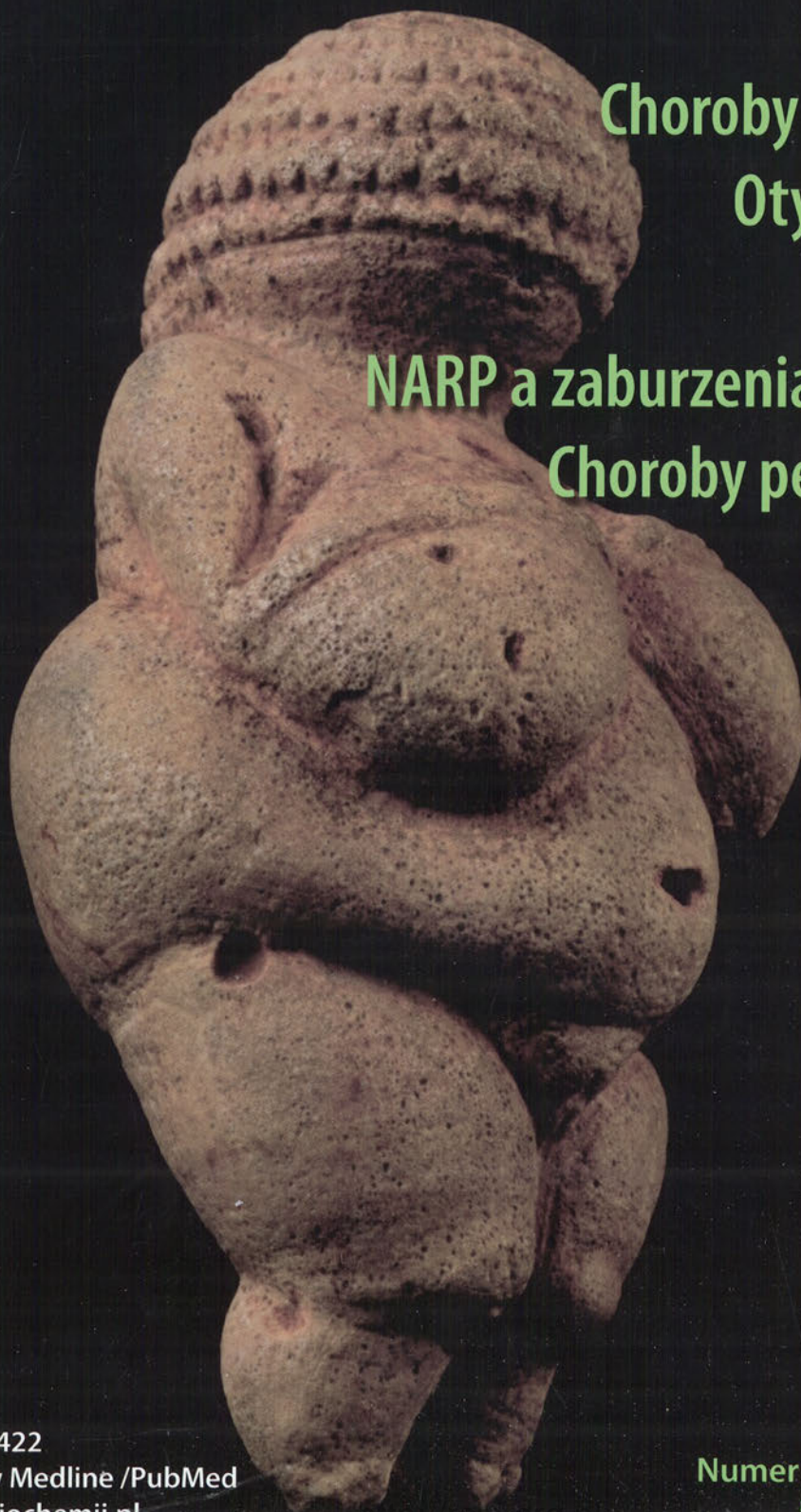


P. 939 13.01.2012

# POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2011  
TOM 57  
NUMER 2



Choroby spichrzeniowe  
Otyłość i cukrzyca  
Mitofuzyna 2  
NARP a zaburzenia metabolizmu  
Choroby peroksysomalne



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed  
[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

Numer specjalny pod redakcją  
Krzysztofa Zabłockiego

# GS Junior, mój nowy najlepszy przyjaciel



*... ponieważ mogę teraz sekwencjonować w moim laboratorium*

Uważamy, że polubisz nowy system GS Junior. I nie tylko dlatego, że jest nowy i ekscytujący. Z wielu innych powodów. System GS Junior pozwoli Ci wykonywać sekwencjonowanie drugiej generacji w Twoim laboratorium, na Twoim stole, kiedy tylko będziesz gotowy. Ze względu na to, iż działanie systemu GS Junior jest oparte na potwierdzonej technologii 454 Sequencing, dostarczy Ci wyników, którym możesz zaufać za każdym razem. System GS Junior dostarczany jest z komputerem z przyjaznymi użytkownikowi narzędziami bioinformatycznymi, więc nie musisz być już ekspertem by składać, mapować czy analizować Twój genom, transkryptom czy metagenom. I czego tu nie lubić? By dowiedzieć się więcej o systemie GS Junior oraz w jaki sposób może Ci pomóc w pracy laboratoryjnej, odwiedź stronę: [www.gsjunior.com](http://www.gsjunior.com). To może być początek pięknej przyjaźni.

## System GS Junior Potęga sekwencjonowania drugiej generacji w Twoich rękach

Przeznaczony jedynie do badań w naukach przyrodniczych.  
Nie do stosowania w procedurach diagnostycznych.

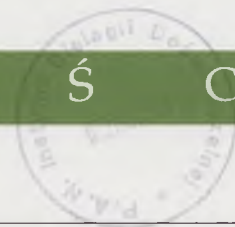
454  
SEQUENCING

454, 454 SEQUENCING, GS JUNIOR and GS FLX are trademarks of Roche  
© 2010 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.  
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B  
01-531 Warszawa  
[biologia.molekularna@roche.com](mailto:biologia.molekularna@roche.com)  
[www.roche.pl](http://www.roche.pl)





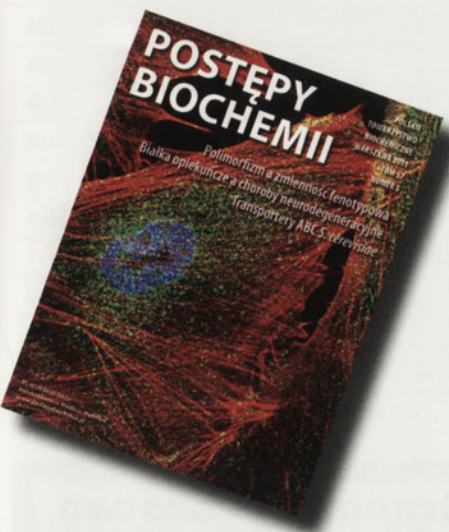
## Numer specjalny „Choroby metaboliczne” pod redakcją Krzysztofa Zabłockiego Instytut Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie

### WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	123
--	-----

### ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Lizosomalne choroby spichrzeniowe – ogólna charakterystyka Anna Kloska, Anna Tylki-Szymańska, Grzegorz Węgrzyn	128
Mukopolisacharydozy – biochemiczne mechanizmy chorób oraz możliwości terapeutyczne Anna Kloska, Anna Tylki-Szymańska, Grzegorz Węgrzyn	133
Glikogenozy – choroby genetyczne związane z zaburzeniami metabolizmu glikogenu Małgorzata Bejtka, Dominika Malińska	148
Patogeneza lipidowych chorób spichrzeniowych Joanna Bandorowicz-Pikuła, Sławomir Pikuła, Anna Tylki-Szymańska	158
Nowo opisane choroby metaboliczne związane z błędami metabolizmu na szlaku przemiany pentoz Anna Tylki-Szymańska, Teresa J. Stradomska	168
Wrodzone wady metabolizmu puryn i pirymidyn Agnieszka Jurecka	172
Peroksysony – funkcje i zaburzenia metaboliczne Teresa J. Stradomska	183
Cukrzyca wyzwaniem dla medycyny XXI wieku – wnioski z badań klinicznych i biochemicznych Adam K. Jagielski, Aneta Piesiewicz	191
Mechanizm powstawania oporności na insulinę w tkankach obwodowych Joanna Pawlak, Rafał A. Derlacz	200
Receptory jądrowe PPAR jako miejsce działania leków w zaburzeniach metabolicznych Marta Stolarczyk, Wojciech Gutman, Rafał A. Derlacz	207
Mitofuzyna 2 – ważne białko obwodowego układu nerwowego i powszechnie występujący regulator metabolizmu Maria Kawalec, Katarzyna Kotruchow, Andrzej Kochański, Barbara Zabłocka	215
Choroby spowodowane mutacjami w mitochondrialnym DNA Marta Wojewoda, Krzysztof Zabłocki, Joanna Szczepanowska	222



### W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Zaburzenia różnicowego składania pierwotnego transkryptu w kancerogenezie**

Hanna Wyszomirska, Agnieszka Piekiełko-Witkowska, Alicja Nauman

**Budowa krypt komórkowych i ich rola w funkcjonowaniu komórki oraz w oporności wielolekowej nowotworów**

Witold Szafarski, Michał Nowicki, Maciej Zabel

**System kontroli jakości białek w cytoplazmie – rola białek opiekuńczych w biologii chorób neurodegeneracyjnych**

Izabela Guenther, Sabina Kędzierska-Mieszkowska

### Rysunek na okładce:

Venus von Willendorf (© Natural History Museum Vienna; www.nhm-wien.ac.at). The well-known exhibit is on permanent display at the NHM Vienna. Published with permission from Naturhistorisches Museum Wien.

Events/Opinions/Comments	123
<b>REVIEWS</b>	
Lysosomal storage diseases – an overview	128
Mucopolysaccharidoses – biochemical mechanisms of diseases and therapeutic possibilities	133
Glycogenoses – genetic disorders leading to disturbed glycogen metabolism	148
Pathogenesis of lipid storage diseases	158
A newly discovered metabolic diseases due to defects in the pentose pathway	168
Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism	172
Peroxisomes – functions and disturbances in human metabolism	183
Diabetes as the challenge to 21 century medicine – insights from clinical and biochemical investigations	191
The mechanism of insulin resistance in peripheral tissues	200
Nuclear receptors PPAR as a drug target in metabolic disorders	207
Mitofusin 2 as a crucial peripheral nervous system protein and a common regulator of cell metabolism	215
Diseases caused by mutations in mitochondrial DNA	222

## Szanowni Państwo,

Choroby metaboliczne to pojęcie o bardzo szerokim znaczeniu. W najogólniejszym sensie są to stany patologiczne spowodowane zaburzeniami aktywności enzymów lub innych białek uczestniczących w procesach metabolicznych organizmu czyli w tzw. przemianie materii. Ich skutkiem jest często nadmierne nagromadzenie lub niedobór metabolitów, deficyt energetyczny komórek, a także zaburzenia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, prowadzące do niewłaściwej odpowiedzi komórek na bodźce. Choroby metaboliczne mogą być spowodowane pojedynczą mutacją konkretnego genu (tak jak fenyloketonuria) lub mogą mieć podłoże wielogenowe (tak jak cukrzyca typu 2). Ich ujawnienie się i nasilenie objawów może być częściowo związane z czynnikami środowiskowymi (cukrzyca typu 2, zespół metaboliczny) lub może być od nich niezależne. Niektóre choroby metaboliczne, chociaż dotyczą całej komórki i w efekcie całego organizmu, mają swoje podłoże w zaburzeniu funkcjonowania konkretnych organelli (mitochondriów lub peroksysomów). Niewątpliwie wspólną cechą chorób metabolicznych jest ich nieuleczalność w sensie np. możliwości usunięcia pierwotnej przyczyny, natomiast w miarę postępu naukowego oraz rozwoju medycyny coraz częściej staje się możliwe łagodzenie skutków choroby, poprawa komfortu i wreszcie przedłużenie życia pacjentów. Pewną szansę upatruje się w badaniach systemowych pozwalających, jak się przypuszcza, na zindywidualizowanie podejścia terapeutycznego w przypadku wielu chorób, w tym dziedzicznych chorób metabolicznych i cukrzycy typu 2. Osiągnięcia genomiki, proteomiki i ostatnio metabolomiki dają taką nadzieję.

W jednym zeszycie Postępów Biochemii trudno jest wyczerpująco omówić tak obszerną tematykę. Redakcja stanęła przed koniecznością dokonania wyboru między skoncentrowaniem się na wybranej grupie chorób lub przedstawianiu ich w nieco szerszym kontekście. Wybrano tą drugą możliwość, dzięki czemu obok chorób dziedzicznych spowodowanych zidentyfikowaną pojedynczą mutacją, takich jak choroby spichrzeniowe, choroby peroksysomalne czy związane z metabolizmem nukleotydów, znalazła się tu otyłość i cukrzyca typu 2. Ponadto włączono tu choroby spowodowane mutacjami w genach kodujących białka mitochondriów. Zazwyczaj zalicza się je do kategorii „choroby mitochondrialne”, ale niewątpliwie jest to jedna z klas chorób metabolicznych o poważnych konsekwencjach dla komórki. Zdajemy sobie sprawę z arbitralności naszego wyboru oraz z tego, że przedstawione w niniejszym zaszycie artykuły dotyczą tylko niewielkiego wycinka bardzo szerokiej problematyki naukowej i medycznej. Wyrażamy wszelako nadzieję, że lektura proponowanych artykułów, napisanych przez wybitnych specjalistów, wzbudzi Państwa zainteresowanie.

Z wyrazami szacunku

*Krzysztof Zabłocki*  
Krzysztof Zabłocki

### PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

**OLYMPUS**  
Your Vision, Our Future

**MERCK**

**Polska Sieć  
Mitochondrialna**  
www.mitonet.pl

Redaktor naczelny: Sławomir Pikula; e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl, Redaktor senior: Zofia Zielińska

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl

Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: postepy@nencki.gov.pl; http://www.postepybiochemii.pl

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel./fax (22) 5892499, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, http://www.ptbioch.edu.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.



[www.nencki.gov.pl](http://www.nencki.gov.pl)

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
realizuje Projekt

# BIO-IMAGINE

**BIO-IMAGing in research INnovation and Education**

FP7-REGPOT-2010-1, Nr kontraktu: 264173, 2011 - 2014

finansowany w ramach Programu Szczegółowego „Możliwości” (Capacities)

**7 Programu Ramowego UE**

**Głównym celem Projektu jest wzmocnienie pozycji Instytutu Nenckiego jako krajowego centrum kompetencji w dziedzinie bio-obrazowania**

**Zadania realizowane w ramach Projektu to:**

- rozszerzenie potencjału badawczego Instytutu
- dwustronna wymiana wiedzy i doświadczeń
- stymulacja innowacji i transferu technologii
- organizacja warsztatów i konferencji
- promocja i popularyzacja nauki



# Jakiego produktu Państwo dzisiaj potrzebują?

Jako uzupełnienie naszego katalogu przeciwciał pierwszorzędowych, Abcam oferuje także wiele odczynników oraz innych produktów o różnorodnych zastosowaniach.

Ostatnio nasz katalog powiększył się o:

- ponad 700 zestawów do oznaczeń techniką ELISA
- bezbiotynowe zestawy EXPOSE do IHC o wysokiej czułości
- szeroką gamę rekombinowanych i oczyszczonych natywnych białek i peptydów
- tysiące przeciwciał drugorzędowych, w tym pre-adsorbowane fragmenty przeciwciał, jak również skoniugowane przeciwciała drugorzędowe DyLight®
- zestawy EasyLink do koniugacji przeciwciał obejmujące 25 różnych znaczników

Więcej informacji na [www.abcam.com](http://www.abcam.com)

Aby skorzystać z naszej gwarancji jakości Abpromise, proszę zamawiać bezpośrednio w Abcamie:

Abcam plc  
330 Cambridge Science Park  
Cambridge CB4 0FL, UK  
Tel. +44 1223 696 000  
[orders@abcam.com](mailto:orders@abcam.com)



**Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu.** 17 marca 2011 roku w Sali Senatu Centrum Kongresowo-Dydaktycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (UMP) po raz drugi odbyły się otwarte wykłady z cyklu „Spotkania Młodych z Nauką”. Konferencja została zorganizowana przez Koło Naukowe Biosfera przy Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP oraz Młodą Farmację Poznań. Wydarzenie, któremu patronowały Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, a w tym roku również Poznańskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, ponownie zgromadziło liczną grupę młodych osób, które chcą wiedzieć więcej, ale też dzielić się swoją wiedzą z innymi. Ideą spotkań jest umożliwienie prezentacji wyników prac badawczych prowadzonych przez osoby, które dopiero rozpoczynają swoją karierę naukową. Najlicniejszą grupę, spośród 16 prelegentów, stanowili magistranci; dla wielu z nich była to pierwsza okazja do publicznego wystąpienia i przekonania innych do wartości swoich badań. A było kogo przekonywać, gdyż na widowni zgromadziło się niemal 100 osób, szczerze wypełniając salę posiedzeń senatu UMP. Wśród gości specjalnych znaleźli się dziekan Wydziału Farmaceutycznego prof. dr hab. Edmund Grzeško-wiak, przedstawiciele Uniwersytetu Zachodniopomorskiego w Szczecinie, a także delegacja z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z profesorem Jerzym Pałką na czele. Jak się okazało tematyka, którą interesują się Młodzi Naukowcy ma często charakter interdyscyplinarny, a dotyczy zagadnień z kręgu metod leczenia konwencjonalnego, rekombinacji, komórek macierzystych, oporności wielolekowej i zupełnie nowych z zakresu terapii fotodynamicznej. Można więc powiedzieć, że prym, jak na uczelni medycznej

przystało, wiodą tematy związane z postęпами farmakoterapii nowotworów. Doskonałym podsumowaniem spotkania był wykład zaprezentowany przez profesora Jerzego Pałkę na temat zastosowania inhibitorów angiogenezy jako nowoczesnej, celowanej terapii w leczeniu chorób nowotworowych. Po raz kolejny okazało się, że naukowcy, choć wywodzą się z różnych środowisk, mają ze sobą wiele wspólnego. Dążą do wspólnego celu i nawet jeżeli reprezentują różne dziedziny nauki (biologia molekularna, immunologia, biotechnologia), to wspólnym mianownikiem ich dążeń pozostaje identyfikacja procesów biochemicznych, których znajomość daje szansę na zrozumienie etiologii, ale i na diagnostykę oraz wyleczenie wielu chorób cywilizacyjnych. Jedno jest pewne. Studenci prezentujący swoje prace, poprzez poziom wystąpień i badań, pokazali, z jak prężnych ośrodków się wywodzą. Pozostaje mieć nadzieję, że już rośnie kolejne pokolenie pasjonatów badań, którzy dzięki możliwości spotkania, wymiany myśli i doświadczeń, stworzą obiecującą, ale i realną perspektywę powrotu Nauki Polskiej na usta przedstawicieli Nauki całego świata. Po zakończeniu tegorocznej konferencji młodzi naukowcy, przedstawiciele Koła Naukowego BIOSFERA (Ryc. 1) oraz Młoda Farmacja Poznań, zachęcani ciepłym przyjęciem ich inicjatywy, zadeklarowali chęć kontynuacji Spotkań Młodych z Nauką w kolejnych latach (opr. dr Błażej Rubiś – opiekun Koła Naukowego Biosfera).

**Narodowe Centrum Badań i Rozwoju** (NCBiR, Warszawa, ul. Nowogrodzka 47a) jest agencją wykonaw-

czą (w rozumieniu ustawy z dnia 27 sierpnia 2009 roku o finansach publicznych) powołaną do realizacji zadań z zakresu polityki naukowej, naukowo-technicznej i innowacyjnej państwa. Głównym zadaniem NCBiR jest zarządzanie i realizacja strategicznych programów badań naukowych i prac rozwojowych, które bezpośrednio przekładają się na rozwój innowacyjności. Do zadań NCBiR należy wspieranie komercjalizacji i innych form transferu wyników badań naukowych do gospodarki, zapewnienie dobrych warunków do rozwoju kadry naukowej, w szczególności udziału młodych naukowców w programach badawczych, realizacja międzynarodowych programów mobilności naukowców oraz inne zadania zlecone przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Centrum jest finansowane ze środków skarbu Państwa oraz funduszy Unii Europejskiej. NCBiR realizuje także zadania zlecone przez MNiSW. W 2007 roku przekazano NCBiR programy ERANET, EUREKA i nadzór nad zamawianymi projektami badawczymi. Dnia 15 marca b.r. zostały otwarte konkursy na międzynarodowe projekty badawcze z zakresu nauki i technologii w ramach programu ERA.NET Rus. Jego celem jest stworzenie warunków do długofalowej współpracy badawczej pomiędzy państwami UE i stowarzyszonymi w ramach 7. Programu Ramowego a Rosją.

**Narodowe Centrum Nauki**, powołane w oparciu o ustawę z dnia 30 kwietnia 2010 roku o Narodowym Centrum Nauki jest agencją wykonawczą w rozumieniu ustawy z dnia 27 sierpnia 2009 roku o finansach. Celem Narodowego Centrum Nauki jest wspieranie działalności



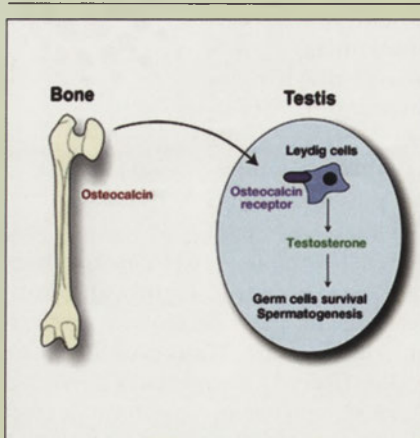
Ryc. 1. Logo Studenckiego Koła Naukowego BIOSFERA.

naukowej w zakresie badań podstawowych. Narodowe Centrum Nauki (Kraków, ul. Królewska 57) otwarte 4 marca przez prof. Barbarę Kudrycką, ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, uroczystie zainaugurowała swoją statutową działalność. Minister powołała na dyrektora Centrum prof. Andrzeja Jajszczyka, który wcześniej został wskazany na to stanowisko przez Radę Narodowego Centrum Nauki. Narodowe Centrum Nauki ogłosiło konkursy na finansowanie projektów badawczych z zakresu badań podstawowych: na finansowanie projektów badawczych, w tym finansowanie zakupu lub wytworzenia aparatury naukowo-badawczej niezbędnej do realizacji tych projektów; na finansowanie projektów badawczych, realizowanych przez osoby rozpoczynające karierę naukową, które nie posiadają stopnia naukowego doktora; na finansowanie projektów badawczych realizowanych przez osoby rozpoczynające karierę naukową posiadające stopień naukowy doktora; na finansowanie międzynarodowych projektów badawczych, które nie podlegają współfinansowaniu z zagranicznych środków finansowych.

**Profesor Barbara Kudrycka**, minister nauki i szkolnictwa wyższego, uznała, że w czasie nadchodzącego niżu demograficznego po reformie szkolnictwa wyższego dobre i bardzo dobre uczelnie, również niepubliczne, będą silnie wspierane z budżetu państwa. Zdaniem ministra nowelizacja ustaw o szkolnictwie wyższym pomoże dobrym uczelniom prywatnym przetrwać trudniejsze czasy. Zapewniła, że już teraz dobre niepubliczne uczelnie dostają fundusze z budżetu Państwa, a dobre projekty z uczelni prywatnych są finansowane ze środków strukturalnych. Ponadto uczelnie prywatne prowadzące ciekawe projekty dydaktyczne lub badawcze mogą je realizować na przykład w ramach programu kierunków zamawianych. Istotną wartością obecnej polityki MNiSW jest propozycja, aby uczelnie niepubliczne, o ile budują i stabilizują kadre szkoły, mogły otrzymywać środki na realizację studiów doktoranckich. Przeciwdziałając złej polityce rekrutacyjnej

uczelnii (brak zapotrzebowania na absolwentów kierunków studiów masowych) MNiSW wprowadziło program kierunków zamawianych, który ma zmienić strukturę kształcenia.

**Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy** jest uczelnią o 60-letniej tradycji. Na jego terenie powstają nowoczesne laboratoria Regionalnego Centrum Innowacyjności. Będą one stanowić zaplecze badawcze przede wszystkim dla przedsiębiorstw regionu kujawsko-pomorskiego. Projekt opiera się na modernizacji i adaptacji istniejących obiektów uczelni, do których trafią nowe urządzenia. Nowoczesne wyposażenie sukcesywnie otrzymują m.in. laboratoria Badań Własności Mechanicznych oraz Składu Chemicznego Materiałów Konstrukcyjnych, Badania Żywności i Urządzeń Przemysłu Chemicznego, Badania Urządzeń Elektrycznych Niskiego Napięcia i Jakości Produkcji, a także Centrum Digitalizacji i Przetwarzania Informacji Naukowo-Technicznej. Pierwszy etap budowy Regionalnego Centrum Innowacyjności przeprowadzono w latach 2005–2007, gdy wzniesiono i wyposażono część dydaktyczną ośrodka. Drugi etap tworzenia zakończy się w lutym 2014 roku. Wszystkie jednostki Centrum



Ryc. 2. Osteokalcyne – testosteron, według Cell (2011) 144: 641-643.

będą stanowiły sieć, która będzie współdziałała z powstającym Krajowym Systemem Innowacji, a także z systemem innowacyjności Unii Eu-

ropejskiej. Koszt inwestycji w prze-ważającej wartości finansowany jest ze środków unijnych. (wg witryny „Nauka w Polsce”)

**Osteokalcyne**, hormon wytwarzany w kościach i regulujący proces ich odbudowy, wpływa na męską płodność (Ryc. 2). Publikacja p.t. **Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton**, przedstawiająca wyniki badań, w których uczestniczyli polscy młodzi naukowcy, Grzegorz i Olga Sumarowie, ukazała się w renomowanym czasopiśmie Cell w lutym b.r. (144: 641-643). Autorami pracy są Franck Oury, Grzegorz Sumara, Olga Sumara, Mathieu Ferron, Haixin Chang, Charles E. Smith, Louis Her-mo, Susan Suarez, Bryan L. Roth, Patricia Ducy i inni). Badacze zdając sobie sprawę z istotnego wpływu hormonów płciowych, estrogenu i testosteronu, na wzrost i gęstość kości postawili odwrotne pytanie: – Czy szkielet reguluje układ rozrodczy? Doświadczenia prowadzono na genetycznie zmodyfikowanych myszach, które pozbawiono genu odpowiadającego za produkcję osteokalcyne. Mając na względzie silny wpływ estrogenu na kości badacze spodziewali się, iż odwrotna zależność jest bardziej prawdopodobna u samic. Doświadczenia przyniosły jednak niespodziankę; kości faktycznie kontrolują płodność, ale wyłącznie męską. Osteokalcyne dodana do hodowli komórek, odpowiadających w jądrach za produkcję testosteronu (tzw. komórki Leydiga), stymulowała wydzielenie męskiego hormonu, a wstrzyknięta zwykłym samcom powodowała u nich wzrost stężenia testosteronu we krwi. Nie pobudzała jednak produkcji estrogenu w jajnikach. Zmodyfikowane genetycznie osobniki męskie, które nie wytwarzały osteokalcyne, rzadziej płodziły potomstwo i było ono o połowę mniej liczne niż w przypadku typowych samców. Stwierdzono u nich również niższe stężenie testosteronu we krwi, mniejsze rozmiary jąder i spadek liczebności plemników. Samice nieprodukujące osteokalcyne nie miały zmian w poziomie estrogenów oraz morfologii i strukturze narządów płciowych. Dalsze badania wykazały, że u samców, które nie wytwarzały osteokal-



cyny, komórki Leydiga wytwarzały znacznie mniej enzymów regulujących syntezę testosteronu. Zidentyfikowano w komórkach Leydiga z jąder typowych samców receptor, poprzez który osteokalcyna stymuluje produkcję testosteronu. Jest to białko oznaczone symbolem Gprc6a. U samców genetycznie zmodyfikowanych badacze wykazali, że osobniki pozbawione tego białka receptorowego mają obniżony poziom testosteronu oraz zmniejszone zdolności rozrodcze. Receptora nie znaleziono w jajnikach. Wydaje się, że opisane mechanizmy mogą dotyczyć również ludzi; osteoblasty człowieka wydzielają osteokalcynę, a receptor osteokalcyny znajduje się na powierzchni komórek produkujących testosteron w jądrach człowieka. Większość układów hormonalnych działa niemal w identyczny sposób u ludzi i u myszy. O ile wpływ osteokalcyny na syntezę testosteronu zostanie potwierdzony również w badaniach u mężczyzn, to prawdopodobnie będzie można wytłumaczyć niezrozumiałe dotąd przypadki niepłodności u nich. Obecnie można rozpocząć poszukiwania mutacji w genie kodującym osteokalcynę lub jej receptor u mężczyzn, którzy nie mogą doczekać się potomstwa. Dotychczasowe badania mogą skutkować w przyszłości rozwojem nowych metod leczenia bezpłodności u mężczyzn, i innych schorzeń wywołanych niedoborami testosteronu. Produkcja osteokalcyny zmniejsza się z wiekiem, bowiem zmniejsza się liczba komórek budujących tkankę kostną. Poziom testosteronu, i płodność mężczyzn obniża się także istotnie podczas starzenia. Potencjalnie terapia zwiększająca produkcję osteokalcyny nie zatrzyma starzenia, ale mogłaby pomóc w leczeniu skutków tego procesu. Naukowcy planują bardziej szczegółowo wyjaśnić mechanizm, na drodze którego osteokalcyna pobudza wytwarzanie testosteronu. Chcieliby też zrozumieć, dlaczego tkanka kostna reguluje płodność męską, a nie wpływa na płodność samicy. Możliwe też jest, że inne komórki w kościach wydzielają jakiś jeszcze niezidentyfikowany hormon, który będzie specyficznie regulował żeński układ płciowy. Naukowcy liczą,

że dalsze prace przyniosą nowe odkrycia na temat roli tkanki kostnej w organizmie. Z wcześniejszych badań zespołu prof. Karsenty'ego wynika, że kości są narządem endokrynnym, który reguluje przemianę materii u myszy i ludzi. Naukowiec wraz ze współpracownikami wykazał, że osteokalcyna kontroluje wydzielanie insuliny, wpływając w ten sposób na metabolizm glukozy i masę ciała. Dr Grzegorz Sumara pracuje obecnie w Centrum Medycznym Uniwersytetu Columbia w Nowym Jorku pod kierunkiem prof. Gerarda Karsenty'ego. Badania były współfinansowane przez National Institute of Child Health Research (NICHR) i National Institutes of Health (NIH) (wg witryny "Nauka w Polsce").

**Profesor Maciej Grabski** (Fot. 3) twórca i organizator Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP), został laureatem Nagrody Jerzmanowskich w 2011 roku. Wyróżnienie przyznawane przez Polską Akademię Umiejętności zostało wręczone w połowie maja b.r. na Wawelu. Zgodnie z testamentem Erazma Jerzmanowskiego nagroda przyznawana jest kandydatowi, który „przez swe prace literackie, naukowe lub humanitarne dokonywane z pożytkiem dla ojczystego kraju, potrafił zająć wybitne stanowisko w społeczeństwie polskim”. Prof. Maciej Grabski związany z Politechniką Warszawską jest specjalistą inżynierii materiałowej. W latach 1992–2005 kierował Fundacją na rzecz Nauki Polskiej, a od 2005 roku jest członkiem Rady FNP. Za swoją działalność był już odznaczony Krzyżem Kawalerskim, Oficerskim i Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski oraz Wielkim Krzyżem Zasługi Republiki Federalnej Niemiec. Jest również doktorem honoris causa Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie i Politechniki Warszawskiej. Rada PAU przyznając wyróżnienie doceniła wyjątkowe zasługi

profesora Grabskiego dla: „organizowania nauki w Polsce, promowania wysokich standardów i związków z zagranicą, spójność myśli i zamierzeń z działaniem, niezwykłą konsekwencję w realizowaniu wypracowanej koncepcji i wysoką skuteczność” (wg witryny „Nauka w Polsce”).

**Nagroda Polskiej Akademii Umiejętności im. Erazma i Anny Jerzmanowskich pod patronatem województwa małopolskiego** – tak brzmi pełna nazwa wyróżnienia – w latach 1915–1938 zdobyła wielki prestiż i nazywana była polskim Noblem. Na mocy testamentu Erazma Jerzmanowskiego Akademia Umiejętności w Krakowie otrzymała ponad milion koron (365 kilogramów złota) na utworzenie Fundacji im. Erazma i Anny Jerzmanowskich. Zgodnie z zapisem, nagrodę mógł otrzymać tylko Polak i katolik, pochodzący z przedrozbiorowych terenów Polski, naukowiec, twórca kultury lub społecznik. W 2008 roku wobec zbliżającej się setnej rocznicy



Fot. 3. Profesor Maciej Grabski.

śmierci Erazma Jerzmanowskiego Polska Akademia Umiejętności podjęła starania o reaktywację Nagrody im. Erazma i Anny Jerzmanowskich. Zainteresowanie ideą przejawiał marszałek województwa małopolskiego Marek Nawara. W 2009 roku – sto lat po śmierci Erazma Jerzmanowskiego – doczekała się odnowienia. Efektem rozmów było podpisanie umowy o reaktywacji „Nagrody Polskiej Akademii Umiejętności im. Erazma i Anny Jerzmanowskich pod patronatem województwa małopolskiego”.



Fot. 4. Erazm Jerzmanowski.

Władze województwa małopolskiego zobowiązały się do sfinansowania nagrody w wysokości 100 tysięcy złotych każdego roku. W 2009 roku nagrodę otrzymała Janina Ochojska-Okońska, rok później – malarz Jerzy Nowosielski. Wśród wcześniej nagrodzonych znaleźli się kardynał Adam Sapięha, Henryk Sienkiewicz i Ignacy Paderewski.

Patron nagrody, **Erazm Jerzmanowski** (Fot. 4, Erazm Józef Jerzmanowski hrabia Dołęga), urodził się 2 czerwca 1844 roku w Tomisławicach w Kaliskiem z ojca Franciszka i matki Kamili z Kossowskich. Był wnukiem Jana Pawła Jerzmanowskiego – pułkownika Wojsk Księstwa Warszawskiego, towarzysza Napoleona na Elbie. Wiódł życie aktywne; był powstańcem Powstania Styczniowego, żołnierzem (walczył z Prusami w wojnie 1870 r.), przemysłowcem, mecenasem, działaczem społecznym i filantropem. Nazywany był „polskim Noblem”. Studiował w Instytucie Politechnicznym w Puławach, Szkole Wyższej Polskiej na Montparnasse, Szkole Inżynierii i Artylerii Wojskowej w Metz. Po klęsce Francji wyjechał do Stanów Zjednoczonych. Zajmując się sprawami gazyfikacji i produkcji karbidu przyczynił się do założenia kompanii gazowych w Nowym Jorku i przez 13 lat nimi kierował. Założył kompanie gazowe w Chicago i w Baltimore, wybudował fabryki gazu w Indianapolis i wielu innych miastach USA. Przez 23 lata był jednym z najwybitniejszych kierowników wysoko rozwiniętego przemysłu gazowego w Stanach Zjednoczonych, dorabiając się wielkiego majątku, zyskał uznanie sfer przemysłowych i fachowców. Hojnie popierał Polonię amerykańską, przeznaczał duże sumy na finansowanie działalności naukowej, kulturalnej i oświatowej wśród emigracji. W dowód uznania szerokiej swojej dobroczynnej działalności i wielu zasług odznaczony został (jako pierwszy człowiek w Ameryki Płn.) w roku 1889 przez papieża Leona XIII Komandorią Krzyża św. Sylwestra. W 1896 roku powrócił ze znaczną fortuną do kraju. Osiedlił w Galicji, gdzie zakupił majątek w Krakowie – Prokocimie. Nie zaprzestał swojej działalności charytatywnej. Różnorodnie wspomagał materialnie chłopów, wspierał Muzeum Narodowe w Raperswilu i Skarb Narodowy, ufundował wawelskie witraże autorstwa Mehoffera. Przeznaczał subwencje dla Banku Ziemińskiego w Poznaniu, Kasy im. Mianowskiego i ochronki imienia jego rodziców w Warszawie, gimnazjum w Cieszynie, szkoły w Białej, Towarzystwa Wzajemnej Po-

mocy Uczestników Powstania 1863. Duże wsparcie na cele dobroczynne otrzymał również Adam Chmielowski czyli św. Brat Albert. Erazm Jerzmanowski zmarł w swoim majątku 7 lutego 1909 roku i pochowany został na Cmentarzu Rakowickim w Krakowie w grobowcu dłuta rzeźbiarza Wacława Szymanowskiego.

Doktor Marek Pawłowski z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego poinformował, że polscy naukowcy zamierzają dostarczyć aparaturę kriogeniczną, wartą blisko 18 mln euro, w ramach udziału w budowie międzynarodowego **Ośrodka Badań nad Antyprotonami i Jonami – FAIR** (Fot. 5). Wchodzący w skład ośrodka kompleks akceleratorów powstanie w ciągu sześciu lat w Darmstadt. Krajowe Konsorcjum FEMTOFIZYKA (KKF), zrzeszające 13 polskich ośrodków akademickich i instytucji badawczych, zainteresowanych udziałem ich naukowców w tym projekcie, reprezentował w Darmstadt w lutym b.r. prof. Tomasz Matulewicz, dyrektor Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Zespół z Politechniki Wrocławskiej opracowuje założenia koncepcyjne dotyczące realizacji polskiego wkładu w budowę akceleratorów FAIR, natomiast sprzęt wykonują polskie firmy, znane już na rynku z wysoko zaawansowanych technologii. Firmy te budowały już wcześniej instalacje w laboratorium CERN w Genewie. Ośrodek FAIR powstaje w kooperacji naukowców i inżynierów niemieckich z zespołami międzynarodowymi (44 kraje). Docelowo przy eksperymentach i analizie danych ma pracować około 3000 badaczy z całego świata, w tym ponad 100 z Polski. W FAIR będą m.in. możliwe badania nad materią znajdującą się w warunkach ekstremalnych gęstości i temperatur, jakie panowały na różnych etapach ewolucji wszechświata i nadal lokalnie występują. Przewidywane są także badania

bardzo praktyczne dla potrzeb energetyki, medycyny, przyszłych misji kosmicznych czy inżynierii materiałowej. Dzięki powstaniu FAIR oraz dotychczasowym zaangażowaniu polskich naukowców w realizacji ośrodka nauka polska zyska pełnoprawny dostęp do laboratorium o

światowym poziomie, a polscy studenci i doktoranci będą mogli gromadzić tam materiał badawczy do swoich rozpraw i zdobywać doświadczenia badawcze. Projekt ustawy o ratyfikacji Konwencji dotyczącej budowy i funkcjonowania Ośrodka

Badań Antyprotonami i Jonami w Europie polski rząd skierował do Sejmu w grudniu 2010 roku. Projekt ustawy ratyfikującej jednomyślnie zaakceptowały sejmowe Komisje Edukacji, Nauki i Młodzieży oraz Spraw Zagranicznych. Konwencję FAIR ratyfikowało już kilka krajów. Projekt zyskuje też kolejnych uczestników. Ostatnio zamiar dołączenia do tego grona zgłosiła Słowenia, deklarując wstępnie udział w wysokości 12 milionów euro.

**Profesor Horst Lange-Bertalot** – botanik (Fot. 6), jeden z czołowych specjalistów badających okrzemki – autor ponad 200 publikacji na ich temat i odkrywca nowych gatunków, otrzymał w marcu b.r. tytuł doktora honoris causa Uniwersytetu Szczecińskiego. Okrzemki, jednokomórkowe glony, należą do jednej z najbardziej zróżnicowanych gromad roślin beznacyniowych o mikroskopijnej wielkości. Profesor Lange-Bertalot (rocznik 1936, ur. w Gdańsku) poświęcił badaniu okrzemek (diatomologii) 50 lat życia, tj. niemal cały okres swojej działalności naukowej. Od wielu lat współpracuje z ośrodkiem diatomologicznym Uniwersytetu Szczecińskiego. Badania nad okrzemkami podjął na początku lat siedemdziesiątych XX w. Początkowo były to prace z dziedziny ekologii; okrzemki wykorzystywano jako wskaźniki stanu zanieczyszczenia wód. Prof. Lange-Bertalot badał materiały z całego świata, współpracował ze



Fot. 5. Ratyfikacja konwencji FAIR.



Fot. 6. Prof. Horst Lange-Bertalot.

specjalistami z różnych krajów, a na podstawie zarówno samodzielnych, jak i wspólnie z innymi prowadzonych badań wyodrębnił 37 nowych rodzajów okrzemek i odkrył ponad tysiąc nieznanych przedtem gatunków. Profesor przyczynił się do rozwoju szczecińskiego ośrodka diatomologicznego. Od lat wspiera go merytorycznie i finansowo. Tytuł doktora honoris causa senat szczecińskiej uczelni przyznał Lange-Bertalotowi w dowód najwyższego uznania i wdzięczności. Profesor

dołączył do grona 26 osób, które Uniwersytet Szczeciński wyróżnił tytułem doktora honoris causa. Są wśród nich prof. Leszek Balcero-wicz, prof. Leszek Kołakowski, prof. John D. Barrow, prof. Richard Pipes oraz jedyna w tej grupie kobieta – wybitna pisarka dla dzieci Joanna Kulmowa.

**Przedsiębiorczość akademicka.** Spośród pracowników i doktorantów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wyróżniła się przedsiębiorcza grupa

bioinformatyków, którzy w Preinkubatorze PP rozwijają firmę bioinformatyczną – VitaInSilica (VitaInSilica – Bioinformatics for Science, Poznański Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości, ul. Kościelna 21, 60-536 Poznań). Interdyscyplinarny zespół, który tworzy firmę to specjaliści z zakresu bioinformatyki, biologii molekularnej, biotechnologii i informatyki. Misją grupy jest wspieranie naukowców w wykorzystywaniu narzędzi bioinformatycznych, projektowanie i tworzenie oprogramowania ułatwiającego pracę biologów oraz wdrażanie laboratoryjnych systemów bazodanowych. Ponadto, VitaInSilica oferuje szeroki wachlarz profesjonalnych szkoleń z zakresu bioinformatyki. Więcej informacji znajduje się na stronie: <http://www.vitainsilica.pl/>.

**XLI Międzynarodowe Colloquium Biometryczne** poświęcone pamięci Profesora Wiktora Oktaby połączone z jubileuszem 50-lecia Polskiego Towarzystwa Biometrycznego oraz Czesko-Słowacko-Polskie Warsztaty z Biometrii przygotowują Polskie Towarzystwo Biometryczne, Katedra Zastosowań Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Zakład Rachunku Prawdopodobieństwa i Statystyki Matematycznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Organizatorzy zapraszają do Lublina w dniach 5-8 września 2011 roku. J.M. Rektor Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, prof. dr hab. Marian Wesołowski, objął Konferencję honorowym patronatem. Organizatorzy zapraszają do prezentacji prac z zakresu metod statystycznych i ich zastosowań w naukach przyrodniczych, biometrii i informatyce. Więcej informacji w witrynie: <http://cb41.up.lublin.pl/rejestracja>.

Kraków, 5-9 września 2011

## II OGÓLNOPOLSKI KONGRES BIOCHEMII I BIOLOGII KOMÓRKI

XLVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
XI Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki



**Organizatorzy:**

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
Polskie Towarzystwo Biologii Komórki

**Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego:**

Ewa Luchter-Wasylewska  
Marcin Majka

**Kontakt:**

[kbbk2011@uj.edu.pl](mailto:kbbk2011@uj.edu.pl)

**Rejestracja i informacja:**

<http://ptbioch.edu.pl>, <http://ptbk.mol.uj.edu.pl>



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie



UNIwersytet Rolniczy  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

# Lizosomalne choroby spichrzeniowe

## – ogólna charakterystyka

Anna Kloska<sup>1</sup>

Anna Tylki-Szymańska<sup>2</sup>

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

<sup>2</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

✉Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.:(58) 52 36 308, faks:(58) 52 35 501, e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl

Artykuł otrzymano 20 stycznia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 21 marca 2011 r.

**Słowa kluczowe:** degradacja makrocząstek, lizosomy, lizosomalne choroby spichrzeniowe, kwaśne hydrolazy

**Wykaz skrótów:** LSD (ang. *lysosomal storage diseases*) – lizosomalne choroby spichrzeniowe; M6P – ugrupowanie mannozo-6-fosforanowe; RER (ang. *rough endoplasmic reticulum*) – szorstka siateczka śródplazmatyczna

**Podziękowanie:** Praca finansowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (projekt nr N N301 668540).

### STRESZCZENIE

**L**izosomalne choroby spichrzeniowe (LSD, ang. *lysosomal storage diseases*) to grupa około pięćdziesięciu chorób metabolicznych. Spowodowane są one defektem genetycznym skutkującym brakiem lub znacznym niedoborem aktywności jednego z białek zaliczanych do czterech grup funkcjonalnych: kwaśnych hydrolaz lizosomalnych zaangażowanych w rozkład różnych związków organicznych, białek uczestniczących w transporcie substancji przez błony lizosomów, białek niezbędnych do procesu kierowania enzymów do lizosomów lub aktywatorów enzymów lizosomalnych. W wyniku tych niedoborów nieodegradowane lub niekompletnie zdegradowane makrocząsteczki ulegają ciągłej akumulacji w lizosomach powodując nieprawidłowe funkcjonowanie komórek, tkanek i narządów. Większość LSD jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Wyjątek stanowią tylko trzy choroby, a mianowicie choroba Fabry'ego i choroba Huntera (mukopolisacharydoza typu II), które dziedziczone są w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X oraz choroba Danona, która dziedziczy się w sposób dominujący sprzężony z chromosomem X. Ze względu na dokonane ostatnio postępy w zrozumieniu patomechanizmów tych chorób, LSD stały się sztandarowymi przykładami znaczenia badań z zakresu biochemii, genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii zarówno w postępie diagnostyki, zrozumienia mechanizmów biologicznych schorzeń jak też rozwoju nowoczesnych metod terapeutycznych. W tym artykule przedstawiona jest ogólna charakterystyka LSD, natomiast bardziej szczegółowe omówienie kilku grup spośród tych chorób: lipidoz, glikogenoz i mukopolisacharydoz, zostanie przedstawione w kolejnych artykułach zawartych w tym zeszycie.

### LIZOSOMY I DEGRADACJA MAKROCZĄSTECZEK W KOMÓRCIE

Lizosomy są wewnątrzkomórkowymi, pęcherzykowatymi organelami otoczonymi pojedynczą błoną lipidowo-białkową, w których odbywa się degradacja różnego rodzaju makrocząsteczek takich jak białka, lipidy, cukry i kwasy nukleinowe. Wchodzą one w skład układu endosomalno-lizosomalnego i występują we wszystkich komórkach u ssaków z wyjątkiem erytrocytów. Lizosomy zawierają ponad 40 różnych enzymów hydrolitycznych, w tym proteazy, nukleazy, glikozydazy, lipazy, fosfolipazy, fosfatazy oraz sulfatazy. Wszystkie one należą do grupy tzw. kwaśnych hydrolaz, które do osiągnięcia optimum swojej aktywności wymagają kwaśnego środowiska, zaś lizosomy, mając w swoim wnętrzu wysokie stężenie protonów, pozwalają utrzymać pH w zakresie około 5,0. Obecność błony lizosomalnej skutecznie oddziela trawiące enzymy lizosomalne od cytoplazmy, a w przypadku jej uszkodzenia i zmieszania zawartości lizosomu z cytozolem o pH w granicach 7,2-7,3 lizosomalne hydrolazy natychmiast tracą swoją aktywność lityczną i praktycznie nie uszkadzają pozostałych składników cytoplazmy [1].

W błonie lipidowej otaczającej lizosom zakotwiczone są specyficzne białka integralne, z których większość jest silnie glikozylowana, co pomaga chronić je przed działaniem proteaz znajdujących się w świetle lizosomu. Białka błonowe lizosomów są głównie dużymi polipeptydami, których masa cząsteczkowa waha się między 20 a 250 kDa [2]. Jednym z białek występujących w błonie lizosomalnej jest pompa protonowa należąca do rodziny wakuolarnych H<sup>+</sup>-ATPaz, która wykorzystując energię z hydrolizy ATP transportuje protony z cytoplazmy do wnętrza lizosomu i umożliwia w ten sposób utrzymanie wewnątrz lizosomu kwaśnego pH, optymalnego do działania hydrolaz [3]. W błonie lizosomalnej zlokalizowanych jest również około 20 specyficznych transporterów, których zadaniem jest przenoszenie końcowych produktów degradacji hydrolitycznej makrocząsteczek przez błonę ze światła lizosomu do cytoplazmy, skąd może nastąpić ich wydalenie bądź powtórne wykorzystanie w procesach biosyntezy komórkowej. Substratami dla tych transporterów są wolne aminokwasy, dwupeptydy, monosacharydy, lipidy jak również kationy i aniony [4,5]. Do przykładowych przenośników, najlepiej poznanych i scharakteryzowanych, zaliczają się kodowana przez gen *CTNS*

cystynozyna, będąca transporterem cystyny [6] oraz kodowana przez gen *SLC17A5* sialina – transporter kwasu sialowego i kwaśnych monosacharydów [7] czy też białka uczestniczące w transporcie cholesterolu [8]. Mutacje w genach kodujących wyżej wymienione białka są bezpośrednio przyczyną lizosomalnego spichrzenia odpowiednio cystyny, kwasu sialowego i cholesterolu [8,9]. Istotnym elementem błony lizosomalnej są białka należące do grupy tzw. glikoprotein błony lizosomalnej (ang. *lysosomal membrane glycoproteins*), spośród których najliczniej występują białka LAMP-1 i LAMP-2 (ang. *lysosome-associated membrane protein*) oraz LIMP-2 (ang. *lysosomal integral membrane protein*), stanowiąc ponad 50% wszystkich białek błony lizosomalnej. Wykazano ich udział w procesie autofagii (białko LAMP-2), a badania prowadzone na mysich modelach pozbawionych tych białek sugerują ich udział w kierowaniu białek do lizosomów, biogenezie lizosomów oraz prawidłowym funkcjonowaniu systemu endosomalno-lizosomalnego [2,10].

Lizosomy są wysoce heterogennymi organelami, a w zależności od rodzaju komórki i jej funkcji mogą znacząco różnić się wielkością i kształtem. Na mikrofotografiach elektronowych widoczne są one jako struktury o wysokiej gęstości (na skutek akumulacji osmu podczas preparatyki), otoczone pojedynczą błoną (Ryc. 1). Lizosomy pierwotne są sferyczne i zawierają w swoim wnętrzu tylko enzymy hydrolityczne. Lizosomy wtórne są większe, mają nieregularny kształt i powstają w drodze fuzji lizosomów pierwotnych z endosomami zawierającymi materiał mający podlegać degradacji [11].

W zależności od typu komórek lizosomy często zajmują określoną pozycję wewnątrz komórki, np. w hepatocytach skupiają się w pobliżu kanalika żółciowego, a fibroblastach w hodowli w okołojądrowej cytoplazmie. Ich wielkość waha się pomiędzy 0,5–1  $\mu\text{m}$  (w wielu typach komórek, np. w hepatocytach i neuronach) a kilkoma mikronami (np. w makrofagach) [12,13]. W różnych typach komórek występuje też znaczne zróżnicowanie pod względem liczby lizosomów przypadających na komórkę. Przykładowo, w prawidłowych fibroblastach, hepatocytach czy też komórkach przysadzkowych lizosomy zajmują zwykle około 0,5% lub mniej objętości cytoplazmy, podczas gdy w makrofagach objętość frakcji lizosomów może być znacznie większa i sięgać 2,5% objętości komórki [13,14]. Różnice w liczbie lizosomów w komórkach mogą również występować w obrębie jednego organu. Komórki nerkowych kanalików proksymalnych (kanalików krętych I rzędu) posiadają dużą liczbę lizosomów, co jest związane z intensywną endocytozą i degradacją białek pochodzących z przesączu kłębuszkowego, natomiast komórki nabłonkowe budujące odcinek nefronu poniżej kanalika proksymalnego są ubogie w lizosomy [13].

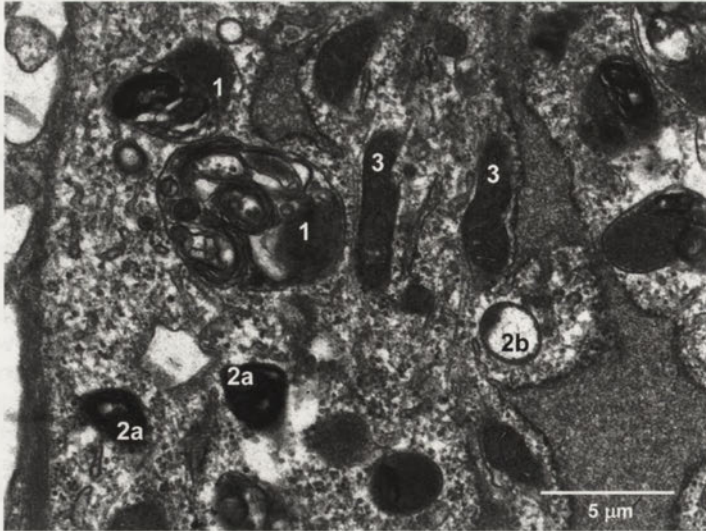
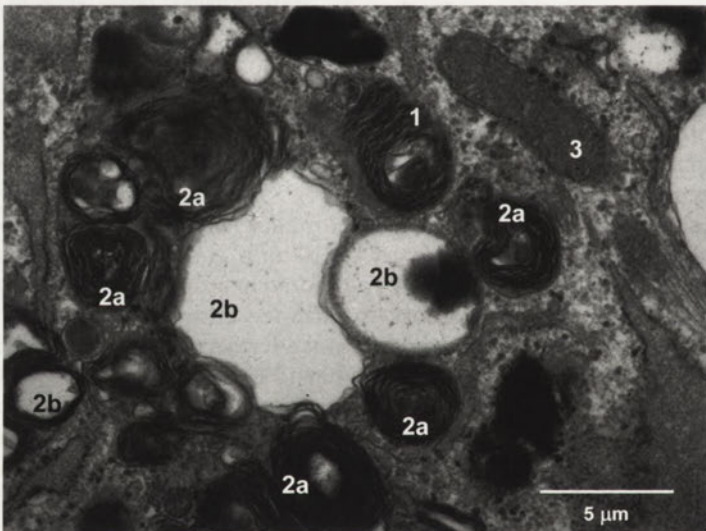
Funkcją lizosomów jest wewnątrzkomórkowa degradacja makrocząsteczek takich jak białka, lipidy, cukry i kwasy nukleinowe, dostarczanych do lizosomu z cytoplazmy komórki jak również materiału pobranego z przestrzeni zewnątrzkomórkowej w drodze endocytozy. Degradacja cząsteczek polimerów do jednostek monomerowych jest katalizowana przez szereg enzymów z grupy hydrolaz, do których należą proteazy, nukleazy, glikozydazy, fosfatazy i lipazy [11,13].

## SYNTEZA LIZOSOMALNYCH HYDROLAZ I KIEROWANIE ICH DO LIZOSOMÓW

Synteza lizosomalnych enzymów hydrolitycznych odbywa się w kanalikach szorstkiej siateczki sarkoplazmatycznej (RER, ang. *rough endoplasmic/sarcoplasmic reticulum*), gdzie powstające polipeptydy ulegają procesowi N-glikozytacji, polegającemu na dołączeniu do polipeptydu kompleksu złożonego z kilkunastu reszt cukrowych. W przypadku białek, których miejscem przeznaczenia są lizosomy, do nowo syntezowanego polipeptydu dołączane są kompleksy cukrowe złożone z wielu reszt mannozy (powstają tzw. glikoproteiny wielomannozowe). Glikozylowane i właściwie pofaladowane białko przechodzi następnie do aparatu Golgiego, gdzie następuje proces fosforylacji dodanych reszt mannozowych. W pierwszym etapie tego procesu, enzym fosfotransferaza N-acetyloglukozoaminy przenosi ufosforylowaną resztę cukrową z UDP-N-acetyloglukozoaminy na resztę mannozy w pozycji 6, a następnie fosfodiesteraza odszczepia N-acetyloglukozoaminę z pozostawieniem grupy fosforanowej przyłączonej do reszty mannozowej. Ugrupowanie mannozo-6-fosforanowe (M6P, ang. *mannose-6-phosphate*) stanowi znacznik kierujący daną hydrolazę do lizosomu.

Hydrolazy znakowane mannozo-6-fosforanem ulegają przyłączeniu do receptorów mannozo-6-fosforanowych (MPR, ang. *mannose-6-phosphate receptor*) znajdujących się w błonach dalszych cystern sieci *trans* aparatu Golgiego. Następnie dochodzi do przyłączania się cząsteczek klatryny po zewnętrznej stronie cystern *trans* aparatu Golgiego i uformowania się opłaszczonego klatryną pęcherzyka transportującego, zawierającego hydrolazy, czyli tzw. lizosomu pierwotnego. Następnie lizosom pierwotny jest kierowany do układu endosomów (czyli zespołu pęcherzyków wypełnionych substancjami, które wniknęły do komórki na drodze endocytozy) i ulega fuzji z endosomem późnym zawierającym makrocząsteczki mające podlegać degradacji. W kwaśnym środowisku późnego endosomu wiązanie receptor M6P-hydrolaza ulega dysocjacji. Wolne receptory M6P powracają następnie w pęcherzykach transportowych do sieci *trans* aparatu Golgiego, gdzie mogą zostać ponownie wykorzystane w procesie przyłączania do znakowanych hydrolaz i ich kierowania do lizosomów.

Część hydrolaz lizosomalnych, trafiających wskutek błędnego kierowania transportujących je pęcherzyków do przestrzeni pozakomórkowej, może być odzyskiwana przez komórkę w procesie wiązania enzymów przez receptory M6P znajdujące się w błonie komórkowej, jak również ich pobierania w drodze endocytozy i ponownego kierowania do przedziału lizosomalnego. W kwaśnym środowisku, dostarczone przez lizosom pierwotny enzymy hydrolityczne ulegają aktywacji a endosom przekształca się w tzw. lizosom wtórny, w którym przy udziale kwaśnych hydrolaz odbywa się właściwa degradacja zgromadzonych makrocząsteczek. Cechą charakterystyczną lizosomów wtórnych jest brak receptorów mannozo-6-fosforanowych [12,13,15-17].

**A****B**

**Rycina 1.** Różnorodność struktur lizosomów w komórkach fibroblastów osoby zdrowej (A) oraz chorej na mukopolisacharydozę typu III, jedną z lizosomalnych chorób spichrzeniowych (B). Mikrofotografie przedstawiają przekroje poprzeczne komórek. Zaznaczone są następujące struktury lizosomalne: złożone lizosomy (autofagolizosomy) (1), pojedyncze lizosomy lamelarne (2a) oraz lizosomy amorficzne spichrzające wielocukry (2b). Na mikrofotografiach widoczne są również mitochondria (3). Zdjęcia wykonane przez autorów w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

## LIZOSOMALNE CHOROBY SPICHRZENIOWE

Zaburzenia różnych funkcji lizosomów leżą u podstaw lizosomalnych chorób spichrzeniowych. U człowieka znanych jest obecnie ponad 50 różnych genetycznych chorób metabolicznych należących do tej grupy. Większość lizosomalnych chorób spichrzeniowych jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Wyjątek stanowią tylko trzy choroby, a mianowicie choroba Fabry'ego [18] i choroba Huntera (mukopolisacharydoza typu II) [19], które dziedziczą się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem

X oraz choroba Danona, która dziedziczy się w sposób dominujący sprzężony z chromosomem X [20]. Co ciekawe, o ile heterozygotyczne kobiety zazwyczaj nie cierpią na chorobę Huntera, to w przypadku choroby Fabry'ego oraz w mniejszym stopniu w przypadku choroby Danona nosicielstwo jednego zmutowanego allelu wiąże się często z wystąpieniem objawów charakterystycznych dla tych chorób, aczkolwiek wyrażanych w łagodniejszej postaci niż u chorych mężczyzn.

## MECHANIZMY I RODZAJE CHORÓB LIZOSOMALNYCH

Lizosomalne choroby spichrzeniowe można podzielić na choroby: (i) wywołane nieprawidłowym funkcjonowaniem hydrolaz lizosomalnych, (ii) wywołane defektami transporterów lizosomalnych, (iii) wywołane defektami procesu kierowania enzymów do lizosomów oraz (iv) spowodowane brakiem aktywatorów enzymów lizosomalnych [17,21].

W przypadku chorób wywołanych zaburzeniami w funkcjonowaniu lizosomalnych enzymów hydrolitycznych, brak lub znaczny niedobór aktywności konkretnej hydrolazy prowadzi do zahamowania degradacji, a w konsekwencji do nadmiernej i postępującej lizosomalnej akumulacji makrocząsteczek będących substratami dla danego enzymu. Do tej grupy zaliczają się choroby spowodowane zahamowaniem degradacji wielocukrowych fragmentów makrocząsteczek, tj. glikoprotein, glikolipidów, glikozoaminoglikanów oraz glikogenu. Wskutek defektu enzymów może dojść do zahamowania degradacji lipidów, takich jak sfingolipidy, trójglicerydy czy estry cholesterolu, jak również białek [17,21-23]. Przykłady lizosomalnych chorób spichrzeniowych, będących przedstawicielami poszczególnych grup, przedstawia tabela 1.

Do nadmiernego spichrzenia lizosomalnego prowadzą również defekty lizosomalnych białek transportowych, których zadaniem jest przeniesienie przez błonę lizosomalną do cytozolu monosacharydów lub aminokwasów powstających podczas hydrolizy makrocząsteczek. Przykładem mogą być defekty transportera cystyny czy też transportera kwasu sialowego, których brak lub niedobór w błonie lizosomalnej uniemożliwia transport, odpowiednio, cystyny i kwasu sialowego z lizosomu [9].

Innym rodzajem zaburzeń prowadzącym do spichrzenia lizosomalnego są nieprawidłowości w procesie kierowania białek do lizosomów. Defekty białek siateczki śródplazmatycznej, białek aparatu Golgiego czy białek cytozolowych zaangażowanych w kierowanie enzymów i białek lizosomalnych do tych organelli powodują, że dany enzym lizosomalny nie dociera do swojego miejsca przeznaczenia i nie może podjąć tam swojej aktywności. Przykładem może

**Tabela 1.** Lizosomalne choroby spichrzeniowe – zestawienie rodzajów zaburzeń funkcji lizosomów wywołujących spichrzenie lizosomalne i przykładowych chorób z nich wynikających. Na podstawie prac [17,21-23].

Zaburzona funkcja lizosomalna	Przykładowe choroby
Degradacja glikozoaminoglikanów	Mukopolisacharydozy: MPS typu I, II, III, IV, VI, VII oraz IX
Degradacja glikoprotein	Glikoproteinozy: $\alpha$ -mannozydoza, $\beta$ -mannozydoza, fukozydoza, aspartyloglukozaminuria, choroba Schindlera, mukolipidoza typu I (sialidoza)
Degradacja glikogenu	Glikogenozy: Choroba Pompego (glikogenoza typu II)
Degradacja glikolipidów	Gangliozydozy: GM <sub>1</sub> -gangliozydoza, GM <sub>2</sub> -gangliozydozy (choroba Taya-Sachsa, choroba Sandhoffa), choroba Gauchera; Degradacja sulfatydów: leukodystrofia metachromatyczna (MLD), choroba Krabbego; Degradacja ceramidów: choroba Fabry'ego
Degradacja sfingolipidów	Sfingolipidozy: choroba Niemann-Picka typu A i B, choroba Farbera
Degradacja lub transport cholesterolu, estrów cholesterolu lub innych złożonych lipidów	Lipidozy: choroba spichrzenia estrów cholesterolu (CESD), choroba Wolmana, choroba Niemann-Picka typu C
Degradacja polipeptydów	Pyknodysostoza, lipofuscynoza ceroidowa typu I oraz II
Mnogie niedobory enzymów lizosomalnych	Mnogi niedobór sulfataz, galaktosialidoza
Transportery lizosomalne	Cystynoza (choroba spichrzenia cystyny), choroba spichrzeniowa kwasu sialowego, choroba Salla
Kierowanie związków (w tym enzymów) do lizosomów	Mukolipidoza typu II i III, mukolipidoza IV, lipofuscynoza ceroidowa (wiele typów)
Defekt strukturalnych białek lizosomalnych	Choroba Danona

być nieprawidłowa aktywność fosfotransferazy UDP-N-acetyloglucozaminy, enzymu zlokalizowanego w sieci *cis* aparatu Golgiego i odpowiedzialnego za fosforylację reszty mannozy N-glikozylowanych hydrolaz lizosomalnych. W przypadku defektów tej transferazy, lizosomalne hydrolazy pozbawione są znacznika kierującego je do lizosomów, jakim jest M6P, co jest przyczyną błędnego skierowania tych hydrolaz na drogę sekrecji poza komórkę [24].

#### WYSTĘPOWANIE CHORÓB LIZOSOMALNYCH

Mimo, że każda z lizosomalnych chorób spichrzeniowych jako odrębna jednostka chorobowa jest rzadka, to jednak częstość występowania LSD jako grupy wynosi około 1 na 7000–8000 żywych urodzeń na podstawie badań przeprowadzonych dla populacji australijskiej i holenderskiej [25,26], chociaż w badaniach przeprowadzonych w populacji portugalskiej częstość ta wyniosła 1 na 4000 żywych urodzeń [27]. Niektóre z chorób spichrzeniowych występują częściej w konkretnych rejonach geograficznych lub w grupach etnicznych, np. choroba Gauchera oraz choroba Taya-Sachsa występują około 50–60 razy częściej w populacji Żydów aszkenazyjskich niż w ogólnej populacji [28,29], a choroba Salla czy też aspartyloglukozaminuria są charakterystyczne dla Finów [23]. Jak same choroby, tak i wywołujące je mutacje są często charakterystyczne dla określonych rejonów geograficznych i grup etnicznych. Przykładowo, mutacja Q70X w genie *IDUA*, leżąca u podłoża mukopolisacharydozy typu I, jest znacznie częstsza w Rosji i Skandynawii niż w Europie Zachodniej [30].

#### RÓŻNORODNOŚĆ OBJAWÓW CHORÓB LIZOSOMALNYCH

Lizosomalne choroby spichrzeniowe, podobnie jak wiele innych chorób metabolicznych, wykazują znaczne zróżnicowanie obrazu klinicznego. W niektórych przypadkach wczesne objawy choroby pojawiają się już w pierwszych tygodniach czy miesiącach życia. Jednak w większości przypadków pierwsze objawy zauważalne są później, po okresie rozwoju nie odbiegającego od normy. Nasilenie

objawów lizosomalnej choroby spichrzeniowej zależy od aktywności resztkowej enzymu oraz od rodzaju i dynamiki spichrzenia substratu, niemniej jednak, wszystkie one mają charakter postępujący. Większość charakteryzuje się objawami ze strony układu nerwowego wraz z towarzyszącymi objawami ze strony innych układów. Chorzy z lizosomalną chorobą spichrzeniową mają zazwyczaj obniżoną długość życia [21].

#### PODSUMOWANIE

Lizosomalne choroby spichrzeniowe to grupa chorób o podłożu genetycznym, która stanowi znakomity przykład sukcesów badań z zakresu biochemii, genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii zarówno w postępie diagnostyki, zrozumienia mechanizmów biologicznych schorzeń jak też rozwoju nowoczesnych metod terapeutycznych. Choroby te były pierwszymi schorzeniami wywołanymi defektami genetycznymi, dla których zastosowano w miarę skuteczne leczenie. Bardziej szczegółowe omówienie kilku grup spośród tych chorób: lipidoz, glikogenoz i mukopolisacharydoz, zostanie przedstawione w kolejnych artykułach zawartych w tym zeszycie.

#### PIŚMIENICTWO

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, London
2. Saftig P (2005) *Lysosomal membrane proteins*. W: Saftig P (red.) *Lysosomes*. Springer, New York, str 37-49
3. Finbow ME, Harrison MA (1997) The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J* 324: 697-712
4. Mancini GM, Havelaar AC, Verheijen FW (2000) Lysosomal transport disorders. *J Inher Metab Dis* 23: 278-292
5. Winchester BG (2001) Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A: 11-19
6. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Calen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18: 319-324
7. Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joosse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GM (1999)

- A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* 23: 462-465
8. Storch J, Cheruku SR (2005) Cholesterol transport in lysosomes, W: Saftig P (red) *Lysosomes*. Springer, New York, str. 100-111
  9. Verheijen FW, Mancini GMS (2001) Lysosomal transporters and associated diseases, W: Saftig P (red) *Lysosomes*. Springer, New York
  10. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-145
  11. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (1999) *Molecular Cell Biology*, WH Freeman & Co, New York
  12. Kilarski W (2003) *Strukturalne podstawy biologii komórki*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
  13. Lullmann-Rauch R (2005) History and morphology of lysosomes, W: Saftig P (red) *Lysosomes*. Springer, New York, str. 2-16
  14. Steinman RM, Brodie SE, Cohn ZA (1976) Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J Cell Biol* 68: 665-687
  15. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113: 1515-1524
  16. Storch S, Braulke T (2005) Transport of lysosomal enzymes, W: Saftig P (red) *Lysosomes*. Springer, New York, str. 17-26
  17. Vellodi A (2005) Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128: 413-431
  18. Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M (2004) Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine* 71: 381-383
  19. Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A (1993) Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 2: 435-442
  20. Horvath J, Ketelsen UP, Geibel-Zehender A, Boehm N, Olbrich H, Korinthenberg R, Omran H (2003) Identification of a novel LAMP2 mutation responsible for X-chromosomal dominant Danon disease. *Neuropediatrics* 34: 270-273
  21. Wilcox WR (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144: 3-14
  22. Wraith JE (2002) Lysosomal disorders. *Semin Neonatol* 7: 75-83
  23. Greiner-Tollersrud OK, Berg T (2005) Lysosomal storage disorders, W: Saftig P (red) *Lysosomes*. Springer, New York, str. 60-73
  24. Dierks T, Schlotawa L, Frese MA, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B (2009) Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease – Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793: 710-725
  25. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281: 249-254
  26. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105: 151-156
  27. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12: 87-92
  28. Myerowitz R (1997) Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene. *Hum Mutat* 9: 195-208
  29. Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z, Falik-Zaccai T, Helldmann K, Carmi R, Parvari R, Beit-Or H, Goldman B, Peleg L, Levy-Lahad E, Renbaum P, Legum S, Shomrat R, Yeger H, Benbenisti D, Navon R, Dror V, Shohat M, Magal N, Navot N, Eyal N (1998) Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat* 12: 240-244
  30. Voskoboeva EY, Krasnopol'skaya XD, Mirenburg TV, Weber B, Hopwood JJ (1998) Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union. *Mol Genet Metab* 65: 174-180

## Lysosomal storage diseases – an overview

Anna Kloska<sup>1</sup>, Anna Tylki-Szymańska<sup>2</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Gdansk, 24 Kładki St., 80-822 Gdansk, Poland

<sup>2</sup>Department of Metabolic Diseases, Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, 20 Al. Dzieci Polskich, 04-730 Warsaw, Poland

✉e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl

**Key words:** degradation of macromolecules, lysosomes, lysosomal storage diseases, acid hydrolases

### ABSTRACT

Lysosomal storage diseases (LSD) are a group of fifty or so metabolic disorders. They are caused by genetic defects causing a lack or severe deficiency in activity of one of proteins belonging to four functional groups: acid lysosomal hydrolases involved in degradation of various macromolecules, proteins involved in lysosomal transportation, proteins required to deliver enzymes into lysosomes or activators of lysosomal enzymes. Due to their deficiency, undegraded or partially degraded macromolecules accumulates in lysosomes, causing dysfunction of cells, tissues and organs. Most LSDs are inherited in autosomal recessive manner. There are only three exceptions: Fabry disease and Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II), which are X-linked recessive disorders, and Danon disease, which is an X-linked and dominant. As significant advantages have been achieved in understanding of LSD pathomechanisms, these diseases became examples of the importance of biochemical, genetic, molecular and biotechnological studies in development of diagnostics, understanding of biological mechanisms of diseases and development of modern therapeutical methods. In this article, an overview on LSD is presented, while more detailed description of some groups of these diseases: lipidoses, glycogenoses and mucopolysaccharidoses, will be presented in subsequent articles included in this issue.



