumulano nei lisosomi (inclusioni lamellari) e in cellule endoteliali, muscolari lisce e parietali delle pareti vascolari
- I depositi tendono ad estendersi all'interno del lume restringendolo
- **Ciò porta all'evoluzione verso ischemia ed infarto (Desnick et al., 1995)**



**Figura 3. Endotelio vascolare nella Malattia di Fabry**

Micrografia al microscopio elettronico a scansione che mostra l'endotelio vascolare di un piccolo vaso in un paziente con Malattia di Fabry. L'endotelio è pieno di vescicole dense di elettroni (lisosomi) contenenti glicosfingolipide non degradato. Il progressivo accumulo lisosomiale nell'endotelio vascolare porta a lesioni ischemiche e infartuali a carico di questi vasi (da R.J. Desnick).

# Sintomi

- Insufficienza renale
- Insufficienza cardiaca
- Acroparestesie
- Sindrome secca
- Occlusioni intestinali
- Aterosclerosi (IMA, Ictus giovanile, dolicoectasia della basilare,...)
- Cheratoacantomi
- Alterazioni corneali e del cristallino (cornea verticillinata).

# Terapia sostitutiva

- Infusione bisettimanale di  $\alpha$ -Galattosidasi A ricombinante (2 formulazioni farmaceutiche A e B, diversi dosaggi, equiparabili secondo i trials).
- Terapie sintomatiche.

# Pictures of Fabry Victims



Fabry on skin



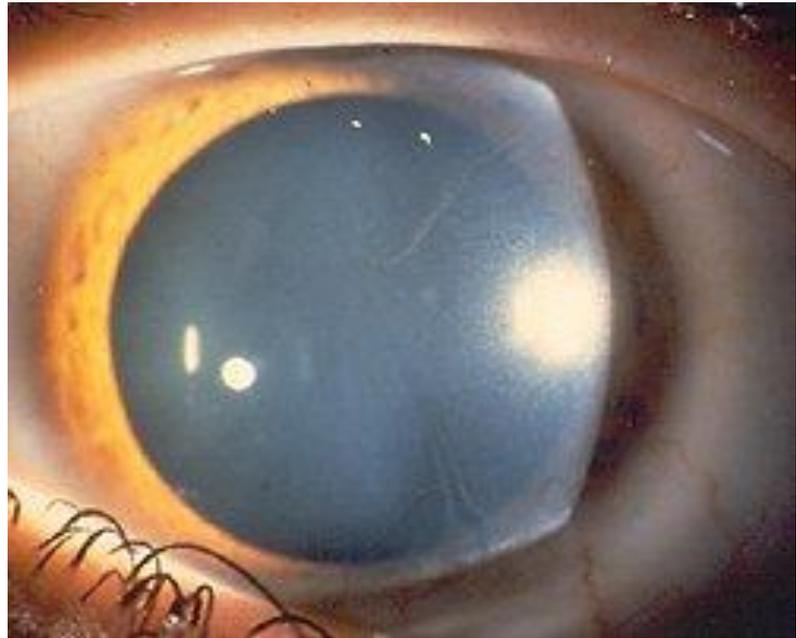
Fabry on skin



Fabry on leg and foot

# X inactivation

Women don't get full blown Fabry's. They get Corneal Opacity, this is where there is a fliming cloud over the eye.



# Cardiomyopathy

Some victims of Fabry can get Cardiomyopathy which is inefficient pumping of the ventricles.