# Mukopolisacharydozy – biochemiczne mechanizmy chorób oraz możliwości terapeutyczne

## STRESZCZENIE

Mukopolisacharydozy (MPS) stanowią zespół genetycznych chorób metabolicznych z grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD). Spowodowane są one defektem genetycznym, którego skutkiem jest brak lub znaczny niedobór aktywności jednej z hydrolaz lizosomalnych zaangażowanych w rozkład glikozoaminoglikanów (GAG). Częściowo zdegradowane cząsteczki GAG ulegają ciągłej akumulacji w lizosomach powodując nieprawidłowe funkcjonowanie komórek, tkanek i narządów. Ostatnia dekada przyniosła przełomowe osiągnięcia zarówno w zrozumieniu biochemicznych mechanizmów powstawania i przebiegu mukopolisacharydoz jak również w rozwijaniu metod terapeutycznych zmierzających do wprowadzenia skutecznego leczenia.

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA MUKOPOLISACHARYDOZ

Mukopolisacharydozy (MPS) to heterogenna grupa lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD), z których każda charakteryzuje się postępującą akumulacją glikozoaminoglikanów (GAG, dawniej zwanych mukopolisacharydami) w lizosomach. Spichrzenie zachodzi na skutek niedoboru lub całkowitego braku aktywności specyficznych enzymów lizosomalnych z grupy hydrolaz, zaangażowanych w rozkład tych związków. W zależności od tego, który z enzymów wykazuje niedobór aktywności, dochodzi do zaburzeń katabolizmu glikozoaminoglikanów takich jak siarczan dermatanu, siarczan heparanu, siarczan keratanu, siarczan chondroitynu lub hialuronian [1].

W grupie mukopolisacharydoz, na podstawie rodzaju spichrzanego GAG, wyróżnia się 7 ich typów: MPS typu I, II, III, IV, VI, VII i IX. Choroby te znane są pod nazwami eponimowymi wywodzącymi się od nazwisk pierwszych opisujących je lekarzy (Tab. 1). Dwa spośród tych typów, a mianowicie MPS III oraz MPS IV, dzieli się na podtypy na podstawie różnego podłoża genetycznego (defektu innego enzymu lizosomalnego) skutkującego gromadzeniem tego samego rodzaju GAG i wystąpieniem tej samej postaci klinicznej choroby. MPS typu III dzieli się na 4 podtypy (IIIA, IIIB, IIIC oraz IIID), charakteryzujące się podobnym fenotypem i spichrzeniem siarczanu heparanu. Jednak u podłoża każdego z tych podtypów leży defekt innego lizosomalnego enzymu hydrolitycznego. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku MPS typu IV, w którym dochodzi do spichrzenia siarczanu keratanu, ale efekt ten jest spowodowany deficytem dwóch różnych enzymów, w związku z czym wyróżnia się dwa podtypy – MPS IVA oraz MPS IVB [1,2]. Podział na typy i podtypy MPS oraz odpowiadające im deficyty enzymatyczne został przedstawiony w tabeli 1.

Mukopolisacharydozy dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny, za wyjątkiem choroby Huntera (MPS II), która jest chorobą recesywną, dziedziczną w sprzężeniu z chromosomem X. Częstość występowania mukopolisacharydoz w populacji jest trudna do oszacowania, ponieważ niewiele zostało przeprowadzonych badań populacyjnych oraz mało jest danych epidemiologicznych dotyczących tych chorób. Na podstawie retrospektywnych badań przeprowadzonych w populacji australijskiej obejmujących lata 1980–1996 oszacowano, że częstość występowania mukopolisacharydoz jako grupy chorób wynosi 1 na 22500 żywych urodzeń, a w badaniach dla populacji holenderskiej i portugalskiej częstość ta wyniosła odpowiednio 1 na 22200 żywych urodzeń oraz 1 na 20800 żywych urodzeń. Częstość występowania w populacji MPS typu I szacuje się na około 1 na 88000 żywych urodzeń (dane dla populacji australijskiej i holenderskiej). W przypadku MPS II szacuje się ją na 1 na 77000 żywych urodzeń płci męskiej (dane dla populacji holenderskiej i niemieckiej) [3]. Do stosunkowo częstych należą również MPS IIIA oraz IIIB, obserwowane z częstością odpowiednio 1 na 114000 i 1 na 211000 w populacji australijskiej. Do najrzadszych mukopolisacharydoz należą MPS typu VII (choroba Sly'a) z częstością wystę-

Anna Kloska<sup>1</sup>

Anna Tylki-Szymańska<sup>2</sup>

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk  
<sup>2</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

✉Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.:(58) 52 36 308, faks: (58) 52 35 501, e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl

Artykuł otrzymano 20 stycznia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 21 marca 2011 r.

**Słowa kluczowe:** mukopolisacharydozy, lizosomalne choroby spichrzeniowe, enzymatyczna terapia zastępcza, terapia genowa, terapia przez zahamowanie syntezy substratu

**Wykaz skrótów:** GAG – glikozoaminoglikan(y); LSD (ang. *lysosomal storage diseases*) – lizosomalne choroby spichrzeniowe; M6P – ugrupowanie mannozo-6-fosforanowe; MPS – mukopolisacharydoza; RER (ang. *rough endoplasmic reticulum*) – szorstka siateczka śródplazmatyczna

**Podziękowanie:** Praca finansowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (projekt nr N N301 668540).

**Tabela 1.** Typy i podtypy mukopolisacharydoz. W tabeli podano zwyczajowe nazwy poszczególnych podtypów MPS, nazwę enzymu lizosomalnego, którego deficyt leży u podłoża choroby, lokalizację na chromosomie genów kodujących poszczególne enzymy oraz rodzaj akumulowanych glikoaminoglikanów (GAG).

Typ MPS*	Nazwa choroby	Enzym**	Gen i jego lokalizacja	Spichrzane GAG***
MPS IH	choroba Hurler	$\alpha$ -L-iduronidaza	<i>IDUA</i> , 4p16.3	HS, DS
MPS IS	choroba Scheie	$\alpha$ -L-iduronidaza	<i>IDUA</i> , 4p16.3	HS, DS
MPS IH/S	choroba Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-iduronidaza	<i>IDUA</i> , 4p16.3	HS, DS
MPS II	choroba Huntera	2-sulfataza iduronianu	<i>IDS</i> , Xq28	HS, DS
MPS IIIA	choroba Sanfilippo A	sulfohydrolaza N-sulfoglikoaminy	<i>SGSH</i> , 17q25.3	HS
MPS IIIB	choroba Sanfilippo B	N- $\alpha$ -acetyloglikoaminydaza	<i>NAGLU</i> , 17q21	HS
MPS IIIC	choroba Sanfilippo C	N-acetylotransferaza heparan- $\alpha$ -glukoaminyd	<i>HGSNAT</i> , 8p11.1	HS
MPS IIID	choroba Sanfilippo D	6-sulfataza N-acetyloglikoaminy	<i>GNS</i> , 12q14	HS
MPS IVA	choroba Morquio A	6-sulfataza N-acetylogalaktoaminy	<i>GALNS</i> , 6q24.3	KS, 6-CS
MPS IVB	choroba Morquio B	$\beta$ -galaktozydaza	<i>GLB1</i> , 3p21.33	KS
MPS VI	choroba Maroteaux-Lamy	4-sulfataza N-acetylogalaktoaminy (arylosulfataza B)	<i>ARSB</i> , 5q11-13	DS
MPS VII	choroba Sly'a	$\beta$ -glukuronidaza	<i>GUSB</i> , 7q21.11	HS, DS, 4-CS, 6-CS
MPS IX	-	hialuronoglikoaminydaza (hialuronidaza)	<i>HYAL1</i> , 3p21.3	HA

\*MPS IH, IS i IH/S są podtypami MPS I wyróżnionymi jedynie na podstawie objawów klinicznych, gdyż w każdym z tych podtypów deficyt dotyczy tego samego enzymu. Skrót MPS V (dawna nazwa MPS IS uznanej błędnie za odrębną jednostkę chorobową) oraz MPS VIII (nazwa przypadku opisanego na podstawie błędnych danych laboratoryjnych) nie są obecnie stosowane; \*\*Nazwa zgodna z nomenklaturą IUBMB (ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*); \*\*\*HS – siarczan heparanu, DS – siarczan dermatanu, KS – siarczan keratanu, CS – siarczan chondroityny, HA – hialuronian, 4-CS – 4-siarczan chondroityny, 6-CS – 6-siarczan chondroityny

powania oszacowaną dla populacji australijskiej rzędu 1 na 2 111 000 oraz MPS IIIC i IIID z częstością występowania odpowiednio 1 na 1 407 000 oraz 1 na 1 056 000 żywych urodzeń [1].

Różne typy mukopolisacharydoz charakteryzują się wieloma wspólnymi objawami klinicznymi, choć ich nasilenie w każdym z typów może być różne. Choroby te mają postępujący charakter. Objawy kliniczne obejmują organomegalie (powiększenie wątroby i języka), zmiany w obrębie układu kostnego o charakterze *dysostosis multiplex* spowodowane nieprawidłowym formowaniem się kości oraz charakterystyczne rysy twarzy (pogrubione rysy twarzy, wydatte czoło). W wyniku choroby dochodzi często do upośledzenia słuchu oraz wzroku (zmętnienie rogówki, uszkodzenie nerwu wzrokowego). Zajęte są również układy oddechowy i sercowo-naczyniowy (defekty zastawek serca, kardiomegalia i kardiomiopatia), a w miarę rozwoju choroby dochodzi do ograniczenia ruchomości stawów i pojawiania się licznych przykurczów czy też uwieżienia nerwów, jak w zespole cieśni nadgarstka. Opóźnienie rozwoju umysłowego jest charakterystyczne dla MPS IH (choroba Hurler), ciężkich postaci MPS II (choroba Huntera), wszystkich podtypów MPS III (choroba Sanfilippo) oraz MPS VII (choroba Sly'a) [1,2,4,5].

Diagnostyka mukopolisacharydoz opiera się na badaniu aktywności enzymów lizosomalnych, a także ilościowej analizie glikoaminoglikanów wydalanych z moczem. O ile lizosomalne hydrolazy są wysoce specyficzne względem struktury i rodzaju wiązania w końcowej części makrocząsteczki, na którą działają, to ogólna struktura takiego związku ma mniejsze znaczenie dla aktywności tych enzymów. Stąd możliwe jest oznaczanie ich aktywności z wykorzystaniem różnych syntetycznych substratów (o właściwościach fluorogennych lub chromogennych) w leukocytach krwi obwodowej, osoczu czy w hodowli fibroblastów, ewentualnie

w przypadku diagnostyki prenatalnej w komórkach wyhodowanych z płynu owodniowego lub pobranych podczas biopsji kosmówki [1].

## NEURONOPATYCZNE FORMY MUKOPOLISACHARYDOZ

### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU I

Choroba ta jest spowodowana deficytem aktywności  $\alpha$ -L-iduronidazy (*IDUA*, EC 3.2.1.76), lizosomalnej glikozydazy biorącej udział w degradacji siarczanu heparanu oraz siarczanu dermatanu [1]. Obejmuje ona szeroki zakres różnych klinicznych fenotypów, od najbardziej ciężkiego, jakim jest choroba Hurler, do najbardziej łagodnego, jakim jest choroba Scheie. Pomiędzy tymi dwoma skrajnymi fenotypami istnieje całe kontinuum form pośrednich określanymi jako choroba Hurler-Scheie. We wszystkich tych wariantach występują znaczne różnice w stopniu zajęcia ośrodkowego układu nerwowego. Pacjenci z najcięższą postacią choroby, typem IH, charakteryzują się opóźnieniem rozwoju umysłowego, choć dzieci te pozostają zwykle pogodnie, spokojne i łagodne w odróżnieniu od chorych na MPS III z charakterystycznym zachowaniem przypominającym agresję, jednak różniącym się od niej brakiem świadomego działania w celu wyrządzenia krzywdy. Opóźnienie rozwoju i objawy choroby pojawiają się już w pierwszych dwóch latach życia. W łagodnej postaci choroby, typie IS, objawy somatyczne pojawiają się później, a pacjenci charakteryzują się normalną inteligencją i średnią długością życia tylko nieznacznie niższą od średniej dla ogólnej populacji [1,6].

Gen kodujący  $\alpha$ -L-iduronidazę, zwany *IDUA*, złożony jest z 14 eksonów i ma długość około 19 tysięcy par zasad. Jest on zlokalizowany na chromosomie 4, w pozycji p16.3. Dwa najczęściej występujące defektywne allele, W402X oraz Q70X, a także mniej częsty allel, P533R, stanowią ponad po-

Tabela 2. Grupy enzymów biorących udział w degradacji glikoaminoglikanów. Wyszczególniono rodzaj glikoaminoglikanów, w których degradację zaangażowane są poszczególne enzymy.

Grupa enzymów	Specyficzny enzym	Rodzaj GAG*
Egzoglikozydazy:	$\alpha$ -L-iduronidaza	DS, HS
	$\beta$ -glukuronidaza	DS, HS, CS, HA
	$\beta$ -heksozaminidaza	DS, CS, KS
	N-acetyloglukozoaminidaza	HS
	$\beta$ -galaktozydaza**	KS
Egzosulfatazy:	2-sulfataza iduronianu	DS, HS
	arylosulfataza B	DS, CS
	2-sulfataza glukuronianu	HS
	sulfohydrolaza N-sulfoglukozoaminy	HS
	6-sulfataza N-acetyloglukozoaminy	HS, KS
	6-sulfataza N-acetylogalaktozoaminy	KS, CS
Endoglikozydazy:	hialuronidaza	CS, HA
	heparanaza	HS
Acetylotransferazy:	N-acetylotransferaza heparan: $\alpha$ -glukozaaminid	HS

\*HS – siarczan heparanu, DS – siarczan dermatanu, KS – siarczan keratanu, CS – siarczan chondroitynu, HA – hialuronian; \*\*enzym bierze również udział w degradacji GM<sub>1</sub>-gangliozydu, glikoprotein oraz oligosacharydów

łową wszystkich alleli leżących u podłoża mukopolisacharydozy typu I w populacji kaukaskiej. Produktem tych alleli jest niefunkcyjny enzym, a ich występowanie w formie homozygotycznej lub heterozygotycznej przekłada się w efekcie na rozwój ciężkiej postaci MPS IH [7,8].

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU II (CHOROBA HUNTERA)

Choroba Huntera charakteryzuje się brakiem lub znacznym niedoborem aktywności 2-sulfatazy iduronianu (IDS; EC 3.1.6.13), enzymu katalizującego degradację siarczanu heparanu oraz siarczanu dermatanu, czego skutkiem jest lizosomalne spichrzanie tych glikoaminoglikanów [9]. W mukopolisacharydozie typu II obserwuje się szerokie spektrum objawów i wyróżnia się dwa jej skrajne fenotypy. Fenotyp ciężki, podobnie jak w przypadku choroby Hurler, charakteryzuje się silnie wyrażonymi objawami somatycznymi połączonymi z postępującą neurodegeneracją, podczas gdy fenotyp łagodny MPS typu II charakteryzuje się normalną inteligencją i przeżywalnością do wieku dorosłego [1,2].

Choroba Huntera jest dziedziczona w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X, a gen *IDS*, kodujący sulfatazę iduronianu, jest zlokalizowany na chromosomie X w pozycji q28. Gen ten ma długość ponad 24 tysięcy par zasad i składa się z 8 eksonów [10,11]. W odległości około 20 tysięcy par zasad od genu *IDS* zlokalizowany jest pseudogen *IDS-2*, zawierający sekwencje homologiczne z eksonami 2 i 3 oraz intronem 7 właściwego genu *IDS*. Rejon, w którym zlokalizowane są oba geny jest rejonem bogatym w geny leżące w bliskiej odległości, powyżej i poniżej genu sulfatazy iduronianu [12]. Większość przypadków MPS typu II spowodowana jest mutacjami punktowymi, w tym mutacjami nonsensownymi czy zmiany sensu lub niewielkimi delecjami bądź insercjami prowadzącymi do przesunięcia ramki odczytu, bądź też mutacjami ingerującymi w miejsca „splicingowe” transkryptu [13]. Rzadziej zdarzają się delecje całego genu lub duże rearanżacje chromosomowe obejmujące m.in. rejon genu *IDS*. Tego typu zmiany zawsze dają

ciężki fenotyp choroby Huntera [14,15]. Często, rearanżacje w rejonie genu *IDS* są wynikiem rekombinacji zachodzącej pomiędzy rejonem intronu 7 a homologicznym fragmentem znajdującym się w pobliżu eksonu 3 pseudogenu *IDS-2* i powiązany z tym procesem przerwaniem ciągłości genu *IDS* oraz inwersją fragmentu DNA dokonującą inwazji [16].

Mukopolisacharydoza typu II, jak wiele chorób dziedziczonych w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X, występuje prawie wyłącznie u płci męskiej, podczas gdy kobiety są jej bezobjawowymi nosicielkami. Opisano kilka przypadków MPS II zdiagnozowanych u chorych płci żeńskiej. Chorzy mężczyźni z reguły nie posiadają potomstwa [1], zatem pojawienie się jednocześnie dwóch alleli z mutacją w genie *IDS* u kobiety jest

mało prawdopodobne i do tej pory opisano tylko jeden przypadek pacjentki z mutacją L41P w formie homozygotycznej, przy wykluczeniu delecji jednej kopii genu *IDS* [17]. Część klinicznych przypadków żeńskiej formy choroby Huntera występuje u heterozygot i jest związana z jednoczesnym wystąpieniem zjawiska nielosowej inaktywacji chromosomu X niosącego prawidłowy allel genu *IDS*. Pierwszy opisany tego typu przypadek był spowodowany wystąpieniem wzajemnej zrównoważonej translokacji t(X;5), która spowodowała przerwanie ciągłości jednego allelu genu *IDS* oraz współwystąpieniem nielosowej inaktywacji drugiego, nienaruszonego chromosomu X [18]. Najczęściej jednak przypadki MPS typu II u kobiet zdarzają się u pacjentek z prawidłowym kariotypem, jako wynik obecności mutacji w jednym allelu genu *IDS* oraz preferencyjnej, nielosowej inaktywacji drugiego z chromosomów X, niosącego prawidłową kopię genu. Opisano przypadki dziewczynek z mutacją punktową R468Q [19] lub z insercją c.706insG, powodującą zmianę ramki odczytu [20], które występowały w matczym allelu genu *IDS* podlegającym ekspresji oraz z prawidłowym allelem genu *IDS* leżącym na chromosomie X pochodzenia ojcowskiego i pozostającym w stanie zinaktywowanym. Znane są też przypadki delecji *de novo* w allelu genu *IDS* leżącym na aktywnym chromosomie X pochodzenia ojcowskiego, przy jednoczesnej inaktywacji chromosomu X odziedziczonego po matce, niosącego prawidłową kopię genu *IDS* [17,21,22]. Ciekawym przypadkiem opisanym w literaturze jest wystąpienie choroby Huntera u jednej z bliźniaczek jednojajowych. U pacjentki będącej heterozygotą w *locus IDS* z klinicznymi objawami choroby Huntera wykazano prawidłowy kariotyp i nielosową inaktywację jednego z chromosomów X podczas gdy u jej heterozygotycznej siostry, monozygotycznej bliźniaczki, a także u heterozygotycznej matki, które nie wykazywały objawów klinicznych choroby, inaktywacja chromosomów X była losowa [23].

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU III (CHOROBA SANFILIPPO)

Choroba Sanfilippo, w której dochodzi do spichrzania siarczanu heparanu, wywołana jest deficytami w

aktywności 4 różnych enzymów – sulfohydrolazy *N*-sulfoglukozoaminy (SGSH w MPS IIIA; EC 3.10.1.1), *N*- $\alpha$ -acetyloglukozoaminidazy (NAGLU w MPS IIIB; EC 3.2.1.50), *N*-acetylotransferazy heparan- $\alpha$ -glukozoaminid (w MPS IIIC; EC 2.3.1.3) lub 6-sulfatazy *N*-acetyloglukozoaminy (GNS w MPS IIID; EC 3.1.6.14) (lokalizacja genów kodujących te enzymy została przedstawiona w tabeli 2) [1]. Wszystkie te podtypy MPS III charakteryzują się podobnym obrazem klinicznym. Obserwuje się niewielkie zmiany somatyczne przy postępującym uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego. Ogólnie można wyróżnić trzy fazy w przebiegu mukopolisacharydozy typu III. Pierwsza faza, przypadająca na okres 1–4 lat, charakteryzuje się niewielkim opóźnieniem rozwoju dziecka po okresie 1–2 lat prawidłowego rozwoju. W drugiej fazie, w wieku kilku lat, charakter choroby ulega zmianie i pojawiają się nadpobudliwość psychoruchowa, upośledzenie zdolności uczenia się i stopniowa utrata zdobytych wcześniej umiejętności, z towarzyszącymi im zaburzeniami snu. Trzecia faza choroby przypada zwykle na koniec pierwszej lub początek drugiej dekady życia i objawia się postępującą neurodegeneracją. Dziecko staje się mniej mobilne i bardziej wyciszone, a wszystkie jego umiejętności stopniowo zanikają. W końcowej fazie choroby pacjenci nie są w stanie poruszać się i są całkowicie uzależnieni od opieki innych osób.

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU VII (CHOROBA SLY'A)

Mukopolisacharydoza typu VII spowodowana jest niedoborem aktywności  $\beta$ -glukuronidazy (GUSB; EC 3.2.1.31) i zaburzeniami degradacji glikoaminoglikanów zawierających kwas glukuronowy. Fenotyp pacjentów z tą chorobą jest podobny jak w przypadku choroby Hurler (MPS I-H) lub choroby Huntera (MPS II). Choroba Sly'a cechuje się dużą zmiennością począwszy od ciężkiego, śmiertelnego obrzęku płodowego z początkiem objawów nawet w rozwoju płodowym lub tuż po urodzeniu, do form o łagodnym przebiegu, kiedy to pacjenci dożywają wieku dorosłego. U większości pacjentów obserwuje się hepatosplenomegalię, umiarkowane zmiany w obrębie układu kostnego, niski wzrost oraz różny stopień upośledzenia rozwoju umysłowego [1].

#### NIENEURONOPATYCZNE FORMY MUKOPOLISACHARYDOZ

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU IV (CHOROBA MORQUIO)

Typ IV MPS spowodowany jest zaburzeniem degradacji siarczanu keratanu na skutek deficytu 6-sulfatazy *N*-acetylogalaktozoaminy (GALNS w MPS IVA; EC 3.1.6.4) lub  $\beta$ -galaktozydazy (GLB1 w MPS IVB; EC 3.2.1.23). Obie formy MPS typu IV cechują się zmianami w obrębie układu kostnego i więzadłowo-stawowego, karłowatością, koślawością kończyn dolnych, garbem lędźwiowym i deformacją klatki piersiowej, przy całkowitym braku objawów neurologicznych i zachowaniem normalnej inteligencji. Gen *GALNS*, kodujący sulfatazę siarczanu 6-*N*-acetylogalaktozoaminy, ma długość ponad 40 tysięcy par zasad i składa się z 14 eksonów, a u podłoża MPS IVA leży wiele różnych mutacji punktowych lub niewielkich delecji. Ciekawym jest fakt, że w przypadku genu kodującego  $\beta$ -galaktozydazę, mutacje

leżące u podłoża MPS IVB są zmianami wpływającymi na obniżenie zdolności enzymu do degradacji siarczanu keratanu, natomiast degradacja  $GM_1$ -gangliozydu, przeprowadzana przez ten sam enzym, nie ulega zahamowaniu i nie wywołuje tym samym innej choroby spichrzeniowej,  $GM_1$ -gangliozydozy, będącej skutkiem defektu tego samego enzymu, ale występującej w innej części polipeptydu [1].

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU VI (CHOROBA MAROTEAUX-LAMY)

W typie VI MPS, spowodowanym deficytem aktywności arylosulfatazy B (ARSB; EC 3.1.6.12) i wynikającym z tego spichrzaniem siarczanu dermatanu, również nie dochodzi do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego przez chorobę, a główne dolegliwości dotyczą układu kostnego i układu krążenia. Zazwyczaj występują ciężkie objawy w postaci kardiomiopatii, uszkodzenia zastawek serca czy też postępującego zwężenia dróg oddechowych, prowadzące do niewydolności prawej komory serca [2].

#### MUKOPOLISACHARYDOZA TYPU IX

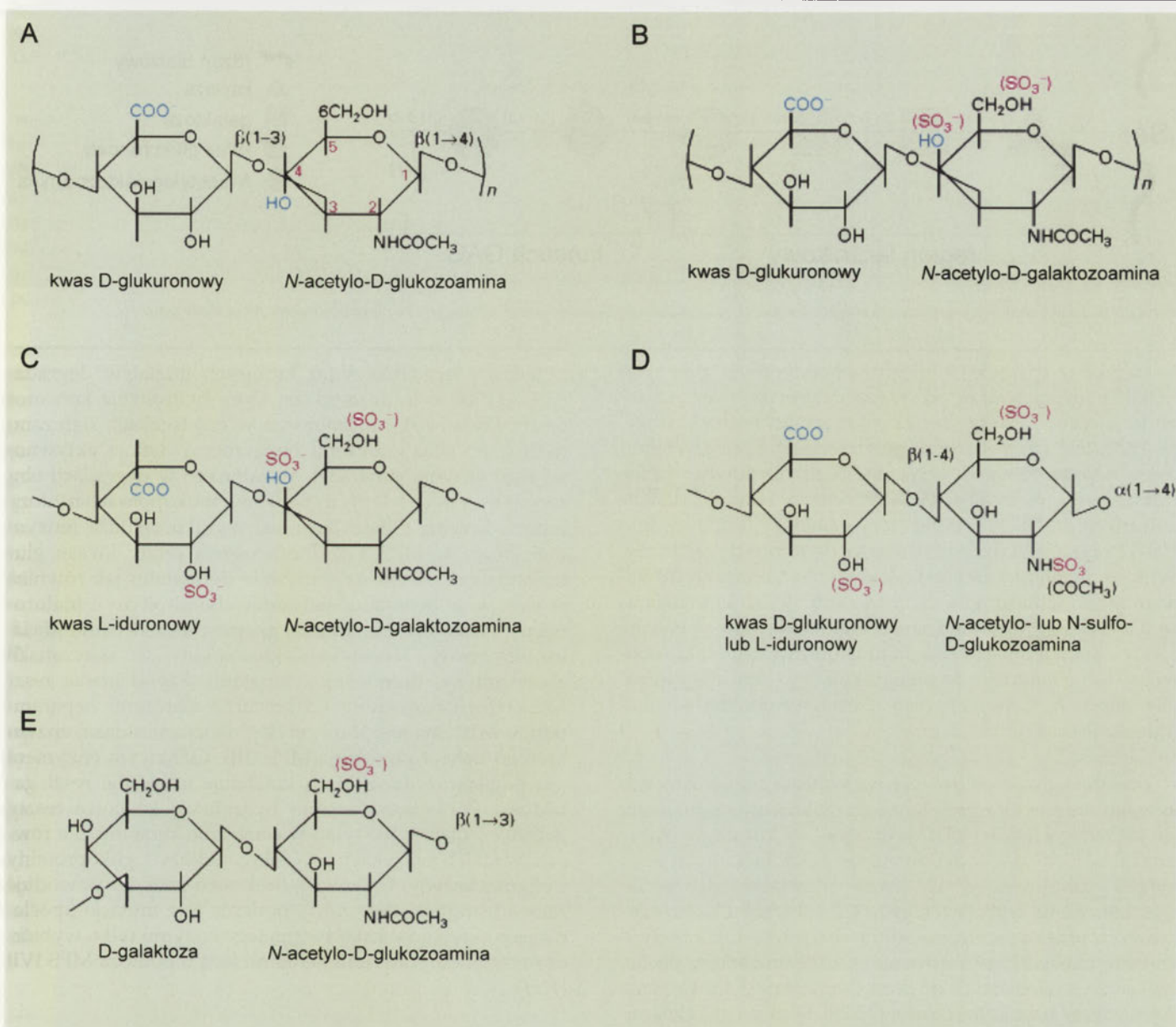
Do tej pory opisano tylko jeden przypadek osoby cierpiącej na typ IX MPS, związany z niedoborem hialuronidazy (HYAL1; EC 3.2.1.35) i nadmierną akumulacją hialuronianu. Pacjent z objawami obejmującymi łagodne cechy dysmorficzne w obrębie twarzoczaszki i niski wzrost, przy zachowaniu prawidłowej ruchomości stawów i normalnej inteligencji, został opisany w 1996 roku, ale od tamtej pory nie udało się zdiagnozować żadnego innego przypadku tej choroby [24].

#### METABOLIZM GLIKOZOAMINOGLIKANÓW

Glikoaminoglikany (GAG) są długimi, liniowymi polisacharydami zbudowanymi z około 20–200 powtarzających się dwucukrowych elementów złożonych z aminocukru (takiego jak *N*-acetyloglukozoamina lub *N*-acetylogalaktozoamina) oraz kwasu uronowego (takiego jak kwas D-glukuronowy lub kwas L-iduronowy) lub D-galaktozy. Jedna lub obie jednostki cukrowe posiadają jedną bądź dwie reszty siarczanowe (w pozycji C2, C4 lub C6), zatem GAG mają silny ujemny ładunek, co ma związek z ich funkcją w organizmie [25]. Głównymi glikoaminoglikanami obecnymi u kręgowców są hialuronian, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu, siarczan heparanu i siarczan keratanu. Ich budowę przedstawiono schematycznie na rysunku 1.

Glikoaminoglikany występują w komórce w postaci proteoglikanów, czyli kompleksów złożonych z rdzenia białkowego z przyłączonym kowalencyjnie jednym lub większą liczbą łańcuchów GAG. W takiej postaci związki te występują na powierzchni komórki bądź w macierzy pozakomórkowej. Jedynym wyjątkiem jest hialuronian, który nie wiąże się kowalencyjnie z białkami, może jednak oddziaływać z nimi niekowalencyjnie poprzez tzw. motyw wiążący hialuronianu [26].

Proteoglikany są produkowane praktycznie przez wszystkie komórki ssaków i są wydzielane do macierzy po-



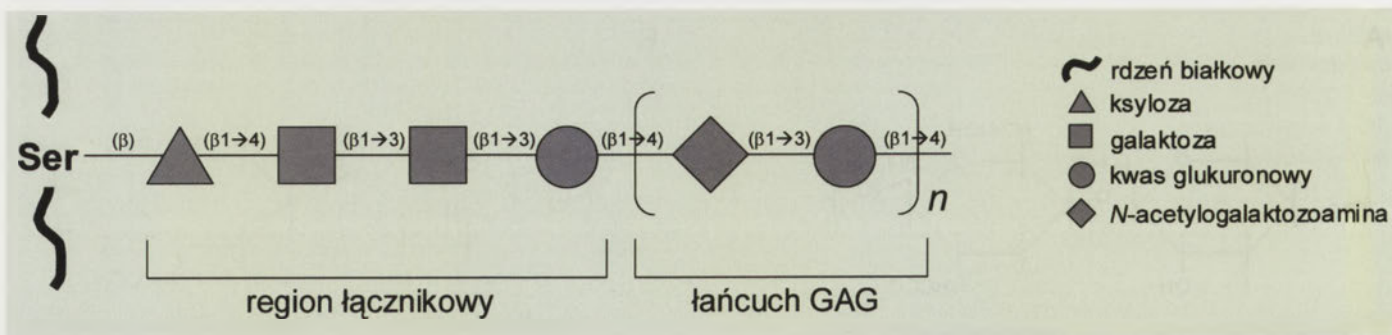
**Rycina 1.** Budowa strukturalna powtarzalnych elementów różnych glikozoaminoglikanów. Poszczególne panele przedstawiają następujące GAG (w nawiasie podano liczbę jednostek dwucukrowych ( $n$ ) wchodzących w skład każdego z nich): A – hialuronian ( $n \leq 50\,000$ ), B – siarczan chondroityny ( $n \leq 250$ ), C – siarczan dermatanu ( $n \leq 250$ ), D – heparyna/siarczan heparanu ( $n = 15-30$ ), E – siarczan keratanu ( $n = 20-30$ ).

zakomórkowej, wbudowywane do błony komórkowej lub przechowywane w ziarnistościach wydzielniczych. Są one, obok białek fibrylnych (takich jak różne rodzaje kolagenu i elastyn) i glikoprotein adhezyjnych (jak fibronektyna, lamina czy tenascyna), głównymi składnikami macierzy pozakomórkowej. Silnie ujemny ładunek GAG wchodzących w skład proteoglikanów sprawia, że oddziałują one z pozostałymi składnikami macierzy pozakomórkowej, wiążą dużą liczbę kationów ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oraz  $\text{Ca}^{2+}$ ) oraz wodę, co prowadzi do wytworzenia swoistego uwodnionego żelu, utrzymującego sprężystość i elastyczność macierzy pozakomórkowej danej tkanki. Wpływa to na transport w obrębie przestrzeni pozakomórkowej oraz zapewnia optymalne środowisko niezbędne do prawidłowej proliferacji, różnicowania się i migracji komórek.

Duże ilości siarczanów chondroityny oraz keratanu wchodzi w skład proteoglikanu o nazwie agrekan i odgrywają istotną rolę w uwodnieniu chrząstki nadając jej właściwości żelowe i oporność na odkształcenie [26]. Polianionowy charakter proteoglikanów sprawia, że związki te oddziałują z enzymami, czynnikami wzrostowymi lub ich receptorami, czynnikami transkrypcyjnymi czy białkami strukturalnymi macierzy pozakomórkowej, biorąc udział m.in. w adhezji komórek, działaniu cytokin czy w modulacji katalizy enzymatycznej [27].

#### SYNTEZA GLIKOZOAMINOGLIKANÓW

Proces biosyntezy proteoglikanów rozpoczyna się od syntezy właściwego rdzenia białkowego na rybosomach.



Rycina 2. Schemat budowy proteoglikanu, którego łańcuchem GAG jest siarczan chondroityny ( $n$  – liczba powtarzalnych jednostek dwucukrowych).

Następnie w aparacie Golgiego zachodzi proces glikozytacji, który rozpoczyna się od syntezy czterocukrowego regionu łączącego. Pierwszą resztą cukrową jest reszta ksylozy, przenoszona na specyficzną resztę seryny rdzenia białkowego z wytworzeniem wiązania O-glikozydowego przez transferazę ksylozy (Xyl-T). Następnie, w reakcjach katalizowanych przez dwie transferazy galaktozy (odpowiednio Gal-TI oraz Gal-TII), dodawane są dwie reszty galaktozy. Syntezę regionu łączącego kończy przyłączenie aktywowanego kwasu glukuronowego przez odpowiednią transferazę (GlcUA-TI). Następnie naprzemian dodawane są kolejne reszty odpowiedniej heksozozaminy oraz kwasu glukuronowego (lub galaktozy) do nieredukującego końca wydłużanego łańcucha GAG, do czasu aż osiągnie on odpowiednią długość (Ryc. 2) [25,27,28].

Donorami reszt cukrowych w syntezie regionu łącznikowego oraz w elongacji łańcucha glikozoaminoglikanów są ich odpowiednie UDP-pochodne. W ostatnim etapie produkcji GAG dochodzi do epimeryzacji niektórych reszt kwasu glukuronowego do kwasu iduronowego oraz do siarczanowania wybranych grup C2, C4 i/lub C6 reszt cukrowych przez specyficzne sulfotransferazy. Tak zmodyfikowane cząsteczki są następnie transportowane w pęcherzykach wydzielniczych do błony komórkowej i uwalniane do macierzy pozakomórkowej [27,28]. Synteza glikozoaminoglikanów wydaje się być procesem ściśle regulowanym, ponieważ GAG różnią się strukturą na różnych etapach, od rozwoju zarodkowego, poprzez etap wzrostu aż po starzenie się organizmu [27].

## DEGRADACJA GLIKOZOAMINOGLIKANÓW

Glikozoaminoglikany są produktami lizosomalnej degradacji, powstałymi w wyniku proteolitycznego usunięcia rdzenia białkowego proteoglikanów. Uwolnione łańcuchy GAG są następnie częściowo rozszczepiane przez enzymy takie jak endoglukuronidazy lub endohexozozaminidazy, które przecinają makrocząsteczki GAG w kilku specyficznych miejscach. W wyniku działania tych endoglikozydaz powstają fragmenty łańcuchów GAG, które następnie podlegają etapowej degradacji katalizowanej przez wiele enzymów z grupy egzoglikozydaz oraz egzosulfataz [29,30]. Często te same enzymy uczestniczą w etapach degradacji kilku różnych glikozoaminoglikanów (Tab. 2), dlatego deficyt aktywności jednej takiej hydrolazy może skutkować spichrzaniem kilku różnych rodzajów GAG w lizosomach.

Jedną z egzoglikozydaz biorących udział w degradacji GAG jest  $\alpha$ -L-iduronidaza, która hydrolizuje końcowe reszty kwasu  $\alpha$ -L-iduronowego w cząsteczkach siarczanu dermatanu oraz siarczanu heparanu, a deficyt aktywności tego enzymu prowadzi do zaburzeń w degradacji obu rodzajów GAG i leży u podstaw mukopolisacharydozy typu I. Kolejną glikozydazą jest  $\beta$ -glukuronidaza (enzym deficytowy w MPS VII), która usuwa reszty kwasu glukuronowego obecne w siarczanie dermatanu jak również w siarczanie heparanu, siarczanie chondroityny i hialuronianie. Następny enzym z tej grupy,  $\beta$ -heksozozaminidaza, usuwa reszty N-acetylogalaktozozaminy w siarczanach chondroityny, dermatanu i keratanu. Za odcinanie reszt N-acetyloglukozozaminy od łańcucha siarczanu heparanu odpowiedzialna jest N- $\alpha$ -acetyloglukozozaminidaza, enzym którego deficyt powoduje MPS IIIB. Ciekawym enzymem jest  $\beta$ -galaktozydaza, która katalizuje usuwanie reszt galaktozy. Prawidłowy enzym hydrolizuje końcowe reszty galaktozy obecne nie tylko w siarczanie keratanu, ale również w takich związkach jak GM<sub>1</sub>-gangliozyd, glikoproteiny i oligosacharydy. Całkowity brak tego enzymu powoduje rozwój gangliozydozy GM<sub>1</sub>, podczas gdy mutacje upośledzające aktywność katalityczną tego enzymu tylko wybiórczo względem siarczanu keratanu leżą u podłoża MPS IVB [1,29].

Usuwanie reszt cukrowych i reszt kwasów uronowych z łańcuchów GAG przez egzoglikozydazy towarzyszy usuwanie grup siarczanowych, w którym uczestniczą enzymy z grupy egzosulfataz. Jednym z takich enzymów jest sulfataza iduronianu, która odcina grupę siarczanową znajdującą się w pozycji 2 kwasu L-iduronowego, obecnego w siarczanie dermatanu i siarczanie heparanu. Arylosulfataza B, kolejna sulfataza uczestnicząca w procesach degradacji GAG, usuwa grupy siarczanowe z 4-siarczanu N-acetylogalaktozozaminy, wchodzącej w skład siarczanu dermatanu a także siarczanu chondroityny. Sulfatazy, takie jak 2-sulfataza glukuronianu czy sulfohydrolaza N-acetyloglukozozaminy (N-sulfataza heparanu), specyficznie usuwają reszty siarczanowe z siarczanu heparanu. Co ciekawe, do tej pory nie zidentyfikowano choroby, u której podstaw leżałby deficyt aktywności pierwszej z wymienionych sulfataz, natomiast deficyt drugiej z nich odpowiada za rozwój MPS IIIA. Pozostałe sulfatazy uczestniczące w katabolizmie GAG to 6-sulfataza N-acetyloglukozozaminy, usuwająca reszty siarczanowe z N-acetyloglukozozaminy wchodzącej w skład siarczanów heparanu i keratanu oraz

6-sulfataza *N*-acetylogalaktozoaminy, usuwająca grupy siarczanowe z *N*-acetylogalaktozoaminy będącej składnikiem siarczanów keratanu i chondroityny [1,29].

Degradacja siarczanu heparanu wymaga jeszcze jednego enzymu, który jako jedyny nie jest hydrolazą, a mianowicie *N*-acetylotransferazy heparan: $\alpha$ -glukozaaminid (*N*-acetylotransferazy acetylo-CoA: $\alpha$ -glukozaaminid). Enzym ten katalizuje acetylację grupy aminowej glukozaaminy, która została wyeksponowana w wyniku działania *N*-sulfatazy heparanu, a nie może ulec hydrolizie bezpośrednio w takiej formie. Deficyt aktywności tego enzymu leży u podstaw MPS IIIC [31].

W degradacji siarczanu chondroityny, obok glikozydaz i sulfataz, wspólnych z innymi GAG, uczestniczy także hialuronidaza, enzym będący endoheksosaminidazą, która odcina reszty *N*-acetylogalaktozoaminy z cząsteczki tego polimeru i umożliwia w ten sposób ominięcie bloków w degradacji siarczanu chondroityny spowodowanych deficytami enzymów w MPS IVA, MPS VI, MPS VII oraz chorobie Sandhoffa [1]. Hialuronidaza uczestniczy też w degradacji hialuronianu, a deficyt jej aktywności wywołuje rzadki typ MPS IX [24].

## BIOCHEMICZNE PODSTAWY PATOLOGII W MUKOPOLISACHARYDOZACH

Niewątpliwie pierwotną przyczyną zmian patologicznych obserwowanych u pacjentów cierpiących na wszystkie typy MPS jest upośledzenie degradacji glikozaaminoglikanów i akumulacja tych związków w lizosomach. Niemniej jednak, o ile jeszcze stosunkowo niedawno wydawało się, że jest to jedyna przyczyna objawów występujących u osób chorych na MPS, to badania biochemiczne, genetyczne, cytologiczne i inne, przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, iż patomechanizm tych chorób jest znacznie bardziej złożony.

Badania biochemiczne wykazały, że w komórkach pochodzących od pacjentów z różnymi typami MPS gromadzą się nie tylko cząsteczki GAG, lecz również inne związki. To wtórne spichrzanie może być spowodowane bądź to ogólnym upośledzeniem funkcji lizosomów, bądź też specyficznym hamowaniem konkretnych hydrolaz lizosomalnych przez nadmiar GAG. Wtórному spichrzeniu w komórkach MPS ulegają przede wszystkim glikosfingolipidy, fosfolipidy oraz cholesterol [32]. Szczególnie ta pierwsza z wymienionych grup związków może w istotny sposób wpływać na przebieg choroby, jako że akumulacja glikosfingolipidów w ośrodkowym układzie nerwowym prowadzi do poważnych zaburzeń funkcjonalnych, czego przykładem jest bardzo ciężki przebieg lizosomalnych chorób spichrzniowych, w których związki te nie mogą być degradowane pierwotnie w wyniku defektów specyficznych enzymów.

Bardzo ciekawą informacją było stwierdzenie, że w mózgu myszy chorych na MPS IIIB dochodzi do gromadzenia się hiperfosforylowanej formy białka tau (tzw. P-tau) [33]. Białko takie jest akumulowane również w niektórych innych chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Alzheimera. Te odkrycia świadczą o tym, iż podobne

mechanizmy mogą leżeć u podstaw zmian patologicznych obserwowanych w przypadku mukopolisacharydoz oraz innych schorzeń przebiegających z ciężkimi objawami ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

Wtórne spichrzanie różnych związków w komórkach pacjentów chorych na MPS może wynikać z ogólnych zaburzeń w funkcjonowaniu aparatu lizosomalnego. Stwierdzono bowiem niedawno, że w komórkach myszy stanowiących model badawczy dla MPS IIIA występuje zwiększona liczba autofagosomów w porównaniu ze zdrowymi zwierzętami [34]. Wyniki te sugerują zaburzenia w łączeniu się autofagosomów z lizosomami, co może skutkować poważnymi zaburzeniami procesu autofagii i wtórnym gromadzeniem się różnych związków. Podobne zjawisko obserwowano w komórkach pacjentów cierpiących na MPS VI oraz w komórkach szczurów dotkniętych tą chorobą [35]. Dodatkowo, u pacjentów z MPS VI wykryto akumulację poliubikwitynowanych białek — co sugeruje zaburzenie procesu proteolizy, jak również zaburzenia funkcji mitochondriów [35]. Ta ostatnia cecha może wynikać z akumulacji uszkodzonych mitochondriów w komórkach defektywnych w procesie autofagii.

Zaburzenia funkcjonowania układu kostnego u pacjentów cierpiących na MPS może wynikać z nieprawidłowości w funkcjonowaniu niektórych enzymów ważnych dla prawidłowego rozwoju kości i chrząstek. Wyniki niedawno opublikowanych badań wskazują, że w przypadku MPS I występuje zwiększenie liczby osteoklastów produkujących katepsynę K, przy równoczesnym obniżeniu wydajności degradacji chrząstek — procesu zależnego od aktywności katepsyny K [36]. Wynikiem tego było nagromadzenie się tkanki chrzęstnej w płytkach wzrostowych kości myszy chorych na MPS I [36].

Niedawno opisanymi objawami występującymi w niektórych typach MPS (w typie I, II i III, ale nie w typie IV i VI) są zmiany w morfologii włosów [37,38]. Zmiany te są dobrze widoczne w badaniach prowadzonych z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego [37,38]. Nie są znane biochemiczne mechanizmy tego zjawiska, niemniej jednak wydaje się, że obserwowane efekty mogą być wynikiem zaburzeń w metabolizmie białek związanych z budową i funkcją tkanki łącznej [39].

Zastanawiające i do niedawna niemal zupełnie nieznanymi były mechanizmy prowadzące do ciężkich zaburzeń funkcjonalnych ośrodkowego układu nerwowego u pacjentów z neuronopatycznymi formami MPS. Ostatnie badania wskazują na dużą rolę jaką w tych zaburzeniach mogą odgrywać takie procesy jak odpowiedź autoimmunologiczna [40], podwyższony poziom stresu oksydacyjnego oraz zwiększona cytotoksyczność [41]. Wszystkie one były obserwowane w przypadku choroby Sanfilippo (konkretnie MPS IIIB), mukopolisacharydozy, w przypadku której objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego są szczególnie ciężkie [40,41]. Procesy zapalne ogólnie wydają się odgrywać dużą rolę w rozwoju objawów neurologicznych u pacjentów z MPS III. Niezwykle ciekawą i ważną obserwacją było niedawne stwierdzenie, że u myszy chorych na MPS IIIB występuje znacznie obniżony poziom synaptofizyny, biał-

ka stanowiącego istotny komponent błony pęcherzyków synaptycznych [42]. Dokładniejsze badania wykazały, że zwiększony poziom GAG (w szczególności siarczanu heparanu) stymuluje degradację synaptofizyny przez proteasom [42]. Brak odpowiedniego poziomu synaptofizyny może w istotny sposób upośledzać przekazywanie sygnałów przez synapsy, prowadząc do poważnych zaburzeń zarówno poznawczych jak i behawioralnych.

W przypadku objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego intrygujące są różnice w zachowaniu pacjentów cierpiących na różne typy MPS. Jeśli objawy tego typu występują u chorych na MPS I (czyli w podtypie IH), pacjenci ci wykazują stopniowe spowalnianie funkcji poznawczych jak również rozumienia poleceń czy możliwości porozumiewania się, jednakże pozostają dziećmi pogodnymi i łagodnymi. Z kolei u dzieci chorych na MPS typu II i typu III zaburzenia funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego wiążą się dodatkowo z hiperaktywnością, bezsennością oraz zachowaniami określanymi jako agresywne (choć nie spełniają one psychologicznej definicji takich zachowań), aczkolwiek tego typu objawy są znacznie silniej wyrażone u pacjentów cierpiących na MPS III niż w przypadku MPS II. Rezultaty niedawnej analizy teoretycznej, biorącej pod uwagę budowę chemiczną fragmentów GAG występujących w przypadku każdego z typów MPS, silnie sugerują, że za pojawianie się tak różnych zaburzeń behawioralnych mogą być odpowiedzialne różnice w obecności specyficznych grup chemicznych w cząsteczkach monosacharydów stanowiących substraty dla enzymów defektywnych w poszczególnych typach MPS [43]. Brak możliwości usunięcia lub modyfikacji tych monosacharydów powoduje, że określone grupy chemiczne pozostają wolne w terminalnych jednostkach GAG, mogąc potencjalnie wchodzić w różnego typu reakcje chemiczne i tym samym zaburzać procesy przewodzenia sygnałów nerwowych w mózgu [43].

Na podstawie wyżej przedstawionych faktów widać wyraźnie, że pierwotne zaburzenia degradacji GAG wywołują szereg bardzo poważnych wtórnych zmian biochemicznych w organizmach pacjentów. Przekłada się to na postrzeganie patomechanizmu MPS jako procesu dużo bardziej złożonego niż mogłoby się to wydawać w przypadku chorób spowodowanych mutacjami w pojedynczych genach. W tym świetle warto również sobie zdawać sprawę z jeszcze bardziej pośrednich zaburzeń funkcjonowania organizmów osób chorych na MPS. Przykładem tego mogą być chociażby przewlekłe biegunki, których przyczyn fizjologicznych upatruje się bądź w infekcjach przewodu pokarmowego wywołanych nietypowymi patogennymi mikroorganizmami [44], bądź w zaburzeniach perystaltyki jelit [45]. Obie te przyczyny biegunek mogą wynikać z gromadzenia się niezdegradowanych cząsteczek GAG bądź w komórkach jelita, bądź w świetle jelita, na skutek ich wydostawania się z masowo uszkodzonych komórek, bądź też w zwojach układu przywspółczulnego.

## LECZENIE W MUKOPOLISACHARYDOZACH

Jak stwierdzono w poprzednim rozdziale, mimo iż nie do końca rozumiemy patofizjologię lizosomalnych chorób spichrzeniowych, nie ma wątpliwości, że akumulacja materia-

łu spichrzanego jest pierwotnym czynnikiem patogennym, który uruchamia powstawanie strukturalnych i biochemicznych zmian wtórnych (jak np. rozwój procesów zapalnych czy zaburzenia funkcji kanałów jonowych) i prowadzi do inicjacji choroby oraz jej progresji. Usunięcie materiału podlegającego patologicznemu spichrzeniu powinno zatem być głównym celem terapeutycznym w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych, w tym mukopolisacharydoz [46].

Ponad 40 lat temu Elizabeth Neufeld wraz z zespołem przeprowadziła pionierskie eksperymenty, w których wykazano, że defekt metaboliczny w hodowli fibroblastów pobranych od pacjenta z chorobą Hurler (MPS IH) lub z chorobą Huntera (MPS II) można kompensować poprzez hodowanie tych komórek w obecności fibroblastów pobranych od osoby zdrowej bądź podczas prowadzenia hodowli mieszanej złożonej z fibroblastów obu typów MPS. Efekt ten wywołany jest obecnością tzw. czynników korygujących, będących odpowiednikami deficytowych enzymów lizosomalnych i wydzielanych przez komórki nie posiadające tego samego defektu [47,48]. Później wykazano, że czynnikiem kompensacyjnym są enzymy pobierane spoza komórki do przedziału lizosomalnego poprzez endocytozę zależną od receptora mannozo-6-fosforanowego. Co ciekawe, tylko 1-5% prawidłowej aktywności komórkowej danego enzymu jest niezbędne do skutecznego skorygowania defektu metabolicznego [46]. To właśnie te doświadczenia stały się podstawą do opracowania strategii terapeutycznych bazujących na dostarczeniu odpowiedniego enzymu lizosomalnego bezpośrednio w formie tzw. enzymatycznej terapii zastępczej lub w sposób pośredni poprzez przeszczepienie szpiku kostnego.

## PRZESZCZEPIENIE SZPIKU KOSTNEGO LUB HEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Potencjalny korzystny wpływ przeszczepienia szpiku kostnego lub krwiotwórczych komórek macierzystych w przypadku lizosomalnych chorób spichrzeniowych opiera się na zastąpieniu makrofagów pacjenta z deficytem aktywności enzymu lizosomalnego przez pulę komórek wywodzących się ze szpiku zdrowego dawcy, a więc z prawidłową aktywnością danego enzymu, które przyjmują postać komórek Kupffera (makrofagów osadzonych w płucach, śledzionie, węzłach chłonnych, migdałkach oraz jamie otrzewnej) oraz komórek mikrogleju (makrofagów rezydujących w obrębie ośrodkowego układu nerwowego).

Stosunkowo dobre rezultaty z zastosowaniem tego typu leczenia uzyskano w przypadku pacjentów z chorobą Hurler (MPS IH), którym przeszczepiono szpik a procedurę tę wykonano przed osiągnięciem drugiego roku życia [6]. Długoterminowe badania tak leczonych pacjentów wykazały, że przeszczepienie zaowocowało obniżeniem ilości wydalanego glikozoaminoglikanu, poprawą parametrów oddechowych, zmniejszeniem wielkości wątroby oraz ustabilizowaniem funkcji serca i zatrzymaniem bądź spowolnieniem zaburzeń neurologicznych [49,50]. Niemniej jednak, terapia ta okazała się być nieskuteczna w odniesieniu do układu kostnego [51].

U pacjentów z MPS II oraz MPS III, którym poddano zabiegom przeszczepienia, zaobserwowano brak poprawy



lub tylko niewielką poprawę stanu zdrowia. Przyczyna nieskuteczności tego typu leczenia w obu tych typach MPS pozostaje nieznana. Również w przypadku pacjentów z MPS typu IV, u których głównie dochodzi do zajęcia układu kostnego, przeszczepienie szpiku kostnego nie ma wpływu na postęp choroby [52]. Dodatkowym mankamentem tego rodzaju terapii jest stosunkowo wysoka śmiertelność wśród pacjentów z powodu odrzucenia przeszczepu oraz częste inne powikłania, takie jak infekcja, krwotok, endokrynopatia czy rozwój nowotworów wtórnych [1,53].

## ENZYMATYCZNA TERAPIA ZASTĘPCZA

Rozwinięte techniki rekombinacji DNA oraz wydajnej produkcji rekombinowanych ludzkich białek umożliwiają obecnie wyprodukowanie dużych ilości enzymu o wysokiej czystości i jego praktyczne zastosowanie w leczeniu chorób w postaci strategii terapeutycznej określanej mianem enzymatycznej terapii zastępczej (ERT, ang. *enzyme replacement therapy*). Polega ona na podawaniu odpowiedniego enzymu lizosomalnego o prawidłowej aktywności, którego brakuje w komórkach chorych. W większości przypadków ludzkie rekombinowane enzymy są produkowane w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO, ang. *Chinese hamster ovary cells*), a związane z nimi glikozydowe łańcuchy podlegają modyfikacjom mającym na celu wprowadzenie znacznika mannozo-6-fosforanowego, będącego swoistym sygnałem kierującym białko do lizosomów [1,46].

Pierwszą zatwierdzoną w 1991 roku przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*) i wprowadzoną do stosowania była enzymatyczna terapia zastępcza w chorobie Gauchera [54]. W chwili obecnej enzymatyczna terapia zastępcza jest dostępna dla kilku lizosomalnych chorób spichrzeniowych a nad wieloma prowadzone są badania lub trwają testy kliniczne obejmujące jej opracowanie i zweryfikowanie skuteczności terapeutycznej.

W przypadku mukopolisacharydoz, enzymatyczna terapia zastępcza jest dostępna dla MPS I, MPS II oraz MPS VI. Badania kliniczne oraz długofalowe badania skuteczności i bezpieczeństwa enzymatycznej terapii zastępczej z zastosowaniem rekombinowanej  $\alpha$ -L-iduronidazy wykazały znaczne obniżenie ilości glikoaminoglikanów wydalanych z moczem, poprawę funkcji oddechowych, ruchomości stawów, redukcję wielkości wątroby i śledziony oraz poprawę wytrzymałości zmierzoną jako wydłużenie dystansu pokonywanego przez pacjentów w przeprowadzonym teście 6-minutowego marszu [55,56]. W czerwcu 2003 roku leczenie z zastosowaniem preparatu Aldurazyme® [Genzyme] zostało zatwierdzone przez Europejską Agencję ds. Leków (EMA).

Późniejsze badania kliniczne w grupie pacjentów z MPS typu VI otrzymujących rekombinowaną ludzką arylosulfatazę B (rhASB) wykazały obniżenie ilości GAG wydalanych z moczem, znaczącą poprawę wytrzymałości pacjentów polegającą na wydłużeniu dystansu pokonywanego przez pacjentów w przeprowadzonym teście 12-minutowego marszu oraz zwiększeniu liczby stopni, na które dany pacjent był w stanie się wspiąć podczas 3-minutowego testu wcho-

dzenia po schodach, jak również obniżenie odczucia bólu, zmniejszenie wielkości wątroby i śledziony [57-59]. Badania te zaowocowały wprowadzeniem na rynek preparatu Naglazyme® [BioMarin], który uzyskał zatwierdzenie EMA w styczniu 2006 roku.

Badania kliniczne prowadzone nad ludzką rekombinowaną sulfatazą iduronianu w leczeniu choroby Huntera (MPS II) wykazały znaczną poprawę funkcji układu sercowo-płucnego, zmniejszenie wielkości wątroby i śledziony oraz obniżenie ilości wydalanych GAG z moczem pacjentów [60]. Preparat enzymatyczny o nazwie Elaprase® [Shire] dopuszczono do stosowania w Europie w styczniu 2007 roku.

Jak każdy rodzaj terapii, tak i enzymatyczna terapia zastępcza nie jest doskonała. Regularne dożylnie podawanie białka jest związane z ryzykiem wytworzenia przeciwciał, które mogą potencjalnie prowadzić do powstania odczynów alergicznych lub inaktywacji podawanego enzymu. Podczas badań klinicznych nad enzymatyczną terapią zastępczą w MPS I obserwowano łagodne reakcje alergiczne, głównie w postaci bladości, gorączki, bólów głowy czy wysypki, które związane były z podawaniem enzymu, jednak w żadnym z przypadków nie wymagały one interwencji medycznej czy przerwania infuzji [55]. Podwyższony poziom przeciwciał, należących do podklasy IgG, w odpowiedzi na obecność rekombinowanej  $\alpha$ -L-iduronidazy spadał już w 26 tygodniu leczenia a w 104 tygodniu ich miano u większości pacjentów osiągało prawidłowy poziom sugerując, że pacjenci ci rozwinęli tolerancję immunologiczną względem podawanego preparatu enzymatycznego [61]. Podobne obserwacje zanotowane podczas badań klinicznych terapii enzymatycznych dla MPS VI oraz MPS II pozwalają twierdzić, że enzymatyczna terapia zastępcza jest dobrze tolerowana przez pacjentów.

Rekombinowany enzym podany dożylnie dociera do większości tkanek i jest skuteczny w leczeniu wielu objawów somatycznych choroby. Jednak okazało się, że duże cząsteczki enzymu nie są w stanie przeniknąć przez barierę krew-mózg i dotrzeć do ośrodkowego układu nerwowego powodując, że stosowane preparaty nie są skuteczne w leczeniu objawów neurologicznych występujących w wielu podtypach mukopolisacharydoz. Problemy z dostarczeniem enzymu do tkanek docelowych dotyczą też układu kostnego i zastawek serca. Enzymatyczna terapia zastępcza okazuje się być mało skuteczną metodą w leczeniu objawów z ich strony [46].

W chwili obecnej prowadzone są liczne badania nad sposobami ominięcia bariery krew-mózg i dostarczenia enzymu do mózgu w ilościach umożliwiających uzyskanie efektu terapeutycznego. Badania na mysim modelu MPS VII wykazały, że stosowanie wyższych niż konwencjonalne dawek enzymu przez długi czas prowadzi do wykrywania aktywności enzymu i obniżenia spichrzenia w obrębie struktur mózgu [62]. Podawanie preparatu enzymatycznego dooponowo do płynu mózgowo-rdzeniowego również prowadzi do zwiększenia jego penetracji w głąb struktur mózgu i zmniejszenia objawów neurologicznych w mysim modelu MPS IIIA [63] czy też psim modelu MPS I [64,65].

Proponowanym sposobem jest dostarczenie enzymu do mózgu poprzez endocytozę zależną od receptora transferyny, którego wysoki poziom syntezy cechuje komórki śródbłonna formujące barierę krew-mózg. Sprzężenie  $\alpha$ -L-iduronidazy z transferyną umożliwiło transport enzymu do ośrodkowego układu nerwowego powodując w efekcie obniżenie ilości GAG u myszy z MPS I [66]. Wyznakowanie ludzkiej  $\beta$ -glukuronidazy krótkim peptydem złożonym z kwaśnych aminokwasów skutkowało 5-krotnym wydłużeniem czasu jej półtrwania we krwi i bardziej efektywnym dostarczaniem enzymu do kości, szpiku kostnego i mózgu w badaniach na mysim modelu MPS VII [67]. Innym potencjalnym sposobem wydaje się być zwiększenie wydajności transportu enzymu na drodze zależnej od receptorów mannozo-6-fosforanowych. Ten rodzaj transportu jest obecny u nowonarodzonych myszy i ulega utracie podczas dojrzewania i procesu zamykania bariery krew-mózg. W badaniach na mysim modelu MPS VII wykazano, że epinefryna indukuje syntezę receptora M6P i przywraca tę drogę transportu enzymu [68].

Ten sam model zwierzęcy (myszy chore na MPS VII) posłużył ostatnio do zaproponowania trzech alternatywnych metod dostarczania rekombinowanego enzymu lizosomalnego do właściwego miejsca jego działania [69]. Po pierwsze, stworzono białko fuzyjne złożone z insulino-podobnego czynnika wzrostowego II (IGF-II) z  $\beta$ -glukuronidazą w celu jego dostarczenia do lizosomów poprzez miejsce wiążące IGF-II na dwufunkcyjnym receptorze IGF-II/M6P. Po drugie, skonstruowano fuzyjne białko zawierające  $\beta$ -glukuronidazę oraz złożony z 11 reszt aminokwasowych fragment białka Tat wirusa HIV, które może być dostarczane do lizosomów poprzez endocytozę (efektywną dzięki obecności fragmentu białka Tat). Po trzecie, skonstruowano białko fuzyjne złożone z  $\beta$ -glukuronidazy oraz fragmentu  $F_c$  ludzkiej immunoglobuliny G (IgG). Takie białko może być transportowane poprzez noworodkowy receptor  $F_c$  z krwioobiegu matki poprzez łożysko do miejsc spichrzania się substancji w tkankach płodu. Te podejścia eksperymentalne stwarzają szansę wprowadzenia istotnych modyfikacji do enzymatycznej terapii zastępczej, w tym do leczenia płodu w przypadku zdiagnozowania MPS w okresie prenatalnym [69].

## CZĘŚCIOWE ZAHAMOWANIE SYNTEZY SUBSTRATU

Celem terapii takich jak przeszczepienie szpiku kostnego czy enzymatyczna terapia zastępcza jest usunięcie spichrzanego materiału poprzez dostarczenie do komórek brakującego enzymu lizosomalnego. Liczne badania prowadzone są jednak nad innym podejściem terapeutycznym, opartym na zahamowaniu biosyntezy związków, których dotyczy dany defekt metaboliczny, w celu zmniejszenia ich dopływu do katabolicznie upośledzonego aparatu lizosomalnego. To podejście zakłada częściowe zahamowanie syntezy *de novo* akumulowanych makrocząstek. Można to uzyskać poprzez zastosowanie niskocząsteczkowego inhibitora, a jeśli uda się zredukować efektywność syntezy substratu do poziomu, w którym resztkowa aktywność defektywnego enzymu biorącego udział w ich rozkładzie będzie wystarczająca do zapobiegania patologicznemu spichrzeniu, to można liczyć na uzyskanie efektów terapeutycznych [46].

Skuteczność terapii opartej na częściowym zahamowaniu syntezy substratu opiera się zatem na przywróceniu równowagi pomiędzy biosyntezą a degradacją tych związków. Jeśli cząsteczki takiego potencjalnego inhibitora będą relatywnie małe i zdolne do przekraczania bariery krew-mózg to istnieje szansa, że będą one skuteczne w obniżeniu spichrzania nie tylko w tkankach somatycznych ale także w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [70].

Pierwszą lizosomalną chorobą spichrzeniową, dla której wprowadzono leczenie oparte na częściowym zahamowaniu syntezy substratu była choroba Gauchera. Wykazano, że stosowanie *N*-butylodeoksyjrymycyny (NB-DNJ, OGT 918) w postaci leku o nazwie miglustat lub Zavesca® [Actelion Pharmaceuticals Ltd.], który jest inhibitorem syntezy glukozyloceramidów, zmniejsza wielkość wątroby i śledziona [71] oraz powoduje zmniejszenie dolegliwości ze strony układu kostnego [72], występujące w przebiegu choroby Gauchera typu I (forma nieneuronopatyczna). Połączenie enzymatycznej terapii zastępczej z podawaniem miglustatu spowodowało złagodzenie objawów neurologicznych po dwuletniej terapii pacjenta z neuronopatyczną formą choroby Gauchera (typ III) [73]. Obecnie prowadzone są też badania nad zastosowaniem miglustatu w leczeniu choroby Niemann-Picka typu C [74].

Niedawno opracowano potencjalną metodę terapeutyczną dla mukopolisacharydoz opartą na częściowym zahamowaniu syntezy substratu. W tym przypadku zastosowano genisteinę [5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenilo)-4*H*-1-benzopiran-4-on], naturalny związek z grupy izoflawonów, która skutecznie hamuje syntezę glikozoaminoglikanów oraz zmniejsza ich spichrzanie w fibroblastach. Stwierdzono skuteczność tego związku w hamowaniu syntezy GAG w komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na różne typy mukopolisacharydoz (MPS I, II, IIIA oraz IIIB) [75]. Genisteina hamuje aktywność kinazy receptora naskórkowego czynnika wzrostowego (EGF), stąd przypuszcza się, iż obniża wydajność ekspresji genów kodujących niektóre enzymy zaangażowane w syntezę GAG [76]. Krótkoterminowe badania na modelach zwierzęcych MPS II i MPS IIIB potwierdziły efektywność terapii z zastosowaniem genisteiny w stosunku do tkanek somatycznych [77,78]. Natomiast długoterminowe (niemal roczne) testy z użyciem stosunkowo dużej dawki genisteiny (160 mg/kg/dzień) wykazały efekty zmniejszenia się spichrzania zarówno GAG jak i wtórnie akumulowanych substancji (w szczególności gangliozydów) w mózgu, ograniczenie reakcji zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym oraz zwiększenie wydajności tworzenia się synaps [79]. Co jednak najważniejsze, w doświadczeniach tych zaobserwowano całkowitą normalizację zachowań zwierząt, którym podawano genisteinę w przeciwieństwie do grupy chorych zwierząt kontrolnych, u których występowały wyraźne zaburzenia behawioralne w postaci hiperaktywności i drastycznie obniżonej zdolności do uczenia się [79]. W otwartej pilotowej próbie klinicznej przeprowadzonej na grupie 10 pacjentów cierpiących na chorobę Sanfilippo (MPS typu IIIA oraz IIIB), którym przez okres 12 miesięcy podawano bogaty w genisteinę preparat izoflawonów sojowych (preparat o nazwie SE-2000 produkowany przez firmę Biofarm) wykazano skuteczność tego

związku w obniżaniu poziomu GAG wydalanych z moczem oraz poprawę morfologii włosów, a także poprawę funkcji poznawczych i zachowania [80]. Ostatnio wykazano, że mieszanki różnych izoflawonów mogą być bardziej skuteczne w obniżaniu poziomu GAG w komórkach MPS IIIA i MPS VII niż poszczególne związki stosowane pojedynczo [81]. Niemniej jednak, niektóre ekstrakty izoflawonów sojowych mogą mieć działanie wręcz przeciwne w porównaniu do efektów stwierdzanych dla oczyszczonej genisteiny, co wskazuje na konieczność ostrożnego doboru mieszanin izoflawonów w przypadku ewentualnej terapii [82].

Inną substancją badaną w przypadku mukopolisacharydozy jest rodamina B. Związek ten skutecznie ogranicza syntezę GAG oraz obniża ich spichrzanie w hodowlach komórek pobranych od chorych na MPS VI oraz MPS IIIA. Doświadczenia na mysim modelu MPS IIIA wykazały zmniejszenie wielkości wątroby, ilości wydalanych GAG oraz całkowitej zawartości GAG w wątrobie i mózgu u zwierząt, którym podawano rodaminę B [83]. Testy behawioralne wykazały również korzystny wpływ rodamin B na funkcjonowanie układu nerwowego w postaci poprawy pamięci i zdolności uczenia się myszy MPS IIIA poddanych leczeniu [84]. Problemem przy ewentualnych próbach zastosowania rodamin B jako leku jest toksyczność tego związku w przypadku podania go w większych ilościach. W badaniach na zwierzętach stwierdzano pojawianie się polipów i guzów jelita przy podawaniu doustnym, nowotworów wątroby i zmian skórnych przy podawaniu podskórnym oraz atrofii bądź nowotworów wątroby przy podawaniu dożylnym [85-88]. Niemniej jednak, ostatnie badania sugerują, że długotrwałe podawanie niskich dawek rodamin B nie wywołuje u zwierząt efektów niepożądanych [89].

Specyficzną odmianą terapii polegającej na częściowym zahamowaniu syntezy substratu jest zastosowanie zjawiska interferencji RNA. Użycie małych interferujących cząsteczek RNA (siRNA) powoduje wyciszenie ekspresji specyficznych genów. Jeśli zatem zastosuje się siRNA specyficzne dla genów kodujących enzymy niezbędne do syntezy GAG, to można selektywnie zahamować produkcję tych związków. Podejście takie zastosowano ostatnio z powodzeniem w celu obniżenia wydajności syntezy GAG w komórkach MPS I oraz MPS IIIA [90,91].

## TERAPIA GENOWA

W chwili obecnej prowadzone są liczne badania nad opracowaniem terapii genowych w leczeniu mukopolisacharydoz oraz innych lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Celem tych terapii jest wprowadzenie do komórek z deficytem enzymów lizosomalnych wektorów wirusowych (adenowirusowych, retrowirusowych lub lentiwirusowych) niosących prawidłową kopię genu i utrzymanie produkcji enzymu o prawidłowej aktywności na poziomie umożliwiającym rozkład spichrzanego materiału. Wektor przenoszący gen może być podany bezpośrednio do tkanki lub do krwiobiegu (terapia genowa *in vivo*) lub poprzez przeszczepienie uprzednio transfekowanych i zmodyfikowanych genetycznie komórek (terapia genowa *ex vivo*) [92,93].

Obiecujące efekty skuteczności terapii genowej przynoszą eksperymenty prowadzone na różnych modelach zwierzęcych MPS. Badania na mysim modelu MPS IIIA [94] czy też mysim i psim modelu MPS VII [95,96] wykazały efektywną transdukcję komórek tych zwierząt po dożylnym podaniu różnych wektorów wirusowych niosących geny odpowiednich enzymów lizosomalnych. Obserwowany był wzrost aktywności danego enzymu w wątrobie i śledzionie oraz obniżenie i normalizacja spichrzania GAG w różnych tkankach somatycznych przy zróżnicowanej odpowiedzi ze strony układu nerwowego. Dokanałowe podanie wektorów wirusowych do ośrodkowego układu nerwowego przeprowadzone na mysim modelu MPS I okazało się być bardzo wydajnym sposobem dostarczenia ich do mózgu i prowadziło do uzyskania eliminacji spichrzania lizosomalnego, przy czym aktywność  $\alpha$ -L-iduronidazy była zależna od zastosowanej dawki wektora [97].

Ostatnie lata przyniosły istotny postęp w rozwoju terapii genowych ukierunkowanych na leczenie MPS. Przykładami mogą być bardzo zachęcające wyniki badań z wykorzystaniem modeli komórkowych i zwierzęcych, m.in. MPS I [98,99], MPS II [100], MPS IIIA [101,102], MPS IIIB [103,104], MPS IVA [105], MPS VII [106]. Co ważne, uzyskano pozytywne wyniki w dostarczaniu rekombinowanych, aktywnych genów do centralnego układu nerwowego.

## INNE PODEJŚCIA TERAPEUTYCZNE

W fazie badań znajdują się terapie z wykorzystaniem farmakologicznych „chaperonów”. Mutacje punktowe bądź małe delecje często prowadzą do nieprawidłowego fałdowania powstających polipeptydów bez wpływu na ich domeny katalityczne. Związki stosowane jako „chaperony” miałyby ułatwiać stabilizację takich źle sfałdowanych białek i asystować w procesie powtórnej ich fałdowania, umożliwiając tym samym zwiększenie ilości aktywnych cząsteczek enzymu w lizosomach [46,92].

Odmiernym, od wcześniej wymienionych, podejściem terapeutycznym jest potencjalne użycie związków, które pozwalają na przejście translacji (podczas biosyntezy białek na rybosomach) przez kodony „stop”. W ten sposób istnieje szansa na częściowe zniwelowanie deficytu aktywności enzymów w przypadkach gdy pacjenci mają przynajmniej w jednym allelu mutację typu „nonsens”. Wstępnie testowane substancje, których efektem była częściowa supresja mutacji takiego typu, np. gentamycyna, charakteryzowały się stosunkowo wysoką toksycznością. Jednakże nowsze pochodne związków tego typu wykazują zarówno większe bezpieczeństwo w potencjalnym użyciu terapeutycznym jak też większą skuteczność działania [107].

Cały czas trwają poszukiwania nowych podejść terapeutycznych, które wykorzystywałyby ostatnie osiągnięcia biochemii i genetyki molekularnej. Przykładem może być propozycja zastosowania antagonistów czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) w leczeniu MPS, szczególnie w odniesieniu do objawów ze strony układu kostno-stawowego [108].

## PODSUMOWANIE

Mukopolisacharydozy są jednymi z lepiej poznanych chorób dziedzicznych jeśli chodzi o mechanizmy molekularne patogenezy. Duży postęp w poznaniu tych mechanizmów dokonał się w ostatnich latach, niemniej jednak szczególnie patomechanizmów prowadzących do występowania poszczególnych objawów MPS wciąż wymagają intensywne badania. Wystarczy wspomnieć, że w dalszym ciągu niezwykle trudno jest przewidzieć przebieg choroby u danego pacjenta nawet jeśli znane są jego mutacje w konkretnym genie kodującym jedną z hydrolaz i oznaczony jest poziom resztkowej aktywności produktu tego genu. Dopiero niedawno zaproponowano, że analiza pojedynczych parametrów (np. genotypu, poziomu wydalania GAG z moczem czy aktywności enzymu) nie jest wystarczająca do prognozy odnośnie ciężkości objawów choroby oraz tempa jej rozwoju. Aby podjąć w miarę skuteczne próby takich przewidywań konieczna jest jednoczesna analiza kilku czynników, w tym nie tylko związanych z upośledzeniem degradacji GAG, ale także wpływających na efektywność syntezy tych związków w komórkach [109,110].

Wiedza zdobyta w badaniach nad mechanizmami mukopolisacharydoz umożliwiła rozwój nowych podejść terapeutycznych. Należy zauważyć, że mukopolisacharydozy należą do jednych z pierwszych chorób o podłożu genetycznym, dla których wprowadzono nowatorskie i w miarę skuteczne metody lecznicze [111,112]. Ponadto okazało się, że metody czy nawet substancje stosowane w próbach leczenia MPS mogą być użyteczne w znaczeniu szerszym aspekcie, a mianowicie w leczeniu podobnych chorób [70,113]. Z drugiej strony, wydaje się, iż zarówno w przypadku MPS jak i przynajmniej niektórych innych chorób genetycznych użycie jakiegokolwiek pojedynczej metody leczenia nie może dać optymalnych rezultatów terapeutycznych. Prawdopodobnie zatem w niedalekiej przyszłości różnego rodzaju terapie będą stosowane synergistycznie w celu wykorzystania zalet każdej z nich i uzyskania jak najlepszych efektów terapeutycznych.

## PÍSMIENICTWO

1. Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses, W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill Co., New York, str. 3421-3452
2. Wraith JE (1996) Mucopolysaccharidoses. *Curr Paediatr* 6: 74-79
3. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschutter A, Kampmann C, Beck M (2005) Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis* 28: 1011-1017
4. Wraith JE (1995) The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 72: 263-267
5. Muenzer J (2004) The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr* 144: S27-34
6. Wilcox WR (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144: 3-14
7. Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Brooks DA, Hopwood JJ, Morris CP (1992) Alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat* 1: 333-339
8. Scott HS, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP (1992) A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat* 1: 103-108
9. Bach G, Eisenberg F, Jr., Cantz M, Neufeld EF (1973) The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2134-2138
10. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F (1993) Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet* 2: 5-10
11. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP (1993) Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 17: 773-775
12. Timms KM, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Gu Y, Nelson DL, Gibbs RA (1995) 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfate sulfatase locus. *Genome Res* 5: 71-78
13. Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A (1993) Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 2: 435-442
14. Wehnert M, Hopwood JJ, Schroder W, Herrmann FH (1992) Structural gene aberrations in mucopolysaccharidosis II (Hunter). *Hum Genet* 89: 430-432
15. Beck M, Steglich C, Zabel B, Dahl N, Schwinger E, Hopwood JJ, Gal A (1992) Deletion of the Hunter gene and both DXS466 and DXS304 in a patient with mucopolysaccharidosis type II. *Am J Med Genet* 44: 100-103
16. Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tonnesen T, Carlberg BM, Pettersson U (1995) Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 4: 615-621
17. Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Bozon D (2000) MPS II in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet* 37: E29
18. Mossman J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M (1983) Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch Dis Child* 58: 911-915
19. Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimozawa N, Fukuda S, Isogai K, Nishio H, Matsuo M, Tomatsu S, Kondo N, Orii T (1997) Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele. *Hum Mutat* 10: 361-367
20. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA (2005) Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol* 32: 270-272
21. Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN (1991) Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet* 49: 289-297
22. Clarke JT, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Richards RI, Sutherland GR, Ray PN (1992) Characterization of a deletion at Xq27-q28 associated with unbalanced inactivation of the nonmutant X chromosome. *Am J Hum Genet* 51: 316-322
23. Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcolm S (1992) Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am J Med Genet* 44: 834-838
24. Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, Sims KB, Rosenberg AE (1996) Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med* 335: 1029-1033
25. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (1999) *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman & Co., New York
26. Esko JD, Kimata K, Lindahl U (2008) *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*, W: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (red) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
27. Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U (2002) *Functional and molecular glycobiology*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK
28. Prydz K, Dalen KT (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113: 193-205

29. Kresse H, Cantz M, von Figura K, Glossl J, Paschke E (1981) The mucopolysaccharidoses: biochemistry and clinical symptoms. *Klin Wochenschr* 59: 867-876
30. Freeze HH (2008) Genetic Disorders of Glycan Degradation, W: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (red.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
31. Klein U, Kresse H, von Figura K (1978) Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5185-5189
32. Walkley SU, Vanier MT (2009) Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta* 1793: 726-736
33. Ohmi K, Kudo LC, Ryazantsev S, Zhao HZ, Karsten SL, Neufeld EF (2009) Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8332-8337
34. Ballabio A (2009) Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47 Suppl 1: S34-38
35. Tessitore A, Pirozzi M, Auricchio A (2009) Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. *Pathogenetics* 2: 4
36. Wilson S, Hashamiyan S, Clarke L, Saftig P, Mort J, Dejica VM, Bromme D (2009) Glycosaminoglycan-mediated loss of cathepsin K collagenolytic activity in MPS I contributes to osteoclast and growth plate abnormalities. *Am J Pathol* 175: 2053-2062
37. Kloska A, Bohdanowicz J, Konopa G, Tylki-Szymanska A, Jakobkiewicz-Banecka J, Czartoryska B, Liberek A, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2005) Changes in hair morphology of mucopolysaccharidosis I patients treated with recombinant human alpha-L-iduronidase (aronidase, Aldurazyme). *Am J Med Genet A* 139: 199-203
38. Malinowska M, Jakobkiewicz-Banecka J, Kloska A, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Piotrowska E, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2008) Abnormalities in the hair morphology of patients with some but not all types of mucopolysaccharidoses. *Eur J Pediatr* 167: 203-209
39. Hinek A, Wilson SE (2000) Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastin-binding protein and elastic fiber assembly. *Am J Pathol* 156: 925-938
40. Killedar S, Dirosario J, Divers E, Popovich PG, McCarty DM, Fu H (2010) Mucopolysaccharidosis IIIB, a lysosomal storage disease, triggers a pathogenic CNS autoimmune response. *J Neuroinflammation* 7: 39
41. Villani GR, Di Domenico C, Musella A, Cecere F, Di Napoli D, Di Natale P (2009) Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res* 1279: 99-108
42. Vitry S, Ausseil J, Hocquemiller M, Bigou S, Dos Santos Coura R, Heard JM (2009) Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB. *Mol Cell Neurosci* 41: 8-18
43. Wegrzyn G, Jakobkiewicz-Banecka J, Narajczyk M, Wisniewski A, Piotrowska E, Gabig-Ciminska M, Kloska A, Slominska-Wojewodzka M, Korzon-Burakowska A, Wegrzyn A (2010) Why are behaviors of children suffering from various neuronopathic types of mucopolysaccharidoses different? *Med Hypotheses* 75: 605-609
44. Wegrzyn G, Kurlenda J, Liberek A, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Wegrzyn A (2005) Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. *BMC Pediatr* 5: 9
45. Sibilio M, Miele E, Ungaro C, Astarita L, Turco R, Di Natale P, Pontarelli G, Vecchione R, Andria G, Staiano A, Parenti G (2009) Chronic diarrhea in mucopolysaccharidosis IIIB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49: 477-480
46. Beck M (2007) New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum Genet* 121: 1-22
47. Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1968) Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* 162: 570-572
48. Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1969) The defect in Hurler and Hunter syndromes. II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 360-366
49. Whitley CB, Belani KG, Chang PN, Summers CG, Blazar BR, Tsai MY, Latchaw RE, Ramsay NK, Kersey JH (1993) Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am J Med Genet* 46: 209-218
50. Vellodi A, Young EP, Cooper A, Wraith JE, Winchester B, Meaney C, Ramaswami U, Will A (1997) Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Arch Dis Child* 76: 92-99
51. Field RE, Buchanan JA, Coppemans MG, Aichroth PM (1994) Bone-marrow transplantation in Hurler's syndrome. Effect on skeletal development. *J Bone Joint Surg Br* 76: 975-981
52. Peters C, Steward CG (2003) Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 31: 229-239
53. Wraith JE (2004) The management of lysosomal disorders. *Curr Paediatr* 14: 389-393
54. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE *et al* (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 324: 1464-1470
55. Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, Braakman T, Chadbourne E, Walton-Bowen K, Cox GF (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (aronidase). *J Pediatr* 144: 581-588
56. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakkis ED, Cox GF (2009) Long-term efficacy and safety of aronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 123: 229-240
57. Harmatz P, Whitley CB, Waber L, Pais R, Steiner R, Plecko B, Kaplan P, Simon J, Butensky E, Hopwood JJ (2004) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr* 144: 574-580
58. Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ (2005) Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics* 115: e681-689
59. Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu ZF, Wittes J, Berger KI, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ (2006) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr* 148: 533-539
60. Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Gucavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A (2006) A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 8: 465-473
61. Kakavanos R, Turner CT, Hopwood JJ, Kakkis ED, Brooks DA (2003) Immune tolerance after long-term enzyme-replacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. *Lancet* 361: 1608-1613
62. Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E, Pavloff N, Sly WS (2005) Overcoming the blood-brain barrier with high-dose en-

zyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14777-14782

63. Hemsley KM, Luck AJ, Crawley AC, Hassiotis S, Beard H, King B, Rozek T, Rozaklis T, Fuller M, Hopwood JJ (2009) Examination of intravenous and intra-CSF protein delivery for treatment of neurological disease. *Eur J Neurosci* 29: 1197-1214
64. Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M (2004) Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab* 83: 163-174
65. Dickson P, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Peinovich M, Hanson S, Passage M, Kakkis E (2007) Intrathecal enzyme replacement therapy: successful treatment of brain disease via the cerebrospinal fluid. *Mol Genet Metab* 91: 61-68
66. Osborn MJ, McElmurry RT, Peacock B, Tolar J, Blazar BR (2008) Targeting of the CNS in MPS-IH using a nonviral transferrin-alpha-L-iduronidase fusion gene product. *Mol Ther* 16: 1459-1466
67. Montano AM, Oikawa H, Tomatsu S, Nishioka T, Vogler C, Gutierrez MA, Oguma T, Tan Y, Grubb JH, Dung VC, Ohashi A, Miyamoto K, Orii T, Yoneda Y, Sly WS (2008) Acidic amino acid tag enhances response to enzyme replacement in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Genet Metab* 94: 178-189
68. Urayama A, Grubb JH, Banks WA, Sly WS (2007) Epinephrine enhances lysosomal enzyme delivery across the blood brain barrier by up-regulation of the mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12873-12878
69. Grubb JH, Vogler C, Sly WS (2010) New strategies for enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Rejuvenation Res* 13: 229-236
70. Jakobkiewicz-Banecka J, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2007) Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J Appl Genet* 48: 383-388
71. Pastores GM, Barnett NL, Kolodny EH (2005) An open-label, noncomparative study of miglustat in type I Gaucher disease: efficacy and tolerability over 24 months of treatment. *Clin Ther* 27: 1215-1227
72. Pastores GM, Elstein D, Hrebicek M, Zimran A (2007) Effect of miglustat on bone disease in adults with type 1 Gaucher disease: a pooled analysis of three multinational, open-label studies. *Clin Ther* 29: 1645-1654
73. Capablo JL, Franco R, de Cabezon AS, Alfonso P, Pocovi M, Giraldo P (2007) Neurologic improvement in a type 3 Gaucher disease patient treated with miglucerase/miglustat combination. *Epilepsia* 48: 1406-1408
74. Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE (2007) Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* 6: 765-772
75. Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Baranska S, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2006) Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet* 14: 846-852
76. Jakobkiewicz-Banecka J, Piotrowska E, Narajczyk M, Baranska S, Wegrzyn G (2009) Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *J Biomed Sci* 16: 26
77. Friso A, Tomanin R, Salvalaio M, Scarpa M (2010) Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Br J Pharmacol* 159: 1082-1091
78. Malinowska M, Wilkinson FL, Bennett W, Langford-Smith KJ, O'Leary HA, Jakobkiewicz-Banecka J, Wynn R, Wraith JE, Wegrzyn G, Bigger BW (2009) Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharidosis IIIb mice. *Mol Genet Metab* 98: 235-242
79. Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Langford-Smith A, Brown JR, Crawford BE, Vanier MT, Gryniewicz G, Wynn RF, Wraith JE, Wegrzyn G, Bigger BW (2010) Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One* 5: e14192
80. Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Liberek A, Maryniak A, Malinowska M, Czartoryska B, Puk E, Kloska A, Liberek T, Baranska S, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2008) Genistein-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr Ther Res Clin Exp* 63: 166-179
81. Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Scherman D (2010) Storage correction in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses types IIIA and VII after treatment with genistein and other isoflavones. *J Inher Metab Dis* 33: 61-67
82. Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Wegrzyn G (2010) Different amounts of isoflavones in various commercially available soy extracts in the light of gene expression-targeted isoflavone therapy. *Phytother Res* 24 Suppl 1: S109-113
83. Roberts AL, Thomas BJ, Wilkinson AS, Fletcher JM, Byers S (2006) Inhibition of glycosaminoglycan synthesis using rhodamine B in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Pediatr Res* 60: 309-314
84. Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S (2007) Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol Genet Metab* 92: 115-121
85. Webb JM, Hansen WH (1961) Studies of the metabolism of rhodamine B. *Toxicol Appl Pharmacol* 3: 86-95
86. Webb JM, Hansen WH, Desmond A, Fitzhugh OG (1961) Biochemical and toxicologic studies of rhodamine B and 3,6-diaminofluoran. *Toxicol Appl Pharmacol* 3: 696-706
87. Bonser GM, Clayson DB, Jull JW (1956) The induction of tumours of the subcutaneous tissues, liver and intestine in the mouse by certain dye-stuffs and their intermediates. *Br J Cancer* 10: 653-667
88. Hansen WH, Fitzhugh OG, Williams MW (1959) Subacute oral toxicity of nine D&C coal tar colors (Abstr 7789). *J Pharmacol Exp Ther* 122: 29A
89. Roberts AL, Fletcher JM, Moore L, Byers S (2010) Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab* 101: 208-213
90. Kaidonis X, Liaw WC, Roberts AD, Ly M, Anson D, Byers S (2010) Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet* 18: 194-199
91. Dziedzic D, Wegrzyn G, Jakobkiewicz-Banecka J (2010) Impairment of glycosaminoglycan synthesis in mucopolysaccharidosis type IIIA cells by using siRNA: a potential therapeutic approach for Sanfilippo disease. *Eur J Hum Genet* 18: 200-205
92. Matzner U (2005) *Therapy of lysosomal storage diseases, W: Saftig P (red) Lysosomes*. Springer, New York, str. 112-129
93. Sands MS, Davidson BL (2006) Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13: 839-849
94. McIntyre C, Derrick Roberts AL, Ranieri E, Clements PR, Byers S, Anson DS (2008) Lentiviral-mediated gene therapy for murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab* 93: 411-418
95. Ohashi T, Watabe K, Uehara K, Sly WS, Vogler C, Eto Y (1997) Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human beta-glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1287-1292
96. Mango RL, Xu L, Sands MS, Vogler C, Seiler G, Schwarz T, Haskins ME, Ponder KP (2004) Neonatal retroviral vector-mediated hepatic gene therapy reduces bone, joint, and cartilage disease in mucopolysaccharidosis VII mice and dogs. *Mol Genet Metab* 82: 4-19
97. Watson G, Bastacky J, Belichenko P, Buddhikot M, Jungles S, Vellard M, Mobley WC, Kakkis E (2006) Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice. *Gene Ther* 13: 917-925
98. Osborn MJ, McElmurry RT, Lees CJ, Defeo AP, Chen ZY, Kay MA, Naldini L, Freeman G, Tolar J, Blazar BR (2010) Minicircle DNA-based

- Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of alpha-L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Ther* doi:10.1038/mt.2010.1249
99. Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, D'Isa R, Ungaro D, Stok M, Sanvito F, Mariani E, Staszewsky L, Godi C, Russo I, Cecere F, Del Carro U, Rubinacci A, Brambilla R, Quattrini A, Di Natale P, Ponder K, Naldini L, Biffi A (2010) Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood* 116: 5130-5139
  100. Jung SC, Park ES, Choi EN, Kim CH, Kim SJ, Jin DK (2010) Characterization of a novel mucopolysaccharidosis type II mouse model and recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy. *Mol Cells* 30: 13-18
  101. McIntyre C, Byers S, Anson DS (2010) Correction of mucopolysaccharidosis type IIIA somatic and central nervous system pathology by lentiviral-mediated gene transfer. *J Gene Med* 12: 717-728
  102. Lau AA, Hopwood JJ, Kremer EJ, Hemsley KM (2010) SGSH gene transfer in mucopolysaccharidosis type IIIA mice using canine adenovirus vectors. *Mol Genet Metab* 100: 168-175
  103. Fu H, DiRosario J, Kang L, Muenzer J, McCarty DM (2010) Restoration of central nervous system alpha-N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery. *J Gene Med* 12: 624-633
  104. Heldermon CD, Ohlemiller KK, Herzog ED, Vogler C, Qin E, Wozniak DF, Tan Y, Orrock JL, Sands MS (2010) Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol Ther* 18: 873-880
  105. Almeciga-Diaz CJ, Montano AM, Tomatsu S, Barrera LA (2010) Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease - effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. *FEBS J* 277: 3608-3619
  106. Bielicki J, McIntyre C, Anson DS (2010) Comparison of ventricular and intravenous lentiviral-mediated gene therapy for murine MPS VII. *Mol Genet Metab* 101: 370-382
  107. Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, Basso T (2010) Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem* 18: 3735-3746
  108. Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E, He X, Jepsen KJ, Schuchman EH (2010) Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 222-227
  109. Wegrzyn G, Wegrzyn A, Tylki-Szymanska A (2004) A general model for genetic regulation of turnover of glycosaminoglycans suggests a possible procedure for prediction of severity and clinical progress of mucopolysaccharidoses. *Med Hypotheses* 62: 986-992
  110. Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2009) Correlation between severity of mucopolysaccharidoses and combination of the residual enzyme activity and efficiency of glycosaminoglycan synthesis. *Acta Paediatr* 98: 743-749
  111. Beck M (2010) Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 62: 33-40
  112. Schiffmann R (2010) Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 33: 373-379
  113. Wegrzyn G, Jakobkiewicz-Banecka J, Gabig-Ciminska M, Piotrowska E, Narajczyk M, Kloska A, Malinowska M, Dziedzic D, Golebiewska I, Moskot M, Wegrzyn A (2010) Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases. *Biochem Soc Trans* 38: 695-701

## Mucopolysaccharidoses – biochemical mechanisms of diseases and therapeutic possibilities

Anna Kloska<sup>1</sup>, Anna Tylki-Szymańska<sup>2</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Gdansk, 24 Kladki St., 80-822 Gdansk, Poland

<sup>2</sup>Department of Metabolic Diseases, Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, 20 Al. Dzieci Polskich, 04-730 Warsaw, Poland

✉ e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl

**Key words:** mucopolysaccharidoses, lysosomal storage diseases, enzyme replacement therapy, gene therapy, substrate deprivation therapy

### ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses (MPS) are inherited metabolic diseases from the group of lysosomal storage disorders (LSD). They are caused by genetic defects resulting in the absence or severe deficiency in one of lysosomal hydrolases involved in degradation of glycosaminoglycans (GAG). Partially degraded GAGs are accumulated in lysosomes, causing dysfunction of cells, tissues and organs. Last years did bring some breakthrough discoveries, which were important to understand biochemical mechanisms of MPS appearance and course, as well as to develop therapeutic procedures for these inherited metabolic disorders.

# Glikogenozy – choroby genetyczne związane z zaburzeniami metabolizmu glikogenu

Małgorzata Bejtko

Dominika Malińska✉

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

✉Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 23 13, e-mail: d.malinska@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 10 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 23 marca 2011 r.

**Słowa kluczowe:** miopatie metaboliczne, glikogen, GSD, glikogenozy, metabolizm glukozy

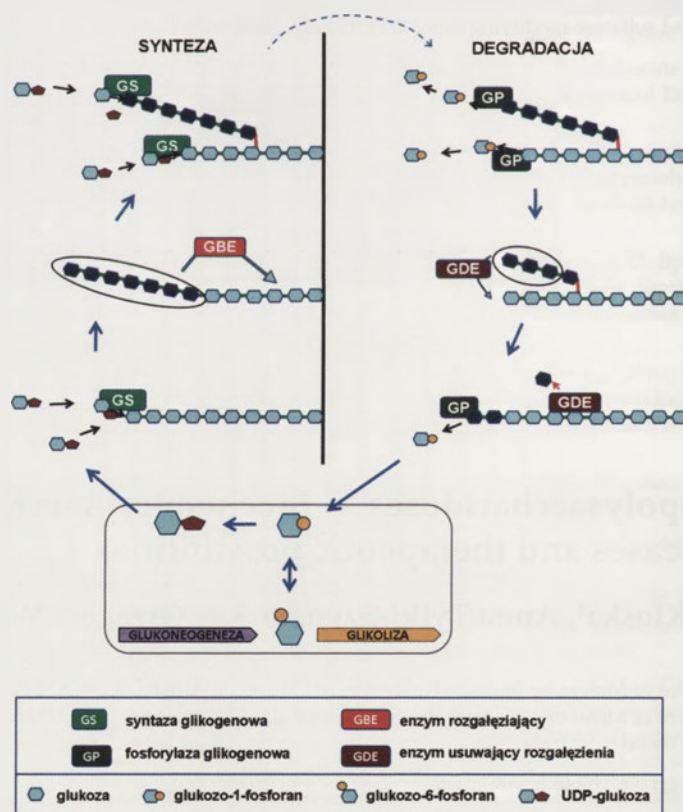
**Wykaz skrótów:** AMP (ang. *adenosine-5'-monophosphate*) – adenozylo-5'-monofosforan; APBD (ang. *adult polyglucosan body disease*) – forma glikogenozy IV występująca u dorosłych, charakteryzująca się powstawaniem ciałek poliglukozaowych; GAA (ang. *alpha-glucosidase*) – alfa-glukozydaza; GBE1 (ang. *glycogen branching enzyme 1*) – enzym rozgałęziający glikogen; GDE (ang. *glycogen debranching enzyme*) – amyllo-1,6-glukozydaza, enzym usuwający rozgałęzienia; GLUT2 (ang. *glucose transporter type 2*) – transporter glukozy; GLUT4 (ang. *insulin-responsive glucose transporter type 4*) – insulinozależny transporter glukozy; GSD (ang. *glycogen storage disease*) – choroba spichrzeniowa glikogenu; GYS2 (ang. *glycogen synthase 2*) – syntaza glikogenowa; LDH (ang. *lactate dehydrogenase A*) – dehydrogenaza mleczanowa; PFKM (ang. *muscle phosphofructokinase*) – izoforma mięśniowa fosfofruktokinazy; PGAM (ang. *muscle phosphoglycerate mutase 2*) – izoforma mięśniowa mutazy fosfoglicerynianowej; PHK (ang. *phosphorylase kinase*) – wątrobowa izoforma kinazy fosforylazej; PYGL (ang. *liver glycogen phosphorylase*) – wątrobowa izoforma fosforylazej glikogenowej; PYGM (ang. *muscle glycogen phosphorylase*) – mięśniowa izoforma fosforylazej glikogenowej; SR (ang. *sarcoplasmic reticulum*) – siateczka sarkoplazmatyczna

## STRESZCZENIE

Glikogenozy to choroby genetyczne wynikające z zaburzeń metabolizmu glikogenu – polimerycznej cząsteczki wielocukru będącego materiałem zapasowym, służącym jako wewnątrzkomórkowe źródło glukozy. Dotychczas opisano 13 typów glikogenoz, związanych z mutacjami w genach dla różnych enzymów, bezpośrednio bądź pośrednio regulujących proces syntezy i degradacji glikogenu. Obraz kliniczny tych chorób obejmuje przede wszystkim zaburzenia w funkcjonowaniu wątroby, mięśni poprzecznie prążkowanych oraz tkanki nerwowej, jako że w metabolizmie tych właśnie narządów i tkanek glikogen odgrywa szczególnie istotną rolę. Spektrum oraz stopień nasilenia objawów są bardzo zróżnicowane, i zależą zarówno od typu (lub podtypu) glikogenozy, jak i od indywidualnych cech pacjenta. Terapia glikogenoz opiera się przede wszystkim na leczeniu objawowym oraz na stosowaniu odpowiedniej diety. Enzymatyczna terapia zastępcza obecnie dostępna jest jedynie w przypadku glikogenozy typu II, trwają natomiast badania nad opracowaniem terapii genowej dla niektórych typów tych chorób.

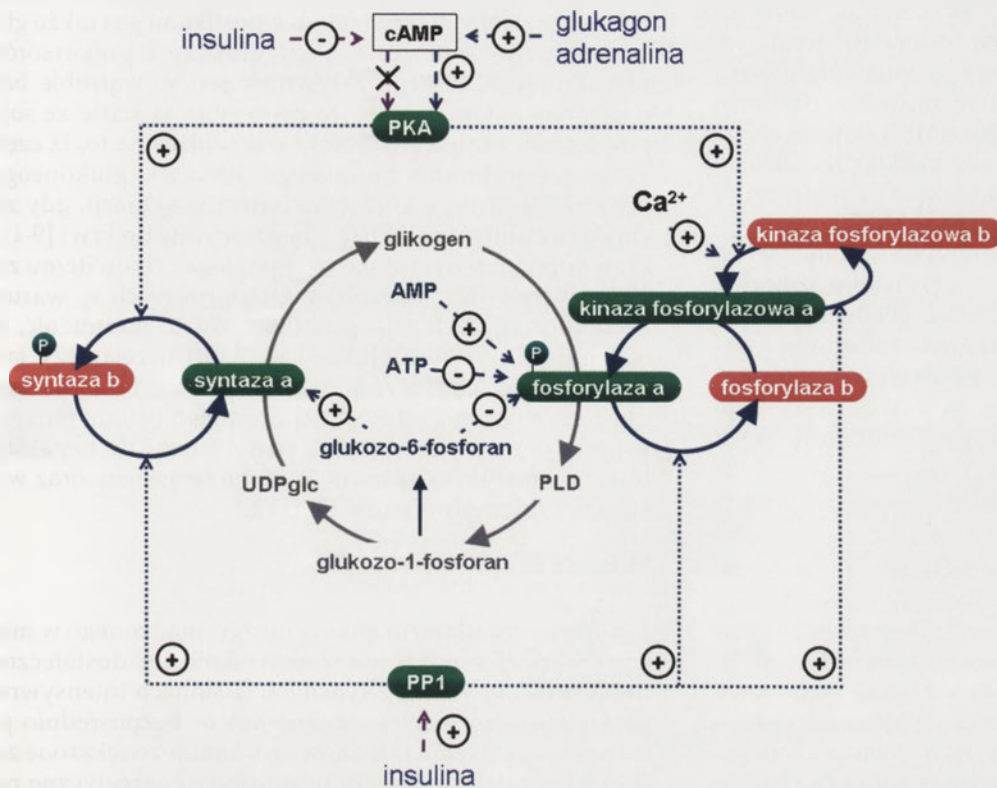
## WPROWADZENIE – STRUKTURA I METABOLIZM GLIKOGENU

Wewnątrzkomórkowe zapasy glukozy u ssaków przechowywane są najczęściej w postaci glikogenu – polimerycznej cząsteczki złożonej z reszt glukozyowych połączonych liniowo wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi oraz wiązaniami  $\alpha$ -1,6-glikozydowymi wprowadzającymi rozgałęzienia w cząsteczce (Ryc. 1).



Rycina 1. Synteza i degradacja glikogenu. Wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe (zaznaczone kolorem zielonym) tworzone są przez syntazę glikogenową, a degradowane przez fosforylazę glikogenową. Za tworzenie wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych (zaznaczone na czerwono) odpowiada enzym rozgałęziający, który odłącza fragmenty zbudowane z ok. 6-8 reszt glukozyowych z końca łańcucha i przyłącza ją do szóstego węgla cząsteczki glukozy oddalonej o kilka reszt od końca łańcucha (tego samego bądź sąsiedniego). Podczas degradacji glikogenu, wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe hydrolizowane są przez enzym usuwający rozgałęzienia. Enzym ten katalizuje również przeniesienie do łańcucha głównego 3 reszt glukozyowych pozostałych przy łańcuchu bocznym (fosforylaza glikogenowa prowadzi degradację glikogenu jedynie do pozycji oddalonej o 4 reszty glukozy od odgałęzienia, prowadząc do powstania tzw. dekstryny granicznej).





**Rycina 2.** Regulacja aktywności syntazy oraz fosforylasy glikogenowej. Syntaza glikogenowa, fosforylaza glikogenowa oraz kinaza fosforylazowa mogą występować w dwóch formach (a i b) w zależności od stopnia ufosforylowania. Formy aktywne to formy a, formy b przeważnie są nieaktywne (choć mogą ulegać aktywacji np. pod wpływem silnego działania aktywatorów allosterycznych). Kinaza białkowa A (PKA) katalizuje fosforylację syntazy glikogenowej, prowadzącą do przejścia tego enzymu w formę nieaktywną. Pośrednio (poprzez aktywację kinazy fosforylazowej) doprowadza też do fosforylacji fosforylasy glikogenowej, co w przypadku tego enzymu działa aktywująco. Defosforylacja syntazy glikogenowej (prowadząca do aktywacji tego enzymu) oraz kinazy fosforylazowej (prowadząca do inaktywacji) katalizowana jest przez fosfatazę-1 białek (PP1), aktywowaną m. in. wskutek działania insuliny. Dodatkowo, enzymy te znajdują się pod wpływem regulatorów allosterycznych, takich jak glukozy-6-fosforan czy AMP.

Rozgałęzienia zapewniają globularną strukturę cząsteczki glikogenu, co poprawia jej rozpuszczalność w środowisku wewnątrzkomórkowym, a także zwiększa liczbę wolnych końców, usprawniając jego syntezę i degradację.

Przylączenie reszt glukozy do cząsteczki glikogenu katalizowane jest przez syntazę glikogenową. Substratem dla tego enzymu jest UDP-glukoza, syntetyzowana przy udziale urydylotransferazy glukozy-1-fosforanowej z glukozy-1-fosforanu i UTP. Syntaza glikogenowa katalizuje powstawanie wiązań 1,4-glikozydowych. Natomiast wiązania 1,6-glikozydowe, odpowiedzialne za tworzenie rozgałęzień, syntetyzowane są przez enzym rozgałęziający. Degradacja glikogenu wymaga współdziałania fosforylasy glikogenowej (hydrolizującej wiązania 1,4-glikozydowe) oraz enzymu usuwającego rozgałęzienie, hydrolizującego wiązania 1,6-glikozydowe (Ryc. 1).

Synteza i degradacja glikogenu kontrolowane są poprzez regulację aktywności syntazy oraz fosforylasy glikogenowej [1]. Enzymy te podlegają regulacji allosterycznej ze strony metabolitów wewnątrzkomórkowych (np. glukozy-6-fosforanu). Na ich aktywność wpływają również modyfikacje kowalencyjne, przede wszystkim fosforylacja. Stopień ufosforylowania syntazy i fosforylasy glikogenowej kontrolowa-

ny jest przez szlaki zależne od hormonów regulujących metabolizm energetyczny komórek (Ryc. 2). Insulina, wydzielana podczas popo- siłkowej hiperglikemii, stymuluje syntezę glikogenu, zwiększa także pobieranie glukozy z krwi przez mięśnie szkieletowe (poprzez translokację transportera glukozy GLUT4 do błony komórkowej). Z kolei uwalnianie glukozy z glikogenu stymulowane jest przez glukagon, a także przez adrenalinę. Adrenalina, uwalniana do krwi w sytuacji zagrożenia organizmu często związanej z koniecznością wykonania intensywnego wysiłku mięśniowego (walka bądź ucieczka), stymuluje glikogenolizę zarówno w wątrobie, jak i w mięśniach szkieletowych. Natomiast glukagon, jako hormon odpowiedzialny za utrzymanie właściwego stężenia glukozy we krwi między posiłkami, powoduje degradację glikogenu jedynie w wątrobie. Glukagon oraz adrenalina uruchamiają szlak prowadzący

do aktywacji kinazy białkowej A, która stymuluje degradację glikogenu aktywując fosforylazę glikogenową, hamując jednocześnie aktywność syntazy glikogenowej. Z kolei insulina powoduje aktywację fosfatazy-1, sprzyjającej syntezie glikogenu [2].

## ROLA ZAPASÓW GLIKOGENOWYCH W POSZCZEGÓLNYCH TKANKACH

W organizmie ssaków głównym miejscem syntezy i magazynowania glikogenu są mięśnie i wątroba. W innych narządach ilość glikogenu jest dużo mniejsza (przykładowo, w mózgu jego zawartość w przeliczeniu na białko jest ok. 10 razy mniejsza niż w mięśniach i ok. 100 razy mniejsza niż w wątrobie [3]). Z racji zróżnicowania funkcji pełnionych przez glikogen w poszczególnych narządach, regulacja metabolizmu tego wielocukru podlega nieco innym, właściwym dla danego narządu zasadom. Możliwe jest to m. in. dzięki występowaniu kilku izoform syntazy i fosforylasy glikogenowej, charakteryzujących się różną wrażliwością na czynniki aktywujące i inhibitory. Zna- ne są dwie izoformy syntazy glikogenowej: wątrobowa (obecna głównie w wątrobie) oraz mięśniowa (występuje w pozostałych organach) [4], które różnią się lokalizacją miejsc ulegających fosforylacji. Izofорма wątrobowa zawiera krótszą domenę C-końcową, brak w niej więc dwóch

miejsz fosforylacji, które w izoformie mięśniowej zlokalizowane są właśnie w tej domenie. W izoformie wątrobowej występuje natomiast ulegająca fosforylacji reszta seryny (w pozycji 626), której brak w izoformie mięśniowej. Poszczególne miejsca fosforylacji są miejscem działania innych kinaz białkowych, takich jak AMPK (kinaza zależna od AMP), kinaza białkowa A czy białko p38. Dlatego też różna może być podatność obu izoform na regulację ze strony różnych szlaków sygnałowych [5]. Dodatkowo, stymulujące działanie glukozy-6-fosforanu na w pełni zdefosforylowany enzym jest silniejsze w przypadku izoformy wątrobowej niż mięśniowej. Fosforylaza glikogenowa występuje w trzech izoformach: mięśniowej, mózgowej i wątrobowej, które są dominującymi formami w odpowiednich organach. Izofomy te różnią się przede wszystkim wrażliwością na czynniki aktywujące: fosforylację, AMP oraz glikogen.

## WĄTROBA

Rolą zapasów glikogenu w wątrobie jest zapewnienie stałego zaopatrzenia tkanek w glukozę w okresach między posiłkami. Glikogen jest intensywnie gromadzony w wątrobie podczas poposiłkowej hiperglikemii (Ryc. 3). W momencie spadku stężenia glukozy we krwi, wątrobowy glikogen jest hydrolizowany i powstała glukoza uwalniana jest do układu krążenia. W hepatocytach głównym substratem energetycznym są kwasy tłuszczowe, natomiast hydrolyza glikogenu służy przede wszystkim zapewnieniu stałego poziomu glukozy we krwi [6]. Dlatego też hepatocyty charakteryzuje wysoka aktywność glukozy-6-fosfatazy, przekształcającej glukozy-6-fosforan w glukozę. Z kolei w tych narządach, które gromadzą glikogen przede wszystkim dla zaspokojenia własnych potrzeb energetycznych, aktywność glukozy-6-fosfatazy jest znacznie niższa (często na granicy wykrywalności), gdyż powstały tam glukozy-6-fosforan (z glikogenu) jest bezpośrednio włączany w szlak glikolizy [7]. W komórkach tych występuje izoforma  $\beta$  glukozy-6-fosfatazy, natomiast izoforma  $\alpha$  tego enzymu wydaje się być zarezerwowana dla narządów odpowiedzialnych za uwalnianie glukozy do krwi w warunkach hipoglikemii, czyli dla wątroby i kory nerki.

Wysoką wydajność pobierania glukozy z krwi w warunkach hiperglikemii zapewniają obecne w hepatocytach białka transportujące glukozę (tzw. transportery glukozy) GLUT2. W przeciwieństwie do transporterów GLUT4 (obecnych m. in. w mięśniach i tkance tłuszczowej), transportery GLUT2 nie podlegają regulacji zależnej od insuliny, dlatego intensywność pobierania glukozy przez hepatocyty zależy niemal wyłącznie od stężenia glukozy we krwi. Wysoka wydajność syntezy glikogenu w wątrobie zapewniana jest dzięki obecności glukokinazy, która w przeciwieństwie do heksokinazy nie podlega hamowaniu zwrotnemu przez glukozy-6-fosforan [8]. Niskie powinowactwo glukokinazy oraz transportera GLUT2 do glukozy ( $K_m$  ok. 5 mM) powoduje, że intensywne pobieranie glukozy i synteza glikogenu zachodzą w wątrobie jedynie w warunkach podwyższonego stężenia glukozy we krwi. Natomiast w warunkach normoglikemii, glukoza preferencyjnie pobierana jest z krwi przez inne narządy.

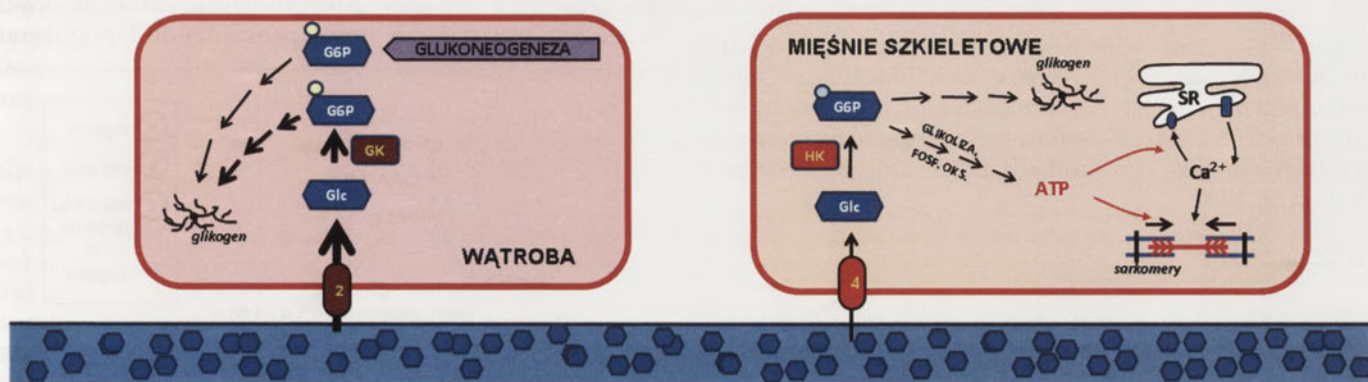
Oprócz hydrolizy glikogenu, źródłem glukozy uwalnianej z wątroby do krwi między posiłkami jest także glukoneogeneza – proces syntezy glukozy z prekursorów niecukrowych, którego aktywność jest w wątrobie bardzo wysoka. Okazuje się, że procesy te są ściśle ze sobą powiązane. Istnieją przesłanki wskazujące na to, iż część glukozy-6-fosforanu powstałego wskutek glukoneogenezy zasila syntezę glikogenu nawet w sytuacji, gdy zachodzi uwalnianie glukozy z hepatocytów do krwi [9-11]. Prawdopodobnie zjawisko to zapobiega całkowitemu zużyciu wątrobowych zasobów glikogenowych w warunkach sprzyjających glikogenolizie. Warto nadmienić, że w regulacji poziomu glukozy we krwi uczestniczy także kora nerki (choć z racji rozmiarów odgrywa znacznie mniejszą rolę niż wątroba) [12]. Stąd metabolizm glukozy w korze nerki wykazuje wiele podobieństw do hepatocytów, m. in. wysoką aktywność glukoneogenezy oraz występowanie transporterów GLUT2.

## MIĘŚNIE SZKIELETOWE

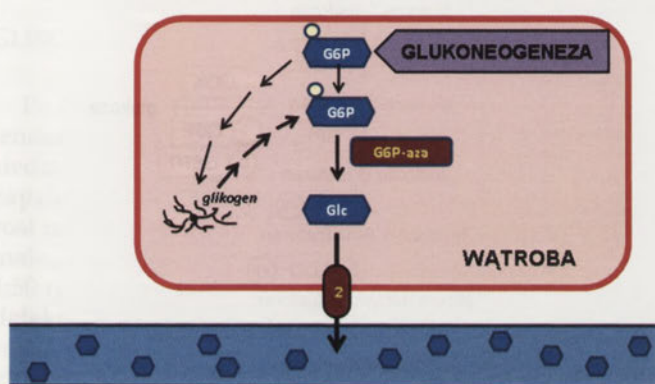
Głównym zadaniem glikogenu zgromadzonego w mięśniach szkieletowych jest zapewnienie im dostatecznej ilości substratów energetycznych w stanach intensywnej pracy. Szczególnie ważne jest to bezpośrednio po wzroście obciążenia mięśniowego, zanim zwiększone zostanie zaopatrzenie mięśni w substraty energetyczne pochodzące z krwi (stymulacja przepływu krwi oraz uwalniania glukozy z wątroby). Zwiększenie częstości skurczów mięśni pociąga za sobą wzrost zapotrzebowania na ATP. W pierwszej kolejności pozyskiwane jest ono z fosfokreatyny, jednak ten zasób szybko się wyczerpuje (zazwyczaj po kilku sekundach wzmożonej pracy mięśnia). Wtedy głównym źródłem energii staje się uwalniany z glikogenu glukozy-1-fosforan, przekształcany następnie w glukozy-6-fosforan i włączany w szlak glikolizy (Ryc. 3). Wykazano, że po 30 minutach intensywnej pracy glikogen może pokrywać ponad 50% zapotrzebowania energetycznego mięśni [13]. Udział ten spada wraz ze spadkiem intensywności wysiłku, a przy małym obciążeniu mięśni wystarczającym źródłem energii są pobierane z krwi glukoza i kwasy tłuszczowe oraz zgromadzone w mięśniach triglicerydy.

W komórkach mięśniowych daje się zauważyć wyraźnie niejednorodny rozkład zapasów glikogenowych. Okazuje się, że glikogen zgromadzony w poszczególnych przedziałach komórkowych jest wykorzystywany w innych sytuacjach. Zaobserwowano, że odporność mięśnia na zmęczenie koreluje z ilością glikogenu zgromadzonego wewnątrz miofibrilli (intramiofibrilarnego), natomiast szybkość rozkurczu (zależna m. in. od wydajności wychwytu  $Ca^{2+}$  przez siateczkę sarkoplazmatyczną) – z ilością glikogenu między miofibrillami (intermiofibrilarnego) [14]. Wydaje się więc, że glikogen intramiofibrilarny odpowiada za dostarczanie substratów energetycznych koniecznych do pracy aparatu kurczliwego, natomiast glikoliza zasilana glikogenem intermiofibrilarnym jest istotnym źródłem ATP dla pracy pompy wapniowej w siateczce sarkoplazmatycznej. Ciekawym mechanizmem regulacyjnym jest powiązanie metabolizmu gliko-

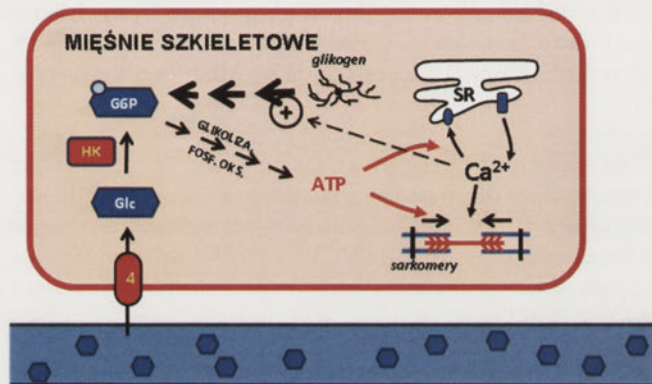
PO POSILKU



MIĘDZY POSILKAMI



INTENSYWNY WYSIŁEK MIĘŚNIOWY



**Rycina 3.** Synteza i degradacja glikogenu w wątrobie i mięśniach poprzecznie prążkowanych. W warunkach poposiłkowej hiperglikemii w wątrobie oraz w mięśniach szkieletowych dochodzi do intensywnej syntezy glikogenu. Dodatkowo, w wątrobie ważnym źródłem glukozy-6-fosforanu do syntezy glikogenu jest glukoneogeneza. Stały poziom glukozy we krwi między posiłkami utrzymywany jest dzięki zachodzącej w hepatocytach glikogenolizie i uwalnianiu powstałej glukozy do krwioobiegu. Podczas intensywnego wysiłku mięśniowego, kiedy ilość glukozy dostępna z krwi nie jest wystarczająca dla zaspokojenia potrzeb energetycznych mięśni, źródłem substratów dla glikolizy jest zmagazynowany w mięśniach glikogen rozkładany w procesie glikogenolizy. Glikogenoliza jest dodatkowo stymulowana przez jony wapniowe, uwalniane z siateczki sarkoplazmatycznej podczas skurczu mięśnia. Objaśnienia skrótów: 2, 4 – transportery glukozy odpowiednio GLUT2 i GLUT4; G6P – glukozy-6-fosforan; G6Paza – fosfataza glukozy-6 fosforanowa; GK – glukokinaza; Glc – glukoza; HK – heksokinaza.

geny z uwalnianiem wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej (SR). Znaczna część fosforylasy glikogenowej i kinazy fosforylazowej związane są z glikogenem znajdującym się blisko SR. Umożliwia to szybką stymulację hydrolizy glikogenu w odpowiedzi na inicjujące proces skurczu mięśnia uwolnienie  $Ca^{2+}$  z siateczki sarkoplazmatycznej, gdyż jony  $Ca^{2+}$  są aktywatorami kinazy fosforylazowej [15].

MÓZG

Glikogen zgromadzony w astrocytach zaopatruje neurony w glukozę w czasie ich intensywnej pracy, kiedy ilość glukozy dostarczana z krwią może być niewystarczająca dla pokrycia zapotrzebowania energetycznego komórek nerwowych [16,17]. Mózgowa izoforma fosforylasy glikogenowej różni się wyraźnie od izoformy mięśniowej [18]. Cechą charakterystyczną fosforylasy

obecnej w astrocytach jest silne uzależnienie aktywacji od stężenia AMP. W warunkach małej dostępności AMP znacznie osłabione jest działanie pozostałych czynników aktywujących, takich jak glikogen czy fosforylacja. Hydroliza glikogenu w astrocytach jest więc regulowana przede wszystkim lokalnym zużyciem ATP i w porównaniu z tkanką mięśniową jest mniej uzależniona od regulacji hormonalnej, zachodzącej przede wszystkim na drodze fosforylacji. Ilość glikogenu w mózgu wzrasta wyraźnie podczas snu, i obecnie uważa się, że zaburzenia w funkcjonowaniu układu nerwowego wynikające z braku snu związane są właśnie z niemożnością odtworzenia zapasów glikogenu w mózgu [3]. Poza astrocytami, glikogen wykryto także w neuronach układu obwodowego [19]. Co ciekawe, prawidłowo funkcjonujące neurony ośrodkowego układu nerwowego nie zawierają glikogenu, powstawanie glikogenu w neuronach obserwowane jest natomiast w chorobie Lafora oraz niektórych gliko-

genozach, a zjawisko to prawdopodobnie leży u podłoża śmierci neuronów [20].

## INNE NARZĄDY

Niewielkie zapasy glikogenu występują także w wielu innych komórkach, m. in. w leukocytach, fibroblastach, nabłonku płucnym czy komórkach śledziony [21]. Zasoby te służą przede wszystkim zaspokojeniu potrzeb energetycznych tych komórek w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na ATP.

## GLIKOGENOZY

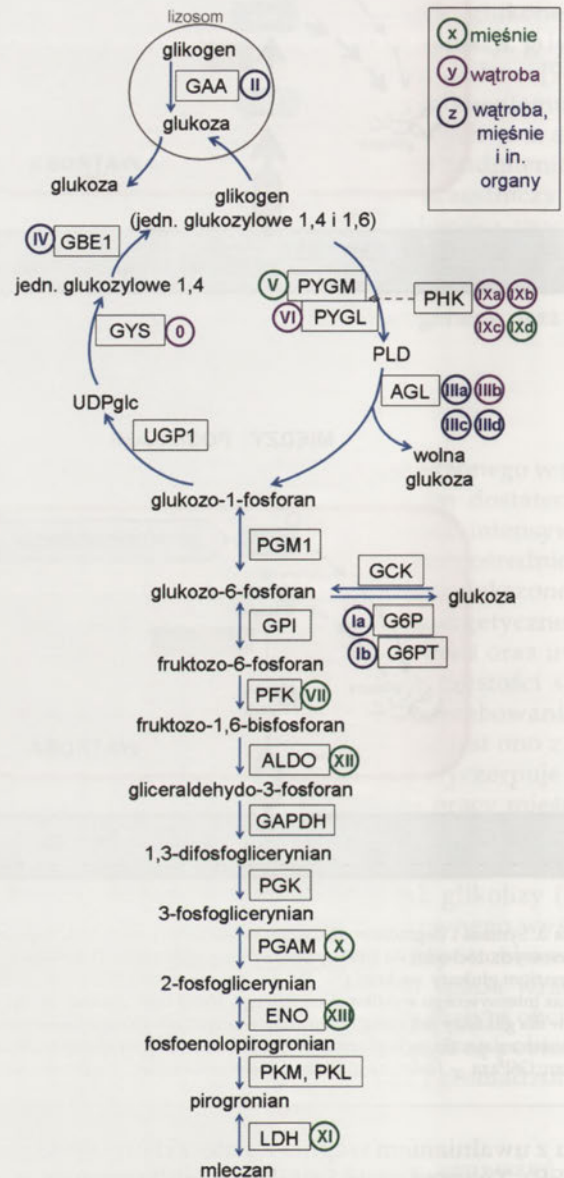
Zidentyfikowano szereg chorób genetycznych wynikających z zaburzeń metabolizmu glikogenu (Ryc. 4) [22]. Dotychczas wyróżniono 13 typów glikogenoz (GSD, ang. *glycogen storage disease*), związanych z mutacjami w genach dla różnych białek, pośrednio bądź bezpośrednio wpływających na syntezę i degradację glikogenu. W obrębie większości typów opisano kilka, a czasami kilkadziesiąt różnych mutacji prowadzących do dysfunkcji danego enzymu, ulokowanych w różnych fragmentach jego genu. Również obraz kliniczny poszczególnych glikogenoz bywa bardzo niejednorodny, wskutek czego w obrębie niektórych typów (np. typu I, III czy IV) wyodrębnia się kilka podtypów choroby.

Dla większości glikogenoz charakterystycznym objawem jest nadmierna akumulacja glikogenu w wątrobie (glikogenozy typu I, III, IV, VI, IX) i/lub w mięśniach szkieletowych (glikogenozy typu II, III, IV, V, VII, IX) prowadząca do uszkodzenia tych tkanek. Niemożność uwolnienia glukozy z zapasów glikogenowych w wątrobie skutkuje hipoglikemią oraz wzrostem ilości mleczanu, triglicerydów i produktów metabolizmu białek we krwi. Z kolei nieprawidłowy metabolizm glikogenu w mięśniach przejawia się nietolerancją wysiłku oraz miopatiami, niekiedy także kardiomiopatiami. W niektórych glikogenozach dochodzi też do uszkodzenia innych komórek i tkanek (m. in. tkanki nerwowej oraz komórek układu odpornościowego). U pacjentów z chorobami spichrzeniowymi glikogenu może dochodzić do wtórnego rozwoju cukrzycy, nowotworów oraz chorób autoimmunologicznych. Obecnie terapia glikogenoz opiera się na normowaniu stężenia glukozy we krwi poprzez stosowanie odpowiedniej diety i unikaniu nadmiernego wysiłku mięśniowego. Przy skrajnych dysfunkcjach wątroby wskazana jest jej transplantacja.

### GLIKOGENOZA TYPU I (CHOROBA VON GIERKE'GO)

Opisana w 1929 roku przez Edgara von Gierke. Choroba dziedziczona recesywnie, o częstości występowania 1:100 tysięcy żywych urodzeń, związana z mutacją w genie glukozy-6-fosfatazy (typ Ia, ponad 80% przypadków glikogenozy typu I) bądź transportera glukozy-6-fosforanu (typ Ib) [23]. Białka te zlokalizowane są w błonie siateczki śródplazmatycznej i katalizują, odpowiednio, pobieranie glukozy-6-fosforanu do wnętrza siateczki oraz jego hydrolizę z uwolnieniem glukozy. Odpowiadają więc za ostatni etap uwalniania glukozy z glikogenu. Upośledzenie aktywności któregośkolwiek z tych białek prowadzi więc

do akumulacji glikogenu w wątrobie i nerkach i przerostu tych narządów, często też pojawiają się nowotwory nerek i wątroby. Drugim problemem jest niemożność uwalniania glukozy z zapasów glikogenowych zgromadzonych w wątrobie, co z jednej strony prowadzi do hipoglikemii



**Rycina 4.** Glikogenozy. Na schemacie metabolizmu glikogenu i glikolizy zaznaczone są enzymy, których niedobory (wynikające z mutacji w ich genach) prowadzą do poszczególnych glikogenoz, opisanych numerami 0, I-VII, IX-XIII. Na zielono oznaczono choroby dotyczące przede wszystkim tkanki mięśniowej, na fioletowo – wątroby, a na granatowo – różnych narządów. Objasnienia skrótów: AGL – amyloglukozydaza i transferaza glukanowa; ALDO – aldolaza; ENO – enolaza; G6P – glukozy-6-fosfataza; G6PT – transporter glukozy-6-fosfatazy; GCK – glukokinaza; GAA – alfa-glukozydaza; GAPDH – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa; GBE1 – enzym rozgałęziający glikogen; GDE – amylo-1,6-glukozydaza, enzym usuwający rozgałęzienia; GPI – izomeraza fosfoheksosowa; GYS – syntaza glikogenowa; LDH – dehydrogenaza mleczanowa; PFK – fosfofruktokinaza; PGK – kinaza fosfoglicerynianowa; PGAM – izoforma mięśniowa mutazy fosfoglicerynianowej; PHK – wątrobowa izoforma kinazy fosforylazej; PKM, PKL – kinaza pirogronianowa (odpowiednio, izoforma mięśniowa i wątrobowa); PLD (ang. *phosphorylase-limited dextrin*) – fragment łańcucha, który nie może być degradowany przez fosforylaze glikogenową ze względu na bliską odległość odgałęzienia od końca łańcucha; PYGL – wątrobowa izoforma fosforylazy glikogenowej; PYGM – mięśniowa izoforma fosforylazy glikogenowej; UGP1 – urydylotransferaza glukozy-1-fosforanowa. Schemat na podstawie [60].

między posiłkami, z drugiej zaś powoduje wzrost stężenia glukozy-6-fosforanu w wątrobie, stymulację glikolizy oraz syntezy kwasów tłuszczowych. We krwi pacjentów, obok niskiego poziomu glukozy, obserwowany jest podwyższony poziom mleczanu, triglicerydów i kwasu moczowego. Dodatkowo, glikogenozie typu Ib często towarzyszy neutropenia [24].

Terapia opiera się przede wszystkim na zapobieganiu hipoglikemii poprzez częste przyjmowanie niewielkich posiłków. Stosuje się także niegotowaną skrobię kukurydzianą, jako źródło powoli uwalnianej do przewodu pokarmowego glukozy. Znacznie ogranicza się spożycie fruktozy i galaktozy, gdyż cukry te przyczyniają się do wzmożonej syntezy glikogenu w wątrobie, a także do stymulacji glikolizy, prowadzącej do wzrostu poziomu mleczanu we krwi (fruktoza i galaktoza włączane są w glikolizę po przekształceniu, odpowiednio, we fruktozo-6-fosforan lub w glukozy-6-fosforan). Jako że zarówno glukozy-6-fosfataza, jak i transporter glukozy-6-fosforanu są białkami błonowymi, nie jest możliwe stosowanie enzymatycznej terapii zastępczej. Trwają natomiast prace nad stworzeniem terapii genowej dla GSD I [25,26].

#### GLIKOGENOZA TYPU II (CHOROBA POMPE'GO)

Po raz pierwszy została opisana w 1932 roku przez holenderskiego patologa Johanna Pompe. Był to przypadek siedmiomiesięcznej dziewczynki, u której podejrzewano zapalenie płuc. Odnotowano u niej również silny przerost mięśnia sercowego. GSD II jest dziedziczona autosomalnie recesywnie. Częstość występowania to od 1:40 do 1:50 tysięcy żywych urodzeń [27]. Przyczyną choroby jest defekt genu GAA, kodującego  $\alpha$ -glukozydazę. Enzym ten rozkłada glikogen (zarówno wiązania  $\alpha$ -1,4 jak i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe), który znalazł się w lizosomach wskutek procesu autofagii. W przypadku dysfunkcji tego enzymu dochodzi do akumulacji glikogenu w lizosomach, w szczególności w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym, co prowadzi do miopatii i kardiomiopatii [27].

Dotychczas odkryto blisko 400 różnych mutacji genu GAA prowadzących do GSD II. Nasilenie objawów choroby jest zwykle odwrotnie skorelowane z poziomem aktywności enzymu [28]. Występują różne formy tej choroby – w zależności od momentu pojawienia się po raz pierwszy objawów: klasyczna forma noworodkowa, forma młodzieńcza oraz forma dorosła. Moment pojawienia się pierwszych objawów jest najczęściej powiązany ze stopniem niedoboru enzymu – im większy niedobór, tym wcześniej i silniej objawia się choroba. Forma noworodkowa, z symptomami pojawiającymi się już w pierwszych miesiącach życia, jest rezultatem całkowitego lub niemal całkowitego braku enzymu. Pierwszym objawem jest zwykle niewydolność oddechowa – dopiero przy dokładniejszych badaniach zauważa się u pacjentów kardiomegalię. Powoduje ją magazynowany w lizosomach glikogen, który prowadzi do uszkodzeń miofibrilli, zwłaszcza w mięśniu serca. Ta postać choroby była dotąd śmiertelna – z powodu niewydolności serca, mięśni i płuc, pacjenci rzadko przeżywali więcej niż rok [27]. Formę młodzieńczą, związaną z mniejszym stopniem niedoboru enzymu, rozpozna-

je się zwykle w pierwszej dekadzie życia. Charakteryzują ją przede wszystkim dysfunkcje mięśni szkieletowych i oddechowych, prowadzące do problemów z poruszaniem się oddychaniem. Forma dorosła ma podobne objawy, ale postępuje wolniej, a jej przebieg jest łagodniejszy. Przez długi czas pacjenci byli objęci jedynie terapią zachowawczą. Od 2006 roku stosuje się enzymatyczną terapię zastępczą (rekombinowane białko) – z różnym powodzeniem. U niektórych pacjentów następuje duża poprawa jakości życia, u innych terapia nie przynosi rezultatów. Możliwe przeszkody w stosowaniu takiego leczenia wynikają z trudności w dostarczeniu enzymu do mięśni szkieletowych oraz z odpowiedzi układu odpornościowego organizmu [29,30].

#### GLIKOGENOZA TYPU III (CHOROBA CORICH)

Po raz pierwszy została opisana w 1928 roku. Choroba dziedziczona jest autosomalnie recesywnie, a częstość jej występowania szacuje się na 1:100 tysięcy żywych urodzeń [31]. GSD III jest spowodowana niedoborem amylo-1,6-glukozydazy (enzymu usuwającego rozgałęzienia, GDE). Enzym ten ma dwa centra aktywne o funkcjach, odpowiednio, transferazy i glukozydazy. GDE razem z fosforylazą glikogenową odpowiada za degradację glikogenu, dlatego niedobór prawidłowego GDE prowadzi do niekompletnej glikogenolizy. W efekcie w komórkach nagromadzany jest nieprawidłowy glikogen, a uwalnianie z niego glukozy jest bardzo utrudnione, co skutkuje hipoglikemią i niedoborem glukozy w tkankach. Opisano szereg mutacji genu GDE, przy czym są one rozmieszczone w różnych miejscach – nie zaobserwowano żadnych specyficznych obszarów ich występowania. Większość z tych mutacji jest indywidualna dla każdego pacjenta [32]. Z powodu tej różnorodności genetycznej, GSD III może wywoływać wiele różnych symptomów, o zróżnicowanym stopniu nasilenia u poszczególnych pacjentów. Wyróżnia się cztery podtypy tej choroby. Najczęstszym jest podtyp IIIa, który dotyka zarówno funkcjonowania wątroby jak i mięśni. U większości pacjentów występuje miopatia, u niektórych także kardiomiopatia. Z kolei podtyp IIIb wiąże się wyłącznie z dysfunkcją wątroby, ponieważ aktywność enzymu w mięśniach pozostaje niezakłócona. Utrata jednej z dwóch aktywności enzymu – glukozydazy lub transferazy, charakteryzuje odpowiednio podtyp IIIc lub IIId.

GSD III jest zwykle rozpoznawana w pierwszym roku życia, a jej głównymi objawami są: hipoglikemia, zaburzenia czynności i powiększenie wątroby (które w późniejszym etapie mogą prowadzić marskości lub nowotworów wątroby) [33], zaburzenia wzrostu oraz dyslipidemia. W późniejszym wieku pojawiają się dysfunkcje układu nerwowego, a niekiedy też cukrzyca [34]. Mimo opóźnionego wzrostu i dojrzewania, pacjenci dotknięci GSD III zwykle dożywają późnych lat. Jednakże z wiekiem dolegliwości, zwłaszcza ze strony mięśni, mogą się nasilać. Główną metodą leczenia jest utrzymywanie odpowiedniej diety zapobiegającej hipoglikemii, bogatej w cukry złożone i białka [31]. Odpowiednie stężenie glukozy w krwi jest utrzymywane przez całą dobę poprzez pobieranie posiłków również w nocy [35].

## GLIKOGENOZA TYPU IV (AMYLOPEKTYNOZA, CHOROBA ANDERSEN)

Choroba pierwszy raz opisana w 1952 roku przez Dorothy Andersen, związana jest z mutacją w genie enzymu rozgałęziającego glikogen (GBE1). Spadek aktywności tego enzymu, a tym samym zawartości wiązań 1,6-glikozydowych, pociąga za sobą powstawanie złogów glikogenu o nieprawidłowej strukturze. Liniowe, słabo rozgałęzione cząsteczki glikogenu charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w środowisku wewnątrzkomórkowym, utrudniona jest także ich hydroliza [36]. Przypadki glikogenozy typu IV stanowią zaledwie 0,3% opisanych przypadków glikogenoz. Jest to więc choroba bardzo rzadka, jednak w niektórych grupach etnicznych częstość jej występowania jest znacznie wyższa, na przykład w populacji Aszkenazyjczyków, u których przyczyną APBD (ang. *adult polyglucosan body disease*) jest często mutacja 986A>C (Y329S) w genie GBE1 [37]. Poza tą mutacją zidentyfikowano ponad 30 innych, odpowiedzialnych za wystąpienie glikogenozy typu IV i w różnym stopniu wpływających na aktywność GBE1 (od 50% do nawet całkowitej utraty aktywności enzymu) [37].

Obraz kliniczny glikogenozy typu IV jest bardzo niejednorodny [36]. Wyróżniono kilka form tej choroby, a różnice dotyczą wieku pacjentów w chwili pojawienia się dolegliwości, nasilenia objawów oraz profilu dysfunkcji poszczególnych tkanek. Forma klasyczna charakteryzuje się ostrym przebiegiem. Objawy pojawiają się we wczesnym dzieciństwie i dotyczą przede wszystkim poważnych zaburzeń ze strony wątroby: początkowo przerost, a następnie marskość tego organu, połączona z nadciśnieniem wrotnym, co ostatecznie prowadzi do śmierci pacjentów około 5 roku życia. Zdarzają się również formy o łagodniejszym przebiegu, z wolniej postępującym uszkodzeniem wątroby (a nawet z częściowym ustąpieniem objawów w późniejszym dzieciństwie). W przypadku formy nerwowo-mięśniowej glikogenozy typu IV, dominującymi objawami są neuropatie, miopatie oraz niekiedy kardiomiopatie [38]. Nasilenie dolegliwości u poszczególnych pacjentów jest bardzo zróżnicowane, a pierwsze objawy mogą pojawić się zarówno w dzieciństwie (a nawet – choć bardzo rzadko – już u noworodków), jak i w wieku 40-50 lat. Postać ujawniająca się u osób dorosłych to APBD, nazwę swą zawdzięcza występowaniu charakterystycznych złogów poliglukozanowych w różnych narządach, szczególnie w układzie nerwowym [36]. Jej objawy to m. in. neurogeniczna dysfunkcja pęcherza moczowego, porażenia kończyn, wynikające z upośledzenia funkcji motoneuronów, czasami chorobie towarzyszy postępująca demencja. W początkowej fazie APBD jest niekiedy błędnie diagnozowane jako stwardnienie rozsiane lub stwardnienie zanikowe boczne [39,40].

Nie wiadomo dokładnie czym uwarunkowane jest wystąpienie konkretnej formy glikogenozy typu IV. Zazwyczaj mutacje prowadzące do większej utraty aktywności enzymu związane są z wcześniejszym ujawnieniem się i ostrzejszym przebiegiem choroby, nie jest to jednak ścisłą regułą [36]. Zakres możliwości terapeutycznych jest stosunkowo wąski. W przypadkach ostrej niewydolności wątroby stosuje się jej transplantację [41], co jednak często nie rozwią-

zuje problemów związanych z dysfunkcją innych narządów. W przypadku APBD, obiecujące wyniki uzyskano w badaniach nad zastosowaniem w terapii tej choroby triglicerydu kwasu heptanowego [39]. Produktem metabolizmu tego związku w wątrobie są pięciowęglowe ciała ketonowe, które po przekształceniu do acetylo-CoA i szczawiooctanu włączane są do cyklu Krebsa. Może to częściowo kompensować niedostateczny dopływ substratów tego cyklu pochodzących z glikolizy. Dodatkowo, część powstałych ciał ketonowych uwalniana jest z wątroby do krwioobiegu, stają się więc dostępne również dla innych tkanek i narządów, takich jak mózg oraz mięśnie szkieletowe. Dzięki temu również w tych tkankach niedobór substratów dla cyklu Krebsa może być kompensowany.

## GLIKOGENOZA TYPU V (CHOROBA MCARDLE'A)

Ten typ został pierwszy raz opisany w 1951 roku. Jest to choroba dziedziczona autosomalnie recesywnie. Powodem GSD V są mutacje w genie kodującym mięśniową izoformę fosforylasy glikogenowej (PYGM). Fosforylaza glikogenowa katalizuje odłączanie glukozy-1-fosforanu od łańcucha glikogenu poprzez fosforolizę wiązań alfa-1,4-glikozydowych. Dotychczas opisano kilkadziesiąt różnych mutacji, przy czym ta sama mutacja niekoniecznie powoduje ten sam efekt u każdego pacjenta. Niezależnie od mutacji, u większości pacjentów stwierdzono niemal całkowity brak aktywności białka kodowanego przez gen PYGM [42].

GSD V charakteryzuje się nietolerancją wysiłku: ból, szybkie zmęczenie, skurcze i sztywność mięśni towarzyszą wysiłkowi, przy czym objawy te ustępują po wypoczynku. W niektórych przypadkach występuje tzw. objaw "drugiego oddechu", który polega na możliwości wykonania wysiłku po krótkim odpoczynku. Jest to możliwe dzięki zwiększonemu wskutek wysiłku przepływowi krwi, a w konsekwencji poprawie zaopatrzenia mięśni w dostarczane z krwią substraty energetyczne: wolne kwasy tłuszczowe i glukozę [42,43]. W niektórych przypadkach, po dłuższym czasie trwania choroby, może występować rhabdomyoliza (uszkodzenie mięśni poprzecznie prążkowanych) i w efekcie mioglobinuria (obecność we krwi wolnej mioglobiny z uszkodzonych mięśni). U części pacjentów prowadzi to z czasem do uszkodzenia nerek [31]. Forma noworodkowa jest często śmiertelna z powodu niewydolności oddechowej, hipotonii i ogólnego osłabienia mięśni [44]. Nie istnieje specyficzna terapia dla tej choroby, leczenie objawowe polega na zachowaniu diety i stosowaniu odpowiednich ćwiczeń. Pacjentom zaleca się ćwiczenia aerobowe w celu zwiększenia tolerancji wysiłku i zapobiegania zniszczeniu mięśni oraz mioglobinurii. Sacharoza może poprawić tolerancję wysiłku, zwłaszcza jeśli zostanie podana w czasie poprzedzającym. Stosuje się też dietę wysokobiałkową, w celu utrzymania wysokiego poziomu aminokwasów [31,42].

## GLIKOGENOZA TYPU VI (CHOROBA HERS'A)

Choroba po raz pierwszy opisana przez Henri'ego Hers'a w 1959 roku [45]. Choroba jest dziedziczona autosomalnie recesywnie, występuje rzadko [46]. Jest wywołana mutacją w genie kodującym izoformę wątrobową fosforylasy glikogenowej (PYGL) [45]. Enzym ten katalizuje odłączanie

glukozy-1-fosforanu od łańcucha glikogenu wskutek fosforolizy wiązań alfa-1,4-glikozydowych. Tak jak większość glikogenoz, jest to choroba zróżnicowana genetycznie i w związku z tym opisano szereg objawów, różniących się u poszczególnych pacjentów [47,48].

Choroba zwykle zostaje rozpoznana w wieku dziecięcym. Jej objawy są dość łagodne i obejmują głównie powiększenie wątroby (i wypukły brzuch) oraz opóźniony wzrost. Rozwój ruchowy może być opóźniony z powodu hipotonii mięśni. Objawy najczęściej ustępują w wieku dorosłym [46].

Terapia tej choroby ogranicza się do leczenia objawowego, w niektórych przypadkach wystarczające jest stosowanie odpowiednich zasad żywieniowych. W celu uniknięcia hipoglikemii, należy wystrzegać się dłuższych przerw pomiędzy posiłkami. Wykazano, że przyjmowanie surowej skrobi kukurydzianej wieczorem pozwala nie tylko uniknąć porannej hipoglikemii, ale także pomaga w normowaniu wzrostu i rozwoju [49].

#### GLIKOGENOZA TYPU VII (CHOROBA TARUI)

Choroba opisana przez Tarui w 1965 roku [50], jest jedną z najrzadziej występujących glikogenoz (do tej pory opisano niewiele ponad sto przypadków). Jest dziedziczona autosomalnie recesywnie. Choroba ta wywołana jest niedoborem aktywności fosfofruktokinazy (izoformy mięśniowej – PFKM). Enzym ten katalizuje fosforylację fruktozo-6-fosforanu do fruktozo 1,6-difosforanu. Jest to jeden z najważniejszych enzymów regulatorowych szlaku glikolizy, dlatego jego niedobór powoduje silne zaburzenia w metabolizmie glukozy [35]. Dotychczas wykryto kilkanaście różnych mutacji w genie PFKM, prowadzących do objawów glikogenozy typu VII. Objawy dotyczą przede wszystkim funkcjonowania mięśni szkieletowych, gdyż w tej tkance izoforma mięśniowa jest praktycznie jedyną formą fosfofruktokinazy [51]. Poza mięśniami szkieletowymi, PFKM obecna jest także w sercu, mózgu, jądrach oraz erytrocytach [51], jednakże w narządach tych współwystępuje z pozostałymi izoformami fosfofruktokinazy (wątrobową i płytkową). Dlatego też w mięśniach pacjentów z glikogenozą typu VII aktywność fosfofruktokinazy jest zazwyczaj śladowa (na poziomie kilku procent aktywności obserwowanej u zdrowych osób), podczas gdy w erytrocytach najczęściej obserwuje się około 50% spadek aktywności. Podobne zmiany aktywności enzymatycznej odnotowano w mysim modelu GSD VII [52]. Objawy glikogenozy typu VII są podobne do typu V (nietolerancja wysiłku: bóle i kurcze mięśni), ale nie występuje w niej tzw. objaw „drugiego oddechu”. Od typu V odróżnia ją także występowanie umiarkowanej hemolizy i hiperbilirubinemii oraz hiperurykemii (podwyższonego poziomu kwasu moczowego we krwi), szczególnie po wysiłku fizycznym [44].

Wyróżnić można dwie formy glikogenozy typu VII, w zależności od momentu pojawienia się objawów – dziecięcą i dorosłą. Forma dorosła charakteryzuje się stałym osłabieniem. Forma dziecięca może być śmiertelna z powodu niewydolności oddechowej, a w niektórych przypadkach również dysfunkcji mózgu. U osób młodych (dojrzących) często rozpoznaje się anemię hemolityczną, z racji

zaburzeń metabolizmu energetycznego w erytrocytach [44]. W chorobie tej możliwe jest wyłącznie leczenie objawowe. Tak jak w przypadku choroby McArdle'a, zaleca się ćwiczenia aerobowe. Należy unikać przyjmowania glukozy lub sacharozy bezpośrednio przed wysiłkiem – glukoza, z powodu blokady metabolicznej, nie może być użyta jako źródło energii, ale jej obecność powoduje spadek dostępności alternatywnych źródeł energii – wolnych kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych – w krwi [44].

#### GLIKOGENOZA TYPU IX

Wywołana przez niedobór wątrobowej izoformy kinazy fosforylazowej (PHK), enzymu odpowiadającego za aktywację fosforylasy glikogenowej. Z powodu niedoboru enzymu, glikogen jest akumulowany w komórkach wątroby i mięśni oraz w erytrocytach [53,54]. Typ IXa jest dziedziczony z chromosomem X, typy b, c i d – autosomalnie recesywnie. Jest to jedna z najłagodniej przebiegających glikogenoz. Główne objawy to powiększenie wątroby, opóźnienie wzrostu, podwyższony poziom transaminaz wątrobowych, ketoza na czczo i hipercholesterolemia. Z wiekiem objawy ustępują. Bardzo rzadko zdarza się ostra hipoglikemia i kwasica metaboliczna [53]. Ten typ został dawniej nazwany typem VIII, obecnie postaci GSD VIII nie wyróżnia się [55].

#### GLIKOGENOZA TYPU X

Typ X jest wywołany mutacjami w genie PGAM, kodującym mutazę fosfoglicerynianową. Enzym ten przekształca 3-fosfoglicerynian do 2-fosfoglicerynianu. GSD X jest dziedziczona recesywnie autosomalnie. Objawy to nietolerancja intensywnego wysiłku – bóle i kurcze mięśni, również mioglobinuria [35,56].

#### GLIKOGENOZA TYPU XI

GSD XI jest spowodowana mutacjami w genie kodującym dehydrogenazę mleczanową (LDH). Enzym ten katalizuje odwracalną reakcję przekształcenia pirogronianu w mleczan. Objawy niedoboru enzymu to szybkie męczenie się, nietolerancja wysiłku i mioglobinuria. Mogą wystąpić ból i kurcze mięśni po wysiłku. W kilku przypadkach zauważono również zmiany skórne [35].

#### GLIKOGENOZA TYPU XII

Ten typ jest spowodowany niedoborem aldolazy A, enzymu katalizującego odwracalną reakcję przekształcenia fruktozo-1,6-bisfosforanu do fosfodihydroksyacetonu i gliceraldehydo-3-fosforanu. Objawia się anemią hemolityczną, opisano też przypadki opóźnienia rozwoju umysłowego. Może wystąpić nietolerancja wysiłku [35,57].

#### GLIKOGENOZA TYPU XIII

Spowodowana mutacją w genie kodującym beta-enolazę – enzym katalizujący przekształcenie 2-fosfoglicerynianu w fosfoenolpirogronian (i odwrotnie). Opisano jeden przypadek – dorosłego mężczyznę z skarżącym się na nawracające bóle mięśniowe wywołane wysiłkiem, ogólne osłabienie i szybkie męczenie się [58].

Choroba dziedziczna autosomalnie recesywnie, występuje bardzo rzadko [35]. GSD 0 jest związana z mutacjami w genie wątrobowej izoformy syntazy glikogenowej (GYS2). Mutacje w tym genie powodują brak możliwości wytwarzania (a więc i magazynowania) glikogenu w komórkach wątroby. Chorobę charakteryzuje złe samopoczucie na czczo, spowodowane hipoglikemią. Inne objawy to ospałość, bladość, mdłości i wymioty, w niektórych przypadkach występują też drgawki. Choroba zwykle zauważana po okresie noworodkowym (kiedy dziecko nie jest już karmione w nocy). Osoby z typem 0 mogą mieć lekko opóźniony wzrost, natomiast rozwój intelektualny nie ulega zaburzeniu. W celu zapobiegania dolegliwościom stosuje się odpowiednią dietę: częste posiłki, co 3-4 godziny, aby zapobiec wystąpieniu epizodów hipoglikemii [59].

## PODSUMOWANIE

Pod pojęciem glikogenozy kryje się szereg nieprawidłowości w metabolizmie glikogenu, zróżnicowanych pod względem genotypu i fenotypu. Objawiają się one przede wszystkim nieprawidłowościami w funkcjonowaniu wątroby, mięśni poprzecznie prążkowanych, często także tkanki nerwowej. Repertuar terapeutyczny dla tych chorób jest dość ograniczony, dla większości typów nie istnieje specyficzna terapia. Pacjenci otrzymują porady na temat diety i radzenia sobie z objawami. Dlatego trwają prace nad opracowaniem skuteczniejszych sposobów leczenia, zarówno z wykorzystaniem terapii genowej, jak i poprzez stymulację szlaków metabolicznych mogących kompensować zaburzenia wynikające z defektu genetycznego.

## PIŚMIENNICTWO

- Radziuk J, Pye S (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 250-272
- Fisher EH, Graves DJ, Crittenden ER, Krebs EG (1959) Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase *b* to *a* reaction. *J Biol Chem* 234: 1698-1704
- Brown AM (2004) Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 89: 537-552
- Jensen J, Lai YC (2009) Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. *Arch Physiol Biochem* 115: 13-21
- Ros S, García-Rocha M, Domínguez J, Ferrer JC, Guinovart JJ (2009) Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 6370-6378
- Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ (2006) Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol* 291: E1-E8
- Kim SY, Jun HS, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY (2008) Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood* 111: 5704-5711
- Agius L (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1-18
- Newgard CB, Moore SV, Foster DW, McGarry JD (1964) Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. *J Biol Chem* 239: 6958-6963
- Hellerstein MK, Neese RA, Linfoot P, Christiansen M, Turner S, Letscher A (1997) Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study. *J Clin Invest* 100: 1305-1319
- Delgado TC, Silva C, Fernandes I, Caldeira M, Bastos M, Baptista C, Carvalheiro M, Geraldés CF, Jones JG (2009) Sources of hepatic glycogen synthesis during an oral glucose tolerance test: effect of transaldolase exchange on flux estimates. *Magn Reson Med* 62: 1120-1128
- Stanley JC (1981) The regulation of glucose production. The role of liver glycogen and gluconeogenesis in the liver and kidney cortex. *Br J Anaesth* 53: 137-146
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Enderit E, Wolfe RR (1993) Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265: E380-E391
- Nielsen J, Schröder HD, Rix CG, Ortenblad N (2009) Distinct effects of subcellular glycogen localization on tetanic relaxation time and endurance in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 587: 3679-3690
- Lees SJ, Franks PD, Spangenburg EE, Williams JH (2001) Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* 91: 1638-1644
- Brown AM, Ransom B (2007) Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism. *Glia* 55: 1263-1271
- Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS (2009) Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem* 109: 80-86
- Lowry OH, Schulz DW, Passoneau JV (1967) The kinetics of glycogen phosphorylases from brain and muscle. *J Biol Chem* 242: 271-280
- Pfeiffer-Guglielmi B, Francke M, Reichenbach A, Hamprecht B (2007) Glycogen phosphorylase isozymes and energy metabolism in the rat peripheral nervous system – An immunocytochemical study. *Brain Res* 1136: 20-27
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Vallés J, García-Fojeda B, Criado-García O, Fernández-Sánchez E, Medraño-Fernández I, Domínguez J, García-Rocha M, Soriano E, Rodríguez de Córdoba S, Guinovart JJ (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 10: 1407-1411
- Sato K, Satoh K, Sato T, Imai F, Morris HP (1976) Isozyme patterns of glycogen phosphorylase in rat tissues and transplantable hepatomas. *Cancer Res* 36: 487-495
- Ozen H (2007) Glycogen storage diseases – new perspectives. *World J Gastroenterol* 13: 2541-2553
- Chou JY (2001) The molecular basis of type 1 glycogen storage diseases. *Curr Mol Med* 1: 25-44
- Chou JY, Jun HS, Mansfield BC (2010) Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. Review. *Curr Opin Hematol* 1: 36-42
- Chou JY, Mansfield BC (2007) Gene Therapy for Type I Glycogen Storage Diseases. *Curr Gene Ther* 7: 79-88
- Yiu WH, Lee YM, Peng WT, Pan CJ, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY (2010) Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy. *Mol Ther* 6: 1076-1084
- Van der Ploeg AT, Reuser AJ (2008) Pompe's disease. *Lancet* 372: 1342-1353
- Raben N, Plotz PJ, Byrne BJ (2002) Acid  $\alpha$ -Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). *Curr Mol Med* 2: 145-166
- Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, Arts WF, Smeitink JA, Van der Ploeg AT (2001) Enzyme therapy for Pompe disease with recombinant human  $\alpha$ -glucosidase from rabbit milk. *J Inher Metab Dis* 24: 266-274
- Beck M (2009) Alglucosidase alfa: Long term use in the treatment of patients with Pompe disease. *Therapeut Clin Risk Manag* 5: 767-772
- Mundy H, Lee PJ (2004) The glycogen storage diseases. *Curr Paediatr* 14: 407-413
- Shen JJ, Chen YT (2002) Molecular characterization of glycogen storage disease type III. *Curr Mol Med* 2: 167-175
- Demo E, Frush D, Gottfried M, Koepke J, Boney A, Bali D, Chen YT, Kishnani PS (2007) Glycogen storage disease type III-hepatocellular carcinoma a long-term complication? *J Hepatol* 46: 492-498



34. Oki Y, Okubo M, Tanaka S, Nakanishi K, Kobayashi T, Murase T (2000) Diabetes mellitus secondary to glycogen storage disease type III. *Diab Med* 17: 810-812
35. Fernandes J (2006) *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*, 4th edition, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, Germany
36. Moses SW, Parvari R (2002) The variable presentations of glycogen storage disease type IV: a review of clinical, enzymatic and molecular studies. *Curr Mol Med* 2: 177-188
37. Li SC, Chen CM, Goldstein JL, Wu JY, Lemyre E, Burrow TA, Kang PB, Chen YT, Bali DS (2010) Glycogen storage disease type IV: novel mutations and molecular characterization of a heterogeneous disorder. *J Inherit Metab Dis* [Epub ahead of print DOI 10.1007/s10545-009-9026-5]
38. Bao Y, Kishnani P, Wu JY, Chen YT (1996) Hepatic and neuromuscular forms of glycogen storage disease type IV caused by mutations in the same glycogen-branching enzyme gene. *J Clin Invest* 97: 941-948
39. Roe CR, Bottiglieri T, Wallace M, Arning E, Martin A (2010) Adult polyglucosan body Disease (APBD): Anaplerotic diet therapy (Triheptanoin) and demonstration of defective methylation pathways. *Mol Genet Metab* 101: 246-252
40. McDonald TD, Faust PL, Bruno C, DiMauro S, Goldman JE (1993) Polyglucosan body disease simulating amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 43: 785-790
41. Matern D, Starzl TE, Arnaout W, Barnard J, Bynon JS, Dhawan A, Emond J, Haagsma EB, Hug G, Lachaux A, Smit GP, Chen YT (1999) Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur J Pediatr* 158: S43-S48
42. Bartram C, Edwards RH, Beynon RJ (1995) McArdle's disease-muscle glycogen phosphorylase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1272: 1-13
43. Braakhekke JP, de Bruin MI, Stegeman DF, Wevers RA, Binkhorst RA, Joosten EM (1986) The second wind phenomenon in McArdle's disease. *Brain* 109: 1087-1101
44. Darras BT, Friedman NR (2000) Metabolic Myopathies: A Clinical Approach; Part II. Review. *Pediatr Neurol* 22: 171-181
45. Lederer B, Van Hoof F, Van den Berghe G, Hers H (1975) Glycogen phosphorylase and its converter enzymes in haemolysates of normal human subjects and of patients with type VI glycogen-storage disease. A study of phosphorylase kinase deficiency. *Biochem J* 147: 23-35
46. Wolfsdorf JL, Weinstein DA (2003) Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord* 4: 95-102
47. Chang S, Rosenberg MJ, Morton H, Francomano CA, Biesecker LG (1998) Identification of a mutation in liver glycogen phosphorylase in glycogen storage disease type VI. *Hum Mol Genet* 7: 865-870
48. Beauchamp NJ, Taybert J, Champion MP, Layet V, Heinz-Erian P, Dalton A, Tanner MS, Pronicka E, Sharrard MJ (2007) High frequency of missense mutations in glycogen storage disease type VI. *Inherit Metab Dis* 30: 722-734
49. Nakai A, Shigematsu Y, Takano T, Kikawa Y, Sudo M (1994) Uncooked cornstarch treatment for hepatic phosphorylase kinase deficiency. *Eur J Pediatr* 153: 581-583
50. Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M, Nishikawa M (1965) Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 517-523
51. Kahn A, Meienhofer MC, Cottreau D, Lagrange JL, Dreyfus JC (1979) Phosphofructokinase (PFK) isozymes in man. I. Studies of adult human tissues. *Hum Genet* 48: 93-108
52. García M, Pujol A, Ruzo A, Riu E, Ruberte J, Arbós A, Serafín A, Albella B, Feliu JE, Bosch F (2009) Phosphofructo-1-kinase deficiency leads to a severe cardiac and hematological disorder in addition to skeletal muscle glycogenosis. *PLoS Genet* 8 [Epub, doi:10.1371/journal.pgen.1000615]
53. Beauchamp NJ, Dalton A, Ramaswami U, Niinikoski H, Mention K, Kenny P, Kolho KL, Raiman J, Walter J, Treacy E, Tanner S, Sharrard M (2007) Glycogen storage disease type IX: High variability in clinical phenotype. *Mol Genet Metab* 92: 88-99
54. Hendrickx J, Bosshard NU, Willems P, Gitzelmann R (1998) Clinical, biochemical and molecular findings in a patient with X-linked liver glycogenosis followed for 40 years. *Eur J Pediatr* 157: 919-923
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/306000> (Online Mendelian Inheritance in Man, NCBI)
56. Tsujino S, Shanske S, Sakoda S, Fenichel G, DiMauro S (1993) The molecular genetic basis of muscle phosphoglycerate mutase (PGAM) deficiency. *Am J Hum Genet* 52: 472-477
57. Kreuder J, Borkhardt A, Repp R, Pekrun A, Götsche B, Gottschalk U, Reichmann H, Schachenmayr W, Schlegel K, Lampert F (1996) Brief report: inherited metabolic myopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *N Engl J Med* 334: 1100-1104
58. Comi GP, Fortunato F, Lucchiari S, Bordoni A, Prella A, Jann S, Keller A, Ciscato P, Galbiati S, Chiveri L, Torrente Y, Scarlato G, Bresolin N (2001) Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. *Ann Neurol* 50: 202-207
59. Gitzelmann R, Spycher MA, Feil G, Müller J, Seilnacht B, Stahl M, Bosshard NU (1996) Liver glycogen synthase deficiency: a rarely diagnosed entity. *Eur J Pediatr* 155: 561-567
60. Mayes PA (2000) *Metabolizm glikogenu*, W: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, tłum. Kokot F, Koj A (red) *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 249-259

## Glycogenoses – genetic disorders leading to disturbed glycogen metabolism

Małgorzata Bejtko, Dominika Malińska 

Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St., 02-093 Warszawa, Poland

 e-mail: d.malinska@nencki.gov.pl

**Key words:** metabolic myopathies, glycogen, GSD, glycogenoses, glucose metabolism

### ABSTRACT

Glycogen storage diseases (GSD, glycogenoses) is a group of genetic disorders resulting from abnormal metabolism of glycogen – a polymeric molecule involved in intercellular glucose storage. Currently 13 different types of glycogenoses are known. They all result from mutations in genes for different enzymes, which directly or indirectly regulate glycogen synthesis and degradation. The clinical manifestation of GSDs encompasses primarily liver, striated muscle and brain tissue dysfunction. In those tissues glycogen plays a particularly important role. The spectrum and severity of symptoms is very diverse, depending on both the type and subtype of the disease as well as on the individual features of the patient. The therapy is based mainly on application of an appropriate diet. Enzyme replacement therapy is currently available only for GSD type II. For some of the other types the possibility for gene therapy is intensively investigated.

Joanna Bendorowicz-  
Pikuła<sup>1,✉</sup>

Sławomir Pikuła<sup>1</sup>

Anna Tyłki-Szymańska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Biologii Doświadczalnej PAN

im. Marcelego Nenckiego w Warszawie  
<sup>2</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Institut  
"Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka" w  
Warszawie

✉ Institut Biologii Doświadczalnej PAN im.  
Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-  
093 Warszawa; tel.: (22) 589 23 47; e-mail:  
j.bendorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 11 maja 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** choroby spichrzeniowe,  
cholesterol, sfingolipidy, lizosomy, tratwy  
lipidowe

**Wykaz skrótów:** EE – wczesne endosomy;  
ER – siateczka śródplazmatyczna; GA –  
aparat Golgiego; LBPA – kwas lizobisfos-  
fatydowy; LDL (ang. *low density lipoprotein*)  
– lipoproteiny o niskiej gęstości; LE –  
późne endosomy; LSO (ang. *lysosome-like*  
*storage organelles*) – organelle przypomi-  
ające lizosomy; MVB (ang. *multivesicular*  
*bodies*) – ciała wielopęcherzykowe; NPC1 lub  
2 – białko Niemann-Picka typu C 1 lub 2

**Podziękowania:** Autorzy pragną podzię-  
kować Paniom Małgorzacie E. Sztolszterer  
i Magdalenie M. Domoń za ich wszech-  
stronny udział w badaniach mechanizmów  
rozwoju choroby Niemann-Picka typu C, a  
szczególnie w badaniach transportu cho-  
lesterolu w komórce i roli aneksyn oraz tratw  
lipidowych w tym procesie. Praca powstała  
w trakcie realizacji projektu badawczego  
numer N N401 642740 finansowanego ze  
środków przyznanych przez Narodowe  
Centrum Nauki.

## STRESZCZENIE

Lipidozy to typ metabolicznych, genetycznie uwarunkowanych, rzadkich chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu, transportu i składowania niektórych lipidów: cholesterolu, sfingolipidów i glikolipidów. Coraz więcej danych wskazuje, że u podłoża cywilizacyjnych chorób metabolicznych dotyczących bardzo wielu ludzi, takich jak otyłość, cukrzyca typu II i miażdżyca, leżą także zaburzenia procesu składowania lipidów w komórce. W niniejszym artykule przeglądowym przedstawiamy mechanizmy rozwoju niektórych rzadkich lipidowych chorób spichrzeniowych (np. choroby Niemann-Picka typu C), a także pewne poszlaki świadczące, że rozwojowi tych chorób może towarzyszyć nieprawidłowe rozmieszczenie, dynamika i funkcjonowanie tratw lipidowych, co skutkuje zaburzeniami różnorodnych szlaków przekazywania sygnałów, transportu pęcherzykowego, jak i funkcjonowania lizosomów. Podobne zjawiska mogą towarzyszyć również rozwojowi innych lipidowych chorób spichrzeniowych, takich jak choroba Gauchera typu 1 lub choroba Niemann-Picka typu A/B.

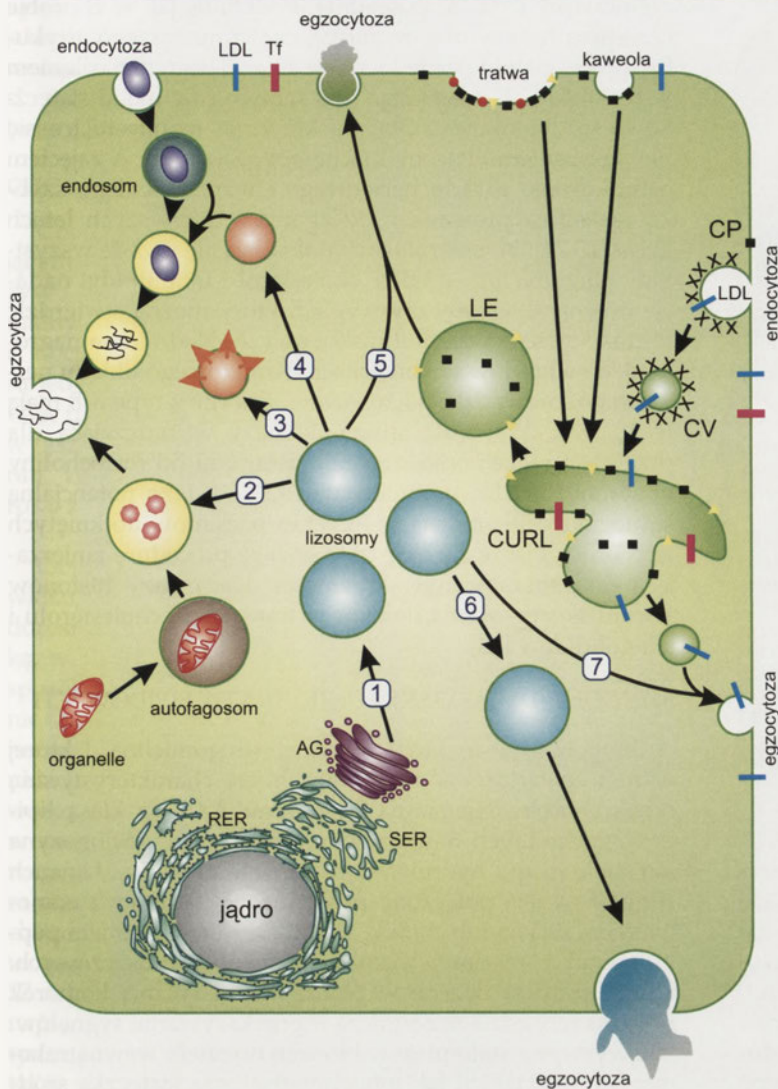
## LIPIDOWE CHOROBY SPICHRZENIOWE

Lipidozy należą do grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych (ang. *lysosomal storage disorders*), które są wynikiem zaburzenia funkcji aparatu lizosomalnego (Ryc. 1) [1-3]. Stanowią one grupę ponad 40 genetycznie uwarunkowanych schorzeń. Z jednym wyjątkiem, dziedziczą się one autosomalnie recesywnie. Podstawę klasyfikacji chorób lizosomalnych stanowi rodzaj związku magazynowanego w lizosomach komórki, który w prawidłowych warunkach ulega w nich rozkładowi. Nagromadzone dane doświadczalne świadczą o tym, że podstawową przyczyną chorób spichrzeniowych jest nieprawidłowe funkcjonowanie białek lizosomalnych, dzięki czemu w lizosomach dochodzi do nagromadzenia metabolitów, które nie ulegają degradacji (Ryc. 2). Mimo wielu lat badań nad genetycznymi uwarunkowaniami tych chorób i molekularnym mechanizmem towarzyszącym rozwojowi choroby, wiedza na temat zdarzeń, które zachodzą od momentu nagromadzenia się nie zdegradowanych cząsteczek wewnątrz lizosomów do pojawienia się objawów choroby, jest nadal ograniczona [4-6].

W artykule szczególną uwagę poświęcono lipidowym chorobom spichrzeniowym, takim jak choroba Niemann-Picka typu A/B i typu C oraz choroba Gauchera typu 1, których charakterystyczną cechą jest zaburzenie metabolizmu lipidów, a także ich gromadzenie w przedziale lizosomalnym komórki na skutek braku lub obniżonej aktywności enzymów hydrolitycznych, lub braku białek pełniących funkcje transportowe bądź receptorowe w błonie lizosomalnej [4,6,7].

## UDZIAŁ MIKRODOMEN BŁONOWYCH W ROZWOJU CHORÓB SPICHRZENIOWYCH

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach nad budową, dynamiką i funkcjami błon biologicznych wskazują, że błony biologiczne, zarówno błona plazmatyczna, jak i błony organelli komórkowych, charakteryzują się obecnością mikrodomen o różnym składzie chemicznym, czasie życia i funkcjach oraz, że domeny te zaangażowane są w procesy kluczowe dla przeżycia komórki. Szczególną uwagę badaczy skupiają mikrodomeny, których powstanie wynika ze specyficznych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami cholesterolu i sfingolipidów, tzw. tratwy lipidowe, występujące w błonie plazmatycznej i w błonach wewnątrzkomórkowych. Określone białka dostają się na teren mikrodomen wzbogaconych w cholesterol i sfingolipidy; mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany [8]. Kluczowym elementem tych mechanizmów jest potranslacyjna modyfikacja białek, polegająca na dołączeniu do cząsteczki białka reszty długocuchowego kwasu tłuszczowego lub innych pochodnych lipidów, dzięki czemu białka, na przykład posiadające kotwicę zbudowaną z glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI), są kierowane na teren tratw lipidowych. W przeciwień-



**Rycina 1.** Udział lizosomów w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. (1) Enzymy lizosomalne (hydrolazy takiej jak kwasna ceramidaza,  $\alpha$ -glukozydaza,  $\alpha$ -L-iduronidaza,  $\beta$ -heksaminidazy A i B, glukocerebrozydaza) są syntetyzowane w kanałkach szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER) i ulegają tam także glikozylacji (dodanie reszt mannozy), a następnie są „pakowane” do pęcherzyków prelizosomalnych w aparacie Golgiego (AG). W aparacie Golgiego reszty mannozy ulegają fosforylacji, co jest sygnałem kierującym enzymy do lizosomów. Prelizosomy ulegają procesowi fuzji, tworząc dojrzałe lizosomy. Lizosomy uczestniczą w kluczowych dla fizjologii komórki procesach, takich jak autofagia (2), programowana śmierć komórki (3), endo- (4) i egzocytoza (5, 6) oraz wymiana i transport białek (7). Na rycinie zaznaczono także położenie wyspecjalizowanych mikrodomen błonowych wzbogaconych w cholesterol i sfingolipidy (tzw. tratw i kaweoli), uczestniczących w transporcie pęcherzykowym. Skróty i symbole zastosowane na rycinie: Tf – transferyna; LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości; CP – dołki oplaszczone klatryną; CV – pęcherzyki oplaszczone klatryną (pH 7,2–7,4); SER/RER – gładka/szorstka siateczka śródplazmatyczna (pH 7,2–7,4); CURL – sortujące endosomy (pH 5,9–6,0); LE – późne endosomy (pH 5,0–6,0); LY – lizosomy (pH 5,0–5,5); n – zgrupowania cząsteczek cholesterolu;  $\Phi$  – siateczka klatrynowa.

stwie do białek, które ulegają modyfikacji resztami krótkołańcuchowych nienasyconych lub rozgałęzionych kwasów tłuszczowych i nie są kierowane na teren tratw [8-10].

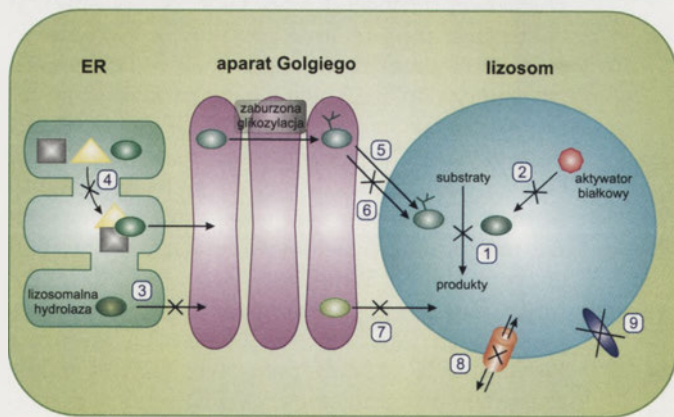
Coraz więcej danych doświadczalnych świadczy o tym, że dynamiczne zmiany organizacji błon komórkowych, polegające na powstawaniu, agregacji, a następnie dysocjacji mikrodomen błon biologicznych bogatych w cholesterol i glikosfingolipidy, tzw. tratw lipidowych, są nieodzownym elementem bardzo wielu procesów biologicznych [9]. Do takich procesów zalicza się między innymi replikację wirusów, ich wnikanie do komórek i organizację otoczki

wirusowej (HIV-1, HHV-6, CPV, NDV), infekcje bakteryjne (np. makrofagów przez bakterie *P. gingivalis*), przekazywanie sygnałów (w których uczestniczą np. białkowe kinazy z rodziny Src, receptory związane z białkami G, TGF- $\beta$ ) i transport pęcherzykowy (np. endocytoza białek z kotwicą GPI na drodze niezależnej od klatryny) [11-14]. Rosnąca liczba obserwacji wskazuje, że na terenie mikrodomen zachodzi regulacja aktywności enzymów (np. 5'-nukleotydaza, PKC $\beta$ II, MT6-MMP, BACE1, PS1, fosfolipaza A<sub>2</sub>), białek transportujących jony (np. NHE3, NaP<sub>2</sub>, izoformy PMCA, CFTR, kanały potasowe, TRPV4) i inne cząsteczki (np. transportery ABC), a także dojrzewanie i regulacja zmian konformacji białek (np. przekształcanie białka APP do  $\beta$ -amyloidu lub regulacja oligomeryzacji receptorów przy pomocy białek opiekuńczych [15]). Stwierdzono także, że w zależności od typu potranslacyjnej modyfikacji, jakiej ulega określone białko, zmienia się jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja, w tym występowanie na terenie mikrodomeny lub poza jej obrębem [12-14].

Molekularne mechanizmy procesów biologicznych zależnych od tratw lipidowych nie są w pełni wyjaśnione. Nie mamy nawet pewności, czy jest to jeden uniwersalny mechanizm, czy mamy do czynienia z różnymi mechanizmami, charakterystycznymi dla określonego procesu biologicznego. Z drugiej strony wydaje się, że zgromadzone dane doświadczalne wskazują, iż zaburzenia funkcjonowania i składu chemicznego specyficznych mikrodomen błonowych – tratw lipidowych – mogą prowadzić do rozwoju bardzo wielu, często ze sobą niezwiązanych stanów patologicznych lub zespołów chorobowych, takich np. jak przerost mięśnia sercowego, zawał serca, nadciśnienie tętnicze, nowotwory, choroby neurodegeneracyjne (np. choroby Alzheimera, Parkinsona, płasawica Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne), mukowiscydoza, choroby autoimmunologiczne (np. SLE), deficyt białka ABCA1 oraz choroby związane z nieprawidłowym metabolizmem lipidów i lipidowe choroby spichrzeniowe [15,16].

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień, pozwalających na sformułowanie hipotezy, że jednym z mechanizmów, które przyczyniają się do rozwoju chorób metabolicznych są zaburzenia

organizacji błon komórkowych [9]. Szczególną uwagę zwraca się na zaburzenia funkcjonowania i składu chemicznego mikrodomen błonowych (tratw lipidowych). Mogą wynikać m.in. z nieprawidłowego transportu i metabolizmu składników lipidowych tych mikrodomen (przede wszystkim cholesterolu i sfingolipidów) i wynikającego z tego nieprawidłowego kierowania białek. Jednym z kluczowych odkryć dotyczących domenowej budowy błon było stwierdzenie istnienia domen nie tylko w błonie plazmatycznej, ale także w błonach wewnątrzkomórkowych i udziału tych mikrodomen w biogenezie organeli komórkowych [13,17-19].



**Rycina 2.** Uwarunkowania molekularne lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Defekt genetyczny wywołuje brak lub niedobór (1) kwaśnych hydrolaz lizosomalnych, np. enzymów degradujących lipidy takie jak sfingolipidy (choroba Niemann-Picka typu A/B, choroba Gauchera typu I) lub białek uczestniczących w transporcie i magazynowaniu cholesterolu (choroba Niemann-Picka typu C); (2) brak aktywatorów enzymów lizosomalnych; (3) brak białek niezbędnych do procesu kierowania enzymów do lizosomów; (4) brak lub nieprawidłowe składanie złożonych z wielu białek kompleksów wymaganych do transportu enzymów z ER; (5) nieprawidłową glikozylację, dzięki czemu enzym, który znajduje się w lizosomie, jest nieaktywny; (6) nieprawidłową glikozylację, czego skutkiem jest zatrzymanie enzymu w aparacie Golgiego; (7) brak białek niezbędnych do procesu kierowania enzymów z aparatu Golgiego do lizosomów; (8) brak integralnych białek błon lizosomalnych regulujących funkcje tych organelli, np. białka LAMP 1 i 2 oraz NPC1; (9) brak transporterów w błonach lizosomalnych uczestniczących w transporcie np. cystyny lub kwasu sialowego do lizosomów. Na podstawie [4], zmienione.

W niniejszym artykule przeglądowym chcemy przedstawić hipotezę, że zaburzenia organizacji i składu chemicznego mikrodomen błon biologicznych, a szczególnie ich nagromadzenia się w błonach późnych endosomów/lizosomów, są ważnym czynnikiem w patomechanizmie chorób spichrzeniowych – lipidoz [8], takich jak bardzo rzadka choroba Niemann-Picka typu C czy występująca zdecydowanie częściej choroba Gauchera typu 1 i typu 2/3 (postać neuronopatyczna).

### CHOROBA NIEMANNA-PICKA TYPU A/B

W zależności od rodzaju nagromadzonych lipidów i obrazu klinicznego wyróżniamy następujące typy choroby Niemann-Picka (NP). Typy A i B, nazywane też typem I, charakteryzują się deficytem sfingomielinazy (a zatem charakteryzują się nagromadzeniem sfingomieliny) [1,20-22], zaś typ C nazywany jest także typem II. Choroba NP typu C ma ten sam eponim, jak A i B, ale zupełnie inny patomechanizm i jest spowodowana nieprawidłowym funkcjonowaniem jednego z dwóch białek, białka NPC1 lub białka NPC2, w wyniku czego dochodzi do odkładania niezestryfikowanej formy (wolnego) cholesterolu i glikosfingolipidów w przedziale endosomalno-lizosomalnym komórki (mechanizmy związane z rozwojem choroby NP typu C omówiono szczegółowo w następnym rozdziale).

Choroba NP typu A/B jest lizosomalną chorobą spichrzeniową o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia, spowodowaną mutacją w genie kodującym enzym sfingomielinazę. Wyróżnia się, podobnie jak w chorobie Gauchera, trzy postacie kliniczne choroby: typ B nieneuronopatyczny o przewlekłym przebiegu, typ A neuronopatyczny

niemowlęcy i postać pośrednią. Podobnie, jak w chorobie Gauchera (omówionej w dalszej części niniejszego artykułu), proces patologiczny toczy się z największym nasileniem w makrofagach, obejmując tym samym cały układ siateczkowo-śródbłonkowy. Objawy kliniczne manifestują się powiększeniem wątroby i śledziony, a w typie A zajęciem ośrodkowego układu nerwowego i wyniszczeniem, szybko postępującą prowadzącą do zgonu w pierwszych latach życia [23,24]. W makrofagach odkładają się przede wszystkim sfingomielina, a także cholesterol i inne lipidy, nadając im charakterystyczny wygląd, który można stwierdzić w trakcie obserwacji mikroskopowych. Nadmierne nagromadzenie lipidów w komórkach ośrodkowego układu nerwowego, prowadzi do ich śmierci. Chorzy z typem B mają resztkową aktywność sfingomielinazy wystarczającą dla przebiegu reakcji odszczepienia ceramidu od fosfocholiny w stopniu bardzo ograniczonym [23,24]. Jako potencjalną strategię terapeutyczną w leczeniu pacjentów dotkniętych tą chorobą bierze się m.in. pod uwagę procedurę zmierzającą do zahamowania aktywności deacetylazy histonów w celu skorygowania defektu w transporcie cholesterolu i sfingolipidów [25].

### SFINGOLIPIDY JAKO SKŁADNIKI TRATW LIPIDOWYCH

Sfingolipidy, do których należy sfingomielina, i której wzrost zawartości w makrofagach jest charakterystyczną cechą choroby Niemann-Picka typu A/B, są klasą lipidów pochodnych aminoalkoholu sfingozyny. Sfingozyna ma dwie grupy hydroksylowe i jedną aminową. Łańcuch sfingozyny jest połączony przez mostek tlenowy z etanoloaminą, seryną lub choliną i jednocześnie wiązaniem peptydowym z resztami rozmaitych kwasów tłuszczowych. Sfingolipidy są obecne w błonie plazmatycznej komórek nerwowych, gdzie uczestniczą w przekazywaniu sygnałów. Nie występują natomiast w błonach organelli wewnątrzkomórkowych, takich jak mitochondria oraz siateczka śródplazmatyczna. W błonie plazmatycznej stanowią 20-30% wszystkich lipidów. Sfingolipidy są syntezowane w aparacie Golgiego, skąd są transportowane do błony plazmatycznej w formie monomerów [26].

Wśród sfingolipidów wyróżnia się sfingomieliny (należą do fosfolipidów), ceramidy, glikosfingolipidy (cerebrozydy, gangliozydy i sulfatydy) oraz fosfosfingozyny (sfingomielidy). Powszechnie uważa się, że glikosfingolipidy chronią powierzchnię komórek przed niebezpiecznymi czynnikami otoczenia, poprzez tworzenie wytrzymałej mechanicznie i chemicznie najbardziej zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Niektóre złożone glikosfingolipidy uczestniczą ponadto w mechanizmie rozpoznawania molekularnego. Okryto, że stosunkowo proste produkty metabolizmu złożonych sfingolipidów, takie jak ceramidy i fosforany sfingozyny są ważnymi cząsteczkami przekaźnikowymi w procesie przekazywania sygnałów blokujących apoptozę oraz redukujących negatywne skutki stresu [27,28].

Należy podkreślić, że cząsteczki lipidów, w których skład wchodzi ceramidy, mają tendencję do samoorganizacji, tworząc w błonach komórkowych mikrodomeny o większej lepkości niż pozostałe rejony błony. Niektórzy badacze przypuszczają, że wzbogacone w sfingolipidy mikrodomeny

ny są platformami, gdzie gromadzą się specyficzne białka, jakkolwiek mechanizm tego zjawiska budzi nadal kontrowersje [29]. Udział mikrodomen błonowych w patogenezie choroby Niemanna-Picka typu A/B nie został jak dotąd potwierdzony doświadczalnie.

### CHOROBA NIEMANNA-PICKA TYPU C

Choroba NP typu C jest rzadkim schorzeniem, dotyczącym rocznie w Europie Zachodniej średnio 1 na 120 000 żywo urodzonych dzieci; dziedziczny się w sposób autosomalny recesywny [30]. W Polsce rodzi się rocznie 1-5 dzieci obciążonych NP typu C. Należy podkreślić, że dane te są jedynie szacunkowe i oparte na rozpoznawalności, tak więc rzeczywista częstość występowania choroby może być wyższa. NP typu C jest chorobą o niepomyślnym rokowaniu. Większość pacjentów umiera przed ukończeniem 20 roku życia (wielu przed 10 rokiem życia) [20,23,31].

Objawy choroby NP typu C mogą wystąpić w różnym wieku, zarówno w okresie noworodkowym, jak i w wieku dorosłym, a sama choroba może rozwijać się z różną dynamiką, w poszczególnych narządach i układach w różnorodny sposób. Najczęściej obserwowanym objawem jest powiększenie śledziony i wątroby oraz postępująca degeneracja układu nerwowego. Obserwujemy postacie z nasileniem zmian w układzie nerwowym, prawie bez zajęcia układu siateczkowo-śródbłonkowego i odwrotnie, z wyraźnym spichrzaniem w makrofagach i powolnym zajmowaniem układu nerwowego. W przypadku wczesnodziecięcej postaci choroby, która charakteryzuje się bardzo szybkim postępem, pierwszym charakterystycznym objawem jest przedłużona żółtaczka noworodkowa a objawy neurologiczne są widoczne już między 12 a 18 miesiącem życia. Są to przede wszystkim obniżone napięcie mięśniowe oraz opóźniony rozwój funkcji motorycznych. Objawom neurologicznym zwykle towarzyszy także powiększenie wątroby [31].

W większości przypadków NP typu C jest wynikiem mutacji w genie *NPC1*, znajdującym się na chromosomie 18q11-q12. Tylko 5% przypadków zidentyfikowano, jako wynik mutacji w genie *HE1/NPC2*, znajdującym się na chromosomie 14q24.3. Podobnie jak komórki pobrane od zdrowych osób, komórki pacjentów obciążonych NP typu C charakteryzują się prawidłową syntezą cholesterolu w siateczce śródplazmatycznej i jego transportem w kierunku błony plazmatycznej. Internalizacja i hydroliza cząsteczek lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) zachodzi w tych komórkach prawidłowo. W wyniku mutacji w jednym z dwóch genów, *NPC1* lub *NPC2* dochodzi do upośledzenia transportu wolnego cholesterolu, pochodzącego z cząsteczek LDL, w kierunku błony plazmatycznej i siateczki śródplazmatycznej. W konsekwencji w komórce obserwuje się nagromadzenie wolnego cholesterolu (oraz innych lipidów, w tym glikosfingolipidów) w organellach przypominających lizosomy (ang. *lysosome-like storage organelles*, LSO) [32]. Ponadto wykazano, że nawet u osobników heterozygotycznych (u myszy), niosących mutację w jednym z alleli genu kodującego białko NPC1 (*NPC1*<sup>+/-</sup>), istnieje wysokie prawdopodobieństwo rozwoju objawów charakterystycznych dla NP typu C w późnym wieku, tzn. gromadzenie cholesterolu w komórkach mózgu, zanik komórek Purkiniego w mózdzku, akty-

wację kinazy MAP odpowiedzialnej za fosforylację białka tau. Obserwacje te wskazują również na możliwość rozwoju w starzejącej się populacji osobników NPC1<sup>+/-</sup> chorób neurologicznych, np. tautopatii [33].

Białko NPC1 (kodowane przez gen *NPC1*) zbudowane jest z 1278 reszt aminokwasowych tworzących 13 domen transbłonowych, kilka pętli skierowanych do cytoplazmy i trzy pętle w świetle późnych endosomów. Analiza sekwencji aminokwasowej białka NPC1 ujawniła obecność w jego strukturze rejonu wykazującego wysoki stopień podobieństwa w stosunku do domeny wiążącej cholesterol (SSD) białek uczestniczących w metabolizmie cholesterolu, takich jak reduktaza HMG-CoA i białko Scap. W skład rejonu wykazującego podobieństwo do domeny SSD wchodzi domeny transbłonowe 3-7 (reszty aminokwasowe 615-797); rejon ten prawdopodobnie odgrywa rolę w regulacji transportu cholesterolu w komórce przez białko NPC1. Na podstawie analizy występowania mutacji w genie *NPC1* stwierdzono, że w wyniku zmian w tej części genu, która koduje SSD dochodzi do syntezy nieaktywnego białka NPC1. Inni badacze podkreślili znaczenie domeny obecnej na N-końcu cząsteczki białka NPC1 w wiązaniu cholesterolu i oksysteroli. We fragmencie C-końcowym białka NPC1 zlokalizowany jest „motyw dwuleucynowy” (LLNF), który odpowiada za kierowanie białka do lizosomów. Delecja tego krótkiego fragmentu białka prowadzi do jego nagromadzenia w ER. Dodatkowo, w strukturze białka NPC1 stwierdzono obecność 13 hydrofobowych reszt aminokwasowych (rejon pomiędzy 1 a 22 resztą aminokwasową), charakterystycznych dla peptydu sygnałowego kierującego białka do ER [13,20]. Analiza mutantów delecyjnych białka NPC1, pozwoliła zaobserwować, że białka pozbawione sekwencji C-końcowej lokują się w ER. Zmienionej lokalizacji białka towarzyszy nagromadzenie cholesterolu w przedziale endosomalno-lizosomalnym komórek. Zatem nowo zsyntezowane białko NPC1 jest prawdopodobnie kierowane najpierw do ER, a następnie do przedziału późnych endosomów/lizosomów, gdzie uczestniczy w procesie eksportu cholesterolu. W komórkach, w których występuje nie zmutowane białko NPC1, współwystępuje ono z białkiem Lamp-2, charakterystycznym zarówno dla późnych endosomów, jak i lizosomów [13].

NPC1 jest integralnym białkiem błonowym późnych endosomów, przedziału komórkowego charakteryzującego się obecnością białek Rab7 i Rab9. Białka Rab, należące do rodziny małych GTPaz, odgrywają kluczową rolę w transporcie pęcherzykowym; białko Rab7 reguluje procesy transportu pęcherzyków błonowych do lizosomów, podczas gdy Rab9 w kierunku rejonu trans aparatu Golgiego. W związku z powyższym zaobserwowano, że białko NPC1 jest tylko czasowo związane z lizosomami i błonami rejonu trans aparatu Golgiego. Nie stwierdzono natomiast obecności białka NPC1 w błonie wczesnych endosomów. W literaturze przedmiotu istnieją doniesienia wskazujące, że pęcherzyki, w których zlokalizowane jest białko NPC1 zawierają kwas lizobisfosfatydowy (LBPA). Podczas gdy LBPA lokuje się wyłącznie w wewnętrznych błonach ciał wielopęcherzykowych (MVB, ang. *multivesicular bodies*), obecność białka NPC1 zaobserwowano zarówno w błonie ograniczającej, jak i w błonach wypełniających ciała wielopęcherzykowe.

W fibroblastach pacjentów z chorobą NP typu C, w strukturach tych dochodzi do nagromadzenia cholesterolu. Podobny obraz uzyskuje się traktując komórki prawidłowe inhibitorem transportu cholesterolu, U18666A. Związek ten prawdopodobnie zaburza funkcję białka NPC1, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania eksportu cholesterolu z późnych endosomów/lizosomów w kierunku innych przedziałów komórki [13].

W odróżnieniu od białka NPC1, białko NPC2 jest zbudowane tylko ze 151 reszt aminokwasowych. W N-końcowym rejonie cząsteczki białka jest obecna sekwencja sygnałowa obejmująca 19 reszt aminokwasowych, dzięki której białko NPC2 jest wydzielane z komórek. W strukturze NPC2 wyróżniono rejon tworzący hydrofobową kieszeń, charakteryzującą się wysokim powinowactwem w stosunku do cholesterolu. W komórkach z mutacją w genie *NPC1* zaobserwowano, że białko NPC2 występuje wyłącznie na terenie lizosomów. W związku z tym, że upośledzenie funkcji dwóch różnych białek zaburza w komórkach transport pęcherzykowy i wywołuje tę samą chorobę, zakłada się sekwencyjny mechanizm działania białek NPC1 i NPC2 w procesie transportu cholesterolu w komórce [13,20,34].

#### METABOLIZM I TRANSPORT CHOLESTEROLU W KOMÓRCIE

W poprzednim rozdziale wspomniano o procesie nadmiernego gromadzenia się cholesterolu w przedziale komórkowym przypominającym lizosomy, czemu towarzyszy rozwój objawów chorobowych. Z drugiej strony cholesterol jest niezbędny do życia. Wiadomo jednak, że w zbyt wysokim stężeniu we krwi człowieka i innych ssaków jest między innymi przyczyną zmian miażdżycowych. Stąd też istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ma precyzyjna regulacja mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy cholesterolu [35,36].

Cholesterol jest głównym steroidem komórek zwierzęcych natomiast inne organizmy eukariotyczne, takie jak rośliny lub grzyby, syntetyzują go w śladowych ilościach. Stanowi on ważny materiał budulcowy błon komórkowych ssaków. Jako najbardziej rozpowszechniony ze steroli, wchodzi w skład błon organelli komórkowych, takich jak endosomy, lizosomy i błony aparatu Golgiego, jednak przede wszystkim lokuje się w błonie plazmatycznej komórek, gdzie stanowi 35–45% wszystkich lipidów [13].

Kontrola zawartości cholesterolu w komórkach ssaków zależy od trzech podstawowych procesów: syntezy *de novo*, poboru lipidu na drodze endocytozy receptorowej cząsteczek LDL oraz transportu zwrotnego i desorpcji cholesterolu z błony plazmatycznej komórek. Miejscem biosyntezy cholesterolu w komórkach jest siateczka śródplazmatyczna (ER), skąd transportowany jest przede wszystkim do błony plazmatycznej; 65–80% komórkowego cholesterolu jest obecne w błonie plazmatycznej komórki, podczas gdy jedynie 0,1–2% w ER. Zawartość cholesterolu w ER może ulegać znacznym wahaniom ze względu na zachodzące wewnątrz komórek procesy jego transportu pomiędzy poszczególnymi przedziałami komórkowymi. W pewnych warunkach zawartość cholesterolu w ER może wzrosnąć dziesięcio-

krotnie, czemu towarzyszy spadek jego zawartości w błonie plazmatycznej [13,37,38].

W stanie normy zawartość komórkowego cholesterolu i jego rozmieszczenie pomiędzy poszczególnymi przedziałami komórkowymi podlegają precyzyjnej kontroli. Jest to możliwe dzięki licznym mechanizmom regulacji wpływającym na ilość i aktywność reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (reduktaza HMG-CoA). Enzym ten, zakotwiczony w ER, odgrywa kluczową rolę w procesie biosyntezy cholesterolu. System kontrolujący poziom cholesterolu w komórce obejmuje także integralne białka ER, które są wrażliwe na zmiany zawartości tego fosfolipidu. Do takich białek należą m.in. białka SREBP, których produkty proteolizy są czynnikami transkrypcyjnymi, odpowiedzialnymi za regulację ~30 genów zaangażowanych w syntezę cholesterolu i innych lipidów [13,39].

Metabolizm i zawartość cholesterolu w komórce kontrolowane są również na poziomie potranskrypcyjnym. Wzrost stężenia mewalonianu lub cholesterolu powoduje, że aktywność reduktazy HMG-CoA ulega zahamowaniu przez białko Insig. Domena wiążąca cholesterol reduktazy HMG-CoA odpowiada za związanie enzymu z białkiem Insig, co prowadzi do ubikwitylacji enzymu. W konsekwencji reduktaza HMG-CoA ulega degradacji w proteasomie 26S. Wysoka zawartość cholesterolu w komórce z jednej strony hamuje jego syntezę, z drugiej natomiast aktywuje białko ER, acylotransferazę acylo-CoA-cholesterol (ACAT). Podobnie jak reduktaza HMG-CoA, ACAT jest integralnym białkiem ER, katalizującym reakcję estryfikacji cholesterolu. Powstające estry cholesterolu wraz z triglicerydami tworzą krople lipidowe przechowywane na terenie cytoplazmy. Kiedy zawartość cholesterolu w komórce spada, zamknięte w kroplach lipidowych estry cholesterolu ulegają hydrolizie w wyniku reakcji katalizowanej przez neutralną hydrolazę estrów cholesterolu (nCEH). Następujące po sobie reakcje syntezy i hydrolizy estrów cholesterolu, katalizowane przez wymienione enzymy, pełnią rolę ochronną w komórce. Tworzenie estrów cholesterolu powoduje powstanie produktu obojętnego, w odróżnieniu od cholesterolu wolnego, którego nadmiar jak już wspomniano jest toksyczny dla komórki [13,38,40,41].

Oprócz syntezy *de novo* komórki pozyskują cholesterol również z innego źródła, jakim jest krew obwodowa, skąd pobierany jest w postaci cząsteczek LDL. Proces ten odbywa się na drodze endocytozy receptorowej. Cząsteczki LDL mają średnicę około 20 nm i masę cząsteczkową 2500 kDa. Ich hydrofobowy rdzeń, zbudowany z triglicerydów i około 1500 cząsteczek cholesterolu, zestryfikowanych najczęściej kwasem linolenowym, jest otoczony polarną warstwą utworzoną przez cząsteczki fosfolipidów, cząsteczki niezestryfikowanego cholesterolu oraz apolipoproteinę ApoB-100. Białko ApoB-100 rozpoznawane jest przez receptory cząsteczek LDL obecne na powierzchni komórek. Proces transportu cząsteczek LDL do komórek docelowych ulega zapoczątkowaniu w wyniku związania cząsteczek LDL z ich specyficznymi receptorami obecnymi na błonie plazmatycznej [13,38,42].

W procesie endocytozy od błony plazmatycznej odłączają się pęcherzyki opłaszczone klatryną, zawierające w swym wnętrzu cząsteczki LDL, związane z białkami receptorowymi. Płaszcz klatrynowy wokół pęcherzyków ulega rozpadowi, w następstwie czego powstają wczesne endosomy. Wnętrze wczesnych endosomów charakteryzuje się obniżonym pH (około 6,0) w stosunku do cytoplazmy dzięki działaniu w błonach tych organelli pompy protonowej, która transportuje  $H^+$  z cytosolu do światła endosomów. ATPaza ta należy do rodziny wakuolarnych  $H^+$ -ATPaz, obecnych między innymi w błonach cystern aparatu Golgiego, pęcherzyków opłaszczonych klatryną, późnych endosomów oraz w błonie lizosomów. W warunkach obniżonego pH cząsteczki LDL ulegają dysocjacji z kompleksu z białkami receptorowymi. Receptory ulegają segregacji i powracają do błony plazmatycznej z udziałem endosomów powracających. Z kolei cząsteczki LDL są dalej transportowane do wnętrza komórki w ciałach wielopęcherzykowych (MVB) określanych również, jako endosomy wielopęcherzykowe lub endosomalne pęcherzyki transportujące. MVB są pośrednimi pęcherzykami pomiędzy wczesnymi a późnymi endosomami. Wyróżniającą je cechą jest obecność w ich wnętrzu systemu błon, zaangażowanych w procesy degradacji oraz transportu zwrotnego do błony plazmatycznej białek i lipidów [13,43-46].

Ważnym składnikiem błon wewnątrz ciał wielopęcherzykowych jest kwas lizobisfosfatydowy (LBPA). Przypuszcza się, że LBPA może być ważnym regulatorem transportu cholesterolu, ponieważ prawdopodobnie odgrywa rolę w fuzji błon pęcherzyków zamkniętych wewnątrz ciał wielopęcherzykowych z błoną ograniczającą te struktury. Poruszając się wzdłuż mikrotubul, ciała wielopęcherzykowe przekazują cząsteczki LDL późnym endosomom oraz lizosomom. W porównaniu z wczesnymi endosomami, pęcherzyki przedziału późnych endosomów i lizosomów charakteryzują się jeszcze niższym pH (4,5-5,5). Dodatkowo zawierają enzymy hydrolityczne, których aktywność prowadzi do ostatecznego rozpadu cząsteczek LDL do aminokwasów, kwasów tłuszczowych i cholesterolu. W następnym etapie cząsteczki cholesterolu są transportowane z późnych endosomów i lizosomów w kierunku innych przedziałów komórki, w celu ponownego wykorzystania. W procesie tym biorą udział białka obecne w przedziale późnych endosomów/lizosomów, w tym białka NPC1 i NPC2 [13,47-49].

Innymi białkami mogącymi prawdopodobnie odgrywać rolę w regulacji eksportu cholesterolu z późnych endosomów są białka wiążące jony wapnia i lipidy, aneksyny (np. aneksyna A6) [50,51] oraz białko MLN64 i białko ORP1L [52]. W C-końcowym rejonie białka MLN64 jest zlokalizowana domena START, która jest odpowiedzialna za wiązanie cholesterolu. Stąd też białko MLN64 odgrywa rolę w transporcie cholesterolu z błon jednego pęcherzyka do drugiego. Utworzenie kompleksu pomiędzy ORP1L, RILP i Rab7 ma kluczowe znaczenie w transporcie późnych endosomów w kierunku ujemnego końca mikrotubul. C-końiec białka RILP wiąże się z białkiem motorycznym dyneiną, a białko ORP1L odpowiada za

związanie tego kompleksu ze spektryną, co ma znaczenie w aktywacji dyneiny [52].

Podsumowując tą część rozważań, należy podkreślić, że cholesterol jest niezbędny dla utrzymania funkcji życiowych komórki. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach na całym świecie wskazują, że w komórkach cholesterol pełni kluczową rolę m.in. w formowaniu i funkcjonowaniu mikrodomen błonowych - tratw lipidowych.

#### UDZIAŁ TRATW LIPIDOWYCH W ETIOLOGII CHOROBY NIEMANNA-PICKA TYPU C

Pewne obserwacje sugerują, że nagromadzenie określonych klas lipidów w chorobie NP typu C jest przyczyną zmian związanych ze zmianą liczby mikrodomen, szczególnie w przedziale późnych endosomów/lizosomów, a co się z tym wiąże, również odmiennego rozmieszczenia białek uczestniczących w transporcie pęcherzykowym i w regulacji dynamiki błon biologicznych [32,53,54]. Stwierdzono na przykład, że w komórkach, w których doszło do nagromadzenia cholesterolu i sfingolipidów w przedziale LE/LY zaobserwowano obecność białka NPC1, a także cząsteczek LDL na terenie tratw lipidowych, a nie w rejonie błony, który ulega solubilizacji pod wpływem detergentów. Zapobiegało to transportowi zwrotnemu cząsteczek LDL do błony plazmatycznej. Według autorów obserwacji świadczy to o obecności tratw lipidowych w błonie późnych endosomów, czego nie obserwowano w komórkach w warunkach normy [53,55].

W przypadku receptora insuliny, którego aktywność zależy od lokalizacji na terenie mikrodomen bogatych w sfingolipidy i cholesterol [56], wykazano wzrost zawartości białka we frakcji wzbogaconej w tratwy lipidowe wyizolowanej z hepatocytów z myszy NPC1<sup>-/-</sup>, co było związane również ze zmianami jego aktywności [57]. Wykazano także, że w procesie transportu cholesterolu na drodze endocytozy, w którym uczestniczy białko NPC1, współdziałają z tym białkiem białka tratw lipidowych, flotiliny. Kompleks ten uczestniczy w transporcie cholesterolu. Zablockowanie tych oddziaływań w obecności leku hypocholesterolemicznego, miglustatu, hamowało również powstawanie tratw lipidowych [58].

Wyniki badań prowadzonych z użyciem fibroblastów pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą NP typu C pozwoliły na identyfikację wewnątrzkomórkowego przedziału przypominającego lizosomy, w którym gromadzony był cholesterol. Stwierdzono, że błony tego przedziału charakteryzują się zwiększoną zawartością mikrodomen przypominających tratwy lipidowe oraz aneksyny A6 [51]. Obserwacja ta może świadczyć, że aneksyna A6 jest białkiem rozpoznającym mikrodomeny błonowe bogate w cholesterol [59]. Fakt ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami, że oddziaływania aneksyny A6 z błonami są regulowane nie tylko przez zmiany pH oraz stężenia jonów wapnia w komórce, ale także zawartość cholesterolu w błonach [50,51,60-63]. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że aneksyna A6 może uczestniczyć w organizacji mikrodomen błonowych bogatych w cholesterol [63,64] i w ten sposób przyczyniać się do rozwoju choroby Niemann-Picka typu C.

## CHOROBA GAUCHERA TYPU I

Choroba Gauchera jest sfingolipidozą o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia, spowodowaną mutacją w genie *GBA* kodującym enzym, glukocerebrozydazę [65]. Wyróżnia się 3 postaci kliniczne choroby: typ 1 nie neuronopatyczny o przewlekłym przebiegu (szacunkowo 1 na 50 000 urodzeń), typ 2 ostry neuronopatyczny niemowlęcy (1 przypadek na 100 000 urodzeń) i typ 3 podostry neuronopatyczny (1 przypadek na 100 000 urodzeń). Choroba Gauchera jest najczęściej występującą sfingolipidozą, jak również najczęstszą chorobą lizosomalną. U podłoża choroby leży deficyt aktywności  $\beta$ -glukocerebrozydazy, która w fizjologicznych warunkach odszczepia glukozę od cząsteczki cerebrozydu. Fragmenty komórek, w tym fragmenty błon komórkowych zawierających glukocerebrozyd, ulegają fagocytozie przez makrofagi. Komórki, z nagromadzonym glukocerebrozdem, przybierają charakterystyczny wygląd i są określane jako komórki piankowe lub komórki Gauchera. W typie nie neuronopatycznym proces patologiczny najintensywniej odbywa się w komórkach wywodzących się z linii makrofagów. Aktywność resztkowa enzymu jest nie wystarczająca, aby zmetabolizować napływający w dużych ilościach do makrofagów substrat, pochodzący głównie z błon komórkowych. Gromadzi się on w lizosomach makrofagów, prowadząc do zwiększenia ich liczby oraz do proliferacji komórek, zmiany ich funkcji i struktury (komórki piankowe). Choroba Gauchera typu I jest związana także z pojawieniem się szeregu zaburzeń metabolicznych, takich jak zaburzenia metabolizmu energetycznego, z niską zawartością adiponektyny w krwioobiegu oraz nabywaniem insulinooporności [65,66].

W postaciach neuronopatycznych proces patologiczny w komórkach układu nerwowego przebiega inaczej. Nie występuje w niej zjawisko fagocytozy, tak jak to ma miejsce w przypadku makrofagów. Substrat pochodzi z gangliozydów syntetyzowanych w neuronach, stąd jest go znacznie mniej. Aktywność  $\beta$ -glukocerebrozydazy w tej postaci choroby jest śladowa, niewystarczająca do rozłożenia nawet niewielkiej ilości substratu lub nawet całkiem nieobecna. Nie rozłożony glukocerebrozyd gromadzi się w siateczce śródplazmatycznej, w której zlokalizowane są kanały wapniowe. W wyniku tego kanały te ulegają uszkodzeniu, co prowadzi do śmierci komórki nerwowej. Patomechanizm choroby Gauchera jest więc różny w komórkach układu siateczkowo-środbłonkowego i w układzie nerwowym [65,66].

Do niezwykle rzadkich przyczyn choroby Gauchera należy deficyt aktywności aktywatora SAP C (ang. *saposin activator protein C*). Standardowym leczeniem pacjentów z chorobą Gauchera typu 1 jest substytucja enzymatyczna (ERT, ang. *enzyme-replacement therapy*) we wlewach dożylnych. Można stosować preparat Zavesca. Substancją czynną tego preparatu jest miglustat hamujący syntezę sfingolipidów w tym i glukocerebrozydazy. Leczenie takie można stosować jedynie u pacjentów z lżejszą postacią choroby, gdzie aktywność resztkowa enzymu jest wyższa [65], istnieje jednak ryzyko pojawienia się efektów ubocznych, łącznie z rozwojem cukrzycy typu II [66].

## UDZIAŁ TRATW LIPIDOWYCH W ETIOLOGII CHOROBY GAUCHERA TYPU I

Należy pokreślić, że informacje na temat molekularnego mechanizmu prowadzącego do rozwoju choroby Gauchera są bardzo ograniczone i jak dotąd w literaturze przedmiotu pojawiły się jedynie przypuszczenia na temat udziału tratw lipidowych w patomechanizmie tych chorób. Przesłanką dla tych przypuszczeń jest fakt, że ważny składnik lipidowych mikrodomen błonowych, sfingolipidy, jest obecnie brany pod uwagę przez wielu badaczy jako istotny czynnik w chorobach spichrzeniowych. Wykazano np. że w liniach komórkowych odpowiadających komórkowym modelom choroby Gauchera zawartość i skład lipidowy mikrodomen błonowych ulega poważnym zaburzeniom. Przypuszcza się, że zaburzenia te mogą wpływać na nieprawidłowe sortowanie w komórce biologicznie aktywnych cząsteczek, takich jak lipidy i białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów, np. sygnału generowanego przez insulinę. Zmiany te mogą być odpowiedzialne również za obserwowane w niektórych przypadkach choroby Gauchera typu I nabywanie przez pacjentów insulinooporności, co może być związane z nieprawidłowym przekazywaniem sygnału generowanego przez insulinę i nieprawidłową budową mikrodomen, gdzie zlokalizowane są białka tego szlaku sygnałowego [18,66].

## LEUKODYSTROFIA METACHROMATYCZNA

Leukodystrofia metachromatyczna jest dziedziczącą się autosomalnie recesywnie chorobą lizosomalną powodującą demielinizację ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego i uszkadzającą w mniejszym stopniu inne układy. U podłoża choroby leży deficyt aktywności arylosulfatazy A, która odszczepia reszty siarczanowe od sfingolipidów, które są bogato reprezentowane w osłonkach mielinowych. Do prawidłowego funkcjonowania arylosulfatazy konieczny jest aktywator SAP B. Klinicznie leukodystrofia charakteryzuje się niezwykle różnorodnością, od postaci niemowlęcych o gwałtownym przebiegu do postaci, w których objawy pojawiają się w dorosłości i to jako cechy psychotyczne. Objawy kliniczne związane są z postępującym niszczeniem osłonek mielinowych. Obserwujemy zależność między genotypem i aktywnością resztkową arylosulfatazy A a postępowaniem choroby. Próby terapii polegały na przeszczepach szpiku, a ostatnio nawet miały miejsce próby leczenia enzymatycznego jednak bez większego powodzenia, ze względu na nieprzechodzenie białka enzymatycznego przez barierę krew/mózg [67,68].

## CHOROBA FABRY'EGO

Choroba Fabry'ego jest lizosomalną chorobą spichrzeniową dziedziczącą się w sprzężeniu z chromosomem X. Spowodowana jest deficytem aktywności  $\alpha$ -galaktozydazy. W miarę gromadzenia się globotriaosyloceramidu (substratu  $\alpha$ -galaktozydazy), narastają objawy kliniczne, z których większość jest związana z układem naczyniowym. Objawy te są wywołane spichrzeniem wymienionego związku w komórkach nabłonka naczyniowego (głównie naczyń włosowatych) i jego wpływem na proliferację mięśni gładkich ścian większych naczyń krwionośnych. Gromadzący się



substrat uszkadza też obwodowy układ nerwowy, zaburzając między innymi prawidłową potliwość prowadzącą do nietolerancji wysokich temperatur i wysiłku fizycznego. W dzieciństwie choroba manifestuje się ciężkimi, wyczerpującymi bólami dłoni i stóp (tzw. akroparestezje), bólami brzucha, zaburzeniami perystaltyki jelit, a także prowadzi do powstawania zmian skórno-naczyniowych (tzw. angiokeratoma). Gromadzenie się substratu w kłębkach nerkowych prowadzi początkowo do mikroalbuminurii, proteinurii i ostatecznie do całkowitej niewydolności nerek w piątej dekadzie życia. Mięsień sercowy ulega przerostowi; znaczne powiększenie serca nie jest jednak związane z gromadzeniem się w nim glikosfingolipidów, stanowią bowiem one zaledwie 0,5-1,0% masy całego narządu. Ponadto chorzy cierpią na niedosłuch, zawroty i bóle głowy. Wymienione objawy występują u pacjentów hemizygotycznych, natomiast w mniejszym nasileniu obserwuje się je również u heterozygot. Nie obserwuje się wyraźnej zależności między genotypem i fenotypem, większość mutacji jest tzw. mutacjami prywatnymi. Częstość występowania szacuje się na około 0,21 na 100 000 urodzeń. Jako metodę leczenia stosuje się wytworzoną metodami inżynierii genetycznej  $\alpha$ -galaktozydazę A w postaci wlewów dożylnych. Istnieją dwa preparaty: agalzydaza beta (Fabrazyme firmy Genzyme) oraz agalzydaza alfa (Replagal firmy TKT) [68,69]. Oba leki są dostępne w Polsce.

## CHOROBA KRABBEGO

Choroba Krabbego albo globoidalna leukodystrofia jest gwałtownie postępującą chorobą degeneracyjną ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. W większości przypadków pierwsze objawy w postaci nadwrażliwości na bodźce można zauważyć już około 3 miesiąca życia. W wieku 6 miesięcy niemowlęta demonstrowują spastyczność (zaburzenie ruchowe, objawiające się wzmożonym napięciem mięśniowym lub sztywnością mięśni) z wiotkością osiową. Pod koniec pierwszego roku życia dołącza się ślepotę i znaczne upośledzenie słuchu. Postęp choroby jest szybki i prowadzi do zgonu w 2 roku życia. Bardzo rzadkie są przypadki choroby Krabbego o powolnym przebiegu z późną manifestacją objawów w dzieciństwie lub nawet w wieku dorosłym. Nieliczne próby leczenia polegały na przeszczepach szpiku. U podstaw choroby leży deficyt aktywności  $\beta$ -galaktozydazy, enzymu, który w warunkach prawidłowych rozkłada galaktozyloceramid do ceramidu i galaktozy; substratem dla tego enzymu jest również galaktozylosfingozyna, której kumulacja prowadzi do niszczenia komórek oligodendrogleju. W ośrodkowym układzie nerwowym stwierdza się nagromadzenie wielojądrazystych komórek globoidalnych, całkowitą utratę mieliny i rozległą gliozę w istocie białej. Opisano przypadek choroby Krabbego spowodowany deficytem aktywatora SAP A [68,70].

## GANGLIOZYDOZY GM1 I GM2

Gangliozydoza GM1 spowodowana deficytem  $\beta$ -galaktozydazy, klinicznie manifestuje się w postaci dwóch odmiennych fenotypów określanymi mianem odpowiednio gangliozydozy GM1 i choroby Morquio B. Gangliozydoza GM1 jest wywołana głębokim niedoborem aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. Proces patologiczny obejmuje przede

wszystkim ośrodkowy układ nerwowy, ale również tkankę łączną i narządy mięśniowe. Pierwsze objawy zauważalne są już we wczesnym niemowlęctwie jako zahamowanie, a następnie regres rozwoju psychoruchowego, powiększenie wątroby i śledziony, zmiany kostne i dysmorfia (odstępstwa od normy budowy anatomicznej). Choroba może też manifestować się w późnym dzieciństwie, a nawet w wieku dojrzałym. W ośrodkowym układzie nerwowym u chorych stwierdza się liczne lamelarne ciała, różnokształtne pęcherzyki z lipidową zawartością. W przypadkach, gdzie aktywność resztkowa enzymu jest wyższa, fenotyp kliniczny jest podobny do choroby Morquio, a spichrzanym substratem jest siarczan keratanu [68,71-73].

Gangliozydozy GM2 są grupą chorób spowodowanych nadmierną kumulacją gangliozydu GM2 i innych glikolipidów w lizosomach. Do rozkładu gangliozydu GM2 konieczne są dwa izoenzymy: heksozaminidaza  $\beta$  (HEX A) zbudowana z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  oraz heksozaminidaza HEX B zbudowana z dwóch podjednostek  $\beta$ . Do prawidłowego funkcjonowania HEX A musi być czynny aktywator SAP (ang. *saposin activator protein*). Defekt w jednym z trzech genów prowadzi do gangliozydozy GM2, która manifestuje się w postaci trzech dość podobnych fenotypów choroby Tay-Sachsa (deficyt HEX A), choroby Sandhoffa (deficyt HEX B) i deficytu aktywatora. Choroba manifestuje się w niemowlęctwie, pierwszym charakterystycznym objawem jest nadwrażliwość na dźwięki następnie dzieci tracą wzrok i słuch. Charakterystycznym objawem jest obecność na dnie oka tzw. „wisienki”, którą tworzą skumulowane sfingolipidy. Choroba Sandhoffa ma przebieg podobny jednak o nieco słabszym i powolniejszym nasileniu objawów. Nie ma obecnie, żadnych propozycji terapeutycznych. W przypadku choroby Tay-Sachsa, szczególnie często występującej w populacji aszkenazyjskiej w związku z nosicielstwem dwóch mutacji wprowadzono wczesne badania na nosicielstwo, umożliwiając unikanie związków małżeńskich pomiędzy osobami heterozygotycznymi pod tym względem [68,71-73].

## UWAGI KOŃCOWE

Poznanie mechanizmów związanych z rozwojem lipidowych chorób spichrzeniowych, w tym mechanizmu tworzenia i rozpadu mikrodomen błon biologicznych bogatych w cholesterol i sfingolipidy – tratw lipidowych – oraz ich funkcji w komórce może okazać się w przyszłości użyteczne nie tylko w określeniu udziału lipidowych mikrodomen błonowych w ważnych dla komórki procesach, takich jak przekazywanie sygnałów, transport pęcherzykowy i regulacja metabolizmu, ale także w poznaniu molekularnych mechanizmów leżących u podstawy lipidowych chorób spichrzeniowych, ale także określeniu celów przyszłej interwencji terapeutycznej: farmakologicznej (jak w przypadku choroby Niemann-Picka typu C) lub enzymatycznej terapii zastępczej (jak w przypadku choroby Gauchera typu 1).

## PIŚMIENNICTWO

1. Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, Wilcox WR, on behalf of the ACMG Work Group on Diagnostic Confirmation of Lysosomal Storage Diseases (2011) Lysosomal storage diseases: Diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med* 13: 457-484

2. Hemsley KM, Hopwood JJ (2011) Emerging therapies for neurodegenerative lysosomal storage disorders – from concept to reality. *J Inherit Metab Dis*, w druku
3. Schulze H, Sandhoff K (2011) Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, w druku
4. Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 554-565
5. Parenti G (2009) Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med* 1: 268-279
6. Vitner EB, Platt FM, Futerman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* 285: 20423-20427
7. Bellettato CM, Scarpa M (2010) Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 33: 347-362
8. Simons K, Gruenberg J (2000) Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol* 10: 459-462
9. Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46-50
10. Coskun U, Simons K (2010) Membrane rafting: from apical sorting to phase segregation. *FEBS Lett* 584: 1685-1693
11. Laliberte JP, McGinnes LW, Morrison TG (2007) Incorporation of functional HN-F glycoprotein-containing complexes into newcastle disease virus is dependent on cholesterol and membrane lipid raft integrity. *J Virol* 81: 10636-10648
12. Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118: 1099-1102
13. Sztolszterer ME, Bandorowicz-Pikula J (2009) w: Na pograniczu chemii i biologii (Barciszewski J, Koroniak H, red), Wewnątrzkomórkowy transport i magazynowanie cholesterolu w chorobie Niemann-Picka typu C. t. 22, Wydawnictwo UAM w Poznaniu, str. 217-250
14. Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K (2009) Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans* 37: 955-960
15. Kosicek M, Malnar M, Goate A, Hecimovic S (2010) Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 404-409
16. Schmitz G, Grandl M (2008) Lipid homeostasis in macrophages – implications for atherosclerosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 160: 93-125
17. Harder T, Sangani D (2009) Plasma membrane rafts engaged in T cell signaling: new developments in an old concept. *Cell Commun Signal* 7: 21
18. Fuller M (2010) Sphingolipids: the nexus between Gaucher disease and insulin resistance. *Lipids Health Dis* 9: 113
19. Schengrund CL (2010) Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain Res Bull* 82: 7-17
20. Vance JE, Peake KB (2011) Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr Opin Lipidol* 22: 204-209
21. Prinetti A, Prioni S, Chiricozzi E, Schuchman EH, Chigorno V, Sonnino S (2011) Secondary alterations of sphingolipid metabolism in lysosomal storage diseases. *Neurochem Res*, w druku
22. Tängemo C, Weber D, Theiss S, Mengel E, Runz H (2011) Niemann-Pick Type C disease: characterizing lipid levels in patients with variant lysosomal cholesterol storage. *J Lipid Res* 52: 813-825
23. Nakamura K, Hattori K, Endo F (2011) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157: 63-71
24. Ledesma MD, Prinetti A, Sonnino S, Schuchman EH (2011) Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem* 116: 779-788
25. Munkacsı AB, Chen FW, Brinkman MA, Higaki K, Dominguez-Gutiérrez G, Chaudhari J, Layer JV, Tong A, Bard M, Boone C, Ioannou YA, Sturley SL (2011) An „exacerbate-reverse” strategy in yeast identifies histone deacetylase inhibition as a correction for cholesterol and sphingolipid transport defects in human niemann-pick type C disease. *J Biol Chem*, w druku
26. van Meer G, Lisman Q (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* 277: 25855-25858
27. Hannun YA, Obeid LM (2002) The Ceramide - centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277: 25847-25850
28. Spiegel S, Milstien S (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* 277: 25851-25854
29. Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275: 17221-17224
30. Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5: 16
31. Rosenbaum AI, Maxfield FR (2011) Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *J Neurochem* 116: 789-795
32. te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, Sillence DJ (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 279: 26167-26175
33. Yu W, Ko M, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. *J Biol Chem* 280: 27296-27302
34. Peake KB, Vance JE (2010) Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Lett* 584: 2731-2739
35. Vance JE (2010) Transfer of cholesterol by the NPC team. *Cell Metab* 12: 105-106
36. Sampaio JL, Gerl MJ, Klose C, Ejsing CS, Beug H, Simons K, Shevchenko A (2011) Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1903-1907
37. Maxfield FR, Wustner D (2002) Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 110: 891-898
38. Soccio RE, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1150-1160
39. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124: 35-46
40. Yeaman SJ (2004) Hormone-sensitive lipase – new roles for an old enzyme. *Biochem J* 379: 11-22
41. Tabas I (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 110: 905-911
42. Ioannou YA (2005) Guilty until proven innocent: the case of NPC1 and cholesterol. *Trends Biochem Sci* 30: 498-505
43. Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 721-730
44. Sugii S, Reid PC, Ohgami N, Du H, Chang TY (2003) Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 278: 27180-27189
45. Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438: 612-621
46. Ikonen E (2008) Cellular sterol trafficking and metabolism: spotlight on structure. *Curr Opin Cell Biol* 20: 371-377
47. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905
48. Wüstner D, Mondal M, Huang A, Maxfield FR (2004) Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells. *J Lipid Res* 45: 427-437
49. Liscum L, Sturley SL (2004) Intracellular trafficking of Niemann-Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 1685: 22-27
50. de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 277: 32187-32194
51. Sztolszterer ME, Strzelecka-Kiliszek A, Pikula S, Tyłki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J (2010) Cholesterol as a factor regulating intracellular localization of annexin A6 in Niemann-Pick type C human fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 493: 221-233

52. Johansson M, Lehto M, Tanhuanpää K, Cover TL, Olkkonen VM (2005) The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 16: 5480-5492
53. Lusa S, Blom TS, Eskelinen EL, Kuismanen E, Månsson JE, Simons K, Ikonen E (2001) Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1-dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. *J Cell Sci* 114: 1893-1900
54. Wolf Z, Orso E, Werner T, Klunemann HH, Schmitz G (2007) Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains. *Cytometry A* 71: 486-494
55. Sobo K, Le Blanc I, Luyet PP, Fivaz M, Ferguson C, Parton RG, Gruenberg J, van der Goot FG (2007) Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One* 2: e851
56. Vainio S, Heino S, Mansson JE, Fredman P, Kuismanen E, Vaarala O, Ikonen E (2002) Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep* 3: 95-100
57. Vainio S, Bykov I, Hermansson M, Jokitalo E, Somerharju P, Ikonen E (2005) Defective insulin receptor activation and altered lipid rafts in Niemann-Pick type C disease hepatocytes. *Biochem J* 391: 465-472
58. Ge L, Qi W, Wang LJ, Miao HH, Qu YX, Li BL, Song BL (2011) Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 551-556
59. Domon MM, Besson F, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S (2011) Annexin A6 is recruited into lipid rafts of Niemann-Pick type C disease fibroblasts in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 192-196
60. Cubells L, Vilà de Muga S, Tebar F, Bonventre JV, Balsinde J, Pol A, Grewal T, Enrich C. (2008) Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi. *J Biol Chem* 283: 10174-10183
61. Domon M, Matar G, Strzelecka-Kiliszek A, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S, Besson F (2010) Interaction of annexin A6 with cholesterol rich membranes is pH-dependent and mediated by the sterol OH. *J Colloid Interf Sci* 346: 436-441
62. Grewal T, Koese M, Rentero C, Enrich C (2010) Annexin A6-regulator of the EGFR/Ras signalling pathway and cholesterol homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 580-584
63. Enrich C, Rentero C, de Muga SV, Reverter M, Mulay V, Wood P, Koese M, Grewal T (2011) Annexin A6-Linking Ca<sup>2+</sup> signaling with cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1813: 935-947
64. Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signaling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449-461
65. Marsden D, Levy H (2010) Newborn screening of lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 56: 1071-1079
66. Langeveld M, Ghauharali KJ, Sauerwein HP, Ackermans MT, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Serlie MJ (2008) Type I Gaucher disease, a glycosphingolipid storage disorder, is associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 845-851
67. Gieselmann V, Krägeloh-Mann I (2010) Metachromatic leukodystrophy -- an update. *Neuropediatrics* 41: 1-6
68. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B red (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease, McGraw Hill, New York, 8 wydanie, str. 7012
69. Alfadhel M, Sirrs S (2011) Enzyme replacement therapy for Fabry disease: some answers but more questions. *Ther Clin Risk Manag* 7: 69-82
70. Pastores GM (2009) Krabbe disease: an overview. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47 Suppl 1: S75-S81
71. Boomkamp SD, Butters TD (2008) Glycosphingolipid disorders of the brain. *Subcell Biochem* 49: 441-467
72. Wolf C, Quinn PJ (2008) Lipidomics in diagnosis of lipidoses. *Subcell Biochem* 49: 567-588
73. Walkley SU, Vanier MT (2009) Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta* 1793: 726-736

## Pathogenesis of lipid storage diseases

Joanna Bandorowicz-Pikuła<sup>1,✉</sup>, Sławomir Pikuła<sup>1</sup>, Anna Tylki-Szymańska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Department of Metabolic Diseases, The Childrens' Memorial Health Institute, 20 Al. Dzieci Polskich, 04-730 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl

**Key words:** lipid storage diseases; cholesterol; sphingolipids, lysosome; membrane microdomains

### ABSTRACT

Lipidoses are rare genetic disorders characterized by defects of the digestive system that impair the way the body uses dietary fat. When the body is unable to properly digest fats, lipids such as cholesterol, sphingolipids or glycolipids may accumulate in body tissues in abnormal amounts. It has been also suggested that molecular mechanisms leading to development of human diseases, including obesity, diabetes type II and atherosclerosis, consist of impaired transport and storage of lipids, as well as disturbed structure and function of lipid membrane microdomains. In this review we discuss probable mechanisms, including role of lipid membrane microdomains, which may participate in pathogenesis of lipid storage diseases such as Niemann-Pick type A/B and type C, as well as Gaucher type I diseases.

# Nowo opisanie choroby metaboliczne związane z błędami metabolizmu na szlaku przemiany pentoz

Anna Tylki-Szymańska<sup>1,✉</sup>

Teresa J. Stradomska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

<sup>✉</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa; tel.: (22) 815 75 84, e-mail: a.tylki@czd.pl lub atylki@op.pl

Artykuł otrzymano 7 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 3 marca 2011 r.

**Słowa kluczowe:** pentozy, poliole, deficyt transaldolazy, deficyt izomerazy, leukodystrofia, włóknienie guzkowe wątroby

**Podziękowania:** Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego numer 2329/B/P01/2009/37 finansowanego ze Środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

## STRESZCZENIE

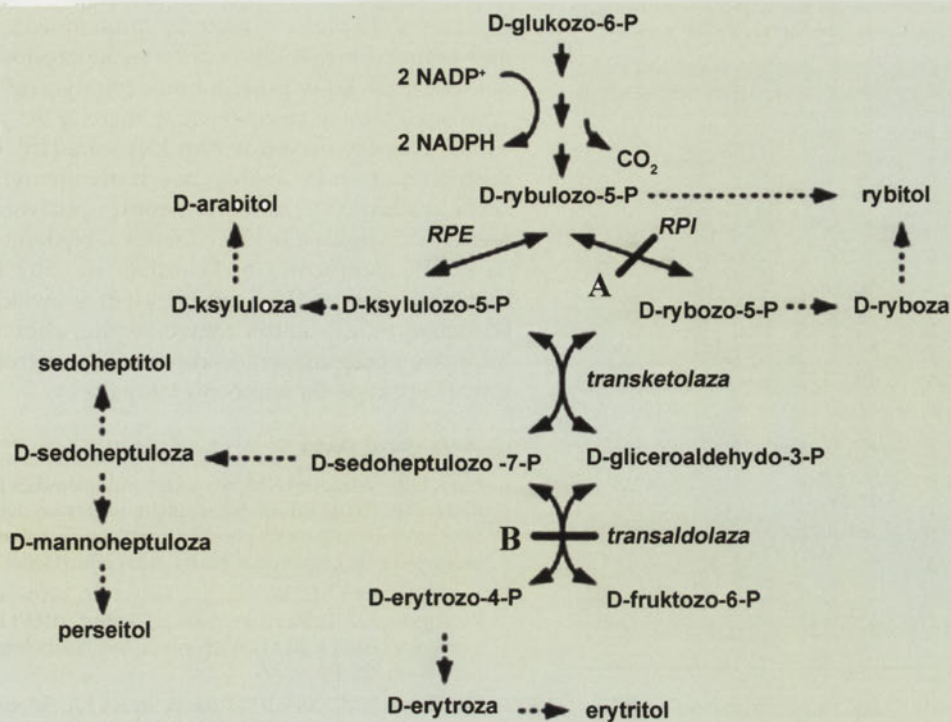
Wrodzone błędy metabolizmu są stale powiększającą się grupą chorób metabolicznych. W minionym dziesięcioleciu zostały zidentyfikowane i opisane dwa wrodzone błędy metabolizmu w szlaku przemiany pentoz. Związane są one z deficytem aktywności dwóch enzymów: izomerazy rybozofosforanowej (EC 5.3.1.6) i transaldolazy (EC 2.2.1.2). Deficyt izomerazy klinicznie manifestuje się leukoencefalopatią, natomiast deficyt transaldolazy charakteryzuje się różnorodnością zaburzeń, od wad wrodzonych do niewydolności wątroby i nerek. Diagnostyka opiera się na stwierdzeniu podwyższonych stężeń polioli: rybitolu, arabitolu, erytritolu oraz cukrów: sedoheptulozy, sedoheptulozy-7P i kwasu erytronowego. Następnym etapem jest wykazanie deficytu aktywności enzymu w leukocytach lub hodowanych fibroblastach. Biorąc pod uwagę powyższe, należałoby w kierunku zaburzeń przemiany pentoz diagnozować noworodki z wadami wrodzonymi, chorych z postępującym uszkodzeniem wątroby i przypadki niewyjaśnionej leukoencefalopatii.

## WPROWADZENIE

Wrodzone błędy metabolizmu są powiększającą się grupą chorób metabolicznych. Jest to związane z ulepszaniem metod diagnostycznych, tak biochemicznych jak i molekularnych, jak również dzięki zaangażowaniu lekarzy. Wrodzone błędy metabolizmu zaliczane są do tak zwanych chorób rzadkich. Szacuje się, że oddzielnie ich częstość występowania jest bardzo niska, natomiast jako całość występują u co 500 noworodka. Niemal co roku pojawiają się nowe publikacje donoszące o identyfikacji kolejnego błędu metabolizmu lub o wyjaśnieniu patomechanizmu znanego już schorzenia. W ciągu minionych kilku lat zostały zidentyfikowane i opisane dwa wrodzone błędy metabolizmu w szlaku przemiany pentoz. Związane są one z deficytem aktywności dwóch enzymów: izomerazy rybozofosforanowej (EC 5.3.1.6) (2004) i transaldolazy (EC 2.2.1.2) (2001) (Ryc. 1) [1-2]. Deficyt aktywności izomerazy opisano dotychczas tylko u jednego chorego, natomiast deficyt transaldolazy u 11 chorych z 6 rodzin [3-9].

## DEFICYT IZOMERAZY

Pacjent z deficytem izomerazy (OMIM 608611) we wczesnym dzieciństwie wykazywał niewielkie spowolnienie rozwoju psychoruchowego i opóźniony rozwój mowy. W czwartym roku życia wystąpiły pierwsze napady drgawek a od siódmego roku dołączyły się postępujące objawy neurologiczne, takie jak spastyczność, dysartria, zespół mózdkowy, obwodowa neuropatia, zanik nerwów wzrokowych. Jednocześnie nasiliła się częstotliwość napadów drgawkowych. Rozwój fizyczny przebiegał prawidłowo. Badanie z zastosowaniem rezonansu magnetycznego wykonane w jedenastym roku życia chłopca wykazało znaczące zmiany leukodystroficzne, szczególnie wyrażone we włóknach U. Badania spektroskopowe metodą rezonansu magnetycznego wykonane w czternastym roku życia wykazały obecność wysokich stężeń arabitolu i rybitolu, co wskazało na zaburzenie przemiany pentoz. Obecnie ten ponad dwudziestoletni pacjent ma bardzo zaawansowane stadium choroby [10]. Izomeraza rybozo-5-fosforanowa jest enzymem znajdującym się w odwracalnym szlaku wytwarzania fosforanów cukrów w cyklu pentozowym. Deficyt jej aktywności prowadzi do zahamowania przemiany rybulozo-5-fosforanu i rybozo-5 fosforanu, co powoduje nadmierne gromadzenie cukrów i polioli: rybozy, rybitolu, ksylitolu i arabitolu [11]. Stwierdzenie wysokiego stężenia tych związków w płynach ustrojowych pozwala wysunąć podejrzenie deficytu izomerazy, przy czym najwyższe stężenie stwierdza się w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wykrycie wysokich stężeń rybitolu i arabitolu w nie inwazyjnym badaniu spektroskopowym metodą rezonansu magnetycznego jest podstawą do podejrzewania deficytu izomerazy. Deficyt aktywności enzymu można potwierdzić oznaczając go w leukocytach krwi obwodowej lub w hodowanych fibroblastach skóry. U wspomnianego pacjenta zidentyfikowano dwie zmiany w genie dla izomerazy 1bp del 540 del G



Rycina 1. Szlak przemiany fosforanu pentozy; A – deficyt izomerazy, B – deficyt transaldolazy; według [11].

i punktową mutację. Pozwoliło to na określenie przekazywania defektu w sposób autosomalny recesywny [2]. Choroba ta występuje niezmiernie rzadko, mimo stosowania diagnostyki neuroobrazowej ze spektrometrią dotychczas zdiagnozowano jeden przypadek. Zaproponowano dla takich błędów metabolizmu określenie „wyjątkowo rzadkie” (ang. *exceptionally rare*) [12].

#### DEFICYT TRANSALDOLAZY

Drugą zidentyfikowaną chorobą związaną z zaburzeniem przemiany w szlaku pentoz jest deficyt transaldolazy TALDO (OMIM 606003). Transaldolaza znajduje się w odwracalnym szlaku wytwarzania fosforanów pentoz i wraz z transketolazą przekształca fosfopentozę w metabolity pośrednie glikolizy. Jej deficyt prowadzi do kumulacji polioli: erytritoli, arabitolu, rybitolu, sedoheptitolu, perseitolu i siedmiowęglowych cukrów: sedoheptulozy, mannoheptulozy i fosfosedoheptulozy [11]. Wstępna diagnostyka deficytu TALDO opiera się na stwierdzeniu wydalania z moczem jak i kumulacji w innych płynach ustrojowych

Tabela 1. Stężenie polioli i siedmiowęglowych cukrów w moczu pacjentów z deficytem TALDO (mmol/mol kreatyniny), modyfikacja wg [8].

Metabolit	Zakresy u pacjentów (7)	Zakresy u zdrowych
erytritol	9-1131	38-148
rybitol	43-722	1-14
arabitol	99-757	22-103
sedoheptitol	3-27	<1
perseitol	3-28	<1
sedoheptuloza	70-1361	<9
mannoheptuloza	6-112	<3
sedoheptulozo-7-P	1.8-23.8	<0,07

rybitolu, arabitolu, erytritoli, a w najwyższym stężeniu sedoheptulozy, sedoheptulozy-7-P (Tabela 1) [13-14]. Ostatnie doniesienia wskazują, że kwas erytronowy jest również obecny w wysokich stężeniach w moczu pacjentów z deficytem TALDO i może być podobnie jak sedoheptuloza pewnym markerem deficytu transaldolazy [15]. U chorych z deficytem transaldolazy nie stwierdza się akumulacji polioli w ośrodkowym układzie nerwowym. Badanie aktywności enzymu można przeprowadzić w leukocytach krwi obwodowej lub hodowanych fibroblastach skóry. Dotychczas zidentyfikowano zaledwie kilkunastu pacjentów z tym defektem. Obraz kliniczny jest dość zróżnicowany, jednak zawsze obejmuje postępujące, ciężkie uszkodzenie wątroby. Większość przypadków rozpoznano u chorych już w okresie noworodkowym. U noworodków stwierdzano powiększenie wątroby i śledziony, niedokrwistość, małopłytkowość, zaburzenia krzepnięcia (deficyty czynników krzepnięcia XI i XII), w kilku przypadkach obrzęk płodowy. Już przebieg ciąży wskazywał na patologię ze względu na ogromny przybór masy ciała przez matkę, duże, zmienione łożysko, niską masę urodzeniową noworodków. Niektórzy autorzy opisywali cechy dysmorfii. W wątrobie stwierdza się dość wcześnie występujące charakterystyczne drobno guzkowe włóknienie. Z czasem u chorych z dłuższym okresem przeżycia narastają objawy niewydolności nerek. Rozwój psychoruchowy i umysłowy pacjentów przebiega prawidłowo. We wszystkich opisanych dotychczas przypadkach, z wyjątkiem jednego, wykazano pokrewieństwo rodziców. Mutacją, która powtarzała się najczęściej, bo w trzech rodzinach, była c.575G>A.

Jedną z hipotez dotyczących przyczyn włóknienia wątroby jest nagromadzenie w deficycie TALDO ufosforylowanych cukrów, podobnie jak w galaktozemii, gdzie deficyt

**Tabela 2.** Stężenie polioli i siedmiowęglowych cukrów w płynach ustrojowych u pacjentów z deficytem izomerazy i deficytem transaldolazy TALDO, wg [10].

Metabolit/płyn ustrojowe	Deficyt izomerazy	Deficyt transaldolazy	Zakresy u zdrowych
	Mocz (mmol/mol kreatyniny)		
arabitol	1021-1612	90-1131	16-99
rybitol	123-166	43-722	5-24
erytritrol	20-49	99-757	35-192
sedoheptitol	<1	3-27	<1
perseitol	<1	3-28	<1
sedoheptuloza	0,9	70-1122	<40
mannoheptuloza	0,6	6-112	<3
sedoheptulozo-7-P	<0,01	1,8-23,8	<0,07
	Surowica (μmol/L)		
arabitol	90-163	16-26	<5
rybitol	14-30	8-33	<5
erytritrol	<5	15-28	<5
	Płyn mózgowo-rdzeniowy (μmol/L)		
arabitol	5234-5535	34	9-39
rybitol	891-1249	19	<5
erytritrol	<5	27	12-33

urydylotransferazy prowadzi do nagromadzenia galaktozo-1-fosforanu i galaktikolu. Drugą hipotezą, próbującą przybliżyć zrozumienie patomechanizmu tego defektu jest tworzenie NADPH bez produkcji kwasu mlekowego i ufosforylowanych pentoz niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych, szczególnie ważnych w intensywnych etapach rozwoju jakim jest okres życia płodowego. Z drugiej strony wytwarzanie NADPH jest kluczowe dla odtwarzania zredukowanego glutationu, kofaktora peroksydazy glutationu przeciwdziałającej stresowi oksydacyjnemu. Niektórzy autorzy wiążą ten mechanizm z cechami dysmorfii, wadami rozwojowymi i upośledzeniem wczesnego rozwoju fizycznego [5]. Wykazano bowiem znaczenie tego szlaku w ochronie przed nagromadzeniem reaktywnych form tlenu jako czynników teratogennych. Pewną analogią może tu być deficyt aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (enzymu części oksydacyjnej cyklu pentozomonofosforanowego), który przejawia się występowaniem ciężkich wad rozwojowych. Uważa się też, że polirole mogą odgrywać istotną rolę w homeostazie płodu w tym homeostazie wodnej [16].

## DIAGNOSTYKA

W diagnostyce biochemicznej omówionych błędów metabolizmu kluczową rolę odgrywa stwierdzenie wysokiego stężenia polioli i cukrów w płynach ustrojowych lub w ośrodkowym układzie nerwowym. (Tabela 2) [17]. Najczulszymi ze względu na wyższe stężenia są: sedoheptuloza, fosfosedoheptuloza i kwas erytronowy. Ostatnio wykazano zwiększoną ilość sedoheptulozy w suchej kropli krwi pochodzącej od pacjentów z cystynozą wynikającą z delekcji fragmentu o wielkości 57 kb w genie cystynozy *CTNS*. Mutacja ta występuje w postaci heterozygotycznej u 75% chorych pochodzących z północnej Europy, natomiast w postaci homozygotycznej u 45–50% chorych na cystynozę w Europie i Stanach Zjednoczonych. Delecja 57 kb obejmuje nie tylko gen *CTNS*, ale również przyległy gen *CARKL* ko-

dujący kinazę sedoheptulozy. Ze względu na łatwość wykrycia sedoheptulozy metodą tandemowej spektrometrii mas w suchej kropli krwi oraz wysoką częstość występowania delekcji 57 kb w postaci homozygotycznej u chorych na cystynozę można zastosować tę metodę do populacyjnych badań przesiewowych w tym kierunku [18]. Coraz szersza dostępność technik analitycznych dla identyfikacji biomarkerów zaburzeń przemiany pentoz pozwoli z pewnością rozpoznać większą liczbę chorych z błędami metabolizmu na szlaku pentozowym. Postuluje się, aby badać w tym kierunku noworodki z obciążonym wywiadem ciążywoprodowym, z wadami rozwojowymi, chorych z niewyjaśnionym, postępującym uszkodzeniem wątroby i nerek, jak również przypadki leukoencefalopatii.

## PIŚMIENNICTWO

- Huck JHJ, Verhoeven NM, Struys EA, Salomons GS, Jakobs C, van der Knaap MS (2004) Ribose-5-phosphate isomerase deficiency: New inborn error in the pentose phosphate pathway associated with a slowly progressive leukoencefalopathy. *Am J Hum Genet* 74: 745-751
- Van der Knaap MS, Wevers RA, Struys EA, Verhoven NM, Pouwels PJ, Engelke UF, Feikema W, Valk J, Jakobs C (1999) Leukoencefalopathy associated with a disturbance in the metabolism of polyols. *Ann Neurol* 46: 925-928
- Verhoeven NM, Huck JHJ, Roos B, Struys EA, Salomons GS, Douwes AC, van der Knaap MS, Jakobs C (2001) Transaldolase deficiency: liver cirrhosis associated with a new inborn error in the pentose phosphate pathway. *Am J Hum Genet* 68: 1086-1092
- Verhoeven NM, Wallot M, Huck JHJ, Dirsch O, Ballauf A, Neudorf U, Salomons GS, van der Knaap MS, Voit T, Jakobs C (2005) A newborn with severe liver failure, cardiomyopathy and transaldolase deficiency. *J Inher Metab Dis* 28: 169-179
- Valayonopoulos V, Verhoeven NM, Mention K, Salomons GA, Sommelet D, Gonzales M, Touati G, de Lyonay P, Jakobs C, Saudubray JM (2006) Transaldolase deficiency: a new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease. *J Pediatr* 149: 713-717
- Fung CW, Siu S, Mak C, Poon G, Wong KY, Cheung PT, Low L, Tam S, Wong V (2007) A rare cause of hepatosplenomegaly – transaldolase deficiency. *J Inher Metab Dis* 30 (suppl 1) 62
- Wamelink MMC, Struys EA, Salomons GA, Fowler D, Jakobs C, Clayton PT (2008) Transaldolase deficiency in a two-year-old boy with cirrhosis. *Mol Genet Met* 94: 255-258
- Tylki-Szymanska A, Stradomska TJ, Wamelink MMC, Salomons GS, Taybert J, Pawłowska J, Jakobs C (2009) Transaldolase deficiency in two new patients with relative mild phenotype. *Mol Genet Metab* 97: 15-17
- Balasubramaniam S, Wamelink MMC, Ngu LH, Talib A, Salomons GS, Jakobs C, Keng WT (2011) Novel heterozygous mutations in *TALDO1* gene causing transaldolase deficiency and early infantile liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52: 113-116
- Jakobs C, Wamelink MMC (2008) Ribose 5-phosphate isomerase deficiency ad transaldolase deficiency, W: Scriver's the online metabolic and molecular bases of inherited disease, red: Valle, Beaudet, Vogelstein, Kinzler, Antonarakis, Ballabio, Scriver, Childs, Sly; chapter 735.
- Wamelink MMC, Struys EA, Jakobs C (2008) The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inher Metab Dis* 31: 703-717
- Wamelink MMC, Grüning NM, Jansen EE, Bluemlein K, Lehrach H, Jakobs C, Ralser M (2010) The difference between rare and exceptionally rare: molecular characterization of ribose 5-phosphate isomerase deficiency. *J Mol Med* 88: 931-939
- Wamelink MMC, Smith DE, Jansen EE, Verhoeven NM, Struys EA, Jakobs C (2007) Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven carbon chain carbohydrate biomarkers in urine. *J Inher Metab Dis* 30: 735-742

14. Wamelink MM, Smith DE, Jakobs C, Verhoeven NM (2005) Analysis of polyols in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism. *J Inher Metab Dis* 28: 951-963
15. Engelke UF, Zijlstra FS, Mochel F, Valayannopoulos V, Rabier D, Kluijtmans LA, Perl A, Verhoeven-Duif NM, de Lonlay P, Wamelink MMC, Jakobs C, Morava E, Wevers RA (2010) Mitochondrial involvement and erythronic acid as a novel biomarker in transaldolase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1028-1035
16. Valayannopoulos V, Verhoeven NM, Mention K, Salomons GS, Sommelet D, Gonzales M, Touati G, de Lyonlay P, Jakobs C (2006) Transaldolase deficiency: a new cause of hydrops fetalis and neonatal multi-organ disease. *J Pediatr* 149: 713-717
17. Wamelink MM, Struys EA, Huck JH, Roos B, van der Knaap MS, Jakobs C, Verhoeven NM (2005) Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 823: 18-25
18. Wamelink MM, Struys EA, Jansen EE, Blom HJ, Vilboux T, Gahl WA, Kömhoff M, Jakobs C, Levtchenko EN (2011) Elevated concentrations of sedoheptulose in bloodspots of patients with cystinosis caused by the 57-kb deletion: Implications for diagnostics and neonatal screening. *Mol Genet Metab* 102: 339-342

## A newly discovered metabolic diseases due to defects in the pentose pathway

Anna Tylki-Szymańska<sup>1</sup>✉, Teresa J. Stradomska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Metabolic Diseases and <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, 20 Al. Dzieci Polskich, 04-730 Warsaw, Poland

✉e-mail: a.tylki@czd.pl lub atylki@op.pl

### ABSTRACT

Two previously unreported inborn errors of metabolism occur in the reversible part of the pentose phosphate pathway. Deficiency of ribose-5-phosphate isomerase has been described in one patient who suffered from a progressive leukoencephalopathy and developmental delay. Transaldolase deficiency has been diagnosed in 11 patients from 6 families in which the probands presented in the newborn and antenatal period with hepatosplenomegaly, hemolytic anaemia, hepatic fibrosis, kidney problems. Enzymes deficiency results in accumulations in body fluids erythritol, arabitol, ribitol, sedoheptitol, sedoheptulose, sedoheptulose-7-phosphate. Isomerase and transaldolase activity can be determined in leukocytes or fibroblasts.

Agnieszka Jurecka<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

<sup>2</sup>Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

✉Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.: (58) 34 66 308, e-mail: ajurecka@gmail.com

Artykuł otrzymano 4 lutego 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 28 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** puryny, pirymidyny, metabolizm, wrodzone wady metaboliczne

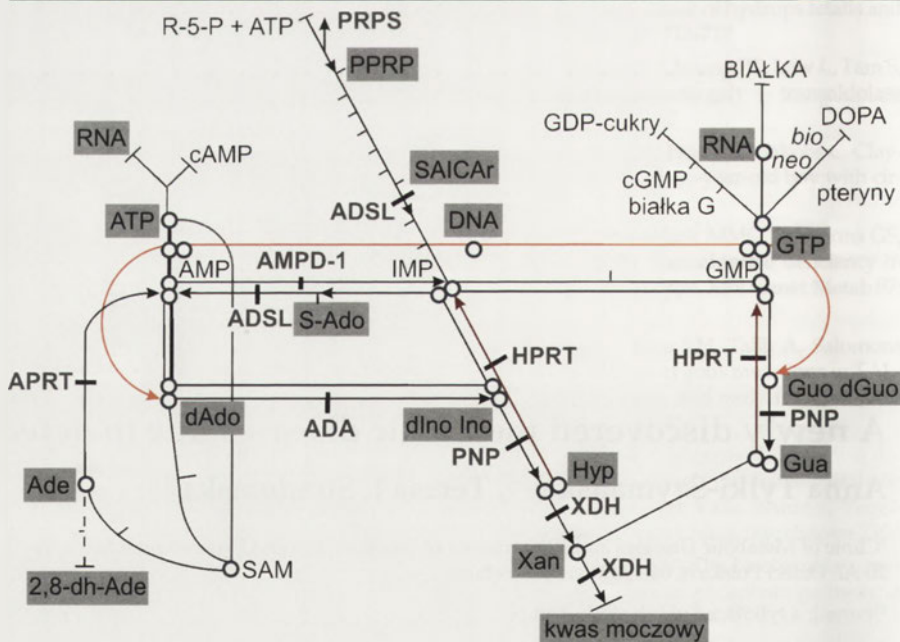
**Wykaz skrótów:** ADA – deaminaza adenozyńska; ADSL – liaza adenylobursztynianowa; AMPD – deaminaza AMP; DHP – dihidropirymidynaza; DPD – dehydrogenaza dihidropirymidynowa; ESI – jonizacja elektrosprejem; FJHN – rozdziałna młodzieńcza nefropatia; GC-MS – chromatografia gazowa-spektrometria mas; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; HPLC MS/MS – wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas; HPRT – fosforybozylotransferaza hipoksantynoguaninowa; IEM – wrodzone wady metaboliczne; ITPA – ITPaza, pirofosfohydrolaza ITP; MCF – deficyt kofaktora molibdenowego; MS/MS – tandemowa spektrometria mas; MTAP – fosforylaza metylioadeozynowa; PEG-ADA – bydlęca deaminaza adenozyńska połączona z glikolem polietylenowym; PRPS (s) – syntetaza fosforybozylpirofosforanowa (nadaktywność); Pu-NT – 5'-nukleotyda puryn; (D)-ryboza – deoksyryboza; SAHH – hydrolaza S-bursztynylhomocysteinowa; SCID – ciężki złożony niedobór odporności; TLC – chromatografia cienkowarstwowa; TPMT – metyltransferaza tiopurynowa; UMPS – syntetaza UMP; UP – ureidopropionaza; XDH – dehydrogenaza ksantynowa

## STRESZCZENIE

Wrodzone wady metabolizmu (IEM, ang. *inborn errors of metabolism*) puryn i pirymidyn (P/P) należą do chorób o szerokim spektrum objawów klinicznych. Mogą one pojawić się w każdym wieku prowadząc do zaburzeń funkcjonowania wielu układów: odpornościowego, krwiotwórczego, nerwowego, szkieletowo-mięśniowego, oraz z powodu wyjątkowej nierozpuszczalności produktów metabolizmu zasad purynowych, również układu moczowego. Obecnie znanych jest 30 defektów enzymatycznych szlaku puryn i pirymidyn, z czego 15 posiada klinicznie znaczące konsekwencje. Analiza częstości występowania w oparciu o liczbę wykrytych przypadków wybranych zaburzeń szlaku P/P w Polsce w stosunku do zdrowej populacji jak również znaczne opóźnienie w ustaleniu właściwego rozpoznania, wskazują na niedostateczny stopień rozpoznawalności tych chorób w naszym kraju. Konieczna jest poprawa edukacji ogółu lekarzy na temat wrodzonych wad metabolizmu szlaku P/P, a także upowszechnienie wczesnoobjawowych badań przesiewowych w kierunku tych defektów.

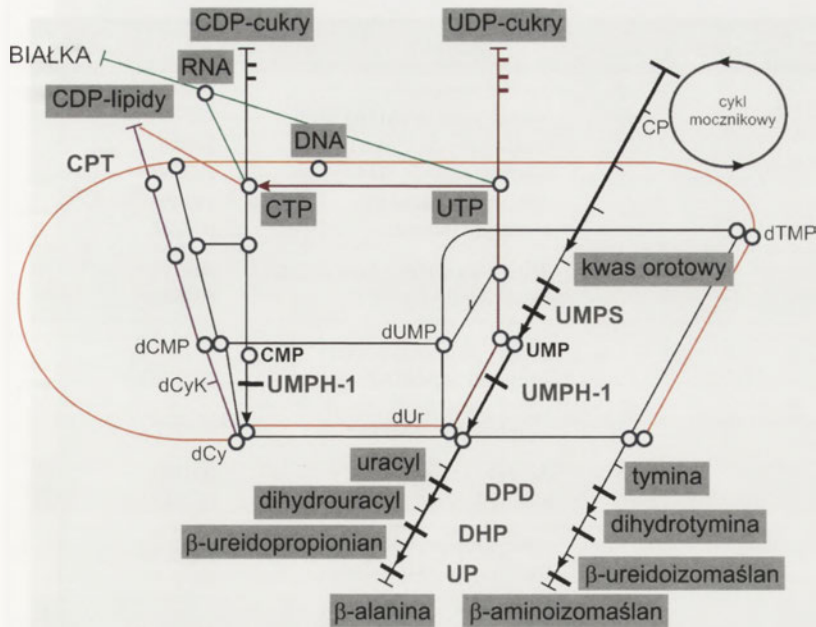
## WPROWADZENIE – BIOSYNTeza NUKLEOTYDÓW

Nukleotydy są syntetyzowane z amfibolicznych związków pośrednich (synteza *de novo*) lub przez ponowne wykorzystanie wolnych, istniejących już zasad (szlak rezerwowy; ang. *salvage synthesis* – dosłownie synteza ratunkowa) (Ryc. 1 i 2). Zdolność do przeprowadzenia reakcji rezerwowej nukleotydy z wykorzystaniem źródeł endogennych, eliminuje zapotrzebowanie na egzogenne nukleotydy, i w efekcie puryny i pirymidyny nie są niezbędne w diecie. Reakcja rezerwowa jest głównym źródłem nukleotydy do syntezy DNA, RNA oraz kofaktorów enzymów. Pobrane z pokarmem kwasy nukleinowe ulegają pozakomórkowej hydrolizie poprzez wspólne działanie endonukleaz (rybo- i deoksyrybonukleaz), egzonukleaz (fosfodiesteraz) oraz fosforylaz nukleotydy. Endo-



**Rycina 1.** Przemiany metaboliczne puryn (opracowano na podstawie [1] i [3]). Szlaki syntezy *de novo*, reakcji rezerwowej oraz katabolizmu rybonukleotydy purynowych. Schemat pokazuje metaboliczne znaczenie puryn jako prekursorów DNA i RNA, jak również cyklicznych nukleotydy, cukrów oraz pteryn. Zaznaczono metabolity akumulujące się w różnych defektach: dAdo (deoksyadenozyna) w ADA (deficyt deaminazy adenozyńskiej); Ino (inozyna), Guo (guanozyna) i ich deoksyanalogi w PNP (deficyt fosforylasy nukleotydy purynowych); Xan (ksantyna) w XDH (deficyt oksydoreduktazy ksantynowej); podwyższony poziom Hyp (hipoksantyny) i kwasu moczowego w HPRT (deficyt fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej) oraz PRPSs (nadaktywność syntetazy PRPP); Ade (adenina) i 2,8-dhAde (2,8-dihydroksyadenina) w APRT (deficyt fosforybozylotransferazy adeninowej); S-Ado (bursztynyladenozyna) i SAICAr (bursztynylaminoimidazolokarboksamid) w ADSL (deficyt liazy adenylobursztynianowej).





**Rycina 2.** Przemiany metaboliczne pirymidyn (opracowano na podstawie [2] i [3]). Szlaki syntezy *de novo*, reakcji rezerwowej oraz katabolizmu rybonukleotydów pirymidynowych. Schemat pokazuje metaboliczne znaczenie pirymidyn jako prekursorów cukrów, lipidów oraz DNA i RNA. W odróżnieniu od metabolizmu puryn reakcja rezerwowa odbywa się na poziomie nukleotydów, a nie zasad oraz brak jest produktu końcowego wykrywalnego za pomocą UV. Zaznaczono metabolity akumulujące się w różnych defektach: kwas orotowy w UMPS (deficyt syntetazy UMP); uracyl i tymina w DPD (deficyt dehydrogenazy dihydropirymidynowej); uracyl i tymina (oraz dihydrouacyl i dihydrotymina) w DHP (deficyt dihydropirymidynazy) oraz UP (deficyt ureidopropionazy); brak wrażliwych na promieniowanie UV metabolitów w CDP-PT (deficyt CDP-fosfotransferazy cholinowej) i pochodne akumulujące się w krwinkach czerwonych w UMPH-1 (deficyt hydrolazy UMP).

nukleazy rozkładają DNA i RNA prowadząc do powstania oligonukleotydów. Oligonukleotydy są trawione poprzez fosfodiesterazy, które stopniowo uwalniają wolne nukleozydy. Zasady są odłączane od nukleotydów na drodze hydrolizy dzięki działaniu fosforylaz jelitowych, których czego efektem jest powstanie rybozofosforanu oraz wolnych zasad. Jeśli nukleozydy i/lub zasady nie zostaną wykorzystane, ulegają dalszej degradacji do kwasu moczowego w przypadku puryn oraz β-alaniny, β-aminoizomaślanu, amoniaku oraz dwutlenku węgla w przypadku pirymidyn (Ryc. 1 i 2).

### WRODZONE WADY METABOLIZMU PURYN I PIRYMIDYN – DEFINICJA I CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA ZABURZEŃ

Wrodzone wady metabolizmu puryn i pirymidyn charakteryzują się nieprawidłowym stężeniem tych związków i/lub ich metabolitów w komórkach lub płynach fizjologicznych będących wynikiem zmniejszonej lub zwiększonej aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie P/P (Tab. 1, Ryc. 1 i 2) [1]. Symptomatologia tych defektów jest wysoce różnorodna, od bardzo ciężkiego do stosunkowo łagodnego przebiegu, a objawy mogą pojawiać się w każdym wieku [1-3]. Ponieważ w zasadzie każdy układ może zostać zajęty, defekty szlaku P/P przebiegają w postaci różnych stanów chorobowych, z których najczęstsze to kamica układu moczowego, drgawki, niedobory odporności, opóźnienie rozwoju psychoruchowego oraz miopatia [1,2].

Wrodzone wady metabolizmu puryn i pirymidyn występują rzadko. Do dzisiaj zdiagnozowanych zostało 835 pacjentów w populacjach z 18 krajów Europy [1]. Z tego 70% przypadków zostało rozpoznanych w trzech krajach, w których dostępne jest odpowiednie zaplecze laboratoryjne umożliwiające diagnozę. Częstość występowania w przeliczeniu na milion mieszkańców różni się znacząco, od 6,7 w Wielkiej Brytanii, 4,4 w Holandii i 4,0 w Czechach, do 1,0 i mniej w 12 z 18 krajów uwzględnionych w europejskiej bazie danych. [1].

### ETIOLOGIA I PATOGENEZA

Pierwsze doniesienia o wrodzonych defektach metabolizmu puryn (deficyt aktywności oksydoreduktazy ksantynowej oraz zespół Lescha-Nyhana) pojawiły się w 1954 i 1964 roku [4,5]. Defekty na szlaku pirymidyn opisano po raz pierwszy w 1959 roku [6]. Od tego czasu wykryto kilkanaście innych rodzajów zaburzeń i obecnie ich liczba wynosi 30, z czego 15 ma znaczące konsekwencje kliniczne (Tab. 2 i 3) [7,8]. W przypadku niektórych enzymów nie opisano defektów wynikających z mutacji w ich genach chociaż nie wyklucza się, że przynajmniej w części z nich prawdopodobne zmiany powodujące całkowity deficyt białka są letalne [7]. Obecnie do defektów spowodowanych zaburzeniami szlaku szlaku P/P zalicza się również deplecje i delecje mitochondrialnego DNA (mtDNA), związane z

deficytem enzymów syntezy pirymidyn: kinazy tymidynowej (TK), kinazy deoksyguanozynowej (dGK) oraz fosforylasy tymidynowej (TP) [9].

### CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA

Defekty szlaku P/P uważano pierwotnie za problem pediatryczny, obecnie jednak coraz częściej rozpoznawane są one również u dorosłych, będąc niejednokrotnie przyczyną zagrażających życiu objawów [2,3,10]. Jakkolwiek zdecydowana większość z nich manifestuje się już w okresie dzieciństwa lub dorastania, niektóre mogą pozostać niezauważone do szóstej, a nawet ósmej dekady życia. W zasadzie zaburzenia mogą dotyczyć każdego układu: odpornościowego, krwiotwórczego, nerwowego, szkieletowo-mięśniowego oraz, z powodu wyjątkowej nierozpuszczalności produktów metabolizmu zasad purynowych, również układu moczowego [2]. Zarówno defekty szlaku puryn jak i pirymidyn mogą być przyczyną zagrażających życiu reakcji na terapię analogami metabolitów [2,3,11]. Najczęściej występujące objawy kliniczne związane z defektami szlaku/PP opisano w tabeli 4.

### DIAGNOSTYKA

W przypadku defektów P/P znaczenie laboratorium diagnostycznego jest nie do przecenienia, ponieważ dostępność badań przesiewowych jest warunkiem niezbęd-

Tabela 1. Enzymy szlaku puryn i pirymidyn (opracowano na podstawie [1-3]).

Skrót	Enzym (numer EC)	Symbol genu lokalizacja chromosomalna	Defekt	OMIM
ADA	deaminaza adenozykowa (3.5.4.4)	ADA (20q13.11)	deficyt deaminazy adenozykowej (ADA)	146920 102700
			nadaktywność deaminazy adenozykowej (ADAs)	146920 102730
			deficyt liazy adenylo- bursztynianowej	103050 608222
			deficyt transformylazy AICAR + cyklohydrolazy IMP	601731 608688
ADSL	liaza adenylo-bursztynianowa (4.3.2.2)	ADSL (22q13.1)	deficyt liazy adenylo- bursztynianowej	103050 608222
AICAR-TF/ IMP-CH	transformylaza AICAR (2.2.2.3)/cyklohydrolaza IMP (3.5.4.10)	ATIC (2q35)	deficyt transformylazy AICAR + cyklohydrolazy IMP	601731 608688
AMPD AMPD-1 (MAD) AMPD-3	deaminaza adenylanowa (3.5.4.6)	AMPD1 (1p21-p13) AMPD3 (11pter-p13)	deficyt deaminazy AMP: - mięśnie: AMPD-1  - erytrocyty: AMPD-3	102770  102772
AO/XDH	oksydaza aldehydowa (1.2.3.1) /dehydrogenaza ksantynowa	AOX1 (2q33)	deficyt oksydazy aldehydowej + XDH	603592 602841
APRT	fosforybozylo-transferaza adeninowa (2.4.2.7)	APRT (16q24.3)	deficyt fosforybozylo- transferazy adeninowej	102600
BAIBPAT	aminotransferaza β-aminoizomasłowo- pirogonianowa (2.6.1.40)	brak danych	deficyt aminotransferazy β-aminoizomasłowo- pirogonianowej	-
BAKAT	aminotransferaza β-alanino- α-ketoglutarynowa (2.6.1.19)	brak danych	deficyt aminotransferazy β-alanino-α-ketoglutarynowej	-
CDP-CPT	CDP-fosfotransferaza cholinowa (2.7.7.15)	PCYT1 (3q)	deficyt CDP-fosfotransferazy cholinowej	123695
DHP	dihydropirymidynaza (3.5.2.2)	DPYS (8q22)	deficyt dihydropirymidynazy	222748
DPD	dehydrogenaza dihydropirymidynowa (1.3.1.2)	DPYD (1p22)	deficyt dehydrogenazy dihydropirymidynowej	274270
FJHN		UMOD (16p12.3)	rodzinna młodzieńcza nefropatia	162000 191845
HPRT LND HRND, HRH	fosforybozylo-transferaza hipoksantyno- guaninowa (2.4.2.8)	HPRT1 (Xq26-q27.2)	deficyt HPRT: - całkowity - częściowy	308000 300322 300323
IMPDH typ I typ II	Dehydrogenaza inozynomonofosforanowa (1.1.1.205)	IMPDH1 (7q31.3-q32) IMPDH2 (3p21.2)	nadaktywność dehydrogenazy inozynomonofosforanowej typ-II	146690 146691
ITPA	pirofosfohydrolaza inozynotrifosforanowa (3.6.1.19)	ITPA (20p)	deficyt pirofosfohydrolazy inozynotrifosforanowej	147520
MTAP	fosforylaza metyltioadenozynowa (2.4.2.28)	MTAP (MSAP) 9p21	deficyt fosforylazy metyltioadenozynowej	156540
MCF (AO/ XDH/SO)	oksydaza aldehydowa/ dehydrogenaza ksantynowa/ oksydaza siarczynowa	MOCS1(6p21.3) MOCS2 (5q11) GEPH (14p24)	deficyt kofaktora molibdenowego (złożony deficyt AO, XDH oraz SO)	252150 603707 603708 603930
PRPS	syntetaza fosforybozylo- pirofosforanowa (2.7.6.1)	PRPS1 (Xq22-q24) PRPS2 (Xp22)	nadaktywność syntetazy fosforybozylo-pirofosforanowej (PRPSs)	300661 311850
			deficyt syntetazy fosforybozylo- pirofosforanu	311850
PNP	fosforylaza nukleozydów purynowych (2.4.2.1)	NP (14q13.1)	deficyt fosforylazy nukleozydów purynowych	164050
Pu-5'Ns	5'-nukleotydaza purynowa	brak danych	nadaktywność 5'-nukleotydazy purynowej	-

Tabela 2. Wrodzone wady metabolizmu szlaku puryn.

Część 1 (opracowano na podstawie [1-3])		Cechy kliniczne „zespoły objawów”		Metabolity diagnostyczne	
Defekt defekt	synonim	skrót	zespół niedoboru odporności, ciężka limfopenia	dAdo↑, dATP↑ (erytrocyty)	brak
Deficyt deaminazy adenozynej	SCID	ADA	niedokrwiłość hemolityczna		
Nadaktywność deaminazy adenozynej	ADA-nadaktywność	ADAs			
Deficyt deaminazy AMP	deficyt mioAMPD	MAD	hipotonia, kurcze mięśni, nietolerancja wysiłku fizycznego	NH3↓ (test wysiłkowy)	
Mięśnie: AMPD-1 Erytrocyty: AMPD-3	deficyt eryAMPD	AMPD-1 AMPD-3	typ I: lekooporne drgawki, głębokie upośledzenie psychoruchowe, cechy autyzmu	AICAR↑, SAICAR↑, S-Ado↑	
Deficyt liazy adenylobursztynianowej	adenylosukcynaza	ADSL	typ II: łagodne/umiarkowane upośledzenie psychoruchowe, zaburzenia kontaktu		
Deficyt liazy adenylobursztynianowej			typ noworodkowy: encefalopatia z hipotonią, drgawki, manifestacje prenatalne		
Deficyt transformylazy AICAR i cyklohydrolazy IMP	ATIC	AICAR-TF IMP-CH	dysmorfia, deficyt neurologiczny, wrodzona ślepotą	AICAR↑, SAICAR↑, S-Ado↑	
Deficyt oksydazy aldehydowej i oksydazy ksantynowej	ksantynuria-II	AO/XDH	kamica nerkowa. ostra niewydolność nerek	(hypo-)xan↑, UA↓	
Deficyt fosforybozylo-transferazy adeniny	2,8-dh-adeninuria	APRT	kamica 2,8-dhAde, krystaluria, ostra niewydolność nerek, ZUM	2,8-dhAde↑, Ade↓	
Poziom metabolitów diagnostycznych podwyższony (↑) lub obniżony (↓) w płynach ustrojowych lub we wskazanych komórkach. AICAR – rybozyd aminoimidazolokarboksamidu; 2,8-dhAde – 2,8-dihydroksyadenina; Ade – adenina; (d)Ado, (d)ATP – (deoksy) adenozyne; (hypo-)xan: hipoksantyna; NH <sub>3</sub> – amoniak, S-Ado – bursztyniadenozyna, SAICAR – rybozyd bursztynioloaminoimidazolokarboksamid; UA – kwas moczowy, ZUM – zakazania układu moczowego.					
Część 2 (wg 4, 7 zmodyfikowano)		Cechy kliniczne „zespoły objawów”		Metabolity diagnostyczne	
Defekt defekt	synonim	skrót	młodzieńcza dna moczanowa, nadciśnienie tętnicze, szybko postępująca niewydolność nerek	UA↓	
Rodzinna młodzieńcza nefropatia	młodzieńcza dna moczanowa	FJHN			
Deficyt fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej – całkowity	zespół Lesch-Nyhana	HPRT	– postępujące uszkodzenie rozwoju motorycznego, spastyczność, drgawki, samookaleczanie	– UA↑, hyp↑	
– częściowy		LND	– młodzieńcza dna moczanowa, ZUM, kamica nerkowa, niewydolność nerek	– UA↑	
Nadaktywność dehydrogenazy IMP typ II	zespół Kelley-Seegmüllera	KSS	aktywacja w przebiegu procesów złośliwych	IMP↑/GMP↓ (komórki rakowe)	
Deficyt ITPazy (pirofosfohydrolazy ITP)	ery-ITPaza	ITPA	skąpoobjawowy obraz kliniczny	ITP↑ (erytrocyty)	
Deficyt fosforylazy metyloadenozyny	deficyt MTAP komórek rakowych	MTAP MCF AO/XDH/SO	aktywacja w przebiegu procesów złośliwych	MTAdo↓ (komórki rakowe)	
Deficyt kofaktora molibdenowego (złożony niedobór AO, XDH i SO)	ksantynuria-III ksantynuria-sulfitura		postać niemowlęca: lekooporne drgawki, zwichnięcie soczewek, ciężkie zaburzenia neurologiczne postać późna: łagodne objawy	(hypo-)xan↑, siarczyn↑, tiosiarczan↑, s-sulfocystyna↑, cystyna↓, UA↓	

Poziom metabolitów diagnostycznych podwyższony (↑) lub obniżony (↓) w płynach ustrojowych lub we wskazanych komórkach. GMP: guanozynomonofosforan; Hyp: hipoksantyna, (hypo-)xan: hipoksantyna; IMP: inozynomonofosforan; ITP: inozynotriofosforan; MTAdo: metyloadenozyna; UA: kwas moczowy; ZUM: zakazania układu moczowego.

Część 3 (wg 4, 7 zmodyfikowano)	synonim	skrót	Cechy kliniczne „zespoły objawów”	Metaboliety diagnostyczne
Defekt defekt				
Deficyt fosforylasy nukleozydów purynowych	deficyt PNP	PNP	niedobór odporności (limfocyty T), zaburzenia neurologiczne (opóźnienie psychiczne/ruchowe, ataksja, hipertonia/hipotonia)	(d)Ino↑, (d)Guo↑, dGTP↑ (erytrocyty), UA↓
Nadaktywność syntetazy PRPP	nadaktywność PRPPs	PRPPs	postać wczesna: wrodzona głuchota, cechy dysmorfii, opóźnienie rozwoju psychoruchowego Postać młodzieńcza: dna/kamica moczanowa, bez ubytku neurologicznego	UA↑
Nadaktywność 5-nukleotydazy purynowej	Pu-5' fibroblasty	Pu-5'-Ns	toksyczność 6-azatiopuryny i merkaptopuryny	brak
Deficyt hydrolazy S-adenozylhomocysteiny		SAHH	ciężkie złożone niedobory odporności (występuje w deficycie ADA, PNP oraz HPRT)	SAH↑ (erytrocyty)
Deficyt metyltransferazy tiopurynowej	metyltransferaza tiopurynowa	TPMT	toksyczność 6-azatiopuryny i merkaptopuryny	nukleotydy tiopurynowe↑ (erytrocyty)
Deficyt oksydoreduktazy ksantynowej	ksantynuria-1	XDH	kamica ksantynowa, ostra niewydolność nerek, ZUM, miopatia, artralgia	(hypo-)xan↑, UA↓

Poziom metabolitów diagnostycznych podwyższony (↑) lub obniżony (↓) w płynach ustrojowych lub we wskazanych komórkach. (d)GTP, (d)Guo, (d)Ino – (deoksy)-trójfosforan guanozyny, -guanozyna, -inozyna; (hypo-)xan – (hypo-)ksantyna; SAH – S-bursztynylhomocysteina; UA – kwas moczowy; ZUM – zakażenia układu moczowego.

nym do ich rozpoznania (Tab. 5) [12]. Ostateczna diagnoza w przypadku większości defektów wymaga wykazania deficytu specyficznego enzymu lub patogennej mutacji. Badania te dostępne są z reguły jedynie w wyspecjalizowanych ośrodkach. Z tego powodu, większość szpitali stosuje serie badań przesiewowych określanych jako „skrining metaboliczny” [12]. Rozpoznanie większości znanych defektów metabolizmu szlaku puryn i pirymidyn może zostać ustalone na podstawie analizy moczu [13]. Mocz jest materiałem z wyboru w celach badań przesiewowych ze względu na akumulowanie się w nim metabolitów P/P. Jeśli mocz jest niedostępny, mogą być również przydatne osocze lub płyn mózgowo-rdzeniowy [14]. We wstępnej diagnostyce pacjentów zakwalifikowanych do badań w kierunku zaburzeń metabolizmu P/P wykorzystywane są różne metody badawcze, od stosunkowo prostych (badanie obecności kwasu moczowego w surowicy i w moczu) do wysokospecjalistycznych (wysokosprawna chromatografia cieczowa, tandemowa spektrometria mas, chromatografia gazowa-spektrometria mas, spektroskopia rezonansu magnetycznego) [15].

Metody chromatograficzne wykorzystywane w diagnostyce IEM od ponad 60 lat, ewoluowały od chromatografii cienkowarstwowej, poprzez jonowymienną do wysokosprawnej chromatografii cieczowej i gazowej [16]. Połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas okazało się przełomem porównywalnym z wprowadzeniem testu Guthrie’go stwarzając ogromne możliwości w diagnostyce wielu defektów metabolicznych, w tym także wad metabolizmu P/P. Tandemowa spektrometria mas (MS/MS) jest metodą analityczną wykorzystującą połączenie dwóch spektrometrów masowych w celu rozdziału i analizy mieszaniny związków po ich uprzedniej jonizacji, z reguły metodą elektrorozpylenia (ESI, ang. *electrospray ionization*). Zaletą tandemowej spektrometrii mas jest, poza wysoką czułością i specyficznością, równoczesne wykrywanie wielu związków, co pozwala na detekcję znacznie szerszego spektrum wrodzonych wad metabolizmu w porównaniu z możliwościami metod konwencjonalnych [17]. Dodatkowo, ograniczenie lub zupełne wyeliminowanie etapu chromatografii, skraca czas analizy, co pozwala na zwiększenie szybkości, a przez to liczby oznaczeń [18]. Z tych powodów HPLC/MS-MS jest obecnie metodą z wyboru dla badań przesiewowych w kierunku defektów szlaku P/P [17]. Inną obiecującą metodą jest również spektroskopia rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Dużą zaletą tej metody jest brak konieczności obróbki próbki, jednak ograniczeniem nadal pozostają koszty [19].

Niektóre defekty metabolizmu P/P nie mogą zostać wykryte na podstawie analizy płynów fizjologicznych. W przypadku defektów specyficznych dla określonych typów komórek, takich jak AMDP-1 (mięśnie), AMDP-2 (erytrocyty), ITPA (erytrocyty), MTAP (komórki nowotworowe), UMPH-1 (erytrocyty) oraz nadaktywność IMPDH (komórki rakowe) i Pu-5’N (fibroblasty) (Tab. 2 i 3), występowanie zmian nie jest uogólnione, a zatem badaniu muszą być poddawane wybrane komórki [1].

Tabela 3. Wrodzone wady metabolizmu szlaku pirymidyn – (opracowano na podstawie [1-3]).

Część 1	synonim	skrót	Cechy kliniczne – zespoły objawów	Metabolity diagnostyczne
Defekt defekt				
deficyt aminotransferazy β-alanino-2-oksoglutarowej	GABAT-AT, β-alaninuria	BAKAT	drgawki, śpiączka	β-alanina ↑
deficyt aminotransferazy β-aminoizomiaslowo-pirogronianowej	acyduria hiper-β-amino-izomiaslowa	BAIBPAT	łagodny przebieg	β-aminoizomiasłan ↑
deficyt CDP-fosfotransferazy cholinowej	deficyt ery-CDP-PT	CDP-PT	niedokrwistość hemolityczna	CDP-cholina + CDP-etanolamina ↑ (erytrocyty)
deficyt dihidropirymidynazy	dihidropirymidynuria	DHP	zaburzenia neurologiczne, małogłowie, toksyczność 5-fluorouracylu	dhU ↑, dhT ↑, U ↑, T ↑
deficyt dehydrogenazy dihidropirymidynowej	uracylotyminuria	DPD	zaburzenia neurologiczne, małogłowie, cechy dysmorfii, toksyczność 5-fluorouracylu	U ↑, T ↑
deficyt UMP-hydrołazy (5'-nukleotydazy pirymidynowej)	deficyt UMPH-1	Py-5"N	niedokrwistość hemolityczna, splenomegali	nukleotydy pirymidynowe ↑ (erytrocyty)

Objaśnienia do części 1: Poziom metabolitów diagnostycznych podwyższony (!) lub obniżony (↓) w płynach ustrojowych lub we wskazanych komórkach. ALTE (ang. acute life threatening event): – ostre stany zagrażające życiu; CDP-cholina – dwufosforan cytidyny-cholina; dhT – dihydroksytymina; dhU – dihydroksyuracyl; NC-BAIB – kwas N-karbamyl-β-aminoizomiasłowy; NC-BALA – N-karbamyl-β-alanina; T – tymina; U – uracyl.

Część 2	synonim	skrót	Cechy kliniczne – zespoły objawów	Metabolity diagnostyczne
Defekt defekt				
deficyt ureidopropionazy	Deficyt NC-BALA amidohydrołazy	UP	hipotonia, opóźnienie rozwoju psychoruchowego, wymioty, drgawki, ALTE	dhU ↑, dhT ↑, NC-BALA ↑, NC-BAIB ↑
deficyt syntetazy UMP	Kwasica orotowa	OPRT-ODC (UMPS)		
deficyt fosforybozyłotransferazy ornitynowej	OA typ I	OPRT	wrodzona acyduria kwasu orotowego, niedokrwistość megaloblastyczna, niedobór odporności	- OA ↑
deficyt dekarboksylazy orotydylanowej	OA typ II	ODC	opóźnienie rozwoju psychoruchowego	- OA ↑, Or ↑
deficyt fosforylazy tymidynowej		TP	MNGIE, oczna i szkieletowa miopatia z objawami żółdkowojelitowymi	tymidyna ↑, urydyna ↑, deoksyurydyna ↑, deplecje mtDNA
deficyt kinazy tymidynowej 2		TK2	ciężka mitochondrialna encefalomiopatia	deplecje mtDNA

Objaśnienia do części 2: Poziom metabolitów diagnostycznych podwyższony (!) lub obniżony (↓) w płynach ustrojowych lub we wskazanych komórkach. OA – kwas orotowy; Or – orotydyna.

**Tabela 4.** Symptomatologia kliniczna w odniesieniu do różnych stanów i jednostek chorobowych, w których mogą występować zaburzenia metabolizmu puryn i pirymidyn (opracowano na podstawie [1-3]).

Specjalność medyczna	Objawy
Gastroenterologia	nawracające wymioty, biegunka, zaburzenia wchłaniania
Genetyka medyczna	cechy dysmorfii, małogłowie, wrodzone anomalie układu moczowo-płciowego oraz odbytnicy
Hematologia	niedokrwistość (normocytarna, megaloblastyczna, hemolityczna, aplastyczna, zespół Diamond-Blackfan), leukopenia, splenomegalia
Histologia	rabdomioliza, zanik kosmków jelitowych
Immunologia	nawracające infekcje, niedobory odporności, limfopenia (limfocyty T/B)
Nefrologia	krystaluria, pomarańczowy osad moczu, hematuria, zakażenia układu moczowego, kamica nerkowa (kwas moczowy, ksantyna, 2,8-dihydroksyadenina), niewydolność nerek
Neonatologia	wrodzona głuchota, wrodzona ślepotą, hipotonia, mikrosomia, kryształki na pieluszkach lub czubku penisa, drgawki noworodkowe
Neurologia	hipotonia/hipertonía, opóźnienie rozwoju psychoruchowego, napady padaczkowe, małogłowie, cechy autyzmu, ataksja, samookaleczanie, choreoatetoza, dystonia, polineuropatia, miopatia, zanik mięśni, kurcze mięśniowe, nietolerancja wysiłku
Okulistyka	wrodzona ślepotą, atrofia nerwu wzrokowego, zwichnięcie soczewek, zez, oftalmoplegia
Onkologia	nowotwory, zespół farmakogenetyczny
Ortopedia	skrzywienia kręgosłupa (skolioza)
Radiologia	podwyższona echogenność nerek MRI: opóźniona mielinizacja mózgu, atrofia mózgu, atrofia mózdzku
Reumatologia	zapalenia stawów, artralgia, dna moczanowa
Biochemia	hipo-/hiperurykemia, hipo-/hiperurykozuria, anemia (normocytarna, megaloblastyczna, hemolityczna, aplastyczna), limfopenia, trombocytopenia, acyduria orotowa, sulfituria
Inne	wypadanie włosów, ostre stany zagrażające życiu (ang. <i>acute life-threatening events</i> , ALTE)

## METODY WERYFIKUJĄCE ROZPOZNANIE

Ostateczna diagnoza w przypadku defektów szlaku P/P wymaga wykazania deficytu specyficznego enzymu i/lub patogennej mutacji. W celu analizy enzymatycznej wykorzystywane są erythrocyty, limfoblasty lub fibroblasty [14]. Procedura ta jest szczególnie ważna w sytuacji, gdy dostęp do potrzebnego materiału jest utrudniony lub gdy zmiany w stężeniu metabolitów są nieznaczne. Typowym przykładem jest deficyt deaminazy AMP (AMPD), który można wykryć tylko na podstawie badania materiału z biopsji mięśnia lub przez badanie DNA wyizolowanego z krwi.

Jeśli u podłoża choroby znajduje się homozygotyczność mutacji, wówczas wykazanie dwóch kopii zmutowanego allelu pozwala na postawienie rozpoznania. Jednakże w takich przypadkach problem stanowi często różnorodność alleliczną. Poza kilkoma wyjątkami, w przypadku wrodzonych wad metabolizmu, dla których został zidentyfikowany gen oraz patogenne mutacje, nie jedna, lecz bardzo wiele mutacji odpowiada za chorobę. W praktyce oznacza to konieczność sekwencjonowania całego genu. Wykrycie określonej mutacji pozwala na potwierdzenie diagnozy, aczkolwiek nie znalezienie mutacji nie wyklucza deficytu białka [14]. Pacjent może być nosicielem nie zidentyfikowanych dotąd zmutowanych alleli, lub mogą one występować na tyle rzadko, iż ze względów finansowych nie zostały umieszczone w rutynowo wykonywanym teście. W takich przypadkach, scharakteryzowanie białkowego produktu genu poprzez oznaczenie jego aktywności enzymatycznej ma szczególnie duże znaczenie [12].

## LECZENIE

Celem leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie, do których należą defekty P/P, jest kompensacja zmian fe-

notypowych. Sposoby leczenia wrodzonych wad metabolizmu obejmują kontrolę gromadzenia się substratu, zastąpienie produktu reakcji, zastąpienie produktu genu (tj. enzymu, kofaktora) oraz terapię genową [12]. Ponieważ terapia genowa, czyli leczenie *sensu stricto* przyczynowe, nie jest obecnie dostępna, stosowane metody zapobiegają skutkom defektu genetycznego przez łagodzenie lub eliminowanie objawów klinicznych. Jest to rodzaj strategii eufemicznej, w której dążąc do „wyrównania” fenotypu modyfikuje się go nie ingerując w genotyp [12]. Najbliższe leczeniu przyczynowemu są metody dostarczające enzym, do których należy przeszczep szpiku oraz enzymatyczne leczenie substytucyjne. Przeszczep szpiku (BMT, ang. *bone marrow transplantation*) pozwala na wprowadzenie prawidłowych limfocytów B i T mających wystarczającą aktywność brakującego enzymu aby zapobiec nadmiernemu nagromadzeniu się nukleozydów i nukleotydów. Jest on stosowany w przypadku pacjentów z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID, ang. *severe combined immunodeficiency*) w przebiegu deficytu deaminazy adenozynowej (ADA) oraz deficytu fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP). Metoda ta prowadzi także do przywrócenia aktywności hydrolazy S-bursztynylhomocysteiny (SAHH), która jest wtórnie zahamowana przez nagromadzające się metabolity. W przypadku deficytu ADA zastępcza terapia enzymatyczna jest również możliwa z zastosowaniem PEG-ADA (deaminaza adenozynowa wołu połączona z glikolem polietylenowym) podawanej domięśniowo. Próby terapii genowej u pacjentów z deficytem ADA skończyły się niepowodzeniem, jednakże oczekuje się, że odpowiednia terapia genowa będzie dostępna w przypadku obydwu defektów w niedalekiej przyszłości [1].

Inne sposoby leczenia mają na celu wiązanie lub rozcieńczenie szkodliwych metabolitów poprzez właściwy dobór diety, kontrolę endogennego wytwarzania oraz przyspiesze-

**Tabela 5.** Wykaz metod przesiewowych stosowanych w diagnostyce zaburzeń metabolizmu puryn i pirymidyn (opracowano na podstawie [1-3]).

Nazwa metody	Materiał	Wykrywane defekty
Rutynowa analiza kwasu moczowego – metoda ilościowa	mocz, surowica	nadaktywność syntetazy PRPP (PRPPs), rodzinna młodzieńcza nefropatia (FJHN), deficyty: fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej (HPRT, KSS), fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP), oksydoreduktazy ksantynowej (XDH, AO/XDH, AO/XDH/SO)
2-Dim-TLC – metoda jakościowa	mocz	wszystkie defekty ze zmienionym stężeniem metabolitów, w tym deficyt liazy adenylbursztynianowej (ADSL) oraz transformylazy AICAR i cyklohydrolazy IMP (ATIC)
HPLC z DAD UV (profil zasad P/P i nukleozydów) – met. ilościowa	mocz, surowica	wszystkie defekty ze zmienionym stężeniem metabolitów absorbujących UV
Chromatografia kationowymienna dla aminokwasów z jednokanałowym detektorem UV	mocz	deficyt oksydoreduktazy ksantynowej (XDH, AO/XDH, AO/XDH/SO)
Analiza aminokwasów przed i po kwaśnej hydrolizie moczu	mocz	deficyt liazy adenylbursztynianowej (ADSL), defekty szlaku pirymidyn (DHP, UP, BAKAT, BAIBPAT)
GC-MS (profil kwasów organicznych) – met. jakościowa	mocz	defekty szlaku pirymidyn (DPD, DHP, UMPS)
HPLC-(FAB/ESI)-MS	mocz	defekty szlaku pirymidyn (DPD, DHP)
H-NMR spektroskopia	mocz	deficyty: liazy adenylbursztynianowej (ADSL), fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej (HPRT), fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP), oksydoreduktazy ksantynowej (XDH), defekty szlaku pirymidyn (DHP, DPD)
HPLC nukleotydów w erytrocytach	erytrocyty	deficyty: deaminazy adenozy (ADA), fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej (HPRT), ITPazy (ITPA), fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP), hydrolazy UMP (Py-5'N), nadaktywność dehydrogenazy IMP (IMPDHs-II)
HPLC MS/MS/ESI (profil zasad PP i nukleozydów) – met. jakościowa	mocz	wszystkie defekty ze zmienionym stężeniem metabolitów diagnostycznych
Częściowo-niedokrwienny mięśniowy test wysiłkowy z oznaczeniem NH <sub>3</sub> oraz mleczanów we krwi	krew	deficyt deaminazy AMP (AMPD-1)

nie wydalania [12]. Pacjenci z deficytem XDH, APRT, FJHN, HPRT oraz pacjenci z nadaktywnością PRPS powinni być leczeni allopurynolem w celu zahamowania powstawania słabo rozpuszczalnych substancji (ksantyna, 2,8-dihydroksyadenina oraz kwas moczowy) akumulujących się w przypadku tych chorób [8]. Dodatkowe sposoby takie jak duże spożycie płynów, alkalizacja moczu poprzez podawanie węglanów lub cytrynianów (nieskuteczne w przypadku deficytu APRT) oraz dieta niskopurynowa mogą być niezbędne w celu zapobiegania powstawania złożeń kryształów.

Pacjenci z deficytem AMDA-1 powinni unikać intensywnego wysiłku fizycznego aby zapobiec atakom rhabdomyolizy i mioglobulinurii. W przypadku niektórych pacjentów leczenie z zastosowaniem rybozy poprawia tolerancję wysiłku fizycznego [1,8]. Pacjenci z deficytem TPMT, Pu-5'N,

MCF, AO/XDH, UMPS, DPD, DHP lub UP oraz ich krewni powinni zostać poinformowani o farmakogenetycznych konsekwencjach tych defektów. Powinni unikać leków będących substratami lub prekursorami substratów dla defektywnych enzymów lub otrzymać dawkę odpowiednią do istniejącej aktywności enzymu [32-34]. Pacjenci z deficytem UMPS mogą być leczeni urydyną, którą jest przekształcana do UMP z udziałem kinazy urydyny. Suplementacja urydyną daje efekty w postaci remisji hematologicznej oraz przyspieszenia wzrostu, ale nie zapobiega opóźnieniu rozwoju zarówno fizycznego jak i psychicznego [8]. Terapia w przypadku innych defektów wymienionych w tabelach 2 i 3 nie została dotąd opracowana.

#### DZIEDZICZENIE I ZAPOBIEGANIE

W większości defektów szlaku puryn i pirymidyn dziedziczenie jest autosomalne recesywne [8]. Wyjątkami są nadaktywność PRPS oraz deficyt HPRT, w których dziedziczenie jest recesywne sprzężone z chromosomem X. Deficyt ADA jest sprzężony z chromosomem X u 1/3 i autosomalny recesywny u 2/3 pacjentów, natomiast w FJHN dziedziczenie jest autosomalne dominujące. Analiza mutacji została opisana dla prawie wszystkich defektów, jednakże duża liczba różnych mutacji oraz pojawianie się

**Tabela 6.** Porównanie częstości występowania deficytu aktywności fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej (HPRT) oraz liazy adenylbursztynianowej (ADSL) w Polsce i na świecie.

Defekt metabolizmu P/P	Deficyt aktywności HPRT	Deficyt aktywności ADSL
Częstość występowania na świecie/pochodzenie etniczne	1:100 000–1:380 000 [36] różne grupy etniczne	brak danych [53] różne grupy etniczne
Liczba pacjentów na świecie	3501 (np. Włochy -28)	501 (np. Belgia – 14, Czechy – 20, Holandia – 7)
Częstość występowania w Polsce <sup>2</sup>	1:860 000	1:418 000
Liczba pacjentów w Polsce	18	7
Liczba rozpoznani w Polsce rocznie rzeczywista/przewidywana	0,6/1,36-5,13	0,875/brak danych

<sup>1</sup>na podstawie [4,53], ADSLdb (<http://www.icp.ucl.ac.be/adsl/db/mutations.html>); <sup>2</sup>częstość występowania obliczona na oparciu o liczbę zidentyfikowanych przypadków w stosunku do liczby urodzeń.

wielu nowych nie pozwala na wykrywanie nosicielstwa ze 100% pewnością. Z tych powodów również diagnoza oparta o analizę molekularną jest trudna. Diagnostyka prenatalna polegająca na wykrywaniu metabolitów lub badania enzymatyczne z wykorzystaniem kosmówki (w pierwszym trymestrze ciąży), płynu owodniowego, komórek płynu owodniowego lub krwi płodu uzyskanej drogą kordocentezy (w drugim trymestrze) jest dostępna dla większości defektów [8,13].

#### WRODZONE WADY METABOLIZMU PURYN

Problemy kliniczne związane z metabolizmem nukleotydów u ludzi są w większości spowodowane zaburzeniami katabolizmu puryn [8]. Kliniczne konsekwencje mogą różnić się od łagodnych do ciężkich, ze zgonem włącznie. Manifestacja kliniczna nieprawidłowego katabolizmu puryn wynika z nierozpuszczalności produktu końcowego jakim jest kwas moczowy. Nadmiar kwasu moczowego prowadzi do hiperurykemii i dny moczanowej. Większość przypadków dny moczanowej jest wynikiem nadmiaru puryn lub częściowego deficytu aktywności fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej (HPRT).

#### WRODZONE WADY METABOLIZMU PIRYMIDYN

Nieprawidłowy metabolizm pirymidyn może mieć konsekwencje hematologiczne, neurologiczne lub mitochondrialne, jak również może prowadzić do ciężkiej toksyczności w przypadku terapii analogami pirymidyn [20-23]. Co więcej, wykazano, że regulacja metabolizmu pirymidyn ulega zaburzeniu w przebiegu procesów nowotworowych [11]. Do tej pory opisano kilka defektów na szlaku pirymidyn, ostatni stosunkowo niedawno (Tab. 3) [11]. Zaden z opisanych deficytów nie dotyczy szlaku rezerwowego urydyny, co prawdopodobnie oznacza, iż defekty te bardzo wcześnie prowadzą do zgonu [11]. Trzy enzymy uczestniczące w katabolizmie pirymidyn (dehydrogenaza dihydropirymidynowa, dihydropirymidynaza oraz urediopropionaza) są odpowiedzialne nie tylko za degradację naturalnie występujących zasad uracylu i tyminy, ale również szeroko stosowanych leków chemioterapeutycznych, takich jak 5-fluorouracyl [22]. Z tego powodu u pacjentów z deficytem tych enzymów istnieje ryzyko rozwoju ciężkiej toksyczności w przebiegu terapii 5-fluorouracylem [22,23].

#### WYKRYWALNOŚĆ WAD METABOLIZMU P/P W POPULACJI POLSKIEJ W PORÓWNANIU Z INNYMI KRAJAMI EUROPY

##### DEFICYT AKTYWNOŚCI FOSFORIBOZYLOTRANSFERAZY HIPOKSANTYNOGUANINOWEJ

Częstość występowania deficytu fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej na świecie szacuje się na 1:100000 do 1:380000 urodzeń [24]. Typowo dla chorób sprzężonych z chromosomem X, częstość występowania jest podobna we wszystkich krajach, zależna jedynie od modelu (dzietności) rodziny. W Polsce w latach 1977-2007 częstość występowania obliczona w oparciu o liczbę zidentyfikowanych przypadków w stosunku do liczby urodzeń została oceniona na 1:860000 (Tab. 6) [25]. Taka wartość jest znacznie niższa w porównaniu z podawanym w literaturze,

a jego przeniesienie na populację polską oznaczałoby 1-5 nowych rozpoznań rocznie w porównaniu z uzyskanym 0,6. Oznacza to, że prawdopodobnie co najmniej połowa pacjentów nie ma ustalonego rozpoznania. Podstawowym badaniem, którego wynik nasuwa podejrzenie deficytu aktywności HPRT jest oznaczanie stężenia kwasu moczowego w surowicy oraz moczu [8]. Badanie to, zwłaszcza przy braku bardziej wyrafinowanych metod diagnostycznych, powinno być stosowane jako standard wstępnej różnicowania zespołu LN u niemowląt płci męskiej z objawami mózgowego porażenia dziecięcego, hipotonii, kamicy nerkowej oraz nefropatii [26].

##### DEFICYT AKTYWNOŚCI LIAZY ADENYLOBURSZTYNIANOWEJ

Ponieważ badania przesiewowe wykonywane w kierunku deficytu aktywności ADSL wykonywane są tylko przez ograniczoną liczbę specjalistycznych ośrodków pediatrii metabolicznej, wiarygodna ocena częstości występowania tego deficytu na świecie nie jest do tej pory możliwa (Tab. 6) [27]. Większość pacjentów zidentyfikowano w Belgii i Holandii, gdzie deficyt został wykryty po raz pierwszy i rutynowo prowadzi się badania laboratoryjne w tym kierunku [27,28]. W Polsce, badania przesiewowe metodą TLC zostały wprowadzone w 1984 roku, ale po bezskutecznych poszukiwaniach przez kilka lat, zostały zaniechane. W 1999 roku po przypadkowym wykryciu pierwszej pacjentki w oparciu o obraz kliniczny, test został ponownie wprowadzony w ramach badań przesiewowych selektywnych w kierunku wrodzonych wad metabolizmu. Pierwsze lata badań nie przyniosły zadowalających wyników, ponieważ uważano, że najbardziej typowym objawem deficytu ADSL są zmiany o cechach autyzmu [28]. Dopiero poszukiwanie deficytu tego enzymu wśród noworodków i niemowląt z lekkoopornymi drgawkami (około 3000 próbek od 1999 roku) pozwoliło na wykrycie pięciu nowych przypadków tego niedoboru [29,30]. Częstość występowania deficytu aktywności liazy adenylbursztynianowej w populacji polskiej w latach 1999-2007 obliczona w oparciu o liczbę zidentyfikowanych przypadków w stosunku do liczby urodzeń została oceniona na 1 na 418 000 urodzeń, co oznacza średnio 0,875 nowych rozpoznań rocznie (Tab. 6).

#### ROZWAŻANIA KOŃCOWE

Kiedy przed stu laty Archibald Garrod (1905) wprowadził pojęcie „wrodzonych fenomenów metabolizmu” (ang. *inborn freaks of metabolism*) uznano jego pogląd za oryginalny jednak dotyczący problemu zupełnie marginalnego. Mała częstość występowania błędów metabolizmu przyłączyła tak do tej grupy chorób, że nawet obecnie w oficjalnym nazewnictwie funkcjonuje to określenie [31]. Postęp znacznie ograniczył mało czułe metody detekcji oraz brak wśród lekarzy wiedzy o możliwości istnienia tych defektów [31]. Wprowadzenie metod chromatograficznych, spektrometrii mas, badań enzymatycznych i współcześnie genetyki molekularnej znacznie zwiększyło ich wykrywalność zarówno wśród objawowych jak i bezobjawowych pacjentów [31]. Mimo znacznego postępu w ciągu minionych kilkunastu lat, nadal na wiele pytań nie potrafimy dać odpowiedzi. Do tej pory niewyjaśnione pozostają patofizjologiczne me-



chanizmy leżące u podłoża samookaleczania w zespole Lescha-Nyhana, upośledzenia umysłowego w deficycie ADSL czy defektów na szlaku katabolizmu pirymidyn [32]. W przypadku wrodzonych wad metabolizmu P/P nadal nie potrafimy powiązać defektu enzymatycznego oraz zaburzenia równowagi substrat/product z manifestacją kliniczną (poza kamicą), a zwłaszcza z objawami neurologicznymi. W niektórych innych chorobach metabolicznych pewne związki między biochemią a patofizjologią zostały znacznie lepiej poznane [8].

Do dzisiaj zidentyfikowano ponad 800 pacjentów z defektami szlaku P/P wśród mieszkańców 18 krajów Europy [1]. Spośród tych pacjentów 70% rozpoznano w trzech krajach, gdzie dostępne jest odpowiednie zaplecze laboratoryjne oraz istnieje większa świadomość dotycząca chorób metabolicznych [1]. Częstość występowania w przeliczeniu na milion mieszkańców różni się znacząco, od 6,7 w Wielkiej Brytanii, 4,4 w Holandii i 4,0 w Czechach, do 1,0 i mniej w 12 z 18 krajów uwzględnionych w europejskiej bazie danych [1]. Analiza częstości występowania w oparciu o liczbę wykrytych przypadków wybranych zaburzeń szlaku P/P (deficyt HPRT, XDH, DPD) w stosunku do zdrowej populacji jak również znaczne opóźnienie w ustaleniu właściwego rozpoznania, wskazują na niedostateczny stopień rozpoznawalności tych chorób w naszym kraju [25,29,30,33,34]. Konieczna jest poprawa edukacji ogółu lekarzy na temat wrodzonych wad metabolizmu szlaku P/P, a także upowszechnienie wczesno objawowych badań przesiewowych w kierunku tych defektów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Van Gennip AH (1999) Defects in metabolism of purines and pyrimidines *Ned Tijdschr Klin Chem* 24: 171-175
2. Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibron KM (2003) Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. W: Simmonds AH, van Gennip AH (red) Purine and pyrimidine disorders. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 445-465
3. Simmonds HA, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB (1997) When to investigate for purine and pyrimidine disorders. Introduction and review of clinical and laboratory indications. *J Inherit Metab Dis* 20: 214-226
4. Dent CE, Philpot GR (1954) Xanthinuria: An inborn error (or deviation) of metabolism. *Lancet* 266: 182-185
5. Lesch M, Nyhan WL (1964) A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 36: 561-570
6. Huguley CM, Bain JA, Rivers SL, Scoggins RB (1959) Refractory megaloblastic anemia associated with excretion of orotic acid. *Blood* 14: 615-634
7. Hoffmann GF, Nyhan WL, Zschocke J, Nyhan WL, Hoffmann GF (2002) Inherited Metabolic Diseases. Part V, Purines and pyrimidines: approach to disease of nucleotide metabolism. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 1<sup>st</sup> ed: 334-343
8. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1995) The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Various authors: Part 7, Purines and pyrimidines. McGraw-Hill, New York, 7<sup>th</sup> ed. vol II: 1655-1940
9. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S (1991) mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 48: 492-501
10. Jurecka A, Sykut-Cegielska J (2006) Wrodzone zaburzenia wad metabolizmu puryn i pirymidyn, nowa, mało poznana grupa chorób metabolicznych. *Klinika Pediatria* 14: 255-260
11. Loffler M, Fairbanks LD, Zameitat E, Marinaki AM, Simmonds HA (2005) Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol Med* 11: 430-437
12. Clarke J (2002) Clinical guide to inherited metabolic diseases. Chapter 10, Treatment. Cambridge University press, Port Chester, NY 255-280
13. Hommes F (1991) Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. Simmonds HA, Cameron JS, Barratt TM, Duley JA, Davies PM, Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine and other physiological fluids. Wiley-Liss, New York, 397-424
14. Simmonds HA, Cameron JS, Barratt TM, Dillon MJ, Meadow SR, Trompeter RS (1989) Purine enzyme defects as a cause of acute renal failure in childhood. *Pediatric Nephrol* 3: 433-437
15. Duran M, Dorland L, Meuleman EE, Allers P, Berger R (1997) Inherited defects of purine and pyrimidine metabolism: Laboratory methods for diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 20: 227-236
16. Clarke S (2002) Tandem mass spectrometry: the tool of choice for diagnosing inborn errors of metabolism? *Br J Biomed Sci* 59: 42-46
17. La Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E (2006) Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J Mass Spectrom* 41: 1442-1452
18. Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibron KM (2003) Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. Millington D. Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2<sup>nd</sup> ed: 57-77
19. Wevers RA, de Abreu RA, Engelke U, Heerschap A, van Gennip AH (1996) <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy of body fluids in patients with inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 19 (supplement 1): 3
20. Van Kuilenburg ABP, De Abreu RA, van Gennip AH (2003) Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem* 40: 41-45
21. Kuilenburg ABP (2006) Screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: to do or not to do, that's the question. *Cancer Investigation* 24: 215-217
22. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, van Gennip AH (2004) Pyrimidine degradation defects and severe 5-fluorouracil toxicity. *Nucleos Nucleot Nucl* 23: 1371-1375
23. Van Kuilenburg AB, Assmann B, Hoffman G, Voit T, Ribes A, Lorrente I, Busch R, Mayatepek E, Abeling NG, Wevers RA, Rutsch F, van Gennip AH (2006) Genetic analysis of the first four patients with  $\beta$ -ureidopropionase deficiency. *Nucleos Nucleot Nucl* 25: 1093-1098
24. Nyhan WL, Pesek J, Sweetman L, Carpenter DG, Carter CH (1967) Genetics of an X-linked disorder of uric acid metabolism and cerebral function. *Pediatr Res* 1: 5-13
25. Jurecka A, Popowska E, Tylki-Szymańska A, Kubalska J, Ciara E, Krumina Z, Sykut-Cegielska J, Pronicka E (2008) Deficyt fosforybozylotransferazy hipoksantynoguaninowej – kliniczna, biochemiczna oraz molekularna charakterystyka polskich pacjentów. *Przegl Pediatr* 38: 227-236
26. Torres RJ, Puig JG (2007) Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan Syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2: 48
27. Kholer M, Assmann B, Brautigam C, Storm W, Marie S, Vincent MF, Van den Berghe G, Simmonds HA, Hoffmann GF (1999) Adenylosuccinase deficiency: Possibly underdiagnosed encephalopathy with variable clinical features. *Eur J Pediatr Neurol* 3: 3-6
28. Jaeken J, Van den Berghe G (1984) An infantile autistic syndrome characterized by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet* 2: 1058
29. Jurecka A, Tylki-Szymańska A, Bogdańska A, Kmieć T, Mierzewska H, Pohorecka M, Słomońska E, Smoleński R, Sykut-Cegielska J, Taybert J, Pronicka E (2007) Deficyt liazy adenylobursztynianowej – diagnostyka oraz charakterystyka kliniczna siedmiu polskich pacjentów. *Pediatr Pol* 82: 526-532
30. Jurecka A, Zikanova M, Tylki-Szymanska A, Krijt J, Bogdanska A, Gradowska W, Mullerova K, Sykut-Cegielska J, Kmoch S, Pronicka

- E (2008) Clinical, biochemical and molecular findings in seven Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency. *Mol Genet Metab* 94: 435-442
31. Lee PJ, Cook P (2006) Frequency of metabolic disorders: more than one needle in the haystack. *Arch Dis Child* 91: 879-880
32. Van den Bergh G (2000) Purine and pyrimidine metabolism between millennia: what has been accomplished: what has to be done? *Adv Exp Med Biol* 486: 1-4
33. Jurecka A, Tylki-Szymańska A, Gradowska W, Stonimska E, Smoleński R, Sykut-Cegielska J (2008) Bardzo rzadki przypadek klasycznej ksantynurii (typ I). *Reumatologia* 46: 95-98
34. Jurecka A, Tylki-Szymańska A (2008) Wrodzona ksantynuria – bardzo rzadka przyczyna hipourykemii oraz kamicy nerkowej. *Urol Pol* 61: 118-121

## Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism

Agnieszka Jurecka<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Gdansk, 24 Kladki St., 80-822 Gdansk, Poland

<sup>2</sup>Department of Metabolic Diseases, Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

✉e-mail: ajurecka@gmail.com

**Key words:** purines; pyrimidines; metabolism; inborn metabolic defects

### ABSTRACT

Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism (P/P) manifest themselves by a variety of clinical picture. They may be recognized at any age and may affect any system – immunological, hematological, neurological, musculoskeletal, and because of the relative insolubility of purine bases, renal as well. At present, a total of 30 defects have been described. Fifteen of them can have serious clinical consequences. Analysis of prevalence estimated by comparing the number of detected P/P patients in Poland and the number of newborns as well as delay of diagnosis, point at insufficient degree of detectability of these defects in our country. It is necessary to improve the education among physicians as well as to popularize screening methods for these defects.

## STRESZCZENIE

**P**eroksosomy, unikalne organelle, których funkcje różnią się zależnie od typu komórki i stopnia rozwoju organizmu, odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie komórkowym. Najważniejsze procesy biochemiczne przebiegające w peroksosomach to  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych, detoksykacja i ochrona przed stresem oksydacyjnym. Ponadto zidentyfikowano mutacje w genach kodujących białka peroksosomalne, które są przyczyną zaburzeń funkcji peroksosomów i stanowią podłoże poważnych chorób metabolicznych. W niniejszym artykule przeglądowym zaprezentowano najważniejsze aspekty dotyczące biogenezy peroksosomów, funkcji oraz skutków zaburzeń tych funkcji dla metabolizmu człowieka.

## WPROWADZENIE

W latach 60. XX wieku Christian de Duve, w nowoodkrytych „mikrociałach” komórkowych zidentyfikował peroksydazę i katalazę, enzymy uczestniczące w wytwarzaniu i usuwaniu  $H_2O_2$ . Badacz nazwał te „mikrociała” peroksosomami. Belgijski uczonec za prace nad charakterystyką tych organelli otrzymał w 1974 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Początkowo peroksosomy postrzegano jako prekursorzy mitochondriów lub lizosomów. Badania prowadzone w ostatnich dwudziestu latach nad mechanizmem tworzenia i funkcjonowania tych organelli odkrywają ich szczególne znaczenie w morfogenezie i rozwoju organizmu, szczególnie na poziomie metabolizmu komórki. Defekty w procesie powstawania peroksosomów powodują postępujące, często śmiertelne choroby wrodzone. Znaczenie peroksosomów dla prawidłowego funkcjonowania i rozwoju organizmu podkreśla zespół objawów klinicznych towarzyszących chorobom z genetycznie uwarunkowanymi defektami zaburzającymi działanie peroksosomalnych szlaków biochemicznych.

## PEROKSYSOMY

Z klasycznych elementów komórki, peroksosomy zostały odkryte najpóźniej. Małe, o średnicy 0,1–1,0 mikrometra, otoczone pojedynczą błoną organelle, po raz pierwszy zostały opisane w 1954 roku [1]. Poznanie ich właściwości następowało stopniowo; dopiero w dwóch ostatnich dekadach ukazało się wiele prac odkrywających ich unikalny charakter. Peroksosomy, podobnie jak inne organelle komórkowe ssaków, poza jądrem i mitochondriami, nie zawierają DNA. Te wszechobecne struktury, występujące we wszystkich komórkach Eukaryota z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów, są miejscem w którym zachodzą liczne procesy biochemiczne. Ich rola fizjologiczna zmienia się zależnie od typu komórki, tkanki, gatunku, stopnia rozwoju, a nawet stanu metabolicznego organizmu. Biochemiczna zmienność jest możliwa dzięki dynamicznym właściwościom błony peroksosomów, dopasowujących się do stanu metabolicznego i fizjologicznego komórki oraz warunków środowiska [2].

Liczba peroksosomów w komórce jest wypadkową kilku różnych procesów, tj. proliferacji peroksosomów, biogenezy *de novo*, dziedziczenia oraz degradacji przez peksosofagi. Najliczniej peroksosomy występują w komórkach wątroby i nerek. W mechanizmie regulującym ich podział i liczbę uczestniczą białka podobne do dynaminy (DLP-1) i Pex11 oraz różne związki chemiczne tzw. proliferatory peroksosomów [3]. Oprócz związków endogennych (m.in. pochodnych kwasów tłuszczowych) do tej grupy należą niektóre leki hipolipidemiczne. Wywołują one proliferację peroksosomów w komórce przez aktywację receptorów jądrowych aktywowanych przez proliferatory peroksosomów (PPAR $\alpha$ ), a także stymulację  $\beta$ -oksydacji. Proliferacja peroksosomów może być również spowodowana wzrostem ekspresji genu kodującego DLP-1, niezależnie od PPAR $\alpha$ .

Teresa J. Stradomska<sup>✉</sup>

Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej,  
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”

<sup>✉</sup>Zakład Biochemii i Medycyny  
Doświadczalnej, Instytut „Pomnik-Centrum  
Zdrowia Dziecka, Al. Dzieci Polskich 20, 04-  
730 Warszawa; tel.: (22) 815 16 38, e-mail:  
jstradomska@op.pl

Artykuł otrzymano 10 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** peroksosomy, choroby zaburzenia biogenezy peroksosomu, deficyt pojedynczego enzymu/białka transportowego, zespół Zellwegera, adrenoleukodystrofia, VLCFA

**Wykaz skrótów:** DPL-1 (ang. *dynamain related protein*) – białko podobne do dynaminy; PMP (ang. *peroxisomal membrane protein*) – białko błonowe peroksosomów; PPAR (ang. *peroxisome proliferator activated receptors*) – receptory aktywowane przez proliferatory peroksosomów; PTS (ang. *peroxisome targeting signal*) – odcinki sygnałowe białek peroksosomalnych; VLCFA (ang. *very long chain fatty acids*) – bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe; DBP (ang. *D-bifunctional protein*) – białko dwufunkcyjne; DHA (ang. *docosahexaenoic acid*) – kwas dokozahexaenowy; RFT (ang. *reactive oxygene species*) – reaktywne formy tlenu; PBD (ang. *peroxisomal biogenesis disorders*) – choroby zaburzenia biogenezy peroksosomów; ZS (ang. *Zellweger Syndrome*) – zespół Zellwegera; X-ALD (ang. *X-linked adrenoleukodystrophy*) – adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X; GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Znamienne jest, że proces ten dotyczy głównie zwierząt laboratoryjnych [4,5].

Od lat 80. XX wieku funkcjonował, opracowany przez Lazarowa i Fujiki, model formowania nowych peroksysomów (ich „wzrostu i podziału”) z istniejących w cytoplazmie preperoksysomów (pochodzenia endosymbiotycznego), po zaopatrzeniu ich w peroksysomalne białka matrycowe i błonowe [6]. Wcześniejsza hipoteza zakładała, uczestnicstwo siateczki śródplazmatycznej (ER) w powstawaniu błony preperoksysomu [7]. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach, m. in. na komórkach dendrytów myszy i drożdżkach, potwierdzają ten właśnie model. Mechanizmy tworzenia peroksysomów należą do najbardziej dyskutowanych obecnie zagadnień naukowych [8-10].

Biogeneza peroksysomów związana jest z białkami zwanymi peroksynami (ang. *peroxines*), sprzężonymi z funkcją genów należących do grupy *PEX*. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano 16 genów *PEX*, natomiast u niżej stojących na drabinie ewolucyjnej organizmach, np. w grzybach, 32 geny *PEX*. Produkty tych genów są niezbędne do powstania i budowy peroksysomów. Proces formowania peroksysomów przebiega trójstopniowo. W pierwszym etapie powstaje błona peroksysomalna, w dalszej kolejności następuje synteza i transport białek błony peroksysomalnej oraz synteza i import białek matrycowych; ostatecznie zachodzi proliferacja peroksysomów [11]. Białka *PEX3*, *PEX16*, *PEX19* są niezbędne dla procesu formowania błony peroksysomalnej oraz lokalizacji białek błonowych (PMP). Zarówno białka błonowe, jak i enzymy peroksysomalne, są syntetyzowane na wolnych rybosomach w cytoplazmie. Białka matrycowe posiadają specjalne odcinki sygnałowe (PTS) z domenami końcowymi C (PTS1) i N (PTS2), kierujące te białka do wnętrza peroksysomu za pomocą krążących w cytoplazmie receptorów. Geny kodujące receptory dla tych białek to odpowiednio *PEX5* i *PEX7*. *PEX5* występuje w dwóch izoformach S i L; forma L może tworzyć kompleks z *PEX7*. Natomiast geny *PEX13* i *PEX14* oraz kompleks domeny RING: *PEX2*, *PEX10*, *PEX12* kontrolują białka dokowania

i translacji błony peroksysomalnej. Dwie ATPazy, *PEX1* i *PEX6*, oraz białko błonowe *PEX26* pośredniczą w recyklingu nośników *PEX5* i *PEX7* do cytoplazmy, po przekazaniu białek matrycowych (Ryc. 1).

Białka matrycowe, w przeważającej większości (powyżej 90%) charakteryzuje obecność domeny PTS1. Mechanizm procesu powstawania i działania peroksysomów wydaje się obejmować również kontrolę jakości i akceptację jako substratów, odpowiednio rozmieszczonych białek [12-14].

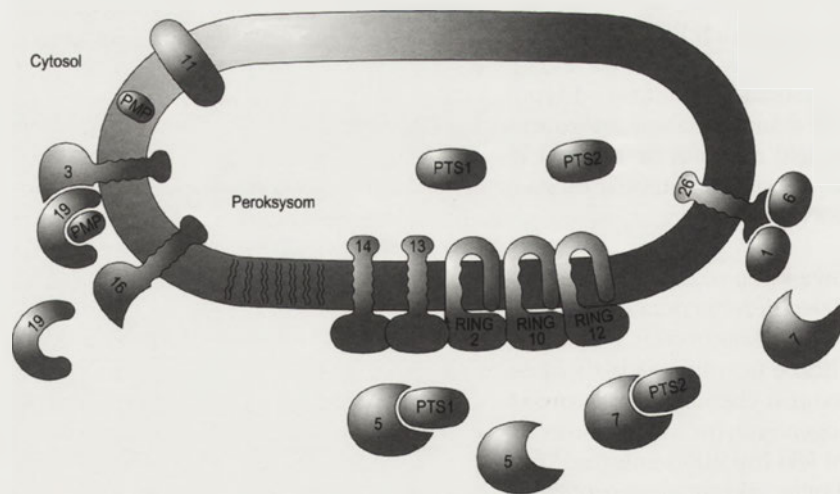
## FUNKCJE METABOLICZNE PEROKSYSOMÓW

W peroksysomach przebiega ponad 50 procesów biochemicznych, zarówno katabolicznych, jak i anabolicznych [15]. Peroksysomy są miejscem biosyntezy cholesterolu, kwasów żółciowych, dolicholu, fosfolipidów (plasmalogenów),  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksydacji nienasyconych i nasyconych kwasów tłuszczowych, szczególnie kwasów o bardzo długim łańcuchu węglowym (VLCFA, ang. *very long chain fatty acids*), 2-hydroksy- i 2-metylo-podstawionych kwasów, prostaglandyn, leukotrienów, katabolizmu D-aminokwasów, poliamin, metabolizmu transaminaz i puryn. Ponadto uczestniczą one również w detoksykacji ksenobiotyków oraz reaktywnych form tlenu [16-19].

### PROCES $\beta$ -OKSYDACJI NASYCONYCH VLCFA

Peroksysomalny proces  $\beta$ -oksydacji nasyconych VLCFA dotyczy kwasów o łańcuchach węglowych C24:0 (kwas tetrakozanowy, lignocerynowy), C26:0 (kwas heksakozanowy, cerotowy) i dłuższych. Wstępny etap utleniania polega na wprowadzeniu cząsteczki VLCFA jako acyloCoA do peroksysomów za pomocą błonowego białka transportującego ALDP, należącego do nadrodziny białkowych transporterów błonowych ABC (ang. *protein ABC transporter superfamily*), zawierających kasetę wiążącą ATP. Białko to kodowane jest przez gen *ABCD1*. Uaktywniona cząsteczka VLCFA uczestniczy w 4 kolejnych reakcjach właściwego procesu utleniania. Są to dehydrogenacja, katalizowana przez oksydazę acetylo-CoA, hydratacja i ponowna dehydrogenacja katalizowane przez enzym dwufunkcyjny (ang. *D-bifunctional protein, DBP*) oraz rozpad tiolityczny z udziałem tiolazy. Peroksysomalny cykl  $\beta$ -oksydacji powoduje cykliczne skracanie łańcucha węglowego o 2 atomy węgla, przez odszczepienie cząsteczki acetylo-CoA [20,21].

System peroksysomalnej  $\beta$ -oksydacji nie jest zdolny do całkowitej degradacji cząsteczki kwasu tłuszczowego. Enzymy peroksysomów charakteryzują się bardzo wysoką aktywnością w stosunku do kwasów o długim łańcuchu węglowym, która zanika w stosunku do ośmiowęglowych i krótszych kwasów tłuszczowych. Produkt  $\beta$ -oksydacji jest eksportowany do cytoplazmy. Całkowitemu utlenieniu do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ , ulega po przejściu do mitochondrium. Zaburzenie procesu  $\beta$ -oksydacji VLCFA na każdym etapie prowa-



Rycina 1. Schematyczny model importu peroksysomalnych białek błonowych i białek macierzy. Objaśnienia w tekście.

dzi do ich kumulacji w komórkach i płynach ustrojowych [22-23].

#### $\alpha$ -OKSYDACJA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Degradacja rozgałęzionych kwasów tłuszczowych z grupą metylową w pozycji C3 przebiega w procesie  $\alpha$ -oksydacji przy współdziałaniu trzech enzymów: hydroksylazy fitanylo-CoA, liazy 2-hydroksyfitanylo-CoA oraz dehydrogenazy pristanalowej. Dalsze utlenianie powstającego związku (2-metylo pochodnej kwasu tłuszczowego) następuje już w procesie  $\beta$ -oksydacji [24].

#### SYNTEZA PLAZMALOGENÓW

Plazmalogeny, to związki lipidowe z podstawioną grupą eterową w pozycji C1 glicerolu. Acylotransferaza dihydroksyacetonofosforanowa i syntaza alkilodihydroksyacetonofosforanowa uczestniczą w ich syntezie były izolowane w peroksysomach i ER. Plazmalogeny stanowią główny składnik fosfolipidów mieliny. Zaburzenie procesu biosyntezy tych związków powoduje zmiany w mielinizacji komórek nerwowych [25].

#### SYNTEZA CHOLESTEROLU

Peroksysomy obok mitochondriów i ER uczestniczą w syntezie cholesterolu. Przekształcenie HMG-CoA (3-hydroksy, 3-metylo glutarylo-CoA) do mewalonianu katalizowane przez reduktazę HMG-CoA przebiega w ER i peroksysomach. Następnym etapem procesu, przekształcenie do difosforanu farnezyli przebiega głównie w peroksysomach [26,27].

#### SYNTEZA NIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Peroksysomy uczestniczą w syntezie kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Substratem w tej reakcji jest kwas linolenowy (C18:3n-3). W procesie następujących po sobie reakcji wydłużania łańcucha i desaturacji powstaje kwas C24:5n-3, desaturowany w mikrosomach do C24:6n-3 i ostatecznie przekształcany w procesie peroksysomalnej  $\beta$ -oksydacji do kwasu dokozaheksaenowego (C22:6n-3) [28]

#### METABOLIZM KWASÓW ŻÓLCIOWYCH

Kwasy 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroksy-5 $\beta$ -cholowy (THCA) i 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ ,-dihydroksy-5 $\beta$ -cholowy (DHCA), prekursorzy kwasów żółciowych cholowego i chenodeoksycholowego są transportowane do peroksysomów, gdzie następuje skracanie bocznego łańcucha węglowego. Aktywowane oksysterole uczestniczą w kolejnych reakcjach katalizowanych najpierw przez racemazę 2-metyloacylo-CoA, a następnie przez kolejne enzymy szlaku peroksysomalnej  $\beta$ -oksydacji [29].

#### DEGRADACJA LEUKOTRIENÓW

Leukotrieny, lipidy związane z układem odpornościowym, pochodne kwasu arachidonowego, ulegają rozkładowi w procesie  $\beta$ -oksydacji z udziałem białka dwufunkcyjnego [18,29].

#### METABOLIZM WIELONIENASYCONYCH DIKARBOKSYLOWYCH DŁUGOŁAŃCUCHOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Peroksysomy, uczestniczą w katabolizmie wielonienasyconych dikarboksylowych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Enzymy  $\beta$ -oksydacji biorą udział w degradacji  $\omega$ -karboksylowych pochodnych kwasu arachidonowego (20-COOH-AA), metabolitu wywołującego rozszerzenie naczyń wieńcowych [30].

#### ODDYCHANIE I STRES OKSYDACYJNY

De Duve i Baudhuin jako pierwsi opisali peroksysomalny proces oddychania, w którym elektrony z różnych cząsteczek chemicznych są usuwane, redukując  $O_2$  do  $H_2O_2$ . Proces ten jest niezależny od ATP i przebiega z wydzielaniem ciepła. Istnieje kilka peroksysomalnych oksydaz katalizujących reakcje, w których powstaje  $H_2O_2$  [31]. Peroksysomy uczestniczą w licznych szlakach metabolicznych wytwarzają, jako produkt uboczny, również anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) oraz jeden z najbardziej agresywnych chemicznie, rodnik hydroksylowy (OH), a także tlenek azotu (NO). Wszystkie te związki, tzw. reaktywne formy tlenu (RFT) charakteryzują się wysoką reaktywnością w stosunku do wielu składników komórkowych o kluczowym znaczeniu biologicznym, w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Uszkodzenia oksydacyjne powstałe wskutek działania RFT na różne biomolekuły prowadzą do zaburzenia funkcjonowania komórki i zależnych od układu redoks szlaków metabolicznych. Peroksysomy grają główną rolę w produkcji  $H_2O_2$ , ale również uczestniczą w inaktywacji zarówno nadtlenu wodoru jak i innych reaktywnych form tlenowych. Aparat peroksysomalny zawiera panel antyoksydacyjnych enzymów, katalazę, peroksydazę glutationu, dysmutazy ponadtlenkowe SOD1 i SOD2, które usuwają RFT [32,33].

Przez długi czas peroksysomy postrzegano przede wszystkim jako organelle autonomiczne, jednakże ostatnie wyniki badań zmuszają do zmiany oceny ich statusu w komórce. Peroksysomy współpracują z mitochondriami i często są miejscem, w którym zachodzi jeden lub kilka etapów ze skomplikowanych, wieloetapowych, metabolicznych procesów komórkowych. Peroksysomy i mitochondria wymieniają się metabolitami pośrednimi, co więcej dzielą się również niektórymi białkami poczynając od czynników podziału (DPL1). Znalezione również identyczne białka z podwójną lokalizacją mitochondrialno-peroksysomalną (racemaza 2-metyloacylo-CoA, liaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA) [34]. Ostatnio wykryto pęcherzykowy szlak transportowy między mitochondriami a peroksysomami, którego znaczenie nie jest dotychczas poznane [35]. Peroksysomy współpracują także z ER i pewne białka wykazują podwójną lokalizację również w tym przypadku. Istnieją dowody sugerujące, że początkowe etapy formowania struktury w biogenezie peroksysomu zachodzą właśnie w ER [36,37].

Funkcje biochemiczne peroksysomów w ponad 60% dotyczą metabolizmu lipidów. Peroksysomy są min. miejscem syntezy kwasu dokozaheksaenowego i plazmalogenów, a

także degradacji VLCFA. Wszystkie te związki mają bezpośredni wpływ na komórki nerwowe. DHA jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania mózgu i siatkówki, a plazmalogeny odgrywają szczególną rolę we wzroście komórek nerwowych oraz stanowią podstawowy składnik mieliny (kompleks o składzie 30% białka, 70% lipidy) [38]. W ostatnich latach stwierdzono silną cytotoksyczną aktywność VLCFA, szczególnie kwasu C26:0 w neuronach, astrocytach i przede wszystkim w oligodendrocytach [39]. Zaburzenie procesu  $\beta$ -oksydacji, jak już wspomniano wyżej, powoduje nagromadzenie się VLCFA w tkankach i płynach ustrojowych.

Zaburzenia funkcji peroksysomów, indukują modyfikacje struktur zawierających związki lipidowe i w dalszej konsekwencji mają szkodliwy wpływ na rozwój i działanie układu nerwowego. Do tej pory opisano 16 chorób będących następstwem nieprawidłowych funkcji peroksysomów, czternaście z tych jednostek chorobowych związanych jest z uszkodzeniem układu nerwowego. Choroby peroksysomalne definiujemy jako grupę genetycznie uwarunkowanych wrodzonych wad metabolicznych, w których anomalie dotyczyć mogą biogenezy peroksysomów lub ich poszczególnych funkcji biochemicznych.

## CHOROBY PEROKSYSOMALNE

Choroby peroksysomalne obejmują trzy grupy defektów: zaburzenia biogenezy peroksysomów (PBD, ang. *peroxisomal biogenesis disorders*), choroby związane z defektem pojedynczego enzymu lub białka transportowego na szlaku peroksysomalnym, oraz inne choroby metaboliczne z współistniejącym defektem peroksysomalnym (Tab. 1) [40,41].

### CHOROBY POLEGAJĄCE NA ZABURZENIU BIOGENEZY PEROKSYSOMÓW

Częstość występowania chorób polegających na zaburzeniu biogenezy peroksysomów szacuje się na 1:50 000 (USA)

– 1:500 000 (Japonia, Polska) [42]. Obraz kliniczny chorych manifestuje się szerokim spektrum fenotypów. Najcięższą postacią jest zespół mózgowo-wątrobowo-nerkowy, opisany przez Zellwegera w 1964 i nazwany jego imieniem [43]. Charakteryzuje się dysmorfia twarzoczaszki, hepatomegalią, głębokim upośledzeniem psychoruchowym, zaburzeniami rozwojowymi i dysmielinozą ośrodkowego układu nerwowego oraz zaburzeniami obwodowego układu nerwowo-mięśniowego. U noworodków obserwuje się hipotonię, drgawki, trudności z przyjmowaniem pokarmów, zaćmę, retinopatię. Stwierdza się także nieprawidłowości w zapisie EEG oraz przewodnictwie potencjałów prągowych i somatosensorycznych. Zgon następuje najczęściej przed upływem pierwszego roku życia. Symptomatologia noworodkowej adrenoleukodystrofii (NALD) czy postaci niemowlęcej choroby Refsuma (IRD) przypomina zespół Zellwegera jednak o łagodniejszym przebiegu i dłuższym okresie przeżycia. Natomiast chondrodystrofia rizomeliczna charakteryzuje się przede wszystkim dysmorfia oraz zaburzeniem kostnienia, skróceniem proksymalnych części kończyn i zaćmą [44,45].

### DEFICYT POJEDYNCZEGO BIAŁKA LUB ENZYMU NA SZLAKU PEROKSYSOMALNYM

Do drugiej grupy chorób peroksysomalnych zaliczane są choroby spowodowane mutacją dotyczącą pojedynczego enzymu lub białka transportującego. Dotychczas zidentyfikowano 10 defektów na szlaku  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, biosyntezy fosfolipidów, metabolizmu nadtlenu wodoru, syntezy kwasów żółciowych. Są to min. adrenoleukodystrofia (ang. *adrenoleukodystrophy*), defekt białka dwufunkcyjnego (ang. *D-bifunctional protein deficiency*), klasyczna postać choroby Refsuma, chondrodystrofia rizomeliczna typu II i III, akatalazemia, hyperoksaluria i deficyt białka X nośnika grupy sterolowej.

Tabela 1. Choroby peroksysomalne.

Grupa	Nazwa grupy	Lokalizacja defektu	Nazwa choroby
1	choroby zaburzenia biogenezy peroksysomu	biogeneza peroksysomów	zespół Zellwegera neonatalna adrenoleukodystrofia niemowlęca postać choroby Refsuma chondrodystrofia rizomeliczna
2	deficyt pojedynczego enzymu/białka transportowego	$\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych	adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X deficyt oksydazy acylo CoA deficyt białka dwufunkcyjnego deficyt białka X nośnika grupy sterolowej deficyt racemazy 2-metyloacylo-CoA
		$\alpha$ -oksydacja kwasów tłuszczowych	deficyt hydroksylazy fitanoylo-CoA (choroba Refsuma)
		biosynteza eterofosfolipidu	deficyt acyltransferazy dihydroksyacetonu fosforanowej (RCDP typ II) deficyt syntazy alkyloldihydroksyacetonofosforanowej (RCDP typ III)
		metabolizm nadtlenu wodoru	deficyt katalazy (akatalazemia)
		detoksyfikacja glioksyłanu	deficyt aminotransferazy alaninoglioksalanowej (hyperoksaluria typu I)
3	inne choroby metaboliczne z równoległym występującym defektem peroksysomalnym		zespół ciągłego genu letalny defekt mitochondrialno-peroksysomalny

**Tabela 2.** Biochemiczne markery peroksysomalne w diagnostyce chorób zaburzenia biogenezy peroksysomów (PBD). Grupa 1.

Choroba peroksysomalna	VLCFA	Kwas fitanowy	Kwas pristanowy	Plazmalogen	DHCA/THCA	Geny
ZS	↑↑	N	N	↓↓	↑↑	PEX1,2,3, 5,6,10,12,
NALD/IRD	↑	↑	↑	↓-N	↑	13, 14, 16, 19, 26
RCDP I	N	N-↑	N	↓↓	N	PEX 7

ZS – Zespół Zellwegera; NALD- neonatalna adrenoleukodystrofia; IRD – neonatalna postać choroby Refsuma; RCDP I – chondrodystrofia rizmeliczna typ I; VLCFA – kwasy tłuszczowe o bardzo długim łańcuchu; DHCA/THCA – metabolity kwasów żółciowych; N – poziomy normalne; ↑ – poziomy podwyższone; ↓ – poziomy obniżone; \*poziomy zależne od diety. Według [44], zmodyfikowano.

Adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X (X-ALD) jest najczęściej występującą chorobą peroksysomalną. Częstość występowania X-ALD dla hemi- i heterozygot szacuje się na 1:20000 (USA), w Polsce proporcja ta wynosi 1:33000 urodzeń [42,46]. Jest to ciężka, postępująca choroba demielinizacyjna ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, uszkadzająca również funkcję nadnerczy. Choroba uwarunkowana jest mutacją w genie *ABCD1* zlokalizowanym na Xq28 kodującym peroksysomalne transportowe białko błonowe ALD. Defekt transportu zaburza degradację VLCFA w procesie β-oksydacji [47]. Szczegółowy patomechanizm choroby nie jest znany. Uważa się jednak, że kumulowane VLCFA uszkadzają proces acylacji gangliozydów i fosfolipidów, co z kolei wywołuje reakcję odpornościową makrofagów i astrocytów [48]. Dotychczas opisano 7 fenotypów różniących się wiekiem pacjenta w chwili wystąpienia pierwszych objawów, ich rodzajem i stopniem nasilenia. Najcięższe z nich to postaci mózgowe: dziecięca, młodzieńcza i dorosłych. Pierwsze objawy w postaci dziecięcej (trudności w koncentracji, zaburzenia wzroku, mowy, napady padaczkowe) pojawiają się między 4 a 10 rokiem życia, po okresie normalnego rozwoju. Najłagodniejszy przebieg ma adrenomieloneuropatia (AMN) z odrębną lokalizacją zmian leukodystroficznych, ujawniająca się dopiero w trzeciej dekadzie życia lub później. Występują również odmiany choroby z izolowanym zajęciem nadnerczy [22,47]. Niektórzy autorzy proponują podział na dwa zasadnicze fenotypy: postać demielinizacyjną mózgową, oraz adrenomieloneuropatię ujawniającą się również u ok. 50% heterozygot po 40 roku życia. W obrębie tej samej rodziny mogą występować różne fenotypy choroby [49,50].

Neuroobrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) uwidacznia u chorych zmiany demielinizacyjne w ośrodkowym układzie nerwowym, których lokalizacja pozwala na określenie stopnia rozwoju choroby [51].

Pacjenci z deficytem oksydazy acylo-CoA wykazują upośledzenie rozwoju psychoruchowego, umiarkowaną hipotonię i częste, lekooporne napady padaczkowe zaczynające się między 2 a 4 miesiącem życia, jednakże łagodniejsze w porównaniu do występujących w deficycie białka dwufunkcyjnego (DBP). Zaburzenie struktury istoty białej charakteryzuje wszystkich pacjentów, natomiast cechy dysmorficzne obserwuje się u około połowy chorych. W większości przypadków, dzieci osiągają pewien etap rozwoju, ale w okresie od 4 miesiąca do 3,5 lat życia pacjenta, następuje regres choroby; czas przeżycia chorych jest też dłuższy niż w DBP [52].

Szczególne miejsce w grupie II zajmuje defekt białka dwufunkcyjnego (DBP). Podwójna rola jaką w oksydacji VLCFA spełnia DBP warunkuje trzy typy choroby. Typ I charakteryzuje się niedoborem hydratazy i dehydrogenazy spowodowany brakiem białka DBP, typ II jest izolowanym niedoborem hydratazy, zaś typ III – izolowanym niedoborem dehydrogenazy. Obraz kliniczny choroby przypomina zespoły z PBD. Wszyscy pacjenci prezentują hipotonię w okresie noworodkowym, a napady padaczkowe pojawiają się bardzo wcześnie, już w pierwszym miesiącu życia. Około 70% dzieci ma dysmorfie przypominającą zespół Zellwegera. Wykazano, że nasilenie objawów choroby koreluje z poziomem aktywności resztkowej enzymu DBP, a średnia długość przeżycia chorych zależy od typu choroby i waha się od 7 miesięcy do około 1,5 roku [53-55].

**Tabela 3.** Biochemiczne markery peroksysomalne w diagnostyce chorób zaburzenia pojedynczego enzymu/białka transportu. Grupa 2.

Choroba peroksysomalna	VLCFA	Kwas fitanowy	Kwas pristanowy	DHCA/THCA	Gen
X-ALD	↑	N	N	N	<i>ABCD1</i>
ACOX1	↑	N	N	N	<i>ACOX1</i>
DBP	↑	↑	↑	↑	<i>17HSD4</i>
SCPx	N	↑*	↑*	↑	<i>SCP2</i>
AMACR	N	↑*	↑*	↑	<i>AMACR</i>
RCDP II	N	N-↑*	N	↓↓	<i>GNPAT</i>
RCDP III	N	N-↑*	N	↓↓	<i>AGPS</i>
Hyperoksaluria	N	N	N	N	<i>AGXT</i>
Alkatalazemia	N	N	N	N	<i>CAT</i>

X-ALD – adrenoleukodystrofia; ACOX1 – deficyt oksydazy acylo CoA; DBP – deficyt białka dwufunkcyjnego; SCPx – deficyt białka X nośnika grupy sterolowej; AMACR – deficyt racemazy 2-metyloacylo-CoA; RCDP II – deficyt acylotransferazy dihydroksyacetono fosforanowej; RCDP III – deficyt syntazy alkilodihydroksyacetono fosforanowej; VLCFA – bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe; DHCA/THCA – metabolity kwasów żółciowych; N – poziomy normalne; ↑ – poziomy podwyższone; ↓ – poziomy obniżone; \*poziomy zależne od diety. Według Wanders i Waterham [55], zmodyfikowano.

Dwie kolejne choroby z tej grupy to deficyt białka X nośnika grupy sterolowej (SCPx, ang. *sterol carrier protein*) i deficyt racemazy 2-metyloacylo-CoA (AMACR, ang. *a-methylacyl-CoA racemase deficiency*) występują niezmiernie rzadko. Obie choroby charakteryzują symptomy neurologiczne, obniżenie napięcia mięśniowego, a także neuropatia czuciowo-ruchowa z objawami ze strony układu piramidowego [56-58].

Choroba Refsuma, objawia się w późnym dzieciństwie pogorszeniem nocnego widzenia, postępującą retinopatią barwnikową oraz utratą powonienia. U chorych może wystąpić również neuropatia, głuchota, ataksja, a nawet zaburzenia psychiczne.

Pacjenci dotknięci chondrodysrofią rizomeliczną typu II (deficyt acylotransferazy dihydroksyacetanofosforanowej, RCDP typ II) i typu III (deficyt syntazy alkyloldihydroksyacetanofosforanowej, RCDP typ III) mają objawy podobne jak w chondrodystrofii rizomelicznej typu I w stopniu bardziej umiarkowanym [55,59].

Hyperoksaluria typu I jest zespołem chorobowym klinicznie bardzo zróżnicowanym zarówno pod względem objawów jak i czasu ich rozwoju. Na ogół objawy pojawiają się po 5 roku życia, ale choroba może się ujawnić nawet w szóstej dekadzie. Najcięższa, neonatalna postać hiperoksalurii typu I (PH1) charakteryzuje się postępującą oksalozą, poważnym uszkodzeniem nerek i wczesnym zgonem.

#### CHOROBY METABOLICZNE, KTÓRYM TOWARZYSZY DEFECT PEROKSYSOMALNY

Zespół CADDs (ang. *contiguous ABCD1 and DXS1357E deletion syndrome*) związany jest z defektem w obrębie genu *ABCD1* (podobnie jak w X-ALD) i jednocześnie genu *DXS1357E* zlokalizowanych na chromosomie X (Xq28). Choroba od urodzenia manifestuje się znaczną wiotkością, głębokim upośledzeniem psychoruchowym dziecka, cholestatą i ogólnym ciężkim przebiegiem [60].

Letalny defekt peroksysomalno-mitochondrialny to zespół, w którym zaburzenie funkcji biochemicznych dotyczy obu tych organelli. Dziecko rodzi się z mikrocefalią niedorozwojem mózgu, atrofią oczu i hypoplasią. Badania biochemiczne wykazują uporczywą kwasicę mleczanową, oraz umiarkowanie podwyższony poziom VLCFA. Znalaziono mutację dominującą negatywną w genie kodującym białko podobne do dynaminy (*DLP1*) [61].

#### DIAGNOSTYKA CHORÓB PEROKSYSOMALNYCH

Diagnostyka biochemiczna chorób peroksysomalnych opiera się na ocenie zawartości biomolekuł, które są substratami lub produktami w procesach biochemicznych związanych z funkcjami peroksysomu. Zaburzenie szlaków metabolicznych umiejscowionych w peroksysomach prowadzi do niedoboru związków syntetyzowanych oraz/lub nagromadzenia związków katabolizowanych w płynach ustrojowych i w tkankach. Markery biochemiczne stosowane w diagnostyce chorób peroksysomalnych przedstawiono w tabelach 2 i 3.

Podstawowym badaniem w diagnostyce chorób peroksysomalnych jest oznaczanie poziomów VLCFA w osoczu lub surowicy, pozwalające ocenić stopień zaburzenia procesu  $\beta$ -oksydacji. Analiza wykonywana jest głównie metodą GC lub GC/MS. Parametr ten jest wysoce specyficzny. Pozostałe funkcje biochemiczne peroksysomów, których ocena jest szczególnie ważna w procesie diagnostycznym to: biosynteza fosfolipidów,  $\alpha$ -oksydacja oraz detoksykacja glioksalanu.

Wykrywanie i oznaczanie stężeń głównych metabolitów tych szlaków dopełniają ocenę statusu biochemicznego peroksysomów (Tab. 2, 3). Poziomy VLCFA w grupie chorych z PBD różnią się między sobą [42] ale szczegółowa diagnoza chorób grupy I wymaga zastosowania metod biologii molekularnej.

Najcięższe postaci spektrum zespołu Zellwegera związane są z mutacjami w genach *PEX 3, 16, 19* odpowiadającymi za kodowanie peroksysomalnych białek błonowych, stanowią poniżej 3% przypadków. Podobnie rzadko identyfikowane są mutacje w genach *PEX 13, 14*, które obejmują miejsca dokowania w błonie, kompleksu białko-receptor. Ponad 85%, zmian w genomie, dotyczy genów *PEX 1, 6, 26* uczestniczących w recyklingu receptorów dla białek macierzy. Z tego, aż 70% stanowią zmiany znalezione w genie kodującym AT-Pazę *PEX1* (7q21-q22), głównie związane z allelami 1700fs i G843D. Mutacje w genach *PEX 2, 10, 12*, odpowiedzialnych za translokację białek macierzy, występują u około 10% chorych. Identyfikowane były zarówno w ciężkich postaciach zespołu Zellwegera jak i noworodkowej adrenoleukodystrofii oraz niemowlęcej postaci choroby Refsuma.

Zmiany w genie *PEX 7*, stanowiące podłoże chondrodystrofii rizomelicznej, z częstotliwością 50% dotyczą allelu L292X (Nt875TDA) [44]. Identyfikacja mutacji jest stosunkowo najmniej skomplikowana tylko w chondrodystrofii rizomelicznej, gdzie występuje ona z dużą częstotliwością. Bardziej złożona sytuacja jest w fenotypie zespołu Zellwegera. Zmiany w genomie leżące u podstaw tej patologii to głównie tzw. mutacje prywatne.

W adrenoleukodystrofii sprzężonej z chromosomem X i defekcie białka dwufunkcyjnego, najczęściej występujących chorobach grupy II, analiza molekularna wykazuje podobnie liczne, różnorodne mutacje bardzo często prywatne. Dotychczas w genie *ABCD1*, warunkującym defekt X-ALD zidentyfikowano ponad 1000 mutacji, z czego, aż ponad 500 unikatowych. Podobnie jak w innych chorobach związanych z chromosomem X nie udaje się wykazać korelacji genotyp – fenotyp [50].

Zespół Zellwegera był pierwszą chorobą, której patomechanizm powiązano z peroksysomami. Goldfisher w 1973 roku [62] wykazał brak peroksysomów w hepatocytach i komórkach kanalików nerkowych u chorego z dysmorfia, hepatomegalią, upośledzeniem psychoruchowym i uogólnioną hipotonią. To spostrzeżenie zapoczątkowało badania nad peroksysomami u chorych wykazujących cechy dysmorficzne i/lub określone objawy neurologiczne, hepatologiczne czy psychoruchowe. Trzeba zauważyć, że autor w tej pierwszej pracy opisał nie tylko defekt peroksysomalny, ale też zmiany w mitochondriach. Następne badania koncentrowały się głównie na defekcie peroksysomalnym. Interesujące, że ostatnio opisany przez Waterham'a i wsp. letalny defekt DPL-1 dotyczy zmian morfologicznych zarówno w peroksysomach jak i mitochondriach [34].

#### UWAGI KOŃCOWE

Obserwowany w ostatnich latach, szybki rozwój wyspecjalistycznych technik analizy instrumentalnej oraz



zastosowanie nowych metod w badaniach genetycznie uwarunkowanych wad metabolicznych, stwarza możliwość wykrycia nowych defektów peroksysomalnych, ale przede wszystkim, szczegółowego poznania patomechanizmu chorób już znanych, co być może przyczyni się do opracowania skutecznych metod ich leczenia. Postępowanie terapeutyczne stosowane obecnie w chorobach peroksysomalnych nie daje zadowalających efektów klinicznych, z wyjątkiem choroby Refsuma i hyperoksalurii, gdzie sprawdza się stosowanie diety eliminacyjnej.

## PIŚMIENNICTWO

- Rhodin J (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. PhD-thesis, Aktiebolaget Godvil, Stockholm
- Platta HW, Erdmann R (2007) Peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett* 581: 2811-2819
- Thoms S, Erdmann R (2005) Dynamine-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J* 272: 5169-5181
- Gonzalez FJ, Peters JM, Cattle RC (1998) Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst* 90: 1702-1709
- Zhang X, Tanaka N, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ, Aoyama T (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent peroxisome proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1307-1311
- Lazarow PB, Fujiki Y (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev Cell Biol* 1: 489-530
- Novikoff PM, Novikoff AB (1972) Peroxisome in absorptive cells of mammalian small intestine. *J Cell Biol* 53: 532-560
- Geuze HJ, Murk JL, Stroobants AK, Griffith JM, Kleijmeer MJ, Koster AJ, Verkleij AJ, Distel B, Tabak HF (2003) Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 4: 2900-2907
- Kunau WH (2005) Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Curr Biol* 15: R774-R776
- Titorenko VI, Rachubinski RA (2009) Spatiotemporal dynamics of the ER-derived peroxisomal endomembrane system. *Int Rev Cell Mol Biol* 272: 191-244
- Thoms S, Erdmann R (2006) Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1620-1628
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2001) Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 153: 1141-1150
- Subramani S, Koller A, Snyder WB (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* 69: 399-418
- Grou CP, Carvalho AF, Pinto MF, Alencastre IS, Rodrigues TA, Freitas MO, Francisco T, Sa-Miranda C, Azevedo JE (2009) The peroxisomal protein import machinery – a case report of transient ubiquitination with a new flavor. *Cell Mol Life Sci* 66: 254-262
- van der Bosch H, Schudgens RB, Wanders RJA, Tager JM (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Ann Rev Biochem* 61: 157-197
- Purdue PE, Lazarow PB (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 701-752
- Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CW, Wanders RJ, Dacremont G (2004) Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *J Lipid Res* 45: 1104-1111
- Ferdinandusse S, Meissner T, Wanders RA, Mayatepek E (2002) Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 269-273
- Schrader M, Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1755-1766
- Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ (2002) Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 64: 477-502
- Wanders RJA, Waterham HR (2004) Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Gene* 67: 107-133
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Barth PD (2001) X-linked adrenoleukodystrophy. W: Scriver CR, Beaudet AL (red) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, str. 3257-3301
- Reddy JK, Hashimoto T (2001) Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21: 193-230
- Wierzbicki AS (2007) Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans* 35: 881-886
- Brites P, Waterham HR, Wanders RJA (2004) Functions and biosynthesis of plasmalogenes in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1636: 219-231
- Olivier LM, Kovacs W, Masuda K, Keller GA, Krisans SK (2000) Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes: AA-CoA thiolase, HMG-CoA synthase, MPPD, and PFP synthase. *J Lipid Res* 41: 1921-1935
- Kovacs WJ, Tape KN, Shackelford JE, Duan X, Kasumov T, Kelleher JK, Brunengraber H, Krisans SK (2007) Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochem Cell Biol* 127: 273-290
- Su HM, Moser AB, Moser HW, Watkins PA (2001) Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis. *J Biol Chem* 276: 38115-38120
- Schrader M, Fahimi HD (2008) The peroxisomes: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 129: 421-440
- Nguyen SD, Baes M, Van Veldhoven (2008) Degradation of very long-chain dicarboxylic polyunsaturated fatty acids in mouse hepatocytes, a peroxisomal process. *Biochim Biophys Acta* 1781: 400-405
- De Duve C, Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46: 323-357
- Schrader M, Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1755-1766
- Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim YM, Simmons RL, Watkins SC (2002) Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology* 36: 81-93
- Thoms S, Grönberg S, Gärtner J (2009) Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends Mol Med* 15: 293-302
- Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA, McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 18: 102-108
- Ashibe B, Hirai T, Higashi K, Sekimizu K, Motojima K (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *J Biol Chem* 282: 20763-20773
- Raychaudhuri S, Prinz WA (2008) Nonvesicular phospholipids transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15785-15790
- Harauz G, Ishiyama N, Hill C, Bates IR, Libich DS, Fare's C (2004) Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* 35: 503-542
- Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* 17: 1750-1761
- Shimozawa N (2007) Molecular and clinical aspects of peroxisomal diseases. *J Inher Metab Dis* 30: 193-197
- Stradowska TJ (2010) Choroby peroksysomalne. *Pediatr Pol* 85:148-155

42. Stradomska TJ, Tylki-Szymańska A (2009) Serum very-long-chain fatty acids levels determined by gas chromatography in the diagnosis of peroxisomal disorders in Poland. *Folia Neuropathol* 47: 306-313
43. Zellweger H, Maertens P, Superneau D, Wertelecki W (1988) History of the cerebrohepato-renal syndrome of Zellweger and other peroxisomal disorders. *South Med J* 81: 357-364
44. Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV, Brawerman NE, Moser AB, Moser HW (2006) Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1733-1748
45. Bams-Mengerink AM, Majoie CB, Duran M, Wanders RA, Van Hove J, Scheurer CD, Barth PG, Poll-The BT (2006) MRI of the brain and cervical spinal cord in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Neurology* 66: 798-803
46. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE, Moser HW (2001) Adrenoleukodystrophy: Incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* 49: 512-517
47. Berger J, Gartner J (2006) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1721-1732
48. Hudspeth MP, Raymond GV (2007) Immunopathogenesis of adrenoleukodystrophy: current understanding. *J Neuroimmunology* 182: 5-12
49. Moser HW, Dubey P, Fatemi A (2004) Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol* 17: 263-269
50. Aubourg P (2007) X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Endocrinol* 68: 403-411
51. Loes DJ, Fatemi A, Melhem ER, Gupte N, Bezman L, Moser HW, Raymond GV (2003) Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 61: 369-374
52. Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM, Koster J, van Roermund CW, IJlst L, Moser AB, Wanders RJA, Waterham HR (2007) Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mutat* 28: 904-912
53. Ferdinandusse S, Ylianttila MS, Gloerich J, Koski MK, Ostheim W, Waterham HR, Hiltunen JK, Wanders RJ, Glumoff T (2006) Multinational spectrum of D-bifunctional protein deficiency and structure-based genotype-phenotype analysis. *Am J Hum Gene* 78: 112-124
54. Paprocka J, Jamroz E, Adamek D, Stradomska TJ, Gluszkiewicz E, Grzybowska-Chlebowczyk U, Marszał E (2007) Clinical and neuropathological picture of familial encephalopathy with bifunctional protein deficiency. *Folia Neuropathol* 45: 213-219
55. Wanders RJA, Waterham HR (2006) Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1707-1720
56. Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, Reith W, Haas D, Wanders RA, Duran M, Marziniak M (2006) Mutations in the gene encoding peroxisomal sterol carrier protein X (SCPx) cause leukoencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 78: 1046-1052
57. Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT, McLean BN, Brown AY, Vreken P, Waterham HR, Wanders RJA (2000) Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet* 24: 188-191
58. Clarke CE, Alger S, Preece MA, Burdon MA, Chavda S, Denis S, Ferdinandusse S, Wanders RA (2004) Tremor and deep white matter changes in alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency. *Neurology* 63: 188-189
59. Wanders RJA, Dekker C, Horvath VA, Schutgens RBH, Tager JM, Van Laer P (1994) Human alkylidihydroxyacetonephosphate synthase deficiency: a new peroxisomal disorder. *J Inher Metab Dis* 17: 315-318
60. Corzo D, Gibson W, Johnson, Mitchell G, LePage G, Cox GF, Casey R, Zeiss C, Tyson H, Cutting GR, Raymond GV, Smith KD, Watkins PA, Moser AB, Moser HW, Steinberg SJ (2002) Contiguous deletion of the X-linked adrenoleukodystrophy gene (*ABCD1*) and *DXS1357E*: a novel neonatal phenotype similar to peroxisomal biogenesis disorders. *Am J Hum Genet* 70: 1520-1531
61. Waterham HR, Koster J, van Roermund CVT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fusion. *N Engl J Med* 356: 1736-1741
62. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gartner LM (1973) Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 182: 62-64

## Peroxisomes – functions and disturbances in human metabolism

Teresa J. Stradomska 

Department of Biochemistry and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-736 Warsaw, Poland

 e-mail: jstradomska@op.pl

**Key words:** peroxisomes, peroxisomal biogenesis disorders, single peroxisomal enzyme/ transporter deficiency, Zellweger syndrome, adrenoleukodystrophy, VLCFA

### ABSTRACT

Peroxisomes, classical compartments of eucaryotic cells have significant functions in cellular metabolism, which  $\beta$ -oxidation fatty acids and detoxification of  $H_2O_2$  are the most important biochemical process. Defects in genes encoding for peroxisomal proteins result in biochemical malfunctioning of these organelles and constitute base for severe human's inherited diseases. This article presents the most important aspects concerning peroxisomal biogenesis, biochemical functions and their disturbance.

# Cukrzyca wyzwaniem dla medycyny XXI wieku – wnioski z badań klinicznych i biochemicznych

## STRESZCZENIE

Zmiany w stylu życia populacji ludzkich spowodowały na świecie epidemię cukrzycy, choroba, która znacząco obniża jakość życia osób na nią cierpiących oraz jest przyczyną licznych zgonów. Większość z nich jest spowodowana powikłaniami w późniejszym stadium choroby, takimi jak zawał serca i udar. Długoterminowe badania kliniczne pozwoliły określić, że za powikłania oraz postęp choroby odpowiada toksyczne działanie glukozy i lipidów, oraz podkreśliły rolę hiperglikemii poposiłkowej jako ważnego mechanizmu patogennego. Badania kliniczne w ostatnich latach koncentrowały się na możliwości zahamowania progresji stanu przedcukrzycowego do pełnoobjawowej cukrzycy, która jest końcowym etapem rozpoczętej wiele lat wcześniej choroby. Badania biochemiczne dostarczyły wielu odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczne działanie wysokich stężeń glukozy oraz lipidów i wskazały na mitochondria jako miejsce zbiegania się patologicznych szlaków przemian. Skuteczna walka z cukrzycą wymaga wcześniejszego wykrycia nieprawidłowości w metabolizmie, zaostrzenia kryteriów definiowania zaburzenia oraz wcześniejszej interwencji. Pozyteczne byłoby również pojawienie się leków poprawiających i osłaniających funkcję mitochondriów.

## WPROWADZENIE – CUKRZYCA JAKO CHOROBA METABOLICZNA

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną, którą cechuje podniesiony poziom glukozy we krwi oraz powikłania w obrębie dużych i małych naczyń krwionośnych, zwane odpowiednio – mikro- i makroangiopatiami. Powodują one obniżenie jakości życia osób cierpiących na cukrzycę, wzrost zachorowalności na inne choroby, inwalidztwo oraz śmierć [1,2]. Rozróżnia się dwa główne rodzaje cukrzycy, typ 1 i typ 2. W cukrzycy typu 1, komórki  $\beta$ -trzustki są uszkodzone, co sprawia, że chory nie produkuje własnej insuliny i jego przeżycie zależy od podawania hormonu z zewnątrz. W cukrzycy typu 2 insulina jest wprawdzie wytwarzana w komórkach trzustki, ale tkanki organizmu cechuje zmniejszona wrażliwość na ten hormon, a ich odpowiedź przypomina tę, która miałaby miejsce przy zbyt niskim poziomie tego hormonu. Osłabioną odpowiedź tkanek docelowych na insulinę nazywamy insulinooportnością [1,3,4].

Podstawową funkcją insuliny jest regulacja metabolizmu energetycznego organizmu, tak by dostosować zużycie substratów energetycznych do ich podaży oraz zapewnić wytwarzanie odpowiednich zapasów pozwalających przetrwać okresy głodzenia. Różne tkanki i narządy człowieka mają niejednakowe preferencje co do wykorzystywania substratów energetycznych, ale z punktu widzenia całego organizmu pozycja glukozy w metabolizmie energetycznym jest wyjątkowa. W nieprzystosowanym do głodzenia organizmie ssaka glukoza jest jedynym substratem energetycznym wykorzystywanym przez mózg oraz jedynym, który mogą wykorzystywać krwinki czerwone (ze względu na brak mitochondriów) [5]. Glukoza jest wreszcie substratem najszybciej dostarczającym energię w mięśniach wykonujących wytężoną pracę. Spadek stężenia glukozy w osoczu poniżej prawidłowych wartości, tzw. hipoglikemia, może powodować utratę przytomności, (przy stężeniu glukozy poniżej 40 mg na 100 ml krwi), uszkodzenie mózgu (stężenie poniżej 10 mg na 100 ml krwi), a w końcu śmierć. U osób zdrowych wykorzystywanie glukozy jest tak dobrze zbilansowane z jej dostarczaniem, że poziom cukru we krwi waha się tylko w wąskich granicach, osiągając najwyższe wartości po posiłku, a najniższe na czczo. Glukoza pobierana i wykorzystywana przez tkanki jest zastępowana glukozą dostarczaną w pożywieniu, uwalnianą z zapasów (glikogen w wątrobie) lub syntezowaną na nowo z innych substratów, głównie aminokwasów w wątrobie i korze nerek. Głównym hormonem odpowiedzialnym za regulację stężenia glukozy we krwi, jej uwalnianie z magazynów, odkładanie w postaci glikogenu oraz wytwarzanie z innych substratów, jest insulina. Jej obecność sprawia, że przy dużej podaży glukozy, następuje jej szybki pobór przez tkanki obwodowe, magazynowanie oraz wyłączenie produkcji glukozy w wątrobie i korze nerek [3,4].

Adam K. Jagielski<sup>✉</sup>

Aneta Piesiewicz

Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, Warszawa

<sup>✉</sup>Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 554 32 08, e-mail: xleigaj@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 11 kwietnia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 9 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** cukrzyca, glukotoksyczność, lipotoksyczność, insulinooportność

Na czczo glukoza jest wykorzystywana głównie przez komórki najsilniej od niej zależne, w których jej pobieranie nie zależy od insuliny, takie jak neurony i erytrocyty. Natomiast hepatocyty i, w mniejszym stopniu, komórki kanalików nerkowych kory nerki, uwalniają glukozę do krwiobiegu, co zapobiega spadkowi jej stężenia. Po posiłku, kiedy stężenie glukozy wzrasta, komórki  $\beta$ -trzustki wydzielają insulinę, która sprawia, że tkanki zależne od insuliny, głównie mięśnie i tkanka tłuszczowa, pobierają glukozę ze krwi i odkładają zapasy substratów energetycznych, a wątroba przestaje uwalniać glukozę i zaczyna ją magazynować w postaci glikogenu. W ten sposób stężenie glukozy powraca do wartości z okresu poprzedzającego posiłek [3]. Cukrzycę cechuje zaburzenie tego mechanizmu regulacyjnego, spowodowane zbyt słabą reakcją tkanek na obecność insuliny, niedostateczną ilością tego hormonu albo kombinacją obu tych czynników [3,4]. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia pobierania glukozy przez liczne tkanki, w tym mięśnie oraz tkankę tłuszczową, co powoduje wzrost stężenia cukru we krwi. Wątroba, zamiast magazynować glukozę w postaci glikogenu, wraz z korą nerek produkuje ją i uwalnia do krwiobiegu przyczyniając się do jeszcze silniejszego zwiększenia stężenia tego cukru. Wysokie stężenie glukozy we krwi powoduje, że po przekroczeniu zdolności reabsorpcyjnych kanalików nerkowych, cukier przedostaje się do moczu wraz z wodą, która podąża za cukrem w celu wyrównania ciśnienia osmotycznego, w następstwie czego dochodzi do postępującego odwodnienia organizmu. Ponadto, zaburzenie zależnego od insuliny pobierania glukozy przez tkanki (za pośrednictwem transporterów glukozy GLUT4) powoduje głód energetyczny w komórkach i stymulację wykorzystania kwasów tłuszczowych oraz białek jako substratów, a w konsekwencji uwalnianie dużych ilości ciał ketonowych do krwi. To właśnie wysokie stężenia glukozy i ciał ketonowych wraz z postępującym odwodnieniem odpowiadają za rozwój powikłań ostrych w cukrzycy: śpiączki hiperosmotycznej w cukrzycy typu 2 i kwasicy ketonowej w cukrzycy typu 1 [6]. Nie będą one omawiane szerzej w tym tekście.

## EPIDEMIA CUKRZYCY I JEJ KONSEKWENCJE DLA ZDROWIA POPULACJI

W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci obserwujemy prawdziwą eksplozję liczby zachorowań na cukrzycę. Wielu specjalistów uważa, że walka z cukrzycą jest jednym z głównych zadań medycyny w XXI wieku. Ze względu na szybki wzrost liczby zachorowań usprawiedliwione jest stosowanie terminu „epidemia” w odniesieniu do cukrzycy, mimo iż nie jest to choroba zakaźna. Uważa się, że za gwałtowny wzrost liczby zachorowań odpowiada zmiana stylu życia ludzi na całym świecie, związana głównie ze spadkiem aktywności fizycznej i niewłaściwą, bogatą energetycznie dietą [7]. Obecnie 68% obywateli USA klasyfikuje się jako osoby otyłe lub mające nadwagę [8]. Według danych WHO na cukrzycę choruje ponad 220 milionów ludzi. W 2004 roku cukrzyca była przyczyną 3,4 milionów zgonów i liczba corocznych, powodowanych przez cukrzycę zgonów ma ulec podwojeniu do roku 2030 [9]. Epidemia cukrzycy jest kosztowna zarówno dla jednostek jak i dla systemów opieki medycznej w poszczególnych

krajach. Według WHO same Chiny w okresie od 2006 do 2015 roku stracą 558 mld dolarów z powodu cukrzycy i jej powikłań [9]. Według Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 25,8 miliona ludzi w USA czyli 8,3% ogółu ludności, choruje na cukrzycę, z czego tylko 18,8 miliona to przypadki zdiagnozowane. U ponad 79 milionów obywateli USA stwierdzono stan przedcukrzycowy, a w samym roku 2010 zdiagnozowano 1,9 miliona nowych przypadków cukrzycy [10].

Cukrzyca typu 2 jest chorobą postępującą. Początkowo niewielkie zaburzenia homeostazy metabolizmu energetycznego uruchamiają mechanizm błędnego koła, który napędza rozwój choroby wraz z towarzyszącymi jej powikłaniami, prowadzącymi do znacznego obniżenia jakości życia, inwalidztwa oraz śmierci. Dzięki dostępności leków obniżających stężenie glukozy we krwi oraz licznych preparatów insuliny, wcześniej wymienione powikłania ostre cukrzycy nie są dziś główną przyczyną śmiertelności cierpiących na tę chorobę. Są nimi powikłania późne w obrębie naczyń krwionośnych (mikro- i makroangiopatie), mogące stać się przyczyną amputacji kończyn, zawału serca oraz udaru mózgu [9,10]. Leczenie pacjentów koncentruje się zatem na zatrzymaniu rozwoju powikłań późnych.

U osób cierpiących na cukrzycę ryzyko zawału serca i udaru mózgu jest od 2 do 4 razy wyższe niż u osób zdrowych. W 2004 roku choroba serca była przyczyną 68% zgonów wśród cukrzyków mających powyżej 65 lat [10]. Co więcej, 67% osób powyżej 20 roku życia chorych na cukrzycę miało nadciśnienie, a 28,5% cukrzyków powyżej 40 roku życia cierpiało na retinopatię, z czego 4,4% z nich – na retinopatię zaawansowaną, grożącą poważnym upośledzeniem wzroku. Cukrzyca jest również wiodącą przyczyną niewydolności nerek i odpowiadała w roku 2008 za 44% nowych przypadków tej choroby [10]. Według CDC, od 60% do 70% osób chorujących na cukrzycę wykazuje mniejsze lub większe uszkodzenia układu nerwowego, a ponad 60% nie powypadkowych amputacji kończyn dolnych jest spowodowanych cukrzycą [10].

## CZY HIPERGLIKEMIA POWODUJE ROZWÓJ CHOROÓB UKŁADU KRAŻENIA?

Najważniejszymi badaniami pokazującymi związek podwyższonego poziomu glukozy we krwi z rozwojem powikłań w obrębie układu krążenia były Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) dla cukrzycy typu 1 oraz United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) dla cukrzycy typu 2. W DCCT pokazano, że w cukrzycy typu 1 obniżenie stężenia glukozy we krwi powoduje późniejsze pojawienie się, a następnie wolniejszy rozwój powikłań w obrębie niewielkich naczyń krwionośnych (typu mikroangiopatia), przy czym redukcja ryzyka osiągnięcia różnych punktów końcowych wynosiła od 35% do 75% zależnie od rodzaju powikłania. Badania wskazały na istnienie silnego związku między wystawieniem organizmu na hiperglikemię, tak długością trwania jak nasileniem, a rozwojem komplikacji. Nie zaobserwowano granicznej wartości glikemii (stężenia cukru we krwi), dla której jej wpływ na rozwój powikłań by ustawał, im bardziej jej wartości były zbliżone do wartości normalnej, tym bardziej ograniczony

był rozwój powikłań. Badania wskazały również na związek skuteczniejszej normalizacji glikemii z redukcją zdarzeń sercowo-naczyniowych, takich jak zawał lub udar, niestety obserwowana różnica nie osiągnęła statystycznej istotności [11].

Do badania UKPDS włączono 5102 pacjentów i śledzono przebieg ich terapii przez około 10 lat. Badanie ustaliło, że lepsza farmakologiczna normalizacja glikemii powoduje wolniejszy rozwój retinopatii, nefropatii i prawdopodobnie neuropatii. Stwierdzono również, że obniżenie w wyniku terapii o każdy punkt procentowy (np. z 9 na 8%) zawartości glikowanej hemoglobiny ( $HbA_{1c}$ , wskaźnik średniego stężenia glukozy w organizmie na przestrzeni kilku miesięcy, jego zawartość wskazuje jak skuteczne było leczenie), redukuje aż o 35% ryzyko rozwoju powikłań. Tak jak poprzednio, nie zaobserwowano wartości granicznych, tzn., że im wartości  $HbA_{1c}$  były bliższe wartości normalnej (6,2%), tym lepsze były rokowania pacjenta. Niestety nie wykazano statystycznie istotnego związku między lepszą farmakologiczną kontrolą glikemii a powikłaniami sercowo-naczyniowymi, aczkolwiek zaobserwowano, statystycznie istotny ( $P=0,052$ ), spadek o 16% łącznego ryzyka wystąpienia śmiertelnego i nieśmiertelnego zawału oraz gwałtownej śmierci. Pomimo braku istotnego statystycznie wpływu intensywnej terapii na powikłania typu makroangiopatia, analiza epidemiologiczna pokazała związek pomiędzy ryzykiem wystąpienia zdarzenia sercowo-naczyniowego a glikemią, spadek  $HbA_{1c}$  o każdy punkt procentowy zmniejszył o 25% śmiertelność związaną z cukrzycą, o 7% śmiertelność ze wszystkich przyczyn łącznie, o 18% łączną liczbę zawałów śmiertelnych i nieśmiertelnych. Badanie wykazało również, że obniżenie ciśnienia krwi do średniej wartości 144/82 mg Hg istotnie obniża ryzyko zawału, powiązanej z cukrzycą śmierci, niewydolności serca oraz utraty wzroku [12].

Wyniki przedstawionych badań wyraźnie wskazały na związek między stopniem hiperglikemii a rozwojem powikłań w obrębie układu krążenia. Były z jednej strony pocieszające – wskazywały, że odpowiednia regulacja glikemii u osób chorych może zapobiegać rozwojowi powikłań cukrzycowych, zwłaszcza tych typu mikroangiopatia, z drugiej jednak strony nie udało się w nich jednoznacznie dowiedzieć, że lepsza kontrola glikemii osób cierpiących na cukrzycę jest w stanie powstrzymać rozwój powikłań typu makroangiopatia, odpowiedzialnych za zwiększone ryzyko wystąpienia najczęstszych przyczyn zgonów: zawału serca i udaru mózgu. Dopiero późniejsze badania miały zasugerować, że za rozwój powikłań typu makroangiopatia może odpowiadać glikemia poposiłkowa, towarzysząca powoli rozwijającej się insulinooporności i rozpoczynająca się wiele lat przed wystąpieniem pełnoobjawowej cukrzycy i hiperglikemii na czczo.

#### KIEDY CUKIER USZKADZA NACZYNIĄ?

Badania Hoorn [13], Cardiovascular Health Study [14], Diabetes Intervention Study [15], Honolulu Heart Study [16], Chicago Heart Study [17] i DECODE (Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis Of Diagnostic Criteria in Europe) [18] wskazały, że nadmiernie wysokie stężenie

glukozy po posiłku – hiperglikemia poposiłkowa, jest niezależnym od innych, także od glikemii na czczo, czynnikiem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, CVD (ang. *cardiovascular disease*). Badanie DECODE objęło ponad 25000 osób, których zdrowie śledzono przez średnio 7,3 lat. Pokazano w nim bezpośredni związek pomiędzy stężeniem glukozy w osoczu 2 godz. po obciążeniu (wynik testu OGTT, ang. *oral glucose tolerance test*) a ryzykiem śmierci z przyczyn chorób układu sercowo-naczyniowego. Test OGTT polega na doustnym przyjęciu 75 g (wg. WHO) glukozy i pomiarze poziomu cukru we krwi po 2 godz. od przyjęcia. Pokazuje on jak skutecznie insulina wyrównuje stężenie glukozy we krwi po posiłku. U osób mających insulinooporność lub obniżoną aktywność wydzielniczą komórek  $\beta$  trzustki, stężenie glukozy wolniej powraca do wartości wyjściowych. Za prawidłową tolerancję glukozy przyjmuje się wartość stężenia poniżej 140 mg/dl we krwi żyłnej 2 godz. po obciążeniu. Wartości od 140–199 mg/dl wskazują na nieprawidłową tolerancję glukozy (IGT, ang. *Impaired Glucose Tolerance*), natomiast powyżej 199 mg/dl to stan cukrzycy. Badanie DECODE pokazało, że nawet u osób klasyfikowanych jako mające prawidłową tolerancję glukozy z wynikiem testu OGTT poniżej 140 mg/dl, glikemia poobciążeniowa koreluje z ryzykiem śmierci z powodu chorób sercowo-naczyniowych (CVD) i śmierci ze wszystkich przyczyn. Ryzyko zgonu z powodu CVD zaczyna wzrastać już wtedy gdy wynik testu OGTT wynosi 80 mg/dl, a przy wartości 140 mg/dl (granicznej dla zaszeregowania pacjenta do grupy osób o nieprawidłowej tolerancji na glukozę), ryzyko podnosi się o 58%. W badaniu DECODE, poziom glikemii 2 godz. po obciążeniu glukozą był niezależnie od glikemii na czczo i znacznie silniej od niej powiązany ze śmiertelnością [18].

Dane te w powiązaniu z coraz lepiej poznawanymi mechanizmami odpowiadającymi za toksyczne działanie wysokich stężeń glukozy (opisane w dalszej części pracy) mocno przemawiały za tezą, że hiperglikemia poposiłkowa odgrywa kluczową rolę w rozwoju powikłań cukrzycowych i progresji choroby, chociaż ścisły związek glikemii poposiłkowej ze śmiertelnością mógłby również wynikać tylko z faktu, że jest dobrą miarą zaawansowania choroby. Z uwagi na to, że początki insulinooporności i towarzyszące jej wysokie poziomy glukozy po posiłku wyprzedzają o wiele lat pełnoobjawową cukrzycę, brak wyraźnych sukcesów w zapobieganiu powikłaniom typu zawał i udar, jest zwykle interpretowany jako następstwo zbyt późnego zaawansowania zmian naczyniowych w momencie zdiagnozowania cukrzycy pełnoobjawowej. Dane te podkreśliły potencjalne znaczenie wcześniejszej diagnostyki rozwijającej się cukrzycy, już na etapie upośledzonej tolerancji na glukozę, a nawet wcześniej, na etapie początkowego spadku insulinooporności tkanek obwodowych.

#### CZY MOŻNA ZATRZYMAĆ CUKRZYCĘ?

Omówione wcześniej wyniki badań pokazały, że uszkodzenia układu krążenia mogą poprzedzać o wiele lat pełnoobjawową cukrzycę. Szkodliwe działanie wysokich stężeń glukozy na układ krążenia rozpoczyna się już w momencie

pojawienia się nieprawidłowej tolerancji glukozy – IGT a może nawet przy pierwszych objawach insulinooporności. Skłoniło to naukowców do uważniejszego przyjrzenia się potencjalnym możliwościom zastosowania wczesnej interwencji poprzez modyfikację stylu życia (dieta połączona z ćwiczeniami fizycznymi) lub poprzez wczesne zastosowanie leków tak, by zahamować rozwój cukrzycy i przywrócić prawidłową tolerancję glukozy (NGT, ang. *Normal Glucose Tolerance*).

Badania Diabetes Prevention Programme – DPP [19], Diabetes Prevention Study – DPS [20], STOP-NIDDM [21], Malmo feasibility study [22], Da Qing Diabetes Prevention Study [23] i inne wskazały, że zarówno intensywna zmiana stylu życia, obejmująca dietę oraz wysiłek fizyczny, jak i włączenie do terapii niektórych leków przeciwcukrzycowych, może zahamować progresję IGT do pełnoobjawowej cukrzycy. W badaniach tych sprawdzano, w jakim stopniu wczesna interwencja chroni osoby z IGT przed zachorowaniem na pełnoobjawową cukrzycę. Zależnie od badania, w ciągu trwającej od 2,5 do 6 lat interwencji, zaobserwowano wynoszącą od 25 do 67% redukcję zachorowań na pełnoobjawową cukrzycę osób z nieprawidłową tolerancją glukozy poddanych leczeniu. Co więcej, u wielu pacjentów taka terapia przywróciła normalną tolerancję glukozy – od 20 do 50% przypadków.

Kiedy opublikowano badania, powstało pytanie: na jak długi czas udało się zahamować rozwój choroby u osób mających wyjściowo IGT? Odpowiedź dostarczona przez badania typu „*follow up*” była optymistyczna. Grupa przeprowadzająca DPS stwierdziła, że 3 lata po zakończeniu czteroletniej terapii, zachorowalność na cukrzycę wśród pacjentów poddanych wczesnej interwencji była nadal obniżona [24], a badacze przeprowadzający Da Qing Diabetes Prevention Study stwierdzili, że wśród pacjentów z IGT poddanych sześcioletniej interwencji, 14 lat po zakończeniu badania zachorowalność na cukrzycę była niższa o 43% niż w grupie nie poddanej leczeniu [25].

Celem terapii nie jest jednak tylko zatrzymanie rozwoju cukrzycy, ale zwiększenie jakości życia i zahamowanie powikłań w obrębie układu krążenia. Przeanalizowano więc losy pacjentów poddanych badaniu DPS także pod kątem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i tutaj wyniki już nie były tak optymistyczne. Interwencja powodująca znaczące i trwałe obniżenie zachorowalności na cukrzycę typu 2 wśród populacji z IGT nie obniżyła ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych i związanej z nimi śmiertelności w ciągu 10 lat po badaniu [26]. Naukowcy zwracają jednak uwagę na to, że zarówno dobór pacjentów, jak i projekt badania nie sprzyjały wykrywalności wpływu interwencji na choroby układu krążenia. Dyskutuje się również możliwość, iż zastosowana w badaniach modyfikacja trybu życia była wystarczająca, by zatrzymać progresję IGT do pełnoobjawowej cukrzycy, ale zbyt mała, by spowodować redukcję ryzyka zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe. W celu jednoznacznego rozstrzygnięcia, czy można obniżyć ryzyko rozwoju chorób układu krążenia u osób z insulinoopornością potrzebne będą kolejne badania.

## BIOCHEMICZNE PODSTAWY CUKRZYCY – MECHANIZM BŁĘDNego KOŁA

Niewłaściwa regulacja stężenia glukozy we krwi oraz wystawienie organizmu na toksyczne działanie glukozy i lipidów zaczyna się wiele lat wcześniej zanim można zaobserwować niewłaściwy poziom glukozy w osoczu na czczo [4]. Początkowo osobę cierpiącą na zaburzenia regulacji glikemii charakteryzuje wyższe od normalnego stężenie glukozy po posiłku oraz wolniejszy jego powrót do wartości wyjściowych. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest zwykle pojawienie się insulinooporności, ale może nią być także niedostateczna aktywność wydzielnicza komórek  $\beta$  trzustki odpowiadających za dostarczanie insuliny [3,4]. Osoba taka, nawet jeśli jeszcze nie spełnia definicji osoby chorującej na cukrzycę (spełnienie jednego z warunków: poziom glukozy w przypadkowym badaniu powyżej 200 mg/dl, stężenie glukozy na czczo powyżej 125 mg/dl, wynik testu OGTT 2 godz. po obciążeniu powyżej 200 mg/dl), jest dłużej od zdrowej wystawiona na toksyczne działanie glukozy. Zapoczątkowuje to mechanizm tzw. błędnego koła, polegający na tym, że wysokie stężenie glukozy i zły profil lipidowy odpowiadają nie tylko za uszkodzenie komórek i rozwój powikłań, w szczególności w obszarze naczyń krwionośnych, ale również za dalsze uszkodzanie organów i struktur odpowiedzialnych za regulację poziomu glukozy we krwi. W ten sposób początkowo niewielkie zaburzenie pogłębia się samo w cyklu, w którym skutek staje się przyczyną: hiperglikemia i dyslipidemia (zły profil lipidów we krwi, w szczególności wysoki poziom triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych), będące skutkami wadliwej regulacji poziomu glukozy, są przyczyną dalszego wzrostu insulinooporności i uszkodzenia komórek odpowiedzialnych za wytwarzanie insuliny. W konsekwencji zarówno hiperglikemia jak i dyslipidemia pogłębiają się.

W pierwszym okresie rozwoju choroby organizm odpowiada na zbyt wysoki poziom glukozy wzmożoną produkcją insuliny, w wyniku czego pojawia się hiperinsulinemia. Jednakże nadprodukcja insuliny, oprócz obniżenia poziomu glukozy, powoduje także adaptacje komórek docelowych do wysokiego poziomu hormonu, poprzez internalizację do wnętrza komórki receptorów odpowiedzialnych za jego wiązanie. Ten mechanizm adaptacji do wzmożonego bodźca w literaturze angielskojęzycznej nazywany jest terminem „*downregulation*”. W wyniku jego występowania dochodzi do dalszego osłabienia odpowiedzi tkanek obwodowych na działanie insuliny. Ponadto wzmożona produkcja insuliny w komórkach  $\beta$  trzustki przyczynia się w dłuższej perspektywie czasowej do ich uszkodzenia, w wyniku procesu obrazowo nazywanego wyczerpaniem. Objawia się on rosnącym udziałem niedojrzałego hormonu w wydzielinie oraz postępującą śmiercią komórek  $\beta$  trzustki.

Wysokie stężenie glukozy pojawiające się po posiłku u osób z rozwijającą się insulinoopornością wraz z wysokim stężeniem triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych uszkodzają liczne tkanki organizmu, poprzez działanie szeregu mechanizmów łącznie nazywanych gluk- i lipotoksycznością, a które zostaną przybliżone w dalszej części pracy. Toksyczne działanie glukozy i lipidów odpowiada nie tylko za uszkodzanie układu krążenia i rozwój powi-

kłań, ale także za niszczenie komórek  $\beta$  trzustki, zwłaszcza że te ostatnie cechują bardzo słabe mechanizmy ochrony przed stresem oksydacyjnym generowanym w wyniku hiperglikemii, oraz wzrost insulinooporności tkanek obwodowych. Choroba sama się napędza i pogłębia. Ostatecznie, w wyniku postępującego uszkodzenia komórek  $\beta$  trzustki produkcja insuliny u chorego spada poniżej wartości cechujących zdrowego osobnika.

## GLUKOTOKSYCZNOŚĆ

Glukoza w wysokich stężeniach jest toksyczna. Szczególnie narażone na jej toksyczne działanie są komórki, które pobierają glukozę z udziałem transporterów niezależnych od obecności insuliny, takie jak komórki śródbłonka naczyniowego i komórki  $\beta$  trzustki. W komórkach tych transport glukozy zależy tylko od różnicy stężeń w poprzek błony plazmatycznej komórki. Dlatego stężenie glukozy w tych komórkach w czasie hiperglikemii jest wysokie.

Istnieją cztery hipotezy wyjaśniające toksyczne działanie glukozy, które odpowiada za towarzyszące cukrzycy patologiczne zmiany. Są to: a) aktywacja szlaku polioli, b) nagromadzenie się zaawansowanych produktów glikacji (AGE), c) aktywacja izoform kinazy białkowej C (PKC), d) gromadzenie się heksozamin. Każdy z tych szlaków bierze swój początek w nagromadzających się w warunkach cukrzycy metabolitach pośrednich glikolizy i każdy po części odpowiada za powikłania cukrzycowe, choć najwięcej uwagi poświęca się obecnie tworzeniu zaawansowanych produktów glikacji oraz aktywacji izoform kinazy białkowej C.

Pierwszym etapem szlaku polioli jest redukcja glukozy do sorbitolu, katalizowana przez reduktazę aldozową, czemu towarzyszy utlenianie NADPH do NADP<sup>+</sup>. Sorbitol jest utleniany przez dehydrogenazę sorbitolową (SDH) do fruktozy, przy jednoczesnej redukcji NAD<sup>+</sup> do NADH [27]. W wyniku nasilenia tych reakcji w komórce dochodzi do akumulacji NADH, co powoduje hamowanie aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i wzrost stężenia fosfodihydroksyacetonu, przekształcanego w aktywujący PKC diacyloglicerol [28]. Nagromadzenie NADH powoduje także „przeciążenie” łańcucha oddechowego i produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w mitochondriach [29]. Wewnątrzkomórkowa akumulacja sorbitolu podnosi także ciśnienie osmotyczne [28], a zużywanie NADPH w pierwszej reakcji szlaku powoduje brak siły redukcyjnej potrzebnej do odtwarzania zredukowanej formy glutationu (GSH), co zaburza potencjał oksydoredukcyjny komórki i przyczynia się do zwiększenia stresu oksydacyjnego, zwłaszcza w warunkach wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu [27]. W cukrzycy nawet 33% glukozy może wchodzić w ten szlak [28].

## WYTWARZANIE AGE

Proces glikacji czyli nieenzymatycznego przyłączania cząsteczki cukru do cząsteczki białka lub lipidu oraz produkty przemian tak powstałych nowych cząsteczek odgrywają olbrzymią rolę w powstawaniu przewlekłych powikłań cukrzycowych. Sam fakt przyłączenia reszt cukrowych do makromolekuł wpływa na ich funkcje, ale patologiczne

zmiany związane z wytwarzaniem zaawansowanych produktów glikacji sięgają znacznie głębiej. Odpowiadają one bowiem w dużym stopniu za zwężanie światła naczyń poprzez unieruchamianie w warstwie podśródbłonkowej rozpuszczalnych lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [30], kumulowanie białek osocza, uwięzienie immunoglobuliny G [31], zmniejszenie produkcji NO [32], wywoływanie przepuszczalności naczyń poprzez oddziaływanie ze specyficznymi receptorami wiążącymi AGE, tzw. RAGE [33] oraz sprzyjający miażdżycy wzrost syntezy VCAM-1 (cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka), liganda dla makrofagów, co powoduje wzrost stresu oksydacyjnego [34].

## AKTYWACJA PKC

Wzrost stężenia fosfodihydroksyacetonu umożliwia przekształcanie go w glicerolo-3-fosforan, który ulega przemianie w diacyloglicerol, aktywator izoform kinazy białkowej C. Aktywacja PKC powoduje zmiany w poziomie syntezy licznych białek mających ścisły związek z patologicznymi zmianami w obrębie naczyń krwionośnych. Niektóre ze zmian to: spadek syntezy eNOS (śródbłonkowej syntazy NO) i wzrost syntezy endoteliny ET-1, co prowadzi do zaburzeń przepływu krwi; wzrost syntezy VEGF (naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka), powodujący wzrost przepuszczalności naczyń i angiogenezę; wzrost syntezy TGF- $\beta$  (czynnika martwicy nowotworu), prowadzący do wzrostu ilości kolagenu i fibronektyny, a w konsekwencji do zatorów w naczyniach włosowatych; wzrost syntezy PAI-1 (inhibitora aktywatora plazminogenu) co przyczynia się do spadku fibrynolizy i zwiększa tendencję do tworzenia zatorów; wzrost syntezy czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B odpowiedzialnego za wyrażanie licznych genów prozapalnych oraz wzrost ekspresji genu oksydazy NAD(P)H, co zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu i stres oksydacyjny [35].

Za aktywację szlaku heksozamin odpowiedzialna jest akumulacja fruktozo-6-fosforanu, który przekształcany jest do glukozamino-6-fosforanu przez aminotransferazę glutamina:fruktozo-6-fosforan (GFAT). Związek ten jest prekursorem UDP-N-acetyloglukozoaminy, uczestniczącej w syntezie proteoglikanów. N-acetyloglukozoamina jest dołączana do czynników transkrypcyjnych, powodując zmiany w ekspresji genów, między innymi wzrost produkcji TGF- $\beta$  [28]. Wszystkie z wymienionych patogenicznych szlaków są aktywowane przez wzrost stężenia różnych pośredników glikolizy. Liczne badania wskazują, że za akumulację pośredników glikolizy w cukrzycy odpowiada hamowanie jednego z kluczowych enzymów tego szlaku, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Można zatem główne szlaki metaboliczne, wywołujące patologiczne zmiany w cukrzycy, sprowadzić do jednego zdarzenia metabolicznego.

Uważa się, że za spadek aktywności dehydrogenazy gliceroaldehydo-3-fosforanowej pośrednio odpowiada wzmożona produkcja anionorodnika nadtlenkowego, do której dochodzi w mitochondriach w warunkach cukrzycy. Wzrost ilości glukozy metabolizowanej w glikolizie i dalej w cyklu Krebsa powoduje dużą podaż NADH i FADH<sub>2</sub>. Ponadto, cukrzycy towarzyszy zwykle podniesiony poziom długołańcuchowych acylo-CoA, które w wyniku  $\beta$ -oksydacji

również są źródłem NADH i FADH<sub>2</sub>. Podniesiony poziom wewnątrzkomórkowego stężenia tych cząsteczek powoduje wzrost podaży elektronów na łańcuch oddechowy i wzrost potencjału błony mitochondrialnej. Po przekroczeniu pewnej wartości potencjału, ubichinon w łańcuchu oddechowym nie przekazuje elektronów na cytochrom c, ale na tlen cząsteczkowy i powstaje bardzo reaktywna cząsteczka RFT, anionorodnik ponadtlenkowy [36]. Akumulacja acylo-CoA może również być przyczyną hamowania nośnika nukleotydów adenylowych (ANT) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, co powoduje spadek mitochondrialnego stężenia ADP. Prowadzi to do zahamowania łańcucha oddechowego, a tym samym zwiększa powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w opisanym poprzednio mechanizmie [37]. Elementem łączącym hamowanie aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego ze wzmożoną produkcją anionorodnika ponadtlenkowego jest poli ADP-rybozylacja enzymu przez polimerazę poli(ADP)rybozylową (PARP), aktywowaną w warunkach pojawiania się powodowanych przez reaktywne formy tlenu uszkodzeń DNA [36].

Wymienione szlaki metaboliczne odpowiadające za rozwój powikłań cukrzycowych przyczyniają się również do wzrostu stresu oksydacyjnego. Anionorodnik ponadtlenkowy poprzez wywołane swą obecnością uszkodzenia powoduje wzrost swojego wytwarzania. W ten sposób powstający w warunkach cukrzycy i zwiększonej podaży równoważników redukujących anionorodnik ponadtlenkowy, odpowiada za spadek aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, akumulację pośredników glikolizy oraz dalsze uszkodzenia funkcji mitochondriów. Możemy zatem dostrzec mechanizm błędnego koła także na tym poziomie regulacyjnym. Mitochondria są nie tylko źródłem powstających w nich reaktywnych form tlenu, ale także najbliższym celem ataku tych wysoce reaktywnych cząsteczek. Uszkodzenia mtDNA oraz struktury błon przez reaktywne formy tlenu może powodować upośledzenie funkcji tych organelli i dalszy wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu. Sugerowano, że uszkodzenia mitochondriów mogą powodować progresję powikłań mimo normalizacji poziomu glukozy oraz tzw. pamięć o hiperglikemii [28].

## LIPOTOKSYCZNOŚĆ

Nieprawidłowy profil lipidów, to obok podniesionego poziomu glukozy, kolejny toksyczny stan towarzyszący cukrzycy. Z jednej strony przyczynia on się do rozwoju chorób układu krążenia, a z drugiej, poprzez wysokie stężenie triglicerydów oraz wolnych kwasów tłuszczowych, powoduje rozwój insulinooporności. Już 1963 roku Randl i wsp. zaproponowali mechanizm nazywany dziś cyklem Randla, wg. którego metabolizm komórek, narządów i całych organizmów nastawia się na zwiększenie wykorzystania jednego z dwóch substratów energetycznych: glukozy lub kwasów tłuszczowych w zależności od tego, który z nich jest dostępny w nadmiarze. Duża dostępność wolnych kwasów tłuszczowych hamuje glikolizę i stymuluje odkładanie zapasów glukozy w postaci glikogenu. W czasie utleniania kwasów tłuszczowych dochodzi do krótkotrwałego hamowania transportu glukozy do

wnętrza komórki oraz obniżenia aktywności heksokinazy, fosfofruktokinazy i dehydrogenazy pirogronianowej. Najsilniej hamowana jest aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w wyniku wzrostu stosunku stężenia acetyloCoA do CoA i NADH do NAD<sup>+</sup> w mitochondriach, w warunkach intensywnie zachodzącej  $\beta$ -oksydacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Następnie dochodzi do wzrostu stężenia cytrynianu, który hamuje aktywność fosfofruktokinazy-1, co powoduje dalszą akumulację glukozy-6-fosforanu i w konsekwencji zahamowanie aktywności heksokinazy [38]. Obecnie uważa się, że cykl Randla działa nie tylko na drodze krótkotrwałej allosterycznej modulacji aktywności enzymatycznej, ale również na poziome zmiany ekspresji genów. Długotrwała obfitość wolnych kwasów tłuszczowych powoduje zatem zmniejszenie wyrażania enzymów glikolitycznych [39]. A zatem, w warunkach cukrzycy, nadmierna dostępność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych zmniejsza szybkość przetwarzania glukozy tym samym przyczyniając się do wzrostu insulinooporności tkanek oraz wzrostu stężenia cukru we krwi.

Cykl Randla nie wyczerpuje jednak pojęcia lipotoksyczności w warunkach cukrzycy. Nowsze badania wyraźnie wskazują, że długołańcuchowe kwasy tłuszczowe odpowiadają za zaburzenie wewnątrzkomórkowego przetwarzania sygnału pobudzenia receptora insulinowego. Związanie insuliny przez podjednostkę  $\alpha$  receptora insulinowego powoduje autofosforylację kilku reszt tyrozynowych wewnątrzkomórkowej części podjednostki. Tak aktywowany receptor katalizuje fosforylację substratów cytosolowych odpowiedzialnych za przewodzenie sygnału do wnętrza komórki i wywołanie efektu. W większości komórek głównym substratem receptora jest białko cytosolowe zwane IRS, do którego przyłączają się inne białka wyposażone w domenę SH2 [40], w szczególności kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, której aktywacja powoduje wzrost poziomu fosfatydyloinozytolo-3,4-bisfosforanu (PIP2) i fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3). Wzrost stężenia PIP3 aktywuje kinazę 1 zależną od fosforanów fosfatydyloinozytolo, która fosforyluje kinazę białkową B (inaczej nazywaną kinazą Akt) i atypową kinazę białkową C ( $\alpha$ PKC). W mięśniach i tkance tłuszczowej aktywacja kinazy białkowej B powoduje translokację transporterów glukozy (GLUT-4) do błony komórkowej i wzrost pobierania cukru do wnętrza komórki. Kinaza białkowa B w komórkach tkanek odkładających glikogen, takich jak mięśnie i wątroba, inaktywuje kinazę syntazy glikogenu-3 (GSK-3) przez fosforylację, tym samym znosząc hamowanie syntazy glikogenowej i promując wytwarzanie glikogenu [41]. IRS przy udziale nieenzymatycznych białek adaptorowych takich jak Grb-2 może aktywować grupę kinaz serynowych MAP oraz białka Ras. Aktywacja tych białek odpowiada prawdopodobnie za wpływ insuliny na procesy komórkowe takie jak mitoz, synteza białek, wzrost i różnicowanie komórek [40].

Opisane szlaki przekazywania sygnału mogą być zaburzone przez dużą podaż długołańcuchowych wolnych kwasów tłuszczowych. Ich obecność w komórkach mięśni i wątroby, zwłaszcza przy obniżonej aktywności oddechowej mitochondriów, która wydaje się być częstym objawem



rozwijającej się insulinooporności, prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji acylo-CoA i diacyloglicerolu, co powoduje aktywację izoform kinazy białkowej C. W komórkach mięśni PKC fosforyluje reszty serynowe w kluczowych miejscach IRS, blokując fosforylację reszt tyrozyny. W ten sposób bezpośrednio zapobiega aktywacji kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej i dalszemu przekazywaniu sygnału. W efekcie nie dochodzi ani do translokacji transporterów glukozy GLUT4 do błony komórkowej, ani do zniesienia hamowania syntezy glikogenu. W wątrobie podobna aktywacja PKC prowadzi do fosforylacji receptora insulinowego blokując autofosforylację jego reszt tyrozynowych. W przypadku tych komórek brak aktywacji kinazy białkowej B, nie zmienia dostępności transporterów glukozy na powierzchni komórek, ale podobnie jak ma to miejsce w komórkach mięśni, nie dochodzi do zniesienia hamowania syntezy glikogenu w wyniku inaktywacji kinazy syntazy glikogenowej-3 (GSK-3) [42]. Ponadto spadek aktywności kinazy Akt zmniejsza w wątrobie stopień fosforylacji białka FOXO (ang. *forkhead box protein O*), co powoduje jego wejście do jądra komórkowego, gdzie jako czynnik transkrypcyjny stymuluje syntezę enzymów biorących udział w glukoneogenezie. W warunkach spadku aktywności Akt dochodzi do wzrostu produkcji glukozy w wątrobie w warunkach cukrzycy i insulinooporności [42,43].

## PODSUMOWANIE

Zmiany w stylu życia populacji ludzkich spowodowały na świecie epidemię cukrzycy, która znacząco obniża jakość życia osób na nią cierpiących jak i jest przyczyną licznych zgonów. W większości przypadków są one spowodowane powikłaniami w późnym stadium choroby typu mikro- i makroangiopatii, takimi jak zawał serca, udar, krańcowa niewydolność nerek. Długoterminowe badania kliniczne pozwoliły określić, że za powikłania cukrzycowe oraz postęp choroby odpowiada toksyczne działanie glukozy, i że w terapii celowe jest agresywne dążenie do przywrócenia właściwego stężenia glukozy we krwi. Dalsze badania podkreśliły rolę hiperglikemii poposiłkowej jako ważnego mechanizmu patogenego, odpowiadającego za uszkodzenia naczyń krwionośnych na wcześniejszych etapach rozwoju zaburzenia metabolizmu cukrów, jeszcze na etapie trwania stanu przedcukrzycowego, charakteryzującego się rosnącą insulinoopornością tkanek obwodowych. Badania te sugerują potrzebę wcześniejszego uchwycenia defektu metabolizmu cukrów i rozwinięcie terapii polegającej na zapobiegnięciu rozwojowi cukrzycy. Istotność zapobiegania jest podkreślona przez fakt, że cukrzyca jest chorobą, która rozwija się w mechanizmie błędnego koła, pojawienie się niewłaściwej tolerancji na glukozę, uruchomi mechanizmy powodujące pogłębianie się choroby. Z tej przyczyny, badania kliniczne w ostatnich latach koncentrowały się na możliwości zahamowania progresji stanu przedcukrzycowego do pełnoobjawowej cukrzycy. Ich wyniki z punktu widzenia zatrzymania rozwoju cukrzycy można by określić jako bardzo optymistyczne – wczesna interwencja u osób z niewłaściwą tolerancją glukozy skutecznie zapobiega rozwojowi cukrzycy. Niestety na obecnym etapie nie udało się wykazać, że tak zahamowana progresja IGT do pełnoobjawowej cukrzycy, zre-

dukowała zapadalność na choroby sercowo-naczyniowe (CVD), a właśnie zapobieganie rozwojowi tych chorób jest nadrzędnym celem w terapii. Może to wynikać z małej specyficzności przeprowadzonych badań w kierunku wykrycia wpływu interwencji na zdarzenia sercowo-naczyniowe lub z niedostatecznej modyfikacji trybu życia osób badanych. Niestety może też sugerować, że na etapie niewłaściwej tolerancji na glukozę interwencja jest już spóźniona. W świetle tych badań, cukrzyca jawi się dziś jako końcowy etap schorzenia, które rozpoczyna się wiele lat wcześniej, i że celowa jest jak najwcześniejsza diagnoza wadliwego metabolizmu cukrów i rozpoczęcie działań terapeutycznych.

Badania biochemiczne dostarczyły wielu odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczne działanie wysokich stężeń glukozy oraz pokazały, że jednym z głównych miejsc, z którego źródła swe biorą ciągi patologicznych przemian odpowiadające za powikłania naczyniowe i progresję choroby są mitochondria. Nadmierna podaż glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych wspólnie przyczyniają się do wzrostu produkcji bardzo aktywnej cząsteczki RFT – anionorodnika ponadtlenkowego. Reszty acylo-CoA hamują również translokację nukleotydów adenylowych, w ten sposób zwiększając produkcję anionorodnika ponadtlenkowego. Cząsteczka ta nie tylko uszkadza struktury komórkowe, ale również powoduje hamowanie aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, czego skutkiem jest akumulacja pośredników glikolizy i nasilenie szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za rozwój powikłań cukrzycowych. Ponadto, wysokie stężenie triglicerydów przekładające się na wysokie stężenie acylo-coA wewnątrz komórek, hamuje wykorzystywanie glukozy jako substratu energetycznego. Prowadzi to do zmniejszenia aktywności i ilości enzymów glikolitycznych (cykl Randla) oraz, w wyniku aktywacji PKC, do hamowania szlaku sygnałowego przekazującego informację o pobudzeniu receptora insulinowego. W konsekwencji dochodzi do osłabienia pobierania glukozy przez tkanki obwodowe, obniżenia syntezy glikogenu oraz braku należytego hamowania glukoneogenezy przy obfitości cukru w ustroju.

Liczne badania prowadzone na ludziach i zwierzętach pokazują, że u osobników otyłych i chorych na cukrzycę dochodzi do zaburzenia funkcji mitochondriów. Mięśnie szkieletowe osób otyłych i diabetyków mają mniejsze mitochondria o słabiej wykształconych grzebieniach [44]. Stwierdzono również zredukowaną liczbę mitochondriów w adipocytach myszy cukrzycowych db/db, zaś u myszy otyłych zmniejszoną wielkość mitochondriów w tych komórkach [45]. Liczne badania wskazują również, że u osobników chorych na cukrzycę dochodzi do spadku ilości wielu białek mitochondrialnych oraz do ograniczenia wydajności utleniania substratów energetycznych w tych organellach. Skuteczna walka z cukrzycą wymaga przerwania opisanego błędnego koła w rozwoju choroby. Aby to uczynić potrzebna jest wcześniejsza detekcja nieprawidłowości w metabolizmie cukrów, zaostrenie kryteriów definiowania zaburzenia oraz wczesna interwencja. Pożyteczne byłoby również pojawienie się leków poprawiających i osłaniających funkcję mitochondriów.

## PIŚMIENICTWO

1. American Diabetes Association (2000) Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetes Care*. Suppl 1: S27-S31
2. American Diabetes Association (2011) National Diabetes Fact Sheet N°312 url <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>
3. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA (2006) Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 29: 1130-1139
4. Del Prato S (2009) Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med* 26: 1185-1192
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2005) *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 426
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2005) *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 858-859
7. Cusi K (2010) The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 10: 306-315
8. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR (2010) Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 303: 235-241
9. WHO Diabetes, Fact sheet N°312 January 2011 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
10. Centers for Disease control and Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011
11. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986
12. Genuth S, Eastman R, Kahn R, Klein R, Lachin J, Lebovitz H, Nathan D, Vinicor F; American Diabetes Association (2003) Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetes Care Suppl* 1: S28-S32
13. de Vegt F, Dekker JM, Ruhe HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ (1999) Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 42: 926-931
14. Barzilay JI, Spiekerman CF, Wahl PW, Kuller LH, Cushman M, Furberg CD, Dobs A, Polak JF, Savage PJ (1999) Cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: comparison of American Diabetes Association criteria for diabetes mellitus with WHO criteria. *Lancet* 354: 622-625
15. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, Ziegelasch HJ, Lindner J (1996) Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia* 39: 1577-1583
16. Donahue RP, Abbott RD, Reed DM, Yano K (1987) Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. Honolulu Heart Program. *Diabetes* 36: 689-692
17. Lowe LP, Liu K, Greenland P, Metzger BE, Dyer AR, Stamler J (1997) Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men. The Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study. *Diabetes Care* 20: 163-169
18. The DECODE study group on behalf of the Europe an Diabetes Epidemiology Group (1999) Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetic Association diagnostic criteria. *Lancet* 354: 617-621
19. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403
20. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343-1350
21. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M; STOP-NIDDM Trail Research Group (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 359: 2072-2077
22. Eriksson KF, Lindgärde F (1991) Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmö feasibility study. *Diabetologia* 34: 891-898
23. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, Hu ZX, Lin J, Xiao JZ, Cao HB, Liu PA, Jiang XG, Jiang YY, Wang JP, Zheng H, Zhang H, Bennett PH, Howard BV (1997) Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20: 537-544
24. Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemio K, Hämäläinen H, Härkönen P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Mannelin M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Group. (2006) Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368: 1673-1679
25. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q, Li H, Li H, Jiang Y, An Y, Shuai Y, Zhang B, Zhang J, Thompson TJ, Gerzoff RB, Roglic G, Hu Y, Bennett PH (2008) The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet* 371: 1783-1789
26. Uusitupa M, Peltonen M, Lindström J, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Valle TT, Eriksson JG, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Group (2009) Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study -- secondary analysis of the randomized trial. *PLoS One* 4: e5656
27. Feener EP, King GL (1997) Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 350 Suppl 1: S19-S13
28. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820
29. Cosentino F, Lüscher TF (1998) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3: S54-61
30. Vlassara H, Bucala R, Striker L (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biological, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70: 138-151
31. Gugliucci A (2000) Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 100: 621-634
32. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87: 432-438
33. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H (1989) Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170: 1387-1407
34. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D (1995) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96: 1395-1403
35. Gerald P, King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106: 1319-1331
36. Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625
37. Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ (2000) Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 148: 17-21
38. Hue L, Taegtmeier H (2009) The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E578-591

39. Xiao J, Gregersen S, Kruhøffer M, Pedersen SB, Ørntoft TF, Hermansen K (2001) The effect of chronic exposure to fatty acids on gene expression in clonal insulin-producing cells: studies using high density oligonucleotide microarray. *Endocrinology* 142: 4777-4784
40. Schmitz-Peiffer C (2000) Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* 12: 583-594
41. Morino K, Petersen KF, Shulman GI (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2: S9-S15
42. Accili D, Arden KC (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117: 421-426
43. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Moria BP, Shulman GI (2006) Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 116: 817-824
44. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944-2950
45. Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM, Ko YG (2006) Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* 49: 784-791

## Diabetes as the challenge to 21 century medicine – insights from clinical and biochemical investigations

Adam Konrad Jagielski<sup>1,✉</sup>, Aneta Piesiewicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Metabolic Regulation, Institute of Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Animal Physiology, Institute of Zoology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

✉e-mail: xleigaj@biol.uw.edu.pl

**Key words:** diabetes, glucotoxicity, lipotoxicity, insulin resistance

### ABSTRACT

The lifestyle changes characteristic to the second half of the 20 century, have evoked diabetes epidemic which drastically impairs the quality of life and is the underling cause of many demises, the most of which are related to the long term complications of the disease. Clinical investigations have established that gluco- and lipotoxicity are responsible for the progression and complications of diabetes and underscored the role of postprandial hypoglycemia in the pathogenesis of the disease. In recent years the clinical investigations were exploring the possibility of stopping the progression of 'prediabetic' state to overt diabetes, which is revealed as the late stage of a metabolic disorder which begins many years earlier and has deleterious effects on health. Biochemical investigations have revealed a large number of mechanisms responsible for the toxicity of high glucose and lipid concentrations, and pointed to mitochondria as the meeting place of pathogenic metabolic pathways.

# Mechanizm powstawania oporności na insulinę w tkankach obwodowych

Joanna Pawlak<sup>1</sup>

Rafał A. Derlacz<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Dział Badawczo-Rozwojowy, Adamed Sp. z o.o., Piętków, Czosnów

<sup>2</sup>Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, Warszawa

✉ Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 55 43 209, e-mail: rderlacz@biol.uw.edu.pl lub Dział Badawczo-Rozwojowy, Adamed Sp. z o.o. Piętków 149, 05-152 Czosnów; tel.: (22) 732 78 64, e-mail: rafal.derlacz@adamed.com.pl

Artykuł otrzymano 24 marca 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** insulina, insulinooporność, kinaza JNK, stan zapalny, IRS

**Wykaz skrótów:** AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; FAA – wolne kwasy tłuszczowe; IR – receptor insulinowy; IRS – substrat dla receptora insulinowego; JNK – kinaza fosforylująca N-końcową część białka Jun; PI3K – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu; PKC – kinaza białkowa C; PPAR – receptor aktywowany proliferatorami peroksyosomów

## STRESZCZENIE

Początek XXI wieku to postępująca „epidemia” chronicznych chorób metabolicznych i chorób układu krążenia, które kojarzone są ze zjawiskiem oporności na insulinę komórek i tkanek obwodowych, wątroby, mięśni czy tkanki tłuszczowej. Sytuację pogarsza fakt, że insulinooporność, która wyprzedza pełnoobjawową cukrzycę typu 2 o wiele lat, jest trudna do wykrycia, a technika będąca „złotym standardem” w pomiarze odpowiedzi tkanek na insulinę – klamra hiperinsulinemiczna normoglikemiczna – jest ze względów praktycznych niemożliwa do stosowania w badaniach przesiewowych. Pogorszona odpowiedź na insulinę to pierwszy etap błędnego koła, w którym słabo reagujące na hormon komórki zmuszają trzustkę do wydzielania większych ilości insuliny, co stopniowo czyni je coraz bardziej opornymi na działanie tego hormonu. Obecnie funkcjonują dwie podstawowe hipotezy wyjaśniające przyczyny insulinooporności. Pierwsza z nich przypisuje kluczową rolę gromadzeniu się lipidów w komórkach mięśni i wątroby. W drugiej, najistotniejsza wydaje się kumulacja lipidów w adipocytach i rozwijający się lokalnie chroniczny stan zapalny spowodowany przerostem tkanki tłuszczowej.

## WPROWADZENIE – OTYŁOŚĆ, CUKRZYCA I INSULINOOPORNOŚĆ

Jednymi z najpoważniejszych problemów zdrowotnych, z jakimi boryka się ludzkość w epoce post-industrialnej są cukrzyca i otyłość. Zmiana nawyków żywieniowych oraz trybu życia doprowadziły do rozpowszechnienia się zaburzeń metabolicznych niemal na skalę epidemii, i to nie tylko w krajach wysoko rozwiniętych, ale również w uboższych regionach świata. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2005 roku 1,6 miliarda ludzi powyżej 15 roku życia miało nadwagę, a około 400 milionów było otyłych. Przewidywania WHO na najbliższe lata są bezlitosne: do 2015 roku liczba ludzi z nadwagą wzrośnie do ponad dwóch miliardów a otyłych będzie blisko 700 milionów. Biorąc pod uwagę szacunki Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ) dotyczące liczebności ludzkiej populacji na świecie w 2015 roku (około 7,3 miliarda), nie trudno jest policzyć, że ponad 40% tej populacji będzie narażone na powikłania zdrowotne będące konsekwencją nadwagi i otyłości.

Do najpoważniejszych konsekwencji zdrowotnych wynikających ze złej diety i nieprawidłowego trybu życia należy grupa schorzeń określanych często wspólnym mianem zespołu metabolicznego [1]. Termin ten nie ma co prawda jednoznacznej definicji, niemniej można posłużyć się kryterium WHO z 1991 roku, według którego zespół metaboliczny diagnozowany jest w sytuacji, gdy u pacjenta występują: podwyższony poziom glukozy we krwi na czczo lub oporność na insulinę lub cukrzyca typu 2 oraz minimum dwa z poniższych: nadciśnienie, dyslipidemia, otyłość lub mikroalbuminuria. Wystąpienie zespołu metabolicznego istotnie zwiększa ryzyko zapadania na choroby układu sercowo-naczyniowego, które z kolei odpowiedzialne są za blisko 50% wszystkich zgonów w populacji. Główna składowa zespołu metabolicznego – cukrzyca typu 2 jest już powszechnie określana mianem epidemii XXI wieku. Szacunkowe dane WHO wskazują, że obecnie na świecie na cukrzycę typu 2 choruje ponad 200 milionów ludzi, z czego połowa w Azji [2], a do roku 2030 liczba ta może ulec podwojeniu. WHO prognozuje, iż do 2030 roku w Polsce na cukrzycę zachoruje ponad 1,5 miliona ludzi. Obecnie, śmiertelność spowodowana chorobami będącymi następstwami cukrzycy typu 2 sięga już 5% wszystkich przyczyn zgonów na świecie.

Praktycznie wszystkie chroniczne choroby metaboliczne oraz choroby układu krążenia, jak choroba niedokrwienna serca, mogą zostać powiązane ze zjawiskiem stopniowej utraty wrażliwości na insulinę przez komórki wątroby, mięśni i tkanki tłuszczowej. Jest bezsporne, że insulinooporność jest głównym czynnikiem ryzyka w rozwoju cukrzycy typu 2 i otyłości. Stale

pogarszająca się wrażliwość na insulinę tkanek obwodowych, odpowiedzialnych za magazynowanie i metabolizowanie glukozy, prowadzi do pojawienia się hiperglikemii, a w późniejszym etapie do rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 oraz do wystąpienia powikłań naczyniowych i neurologicznych, które znacząco zwiększają zapadalność na inne choroby [3,4]. Wyjaśnienie przyczyn tego zjawiska to obecnie jedno z podstawowych wyzwań medycy.

Insulinooporność to stan, w którym dochodzi do upośledzenia działania insuliny. Charakteryzuje się on tym, że tkanki obwodowe nie mogą w odpowiedzi na hormon zwiększyć pobierania glukozy z krwi ani przyspieszyć tempa metabolizmu. Na tym etapie, komórki  $\beta$  trzustki nie są jeszcze w żaden sposób uszkodzone i reagują na podwyższony poziom glukozy we krwi syntetyzując i wydzielając insulinę. Jednakże, w sytuacji, kiedy tkanki docelowe nie reagują prawidłowo na sygnał przekazywany za pośrednictwem insuliny, krążąca glukoza nie jest przez nie pobierana i metabolizowana, nie dochodzi zatem do obniżenia jej stężenia we krwi. W efekcie wysypki  $\beta$  trzustki syntetyzują i wydzielają coraz większe ilości insuliny, co prowadzi w początkowej fazie do ich przerostu, a następnie obumierania [5]. Z drugiej strony, w wyniku stale utrzymujących się wysokich stężeń insuliny, tkanki obwodowe stają się coraz bardziej odporne na działanie tego hormonu, a to prowadzi do swoistego błędnego koła. Rozwijającej się insulinooporności towarzyszą nie tylko zaburzenia metaboliczne, ale także wiele innych schorzeń, jak udar mózgu, niealkoholowa choroba tłuszczowa wątroby (NAFLD, ang. *non-alcoholic fatty liver disease*), astma, niektóre nowotwory, zespół policystycznych jajników (PCOS, ang. *polycystic ovary syndrome*), a także choroba Alzheimera [4].

## DIAGNOSTYKA INSULINOOPORNOŚCI

Insulinooporność jest stanem, który trudno leczyć. Wydaje się, że najlepszym sposobem jest zwiększenie wysiłku fizycznego i stosowanie niskokalorycznej diety [6]. W wielu badaniach wykazano, że zmiana stylu życia skutkuje wyraźnym spowolnieniem rozwoju cukrzycy typu 2, a nawet może jej zapobiegać. Amerykańskie badanie w ramach programu DPP (ang. *Diabetes Prevention Program*) pokazało, że zmniejszenie masy ciała za ledwie o 7% chroni znacznie lepiej przed wystąpieniem cukrzycy typu 2 niż interwencja farmakologiczna [7,8]. Okazuje się jednak, że nakłonienie osób z grupy ryzyka do zmiany trybu życia nie jest łatwe. Z drugiej strony leki z grupy tiazolidynodionów, roziglitazon (Avandia) i pioglitazon (ACTOS), poprawiające wrażliwość tkanek obwodowych na insulinę poprzez aktywację receptorów jądrowych PPAR $\gamma$ , są wycofywane z terapii ze względu na liczne działania niepożądane, jak nadmierny rozrost tkanki tłuszczowej, obrzęki, czy wreszcie wysokie ryzyko sercowo-naczyniowe. Sytuację dodatkowo pogarsza fakt, że spadek wrażliwości na insulinę, który o wiele lat wyprzedza pełnoobjawową cukrzycę typu 2, jest trudny do wykrycia, a technika będąca „złotym standardem” w pomiarze insulinooporności – klamra hiperinsulinemiczna normoglikemiczna (ang. *hyperinsulinemic euglycemic*

*clamp*) – jest ze względów praktycznych niemożliwa do stosowania w populacyjnych badaniach przesiewowych [9].

Wszystkie metody oceny wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę polegają na jednoczesnej analizie stężeń glukozy i insuliny we krwi w różnych warunkach, przy czym można wyróżnić tu warunki fizjologiczne (podstawowe) oraz warunki, w których osobie badanej podaje się jednorazowo lub stale glukozę i/lub insulinę. Jedną z prostszych technik diagnostycznych służących do oceny oporności na insulinę jest pomiar stężenia insuliny i glukozy we krwi pacjentów, a następnie wyliczenie ilorazu stężenia insuliny do glukozy, gdzie wartość powyżej 0,3 świadczy o insulinooporności. Jednak metoda ta jest mało precyzyjna i nie uwzględnia zaburzeń endogennej wydzielania hormonu. Od wielu lat do oceny odpowiedzi organizmu na podwyższone stężenie glukozy stosuje się test doustnego obciążenia glukozą (OGTT), badanie które polega na podaniu dorosłej osobie 75 g glukozy i analizie szybkości i efektywności regulacji poziomu tego cukru we krwi przez endogenną insulinę. Innym podejściem jest test tolerancji insuliny (ITT), który polega na jednorazowym podaniu dożylnym insuliny w dawce 0,1 jednostki w przeliczeniu na kilogram masy ciała. W przypadku pogorszonej wrażliwości na insulinę obserwuje się jedynie nieznaczne obniżenie poziomu glukozy we krwi. Wielu lekarzy, w celu wyznaczenia poziomu insulinooporności, stosuje matematyczny model o nazwie HOMA (ang. *Homeostatic Model Assessment*), w którym na podstawie stężeń glukozy oraz insuliny mierzonych na czczo wylicza się współczynnik R. Wartość R równa jest iloczynowi stężenia glukozy (mmol/l) na czczo (FPG) i stężenia insuliny (Mu/l) na czczo (FIRI) podzielonemu przez 22,5. O insulinooporności świadczy wartość R wyższa od 1 [10].

Dwie najbardziej powtarzalne i wiarygodne metody określania insulinooporności to uważana za „złoty standard” wspomniana wcześniej klamra hiperinsulinemiczna normoglikemiczna oraz test supresji endogennej insuliny (IST). Test IST to badanie, w którym podaje się dożylnie ze stałą prędkością przez około 180 minut jednocześnie: glukozę, insulinę oraz somatostatynę, która hamuje endogenną produkcję insuliny. Stopień insulinooporności w tym badaniu określa się na podstawie poziomu glukozy we krwi oznaczonego w ciągu ostatniej godziny badania - im wyższa wartość stężenia glukozy, tym wyższa oporność na insulinę. W przypadku klamry podaje się dożylnie insulinę tak, aby utrzymać jej stałe stężenie we krwi oraz glukozę tak, aby utrzymać normoglikemii czyli fizjologiczne stężenie cukru we krwi. Insulinooporność w tym badaniu określa się na podstawie ilości podanej dożylnie glukozy. Klamra jest metodą bardzo powtarzalną, a zmienność oznaczanej insulinooporności nie przekracza 10% [9].

## MECHANIZM DZIAŁANIA INSULINY

Przekazywanie sygnału przez krążącą we krwi insulinę do wnętrza komórki jest skomplikowanym i mocno zintegrowanym procesem, w którym z chwilą związa-

nia hormonu do receptora tuż pod powierzchnią błony komórkowej, wokół jego domen cytoplazmatycznych, dochodzi do powstania dużego, białkowego kompleksu sygnałowego. Związanie insuliny prowadzi do dimeryzacji IR oraz aktywacji znajdujących się w cytoplazmie domen katalitycznych o aktywności kinaz tyrozynowych. W pierwszym etapie zachodzi autofosforylacja receptora a następnie fosforylacja białek substratowych, z których najważniejsze są białka IRS [11]. Fosforylowane w resztach tyrozyny białka IRS mogą uruchomić dwie główne ścieżki sygnałowe: ścieżkę kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K), która fosforyluje kinazę Akt i jest odpowiedzialna za metaboliczne działanie insuliny oraz ścieżkę prowadzącą od białka Ras do kinaz aktywowanych mitogenezem (MAPK). Ta druga ścieżka sygnałowa bierze udział w regulacji wyrażania genów zaangażowanych w kontrolę wzrostu i różnicowania komórek (Ryc. 1) [12].

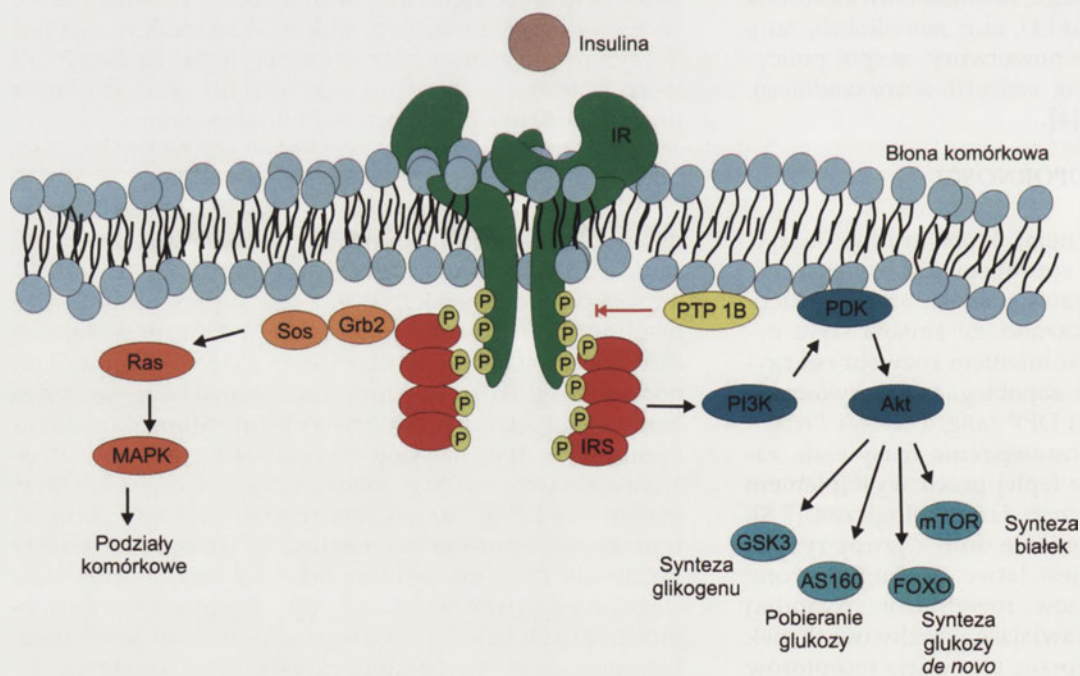
Wiązanie białek IRS do podjednostek regulatorowych kinazy PI3K, które zachodzi za pośrednictwem domeny SH2, powoduje aktywację kinazy, która fosforyluje 4,5 bisfosforan fosfatydyloinozytolu ( $PIP_2$ ) do trisfosforanu inozytolu ( $IP_3$ ). To z kolei prowadzi do aktywacji kinaz zależnych od  $IP_3$ -PDK-1 oraz PDK-2, a w końcu do aktywacji kinazy Akt/PKB oraz atypowych kinaz PKC ( $\gamma$  oraz  $\zeta$ ). W następnej kolejności kinaza Akt może katalizować fosforylację białka substratowego AS160, które stymuluje translokację transportera glukozy GLUT4 z pęcherzyków cytoplazmatycznych na powierzchnię błony komórkowej

i w ten sposób zwiększa zależny od insuliny transport glukozy do komórek. Coraz częściej przy transdukcji sygnału od receptora insulinowego do komórki mówi się o specyficznych, krytycznych dla całego procesu węzłach sygnałowych, w tym przypadku wyróżnia się trzy takie kompleksy: 1) receptor-białka IRS, 2) podjednostki regulatorowe-kinaza PI3K, a także 3) izoformy kinazy Akt/PKB [13]. Aktywność IR jest hamowana w wyniku defosforylacji katalizowanej przez specyficzną fosfatazę tyrozynową – PTP 1B [14].

## HIPOTEZY WYJAŚNIAJĄCE PRZYCZYNY POWSTAWANIA INSULINOOPORNOŚCI

Przyczyny powstawania insulinooporności są coraz lepiej poznane. Ważną rolę pełnią w tym procesie wolne kwasy tłuszczowe (FFA), których stężenie we krwi i, co istotniejsze, w tkankach obwodowych jest podwyższone u osób otyłych. Nadmierne nagromadzenie FFA w komórkach hamuje pobieranie glukozy za co odpowiedzialne jest nieprawidłowe funkcjonowanie szlaków sygnałowych regulowanych przez diacyloglicerol (DAG). Z kolei podwyższona aktywność kinaz serynowo-treoninowych indukowanych stresem (np. kinazy JNK) prowadzi do fosforylacji reszt seryny w białku IRS co blokuje działanie całej ścieżki przekazywania sygnału [15]. Wydaje się, że gromadzące się w organizmie FFA odgrywają szczególną rolę w przejściu od insulinooporności do pełnoobjawowej cukrzycy typu 2. Stwierdzono, że chroniczna

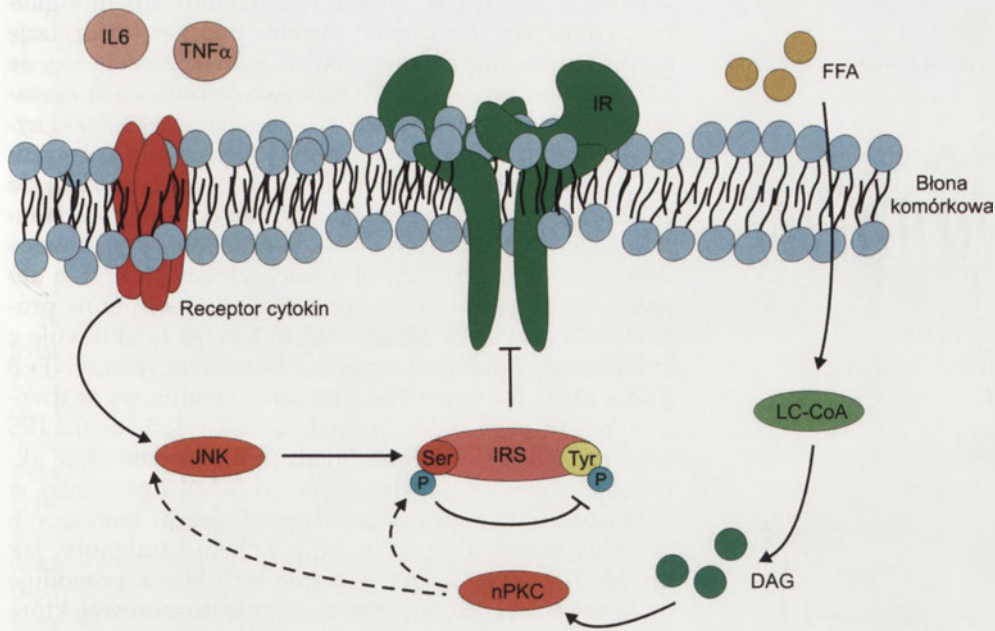
ekspozycja wysepek  $\beta$  trzustki na wysokie stężenia FFA prowadzi do ich odwracania i w konsekwencji zahamowania uwalniania insuliny [16]. Zmniejszenie wrażliwości tkanek na insulinę oraz będąca tego konsekwencją utrata normoglikemii coraz częściej kojarzone są także z zaburzeniami w funkcjonowaniu receptorów jądrowych z rodziny PPAR [17] oraz ze zmianami w wydzielaniu adipokiny (leptyny, adiponektyny, rezystyny) oraz cytokin prozapalnych (IL-6, TNF $\alpha$ ) przez rozrastającą się brzuszną tkankę tłuszczową [18,19].



**Rycina 1.** Mechanizm działania insuliny na poziomie komórkowym. Przyłączenie cząsteczki hormonu do receptora powoduje jego dimeryzację i autofosforylację reszt tyrozynowych w domenach cytoplazmatycznych. Następnie aktywny receptor katalizuje fosforylację reszt tyrozyny w białkach IRS, co może prowadzić do uruchomienia dwóch szlaków sygnałowych: w kierunku podziałów komórkowych lub w kierunku regulacji przemian metabolicznych (synteza białek, metabolizm glukozy). IR – receptor insulinowy; IRS – substrat receptora insulinowego; PTP 1B – fosfataza tyrozynowa 1B; PDK – kinaza zależna od inozytolotrisfosforanu ( $IP_3$ ); PI3K – kinaza 3 fosfatydyloinozytolowa; mTOR – kinaza serynowo-treoninowa mTOR; FOXO – czynnik transkrypcyjny FOXO; AS160 – substrat białkowy kinazy Akt; Akt – kinaza serynowo-treoninowa Akt; GSK3 – kinaza syntazy glikogenowej 3; Grb2 – białko adapterowe; Sos – białko adapterowe; Ras – produkt onkogenu *ras* o aktywności GTPazy; MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenezem.

## PRZEŁADOWANIE LIPIDAMI

Jedną z teorii powstawania oporności na insulinę w komórkach mięśni i wątroby jest hipoteza „przeładowania lipidami”, wśród któ-



**Rycina 2.** Centralna rola białka IRS w rozwoju insulinooporności. Fosforylacja reszty seryny białka IRS blokuje fosforylację reszty tyrozyny, a tym samym zatrzymuje sygnał od IR do wnętrza komórki. IL6 – interleukina 6; TNF $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu; IR – receptor insulinowy; FFA – wolne kwasy tłuszczowe; JNK – kinaza fosforylująca N-końcową część białka Jun; IRS – substrat receptora insulinowego; LC-CoA – koenzym A połączony z długolącuchowymi kwasami tłuszczowymi; DAG – diacyloglicerol; nPKC – nowe kinazy białkowe C.

rych kluczową rolę odgrywają wolne kwasy tłuszczowe. W wyniku nadmiernej ilości substancji odżywczych krążących w krwi i pobieranych przez komórki, dochodzi do nadmiernego zwiększenia tempa metabolizmu komórkowego (ang. *metabolic overload*), a w ślad za tym do nieprawidłowości w funkcjonowaniu enzymów mitochondrialnych i związanych z siateczką śródplazmatyczną (ER). Hipoteza „przeładowania lipidami” powstała już na początku lat 60. XX wieku, kiedy stwierdzono, że nadmierna ilość nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) prowadzi do zaburzeń metabolizmu lipidów, a co za tym idzie do nagromadzenia się acetylokoenzymu A w komórkach, co z kolei wpływa na aktywność kluczowych enzymów cyklu Krebsa i powoduje hamowanie procesu glikolizy [20]. Późniejsze badania pokazały jednak, że to nie metabolizm glukozy ulega upośledzeniu, ale jej transport do komórek mięśni i wątroby [21].

Obecnie uważa się, że główną przyczyną powstawania oporności na insulinę w komórkach mięśniowych i wątrobie jest swoiste rozprężenie metabolizmu kwasów tłuszczowych, cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego. W wyniku rosnącego stężenia lipidów w komórkach dochodzi do zwiększenia ekspresji genów enzymów szlaku beta oksydacji, natomiast efekt ten nie jest skorelowany ze wzrostem ekspresji genów i aktywności enzymów szlaku kwasów trikarboksylowych, co prowadzi do nagromadzenia się w mitochondriach metabolitów pochodzących z niepełnego utleniania lipidów. W efekcie zaburza to funkcję tych organelli prowadząc do zwiększonej syntezy wolnych rodników w komórce oraz aktywacji serynowo-treoninowych kinaz indukowanych stresem m.in. kinazy JNK. Dodatkowo w wątrobie, w wyniku nieprawidłowego utleniania kwasów tłuszczowych w mito-

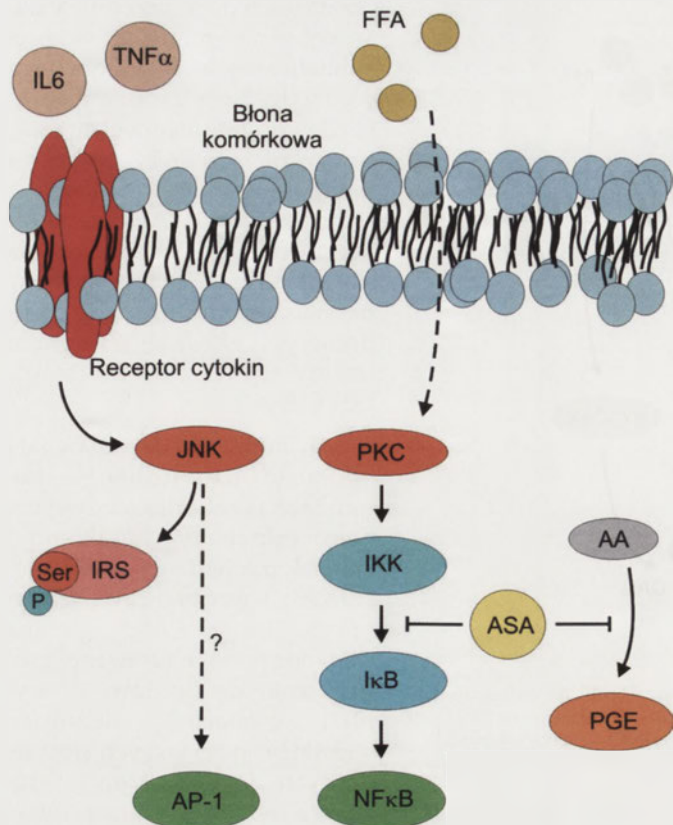
chondriach dochodzi do zwiększonej ponad miarę aktywności anabolicznej w ER, która prowadzi do powstawania nieprawidłowo sfałdowanych białek, co z kolei również aktywuje kinazy serynowo-treoninowe z rodziny JNK [3]. Aktywacja kinaz z rodziny JNK przyczynia się zaś do postawienia bloku w przekazywaniu sygnału insulinowego, głównie w wyniku fosforylacji reszt seryny białka IRS-1 (Ryc. 2).

Mechanizm powstawania oporności na insulinę w komórkach tkanki tłuszczowej ma nieco odmienny charakter od zjawisk zachodzących w mięśniach i wątrobie, choć w tym przypadku również główną rolę odgrywa nadmierne gromadzenie się lipidów. W wyniku nieustającego nadmiaru substancji odżywczych dostarczanych do organizmu i krążących w krwi, tkanka tłuszczowa pobiera i magazynuje zwiększone ilości lipidów, co

proceeds to jej nadmiernego rozrastania się. Hipertrofia tkanki tłuszczowej z jednej strony przyczynia się do niedotlenienia adipocytów w wyniku niewystarczająco szybkiego powstawania nowych naczyń krwionośnych, co prowadzi do stresu komórkowego i aktywacji wspomnianych wcześniej kinaz indukowanych stresem (JNK, PKC $\theta$ ), obumierania części komórek i infiltracji tkanki tłuszczowej przez komórki układu odpornościowego, m.in. makrofagi [22,23]. Z drugiej strony nadmierny rozwój tkanki tłuszczowej powoduje zaburzenia w wytwarzaniu adipokin, i tak wzrasta w krwi stężenie leptyny a maleje stężenie adiponektyny co bezpośrednio łączy się z powstawaniem oporności na insulinę i rozwojem cukrzycy typu 2 [19]. Dodatkowo, wiele nowych doniesień naukowych wskazuje, że syntetyzowane w tkance tłuszczowej adipokiny i cytokiny o właściwościach prozapalnych (m.in. rezystyna, IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF $\alpha$ ) mogą odpowiadać za wywoływanie insulinooporności w samych komórkach tłuszczowych ale także za rozprzestrzenianie się jej na inne tkanki w organizmie [24-26].

#### STAN ZAPALNY A INSULINOOPORNOŚĆ

Związek między występowaniem insulinooporności czy cukrzycy typu 2 a chronicznym stanem zapalnym w organizmie wydaje się niezaprzeczalny. Liczne badania wskazują, że w stanach otyłości pacjenci charakteryzują się podwyższonym poziomem w krwi zarówno cytokin prozapalnych (m.in. IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) jak i receptorów dla nich (m.in. IL-1R $\alpha$ , TNF $\alpha$ -R). Z drugiej strony, w badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych wykazano, że częściowe lub całkowite wyciszenie genów



Rycina 3. Szlaki przekazywania sygnałów zaangażowane w rozwój insulinooporności. Pod wpływem stanu zapalnego i nadmiaru FFA w komórkach tłuszczowych dochodzi do powstania stresu komórkowego i aktywacji dwóch ścieżek sygnałowych. Pierwszej związanej z rodziną kinaz JNK oraz drugiej z czynnikiem transkrypcyjnym NFκB. IL6 – interleukina 6; TNFα – czynnik martwicy nowotworu; FFA – wolne kwasy tłuszczowe; JNK – kinaza fosforylująca N-końcową część białka Jun; IRS – substrat receptora insulinowego; PKC – kinaza białkowa C; IKK – kinaza inhibitora czynnika transkrypcyjnego NFκB; IκB – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB; NFκB – czynnik transkrypcyjny; AP-1 – czynnik transkrypcyjny; ASA – kwas acetylosalicylowy; AA – kwas arachidonowy; PGE – prostaglandyny.

kodujących TNFα lub IL-1α, lub też wyciszenie genu kodującego jedną z kinaz indukowanych stresem - JNK-1, która ulega aktywacji pod wpływem m.in. czynników prozapalnych, skutkuje zwiększeniem wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę [19,23]. Tak zmodyfikowane genetycznie myszy hodowane na wysokotłuszczowej diecie charakteryzowały się niższym poziomem zarówno glukozy w osoczu jak i insuliny niż myszy, u których ekspresja wyżej wymienionych genów nie była zmieniona. Jak wspomniano, szczególnie związek z powstawaniem insulinooporności wydaje się mieć lokalny stan zapalny w rozrastającej się tkance tłuszczowej. Wykazano, że pod wpływem gromadzących się lipidów (szczególnie FFA) dochodzi w adipocytach do powstania stresu komórkowego i aktywacji dwóch ścieżek sygnałowych: (1) związanej z rodziną kinaz JNK oraz (2) z czynnikiem transkrypcyjnym NFκB (Ryc. 3) [23,27].

W otyłości obserwuje się podwyższoną aktywność kinaz JNK w wątrobie, tkance mięśniowej i w adipocytach, a więc w tych tkankach i narządach, w których rozwój insulinooporności ma największe znaczenie epidemiologiczne. Kinazy te biorą udział w regulacji wielu procesów

związanych z rozwojem i funkcjonowaniem komórek, a działanie to zachodzi głównie poprzez fosforylację czynnika transkrypcyjnego AP-1, jednak wydaje się, że ich udział w powstawaniu insulinooporności jest niezależny od fosforylacji AP-1. Uruchomienie tej ścieżki sygnałowej prowadzi do zmienionej fosforylacji substratu dla receptora insulinowego, IRS-1, a co za tym idzie do zablokowania przekazywania sygnału od receptora insulinowego (IR) do innych białek tego szlaku sygnałowego (Ryc. 2). Niezależnie od aktywacji kinazy JNK stan zapalny oraz zwiększone tempo metabolizmu lipidów prowadzi do aktywacji kinazy PKCθ. Kinaza ta aktywuje z kolei kinazę inhibitora czynnika transkrypcyjnego NFκB (IKK), która może wpływać na szlak insulinowy w dwójaki sposób: poprzez bezpośrednią fosforylację białka IRS lub fosforylację inhibitora NFκB (IκB), co powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB i prowadzi w adipocytach do zwiększonej ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne, adipokiny i chemoatraktanty, jak np. MCP-1 (Ryc. 3). Wydzielanie tych białek powoduje m. in. rekrutację monocytów do tkanki tłuszczowej, które różnicują w niej w osiadłe makrofagi przyczyniając się do dalszego zwiększonego wydzielania cytokin prozapalnych [23]. Efektem tego swoistego błędnego koła jest powstanie insulinooporności najpierw w komórkach tkanki tłuszczowej, a następnie w innych tkankach i narządach, z których szczególne znaczenie mają wątroba i mięśnie [24].

#### CENTRALNA ROLA BIAŁKA IRS

W początkowych badaniach nad insulinoopornością uważano, że utrata wrażliwości tkanek na insulinę wiąże się z odwrażliwieniem receptora insulinowego. Dopiero w latach 80. XX wieku wykazano, że defekt prowadzący do powstania oporności na insulinę nie jest związany z samym receptorem insulinowym, ale z nieprawidłowym przekazywaniem sygnału na dalszych etapach ścieżki. Jedną z aktualnych hipotez przypisuje odpowiedzialność za hamowanie przekazywania sygnału insulinowego niewłaściwej z punktu widzenia działania całego szlaku fosforylacji białek będących substratami dla receptora insulinowego (IRS 1-4), a w szczególności IRS-1. Białka z rodziny IRS mogą ulegać zarówno fosforylacji w resztach tyrozyny jak i resztach seryny. Fosforylacja reszt tyrozyny katalizowana przez domeny katalityczne IR powoduje, że białka z rodziny IRS łączą się z kolejnymi białkami efektorowymi na szlaku przekazywania sygnału insulinowego (m.in. z kinazą 3 fosfatydyloinozytolu), natomiast fosforylacja reszt seryny prowadzi do przerwania sygnału, co może wynikać albo z oddysocjowania IRS od IR i skierowania IRS na drogę degradacji, albo z braku możliwości przyłączenia się do IRS innych białek efektorowych (Ryc. 2) [28,29].

Mechanizm powstawania insulinooporności, w którym kluczową rolę odgrywają białka z rodziny IRS jest w świetle najnowszych badań elementem łączącym dwie opisane wcześniej hipotezy, czyli powstawania oporności na insulinę pod wpływem „przeładowania lipidami” i w efekcie rozwoju stanu zapalnego. Zarówno w wyniku nagromadzenia się substancji pochodzących z nieprawidłowo-



wego metabolizmu lipidów (m.in. DAG) jak i zwiększonej syntezy wolnych rodników w komórce a także aktywacji receptorów dla cytokin pro-zapalnych dochodzi do aktywacji wspomnianych wcześniej kinaz serynowych z rodziny kinaz indukowanych stresem, m.in. kinazy JNK-1. Kinazy te odpowiadają m. in. za fosforylację białka IRS-1 w resztach seryny znajdujących się w pozycjach 302 i 307, co uniemożliwia fosforylację przez receptor insulinowy w resztach tyrozyny i w efekcie prowadzi do zahamowania przekazywania sygnału insulinowego [4].

Niezależnie od „wykluczenia” białka IRS ze szlaku insulinowego poprzez brak fosforylacji w resztach tyrozyny może dochodzić do jego przyspieszonej degradacji. Uważa się, że kluczową rolę w tym procesie pełnią białka regulatorowe z rodziny SOCS, które stymulują przyłączanie reszt ubikwityny do białek IRS kierując je tym samym na drogę proteolitycznej degradacji w proteosomach [30]. Dodatkowo wykazano, że białka SOCS-1 oraz SOCS-3 mogą wiązać się bezpośrednio do receptora insulinowego w pozycji 960 gdzie znajduje się reszta tyrozyny zaangażowana w rozpoznawanie białek IRS przez receptor blokując w ten sposób tworzenie kompleksu sygnałowego [31].

Białka SOCS są odpowiedzialne za wygaszanie sygnału pochodzącego od różnych cytokin, m.in. o działaniu prozapalnym. Wykazano, że poziom syntezy tych białek ulega zwiększeniu w stanach zapalnych, i stanowi pewnego rodzaju mechanizm autoregulacyjny w obrębie układu odpornościowego opierający się o zasadę ujemnego sprzężenia zwrotnego – nadmierna synteza cytokin prowadzi do zwiększonej syntezy białek SOCS, które hamują ich działanie. Zwiększony poziom białek SOCS obserwowany jest również w stanach insulinooporności [32].

## PERSPEKTYWY TERAPEUTYCZNE

Jedną z możliwości terapeutycznych, mających na celu zapobieganie powstawaniu insulinooporności, jest selektywne zwiększenie spalania kwasów tłuszczowych w adipocytach. Próbuje się to osiągnąć poprzez zwiększenie aktywności kinazy aktywowanej przez AMP (AMPK) bądź karboksylazy acetylokoenzymu A (ACC). Innym sposobem jest wydłużenie czasu aktywności receptora insulinowego poprzez hamowanie wyłączającej go fosfatazy PTP1B. W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie zyskują jednak badania, w których celami terapeutycznymi stają się czynniki prozapalne lub ich receptory bądź białka ze ścieżek sygnałowych związanych z tymi receptorami, kinazy z rodziny JNK, kinaza PKC $\theta$ , czy czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B. Próbuje się m. in.: (1) blokowania receptorów dla TNF $\alpha$  przy pomocy przeciwciał; (2) obok głównego mechanizmu ich działania, wykorzystania przeciwzapalnych właściwości aktywatorów receptorów z rodziny PPAR; (3) wykorzystania przeciwzapalnych właściwości statyn (choć dotąd nie udało się wykazać w badaniach klinicznych ich wpływu na insulinooporność); (4) wykorzystania nie acetylowanych salicylanów (Ryc. 3), których efektywność jest obecnie testo-

wana w badaniach klinicznych u pacjentów z cukrzycą typu 2 (np. Trilisate, Disalcid) [18,33].

## PIŚMIENNICTWO

1. Gupta A, Gupta V (2010) Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Biosci Trends* 4: 204-212
2. Chan JC, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS, Yoon KH, Hu FB (2009) Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA* 301: 2129-2140
3. Muoio DM, Newgard CB (2008) Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 193-205
4. Taubes G (2009) Prosperity's Plague. *Science* 325: 256-260
5. Saltiel AR (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517-529
6. O'Keefe JH, Abuannadi M (2010) Dietary strategies for the prevention & treatment of metabolic syndrome. *Mo Med* 107: 406-409
7. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S; Diabetes Prevention Program Research Group (2005) The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142: 611-619
8. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403
9. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237: E214-223
10. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419
11. Choi K, Kim YB (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25: 119-129
12. Kasuga M (2006) Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116: 1756-1760
13. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
14. Kasibhatla B, Wos J, Peters KG (2007) Targeting protein tyrosine phosphatase to enhance insulin action for the potential treatment of diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 8: 805-813
15. Boden G (2002) Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 545-549
16. Subauste A, Burant CF (2003) DGAT: novel therapeutic target for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3: 263-70
17. Fuentes L, Roszer T, Ricote M (2010) Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. *Mediators Inflamm* 2010: 219583
18. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801
19. Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119
20. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789
21. Petersen KF, Shulman GI (2002) Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90: 11G-18G
22. Schuster DP (2010) Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 3: 253-262
23. Permana PA, Menge C, Reaven PD (2006) Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 507-514

24. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169-2180
25. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP (2008) Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34: 2-11
26. Haque WA, Garg A (2004) Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med* 24: 217-34
27. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R (2003) Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 228: 1111-1117
28. Boura-Halfon S, Zick Y (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: 581-591
29. Hanke S, Mann M (2008) The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics* 8: 519-534
30. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277: 42394-42398
31. Ueki K, Kondo T, Kahn CR (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24: 5434-5446
32. Krebs DL, Hilton DJ (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113: 2813-2819
33. Goldfine AB, Fonseca V, Shoelson SE (2011) Therapeutic approaches to target inflammation in type 2 diabetes. *Clin Chem* 57: 162-167

## The mechanism of insulin resistance in peripheral tissues

Joanna Pawlak<sup>1</sup>, Rafał Andrzej Derlacz<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Research and Development Department, Adamed Sp. z o.o., Pienkow 149, 05-152 Czosnow, Poland

<sup>2</sup>Department of Metabolic Regulation, Institute of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warsaw, Poland

✉e-mail: rderlacz@biol.uw.edu.pl or rafal.derlacz@adamed.com.pl

**Key words:** insulin, insulin resistance, inflammation, IRS-1, JNK kinase

### ABSTRACT

Chronic metabolic and cardiovascular diseases, described as the epidemics of XXI century, are connected to the resistance of peripheral tissues, such as liver, muscle and fat, to insulin. Insulin resistance, which precedes the development of type 2 diabetes by several years, is difficult to diagnose, mainly because of practical limitations to the use of "gold standard" hyperinsulinemic euglycemic clamp technique for screening. It is also begins a certain vicious circle, in which insulin resistant peripheral tissues force pancreatic beta cells to increased insulin release, and sustained high concentrations of insulin cause further development of insulin resistance. Currently, there are two major hypotheses describing the mechanism of insulin resistance: one relating to the "lipid overload" in liver and muscle cells as the key factor and another one emphasizing the role of lipid accumulation in adipocytes, which leads to the overgrowth of fatty tissue and chronic local inflammation.

# Receptory jądrowe PPAR jako miejsce działania leków w zaburzeniach metabolicznych

## STRESZCZENIE

Receptory jądrowe regulują wiele podstawowych funkcji komórek, a nieprawidłowości w ich działaniu prowadzą do poważnych zaburzeń metabolicznych, otyłości i wreszcie cukrzycy typu 2. Najlepiej poznanymi pod względem ich wykorzystania w terapii są receptory PPAR będące czynnikami transkrypcyjnymi warunkującymi prawidłowy metabolizm glukozy i lipidów, wrażliwość tkanek na insulinę, przebieg procesów zapalnych, odpowiedź immunologiczną oraz podziały i różnicowanie komórek. Obecnie w medycynie w terapii cukrzycy typu 2 stosowane są tiazolidinediony (TZDs) działające przez receptory PPAR $\gamma$  oraz w leczeniu dyslipidemii fibraty będące aktywatorami receptorów PPAR $\alpha$ . Strategia poszukiwania nowych leków działających przez receptory PPAR polega na projektowaniu zupełnie nowych tkankowo-specyficznych cząsteczek, selektywnie modulujących aktywność wybranych receptorów, tzw. selektywnych modulatorów aktywności (S $\nu$ RM), które dzięki dużej wybiórczości nie będą powodowały działań niepożądanych charakterystycznych dla tzw. pełnych agonistów.

## WPROWADZENIE

Receptory jądrowe (NR, ang. *nuclear receptors*) tworzą nadrodzinę filogenetycznie powiązanych białek, które są czynnikami transkrypcyjnymi zależnymi od liganda. W większości wiążą lipofilne cząsteczki sygnałowe, produkty metabolizmu kwasów tłuszczowych o różnych właściwościach, choć są i takie dla których nie udało się zidentyfikować naturalnych ligandów, te NR zaliczane są do podrodziny receptorów sierocych [1,2].

NR regulują szeroki zakres fizjologicznych funkcji komórek a nieprawidłowości w przekazywaniu sygnału za ich pośrednictwem prowadzą do zaburzeń płodności, otyłości, cukrzycy, zaburzeń funkcjonowania układu odpornościowego i rozwoju stanów zapalnych [3], a także mogą powodować nowotworzenie [4]. Strategia poszukiwania nowych leków, które mogłyby działać za pośrednictwem NR polega na projektowaniu związków będących analogami naturalnych ligandów, które dodatkowo wykazują tkankowo-specyficzne działanie i selektywnie modulują aktywność wybranych NR. Są to tzw. selektywne modulatory aktywności (S $\nu$ RM, ang. *selective nuclear receptor modulators*), które dzięki dużej wybiórczości nie powodują działań niepożądanych obserwowanych przy silnej i mało specyficznej aktywacji NR [5]. Obecnie w medycynie wykorzystywanych jest wiele związków o działaniu agonistycznym lub antagonistycznym w stosunku do NR, takich jak: stosowany w terapii raka piersi tamoxifen działający przez receptor estrogenów, tiazolidinediony działające przez receptory PPAR $\gamma$  i stosowane w terapii cukrzycy typu 2, fibraty będące aktywatorami receptora PPAR $\alpha$  stosowane w leczeniu dyslipidemii oraz deksametazon, agonista receptorów glikokortykoidów stosowany w chorobach zapalnych [6,7].

## BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA RECEPTORÓW JĄDROWYCH

Wszystkie receptory jądrowe wykazują podobną budowę (Ryc. 1). Na końcu aminowym cząsteczki białka, w obrębie rejonu A/B, niektóre NR zawierają przynajmniej jedną stale aktywną domenę transaktywacyjną niezależną od liganda, zwaną AF-1 (ang. *activation function helix 1*). Domena ta, aktywowana sygnałami pochodzącymi od czynników wzrostowych [1], charakteryzuje się różną długością i sekwencją reszt aminokwasowych i jest rozpoznawana przez koaktywatory i/lub inne czynniki transkrypcyjne. Najbardziej zachowanym w ewolucji rejonem NR jest domena C, która odpowiada za specyficzność wiązania z DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*). Jest ona kluczowa zarówno dla homo-, jak i heterodimeryzacji receptorów. Zazwyczaj składa się z 70 reszt aminokwasowych i zawiera 2 motywy palca cynkowego, które są charakterystyczne dla całej rodziny NR, z wyjątkiem receptorów DAX1 i SHP [7]. Kolejna domena, określana jako D jest elastycznym rejonem zawiasowym znajdującym się między domeną

Marta Stolarczyk<sup>1</sup>

Wojciech Gutman<sup>2</sup>

Rafał A. Derlacz<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, Warszawa  
<sup>2</sup>Dział Badawczo-Rozwojowy, Adamed Sp. z o.o., Piętków, Czosnów

✉Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 55 43 209, e-mail: rderlacz@biol.uw.edu.pl lub Dział Badawczo-Rozwojowy, Adamed Sp. z o.o., Piętków 149, 05-152 Czosnów; tel.: (22) 73 27 864, e-mail: rafal.derlacz@adamed.com.pl

Artykuł otrzymano 14 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** cukrzyca typu 2, PPAR, receptory jądrowe, roziplitazon,

**Wykaz skrótów:** NR – receptory jądrowe; PPAR – receptory aktywujące proliferację peroksisomów; LBD – domena wiążąca ligand



Rycina 1. Strukturalna organizacja funkcjonalnych domen NR (opis w tekście).

wiążącą DNA i domeną E wiążącą ligand (LBD, ang. *ligand binding domain*). Rejon zawiasowy zawiera sygnał lokalizacji jądrowej oraz służy jako miejsce przyłączania różnych białek. Znajdująca się na końcu karboksylowym domena E odpowiada za rozpoznawanie specyficznego liganda oraz uczestniczy w oddziaływaniach z różnymi koaktywatorami lub korepresorami transkrypcji. Jest ona C-końcową helisą (12 $\alpha$ ) i zawiera kluczowy dla regulacji działania NR rejon transaktywacyjny zależny od liganda, zwany AF-2. Domena ta charakteryzuje się małą zmiennością w obrębie rodziny NR i składa się zazwyczaj z 250 reszt aminokwasowych, ale różnice w sekwencji są wystarczające dla selektywnego rozpoznawania ligandów i dlatego stanowi główny cel w badaniach nad nowymi lekami. Niektóre receptory należące do nadrodziny NR zawierają dodatkową domenę F zlokalizowaną na końcu karboksylowym, której sekwencja reszt aminokwasowych jest niezwykle różnorodna, a jej struktura i funkcje dotychczas nie zostały poznane [2,7].

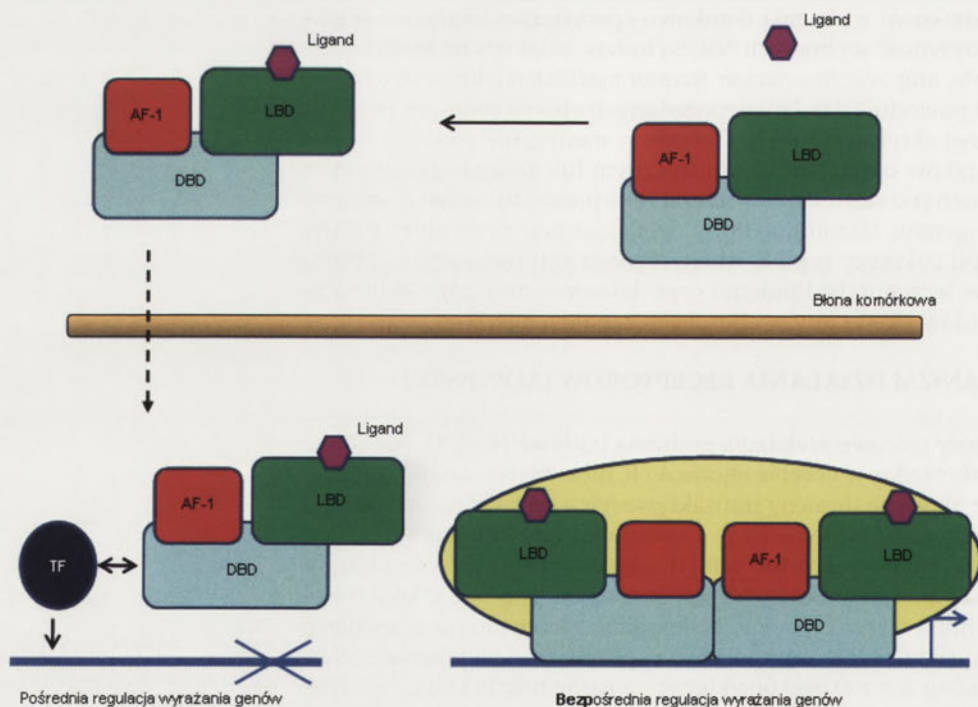
Receptory jądrowe mogą działać jako a) monomery, np. czynnik steroidogenny 1 (SF-1, ang. *steroidogenic factor-1*); b) homodimery, np. receptory androgenów (AR, ang. *androgen receptor*), progesteronu (PR, ang. *progesterone receptor*), glikokortykoidów (GR, ang. *glucocorticoid receptor*), mineralokortykoidów (MR, ang. *mineralocorticoid receptor*), estrogenów (ER, ang. *estrogen receptor*) lub c) heterodimery z różny-

mi receptorami X (RXR, ang. *retinoid X receptor*) [8]. Jako heterodimery działają receptory hormonów tarczycy (TR, ang. *thyroid receptor*), witaminy D (VDR, ang. *vitamin D receptor*), kwasu retinowego (RAR), receptory aktywujące proliferację peroksisomów (PPAR, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*), receptory konstytutywne androstanów (CAR, ang. *constitutive androstane receptor*), receptor pregnanu X (PXR, ang. *pregnane X receptor*) oraz kilka receptorów sierocych [1,4,9].

Receptory jądrowe oprócz podobnej struktury wykazują także zbliżony mechanizm działania na poziomie regulacji wyrażania genów docelowych. Przy braku liganda receptor jądrowy związany jest z korepresorem tworząc nieaktywny kompleks receptor:korepresor. Związanie liganda w obrębie domeny LBD indukuje zmiany konformacyjne receptora, które prowadzą do odłączenia korepresora i homo- lub heterodimerizacji receptorów, a w efekcie do związania koaktywatora transkrypcji. Kompleks homodimer:koaktywator albo heterodimer:koaktywator wiąże się do specyficznych sekwencji nukleotydowych w DNA, zwanych elementami odpowiedzi, a znajdujących się w obrębie promotora genów docelowych, regulując ich aktywność (Ryc. 2) [1,3]. Specyficzne elementy odpowiedzi DNA zawierają zwykle sekwencję RGGTCA, w której R oznacza zasadę purynową [4]. Większość receptorów (na przykład GR czy PPAR) w odpowiedzi na wiązanie liganda przemiesza się z cytoplazmy do jądra, ale są też receptory, które nawet pod nieobecność liganda lokują się w jądrze komórkowym [7].

## RECEPTORY JĄDROWE PPAR

Jądrowe receptory PPAR to czynniki transkrypcyjne, których stymulacja wpływa na metabolizm glukozy i lipidów,



Rycina 2. Bezpośredni i pośredni mechanizm działania NR. Niektóre receptory jądrowe nie związane z ligandem (np. receptory steroidowe) znajdują się cytoplazmie gdzie są nieaktywne. Związanie liganda powoduje przemieszczenie się NR do jądra komórkowego, gdzie po przyłączeniu do elementów odpowiedzi DNA w obrębie promotora genów docelowych dochodzi do indukcji bądź hamowania ich aktywności. Homo- lub heterodimer przyłącza koaktywatory i/lub korepresory oraz inne czynniki transkrypcyjne tworząc kompleks transkrypcyjny bezpośrednio odpowiedzialny za regulację wyrażania genów.

wrażliwość tkanek na insulinę, przebieg procesów zapalnych, odpowiedź układu odpornościowego oraz podziały i różnicowanie komórek. Pierwsze receptory PPAR zostały odkryte w 1990 roku w komórkach wątroby i określone mianem PPAR $\alpha$  [10]. Od tego czasu sklonowano i scharakteryzowano trzy rodzaje receptorów –  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  oraz  $\gamma$  [11]. U ludzi PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  i PPAR- $\gamma$  kodowane są przez geny zlokalizowane odpowiednio na 22, 6 i 3 chromosomie. Zidentyfikowano także co najmniej trzy warianty receptora PPAR $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ), które powstają na drodze alternatywnego składania mRNA [11]. Badania filogenetyczne wykazały, że receptory PPAR należą do pierwszej podrodziny, w której tworzą grupę C, a w obrębie grupy wyróżnia się trzy podtypy: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) oraz PPAR $\gamma$  (NR1C3). Geny PPAR $\alpha$  ulegają silnej ekspresji w narządach, których komórki zawierają dużo mitochondriów: wątrobie, korze nerki, błonie śluzowej jelita i sercu, ale także w mniejszym stopniu w komórkach innych narządów. PPAR $\gamma$  i  $\beta/\delta$  wydają się być wyrażane na niższym poziomie niemal we wszystkich tkankach [9,11,12].

Choć receptory PPAR charakteryzują się wysoką zgodnością na poziomie sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej, wiążą różne ligandy wywołujące odmienne efekty biologiczne. Ich aktywatorami są związki pochodzenia naturalnego (kwas arachidonowy, pochodne kwasów tłuszczowych, prostaglandyny) oraz syntetycznych (tiazolidinidiony, fibraty, pochodne kwasu fenylopropionowego). Należące do tiazolidinidionów rosiglitazon i pioglitazon oraz niektóre prostaglandyny aktywują PPAR $\gamma$ , fibraty oraz kwasy tłuszczowe i ich pochodne aktywują PPAR $\alpha$ , podczas gdy PPAR $\beta/\delta$  ulega aktywacji w odpowiedzi na kwas arachidonowy i jego pochodne.

Receptory PPAR biorą udział w patogenezie grupy chorób określanых wspólnym mianem tzw. zespołu metabolicznego, poprzedzającego pojawienie się cukrzycy typu 2, a charakteryzującego się utratą wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę i będącą tego konsekwencją hiperinsulinemią, zaburzeniem metabolizmu glukozy, otyłością, dyslipidemią, nadciśnieniem, miażdżycą tętnic, mikroalbuminurią oraz nadkrzepliwością [11,12]. Fibraty będące agonistami PPAR $\alpha$  stosowane są jako leki normalizujące poziom lipidów [6], podczas gdy tiazolidinidiony (TZDs) aktywujące PPAR $\gamma$  są stosowane w leczeniu cukrzycy typu 2. Coraz więcej dowodów świadczy o możliwości stosowania ligandów PPAR $\beta/\delta$  jako związków zwiększających wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę i normalizujących zaburzenia poziomu lipidów. Dodatkowo różne ligandy PPAR są uważane za związki o potencjalnie dużym znaczeniu terapeutycznym w leczeniu nadciśnienia, miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych, nefropatii, stanów zapalnych [13, 14].

## DZIAŁANIE RECEPTORÓW PPAR

Receptory PPAR wywołują w komórce złożone efekty biologiczne wynikające z transaktywacji lub transrepresji licznych genów [15,16]. Jak już wspomniano PPAR są receptorami zależnymi od ligandów, jednak połączenie liganda z receptorem nie prowadzi do jego pełnej aktywacji. Transaktywacja wymaga aktywowanej ligandem dimeryza-

cji receptora PPAR z receptorem retinoidowym  $X\alpha$  (RXR $\alpha$ ), a powstający heterodimer rozpoznaje i wiąże odpowiedni fragment DNA (PPRE, ang. *PPAR-response element*) prowadząc do aktywacji konkretnych genów. Dodatkowo działanie PPAR może być modyfikowane przez szereg białek, których obecność nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania receptora, jednak może zmniejszać lub wzmacniać aktywność transkrypcyjną. Formowanie specyficznych kompleksów między heterodimerem PPAR:RXR, a koaktywatorami i korepresorami zależne jest od typu komórki, zmian konformacyjnych wynikających ze związania liganda, a także sekwencji elementów wiążących DNA. Ten poziom kompleksowości umożliwia dostosowywanie fizjologicznej odpowiedzi i tłumaczy różnorodność zmian w ekspresji genów podczas aktywacji receptora różnymi ligandami [17].

Pod nieobecność liganda heterodimery PPAR:RXR tworzą nieaktywne kompleksy z korepresorami takimi, jak: NcoR, RIP140 czy SMRT, które hamują transkrypcję na skutek rekrutacji deacetylazy histonów (HDACs, ang. *histone deacetylases*). Po związaniu liganda następują zmiany konformacyjne receptora powodujące odłączenie korepresorów i rekrutację koaktywatorów np. PGC-1 czy kompleksu P300/CBP [14,17,18]. Izoformy PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$  charakteryzują się mało zmienną ewolucyjnie domeną wiążącą DNA, która rozpoznaje specyficzne sekwencje nukleotydowe PPRE będące powtórzeniami sekwencji AGGTCA oddzielonymi jednym - DR1 (6-N-6) lub dwoma nukleotydami - DR2 (6-NN-6) [19].

Receptory PPAR oprócz indukowania ekspresji genów docelowych pośredniczą także w ich blokowaniu na skutek transrepresyjnego hamowania aktywności kluczowych czynników transkrypcyjnych. Transrepresja może następować w wyniku bezpośredniej interakcji białko-białko albo przez przyłączanie kofaktorów niezbędnych do aktywności danych czynników transkrypcyjnych. W taki sposób PPAR- $\alpha$  i PPAR- $\gamma$  oddziałują z wpływającymi na transkrypcję genów czynnikami NF $\kappa$ B i AP-1. Proces transrepresji może zachodzić w sposób niezależny od obecności ligandów [16].

## RECEPTOR PPAR $\alpha$

Gen kodujący receptor PPAR $\alpha$  ulega ekspresji w komórkach charakteryzujących się wysoką zdolnością utleniania kwasów tłuszczowych: wątrobie, korze nerek, sercu, mięśniach szkieletowych [10], ale wykazano również jego ekspresję w enterocytach, komórkach śródbłonna oraz komórkach układu odpornościowego [20-22]. W mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym zwiększone wyrażanie PPAR $\alpha$  aktywuje geny odpowiedzialne za transport, pobieranie i utlenianie kwasów tłuszczowych [23]. Aktywacja PPAR $\alpha$  pośrednio, na skutek aktywacji kinazy dehydrogenazy pirogronianowej 4 (PDK4), podnosi także stężenie glukozy w wątrobie w mięśniach szkieletowych i sercu zarówno u gryzoni jak i człowieka [24]. Aktywacja PPAR $\alpha$  obok przyspieszania metabolizmu kwasów tłuszczowych w różnych tkankach, poprawia także profil lipidów w surowicy. Przyczynia się do zwiększenia poziomu apolipoproteiny I (apoA1) i apo-

lipoproteiny II (apoAII), co w efekcie podnosi stężenie frakcji HDL (ang. *high density lipoproteins*) o właściwościach kardioprotekcyjnych, zmniejsza natomiast stężenie apolipoproteiny CIII hamującej rozpad triglicerydów za pośrednictwem LPL (ang. *lipoprotein lipase*), i obniża tym samym poziom triglicerydów w surowicy [25,26]. Sugeruje się również udział PPAR $\alpha$  w zwiększaniu wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę, na co wskazują badania z udziałem mysich modeli oporności na insulinę, u których utratę wrażliwości na ten hormon indukowano dietą wysokotłuszczową. Aktywacja PPAR $\alpha$  u tych gryzoni nie tylko znacząco poprawiała insulinowrażliwość, ale także obniżała lipotoksyczność [27,28].

Do naturalnych ligandów receptora PPAR $\alpha$  możemy zaliczyć prostaglandyny, leukotrieny, wolne kwasy tłuszczowe, zarówno długołańcuchowe jak i te o średniej długości, jak kwas eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksanowy (DHA) [7,10], które aktywują receptor PPAR $\alpha$  w stężeniach mikromolowych. Niedawno zidentyfikowano 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicerol-3-fosfocholinę (16:0/18:0 GPC) będącą naturalnym wątrobowym ligandem PPAR $\alpha$ , charakteryzującym się wysokim powinowactwem i selektywnością względem receptora [29]. Syntetyczne ligandy należące do grupy fibratów (gemfibrozil, clofibrat, fenofibrat, bezafibrat) normalizujące poziom lipidów w surowicy wykorzystywane są w leczeniu zaburzeń metabolicznych towarzyszących dyslipidemii. Ostatnio wykazano, że fenofibrat i bezafibrat mogą stanowić bardzo dobre uzupełnienie terapii statynami w przypadku leczenia dyslipidemii aterogennej [6]. Co więcej wskazuje się także na możliwość wykorzystania fibratów w leczeniu zaburzeń układu sercowo-naczyniowego, a potwierdzają to wyniki uzyskane na modelach zwierzęcych, gdzie obserwowano zwiększenie tempa utleniania kwasów tłuszczowych, poprawę funkcję śródbłonna naczyń, a także zmniejszenie stopnia zwłóknienia i przerostu miokardium [30,31].

## RECEPTOR PPAR $\gamma$

Receptor PPAR $\gamma$  został odkryty dzięki jego podobieństwu do PPAR $\alpha$ . Jest on najintensywniej badany i najlepiej poznanym receptorem jądrowym. Kodujący go gen posiada 3 izoformy korzystające z 3 różnych promotorów i podlegające alternatywnemu składaniu: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3, jednak dokładne analizy transkryptów PPAR $\gamma$ 1 i PPAR $\gamma$ 3 wykazały, że obydwa tłumaczone są na to samo białko PPAR $\gamma$ 1, które w porównaniu z białkiem PPAR $\gamma$ 2 jest na końcu aminowym krótsze o 30 aminokwasów [14,32,33]. Gen PPAR $\gamma$  ulega ekspresji głównie w tkance tłuszczowej białej (WAT) i brunatnej (BAT), w mniejszym stopniu w komórkach układu odpornościowego (monocyty, makrofagi, komórki Peyera w układzie trawiennym), w błonie śluzowej okrężnicy i jelita ślepego oraz w łożysku, komórkach błony śluzowej macicy oraz jajnikach. Obserwuje się jego niewielkie występowanie w mięśniach szkieletowych. Należy zwrócić uwagę na odmienny profil ekspresji różnych izoform PPAR $\gamma$ . PPAR- $\gamma$ 1 jest wyrażany w niemal wszystkich tkankach, podczas gdy PPAR $\gamma$ 2 głównie w tkance tłuszczowej białej, w której stanowią około 30% populacji receptorów PPAR $\gamma$  natomiast PPAR $\gamma$ 3 przede wszystkim w jelicie grubym i makrofagach [14].

PPAR $\gamma$  odgrywa szczególnie istotną rolę podczas regulacji powstawania tkanki tłuszczowej, gdzie jest odpowiedzialny za różnicowanie adipocytów i ich prawidłowe funkcjonowanie, a także magazynowanie lipidów oraz glikozy w dojrzałej tkance tłuszczowej [14,34,35]. Wykazano również, że PPAR $\gamma$  zwiększa poziom białka należącego do rodziny angiopoetyn (PGAR, ang. *PPAR $\gamma$  angiopoietin-related protein*), co sugeruje udział w angiogenezie [36]. PPAR $\gamma$  reguluje proliferację komórek, ich różnicowanie i wejście w apoptozę w wielu tkankach i narządach, takich jak: gruczoł piersiowy, okrężnica, płuca, jajniki, gruczoł krokowy, tarczyca [37]. Wykazano m.in., że aktywacja PPAR $\gamma$  hamuje proliferację komórek raków złośliwych wywodzących się z tkanki tłuszczowej (tuszczaków), okrężnicy, trzustki, pęcherza i żołądka, a także ogranicza progresję guza w niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC, ang. *non-small-cell lung carcinoma*) [38,39]. Sugerowany jest także udział receptorów PPAR $\gamma$  w odpowiedzi układu odpornościowego, gdyż stwierdzono jego obecność w różnych populacjach leukocytów włączając w to monocyty, makrofagi, limfocyty i komórki dendrytyczne [14,40].

Od momentu odkrycia receptora PPAR $\gamma$  wykryto wiele naturalnych i syntetycznych związków powodujących jego aktywację. Dwie niezależne grupy badawcze w 1995 roku opisały pierwszy ligand PPAR $\gamma$  jakim była 15-deoxy- $\Delta$ -12,14-prostaglandyna J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) – będąca naturalnym metabolitem prostaglandyny D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>, która zresztą też jest agonistą PPAR $\gamma$ ) [41]. Do naturalnych ligandów zaliczane są również wielonienasycone kwasy tłuszczowe i ich pochodne, np. kwasy 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowy (HETE) oraz 9- i 13-hydroksyoktadekadienowy (HODE), kwas arachidonowy i jego metabolity (które są silniejszymi ligandami PPAR $\gamma$  w porównaniu do ich prekursora). Do agonistów PPAR $\gamma$  należą również substancje wyizolowane z roślin leczniczych: saurufuran A (*Saururus chinensis*), flawonoidy (chryzyna, kampferol), związki fenolowe (*Glycyrrhiza uralensis*) oraz kurkumina (*Curcuma longa*) [42,43].

Pierwszymi syntetycznymi agonistami PPAR $\gamma$  były leki uwrażliwiające tkanki obwodowe na insulinę, znane jako tiazolidynediony (TZDs) [44]. TZDs zostały odkryte przez przypadek na początku lat 70., podczas badań nad lekami normującymi poziom lipidów w organizmie. Prowadzone badania udowodniły, że związki o tej budowie, oprócz działania hipolipemizującego, wykazują także aktywność hipoglikemizującą, która wynika z ich zdolności do zwiększenia wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę. Pierwszym związkiem z tej grupy aktywatorów był ciglitazon zsyntezowany przez japońską firmę Takeda, jednak nie został zarejestrowany jako lek. W 1997 roku także japońska firma Daiichi Sankyo wprowadziła do leczenia, kolejnego agonistę receptora PPAR $\gamma$  – troglitazon. Okazało się jednak, że wykazuje on silne działanie hepatotoksyczne, co zdecydowało o szybkim jego wycofaniu z rynku farmaceutycznego [45]. Obecnie pozostały na nim jedynie pioglitazon (ACTOS®) i roziglitazon (Avandia®) zarejestrowane w 1999 roku odpowiednio przez Takedę i GlaxoSmithKlein, jako leki do stosowania w terapii cukrzycy typu 2 [46].

Zarówno roziglitazon jak i pioglitazon są obecnie stosowane w klinicznym leczeniu cukrzycy typu 2 i zaliczane są do agonistów o bardzo wysokim powinowactwie do receptora PPAR $\gamma$ , jednak ostatnie lata przyniosły wiele kontrowersji szczególnie wokół tego pierwszego leku. Z jednej strony, w dwóch dużych badaniach klinicznych: DREAM (ang. *Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication*) i ADOPT (ang. *A Diabetes Outcome Progression Trial*) wykazano, że roziglitazon stosowany w monoterapii znacznie lepiej niż metformina i pochodne sulfonilomocznika chroni przed rozwojem pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 [47,48], z drugiej jednak wskazano na wyraźne ryzyko sercowo-naczyniowe, a nawet przypadki zgonów spowodowane niewydolnością mięśnia sercowego będące efektem długotrwałej terapii roziglitazonem [49]. Informacje te spowodowały, że w wielu krajach wycofano roziglitazon ze sprzedaży.

Mimo oczywistych kontrowersji jest jednak faktem, iż badania kliniczne rosiglitazonu wykazały, że aktywacja receptorów PPAR $\gamma$  jest cenną opcją terapeutyczną w leczeniu cukrzycy typu 2. Podstawowym problemem jest ograniczenie lub nawet wyeliminowanie działań niepożądanych towarzyszących terapii agonistami powodującymi pełną aktywację receptora: nadmiernego rozrostu tkanki tłuszczowej, obrzęków, ryzyka sercowo-naczyniowego. Ostatnie lata to badania nad związkami, które charakteryzują się zdolnością do częściowej aktywacji lub modulacji receptorów PPAR $\gamma$ , tak zwanymi selektywnymi modulatorami aktywności (SPPARM, ang. *selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator*) [50], których działanie polega na wybiórczej aktywacji/modulacji receptora co w efekcie powoduje zmiany w poziomie ekspresji jedynie specyficznych grup genów. Jednym z pierwszych scharakteryzowanych częściowych agonistów PPAR $\gamma$  był stosowany w leczeniu nadciśnienia telmisartan, który jest jednocześnie antagonistą receptora angiotensyny II. Do najintensywniej obecnie badanych cząsteczek, charakteryzujących się częściową aktywacją receptora PPAR $\gamma$  należą związek MBX-102 (Metabolex) oraz INT 131 (InterKrin, Amgen). Obydwa związki znajdują się w II fazie badań klinicznych, a uzyskane dotychczas wyniki pokazują wysoką efektywność przy jednoczesnym braku działań niepożądanych charakterystycznych dla agonistów receptorów PPAR $\gamma$  powodujących ich maksymalną aktywację [51,52].

## RECEPTOR PPAR $\beta/\delta$

Kolejnym receptorem z rodziny PPAR jest PPAR $\beta/\delta$ , nazywany w literaturze również receptorem aktywowanym kwasami tłuszczowymi (FAAR) lub jądrowym receptorem hormonów 1 (NUC1) [14]. Receptor ten był jak dotychczas najmniej wykorzystywany jako miejsce działania leków, jednak wiele nowych badań wskazuje na możliwość stosowanie jego agonistów w terapii zaburzeń metabolicznych prowadzących do cukrzycy typu 2 i otyłości. Początkowo wyizolowano go z oocytów *Xenopus laevis* i nazwano PPAR $\beta$ , jednak kiedy później został zidentyfikowany także u gryzoni i człowieka nazwano go PPAR $\delta$ , gdyż nie było oczywiste, czy jest homologiem receptorów odkrytych w *Xenopus*. Obecnie jest pewne, że PPAR $\beta$  i PPAR $\delta$  są ontolo-

gami i dla jasności receptor ten jest obecnie określany jako PPAR $\beta/\delta$ . Wykazano ponadto, że u ssaków sekwencja reszt aminokwasowych PPAR $\beta/\delta$  jest zachowana w ewolucji, a podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych w białku wyizolowanym z komórek myszy i człowieka wynosi blisko 90% [17,53].

PPAR $\beta/\delta$  wykazuje odmienny mechanizm działania niż PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ . Heterodimer PPAR $\beta/\delta$ :RXR pod nieobecność liganda wiąże się do sekwencji nukleotydowej PPRE i po dołączeniu korepresora pośrednio hamuje ekspresję genów docelowych [54]. Związanie liganda powoduje rozpad kompleksu z korepresorem, prowadząc do zwiększenia ekspresji genów, zarówno na skutek aktywacji transkrypcyjnej indukowanej ligandem, jak i de-represji transkrypcyjnej. Uwolniony represor może przyczyniać się do hamowania innych ścieżek sygnałowych w komórce, np. zmiany aktywności transkrypcyjnej PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  [55].

Receptor PPAR $\beta/\delta$  wyrażany jest we wszystkich zbadanych tkankach człowieka, w których wykazuje zróżnicowany poziom, a najczęściej obserwuje się go w mózgu, tkance tłuszczowej, skórze, łożysku [14,56] oraz w mięśniach szkieletowych, gdzie wyższy poziom syntezy obserwowany jest w miofibrylach oksydacyjnych w porównaniu z glikolitycznymi, a synteza w porównaniu z receptorami PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  jest odpowiednio 10 i 50 razy wyższa [20].

Do naturalnych agonistów receptora PPAR- $\beta/\delta$  możemy zaliczyć niektóre 14- do 18-węglowe nasycone oraz 16- do 20-węglowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które w badaniach wiązania współzawodniczego wiążą się z powinowactwem (Kd) w zakresie stężeń mikromolowych. Endogennymi agonistami PPAR- $\beta/\delta$  są lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz naturalnie występujące eikozanoidy, jak prostaglandyna A1 i karbaprostacyklina. Prostacyklina 2 (PGI $_2$ ) naturalnie wytwarzana przez komórki śródbłonna (ECs, ang. *endothelial cells*) oraz zsyntetyzowana sztucznie cPGI $_2$  również należą do agonistów PPAR $\beta/\delta$  i jak wykazano aktywacja receptora za ich pośrednictwem chroni ECs przed apoptozą indukowaną H $_2$ O $_2$ . Do naturalnych agonistów PPAR $\beta/\delta$ , nie aktywujących pozostałych dwóch podtypów PPAR należą również kwas 9-cis retinowy, który jest jednocześnie ligandem receptora kwasu retinowego (RXR) [57-60].

Dotychczas udało się zsyntetyzować kilku sztucznych agonistów PPAR $\beta/\delta$ . Pierwszym uzyskanym ligandem był związek GW501516, znaleziony po przeszukaniu biblioteki hydrofobowych karboksylanów przez GlaxoSmithKline (podobnie odkryto GW0742) [61]. Kolejnym syntetycznym agonistą jest opracowany metodą *in silico* przez firmę Merck związek L-165041 [62]. Te pochodne kwasu fenoksyoctowego są wysoko selektywnymi ligandami PPAR- $\beta/\delta$  z powinowactwem do receptora na poziomie stężeń nanomolowych (1000 razy większym niż do PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ ). Obecnie trwają prace nad wieloma innymi syntetycznymi agonistami, a niektóre z nich jak KD3010 (Kalypsos) [63] i MBX-8025 (Metabolex) [64] znajdują się w trakcie zaawansowanych badań klinicznych w kierunku leczenia zaburzeń metabolicznych.

Badania na modelach zwierzęcych z zastosowaniem syntetycznych ligandów wykazały istotną rolę receptora PPAR $\beta/\delta$  w metabolizmie glukozy i lipidów, czyniąc go ważnym terapeutycznym celem w terapii insulinooporności, nadciśnienia i dyslipidemii, co więcej badania te wskazują na możliwość wykorzystania agonistów PPAR $\beta/\delta$  do kontrolowania wzrostu masy ciała i odkładania tkanki tłuszczowej, wzmacniania fizycznej wytrzymałości mięśni szkieletowych, łagodzenia miażdżycy i hamowania stanów zapalnych [54]. Odkrycie agonistów/modulatorów PPAR $\beta/\delta$  może okazać się skuteczne w zwalczaniu całego spektrum negatywnych skutków zespołu metabolicznego.

#### PODWÓJNI I PAN-AGONIŚCI RECEPTORÓW PPAR

Prace badawcze nad rozwojem podwójnych oraz pan-agonistów, które miałyby zdolność aktywacji dwóch lub nawet wszystkich podtypów receptorów PPAR, wydawały się oczywistym rozwiązaniem, wynikającym z faktu iż efekty aktywacji różnych typów receptorów PPAR zdawały się być wzajemnie uzupełniające w przypadku leczenia zaburzeń metabolicznych. I tak, aktywacja PPAR $\alpha$  przyczynia się do poprawy profilu lipidowego, aktywacja receptora PPAR $\beta/\delta$  zwiększa tempo przemian metabolicznych, z kolei aktywacja PPAR $\gamma$  prowadzi do zmniejszenia oporności na insulinę tkanek obwodowych. Okazało się jednak, że zbyt silna aktywacja dwóch lub więcej podtypów receptorów PPAR to niemal jak otwarcie puszkii Pandory [65]. Dla podwójnych agonistów PPAR $\alpha/\gamma$ , jak muraglitazar, tesaglitazar i ragaglitazar już po wejściu w badania kliniczne okazało się, że ich długoterminowe przyjmowanie wiąże się z ryzykiem sercowo-naczyniowym jak również kancerogennością. Dalsze prace nad tymi związkami zostały zarzucone. Z drugiej strony, związek o nazwie aleglitazar, będący także podwójnym agonistą PPAR $\alpha/\gamma$  charakteryzuje się bardzo wysoką skutecznością w terapii cukrzycy typu 2 i wydaje się być pozbawiony działań niepożądanych opisanych wyżej, jak to wykazano w badaniu SYNCHRONY [66,67]. Wiele wskazuje też na to, że duże znaczenie terapeutyczne w leczeniu zaburzeń metabolicznych mogą mieć podwójni agoniści PPAR $\alpha/\delta$  oraz PPAR $\delta/\gamma$  [65].

#### PODSUMOWANIE – PRZYSZŁOŚĆ RECEPTORÓW PPAR W TERAPII ZABURZEŃ METABOLICZNYCH

Mimo oczywistych kontrowersji jakie wzbudza terapia różnymi aktywatorami receptorów PPAR pozostaje faktem, iż są one cenną opcją terapeutyczną w leczeniu zaburzeń metabolicznych, jak cukrzyca typu 2, otyłość czy dyslipidemia. Podstawowym problemem jest wyeliminowanie działań niepożądanych, do których należą nadmiernego rozrostu tkanki tłuszczowej, zatrzymywanie wody w organizmie i ryzyko zaburzeń funkcjonowania układu sercowo-naczyniowego. Ostatnie lata to badania nad związkami, które charakteryzują się zdolnością do częściowej aktywacji lub modulacji receptorów PPAR, tak zwanymi selektywnymi modulatorami aktywności (SNURMs) oraz antagonistami receptorów PPAR. Ciekawa i obiecująca jest także możliwość stosowania agonistów receptorów PPAR w innych schorzeniach niż zaburzenia metaboliczne, jak choroby płuc, choroby oczu, stany zapalne czy infekcje wirusowe [13,68].

#### PIŚMIENNICTWO

1. Moore JT, Collins JL, Pearce KH (2006) The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *Chem Med Chem* 1: 504-523
2. Sonoda J, Pei L, Evans RM (2008) Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 582: 2-9
3. Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Baldelli F (2010) Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation. *Curr Mol Med* 10: 579-595
4. Laudet V, Gronemeyer H (2002) *The Nuclear Receptors Factbooks* Academic, San Diego
5. Kremoser C, Albers M, Burris TP, Deuschle U, Koegl M (2007) Panning for SNURMs: using cofactor profiling for the rational discovery of selective nuclear receptor modulators. *Drug Discov Today* 12: 860-869
6. Wierzbicki AS (2010) Fibrates: no ACCORD on their use in the treatment of dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol* 21: 352-358
7. Chen T (2008) Nuclear receptor drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 12: 418-426
8. Lefebvre P, Benomar Y, Staels B (2010) Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol Metab* 21: 676-683
9. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V (2001) How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17: 554-556
10. Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650
11. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR (2000) The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43: 572-550
12. Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-163
13. Badr MZ (2009) PPAR research: successful launching and promising future. *PPAR Res* 2009: 543584
14. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58: 726-741
15. Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514
16. Ricote M, Glass CK (2007) PPARs and molecular mechanisms of transcription. *Biochim Biophys Acta* 1771: 926-935
17. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006) From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45: 120-159
18. Onate SA, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357
19. Venkatachalam G, Kumar AP, Yue LS, Pervaiz S, Clement MV, Sakharkar MK (2009) Computational identification and experimental validation of PPRE motifs in NHE1 and MnSOD genes of human BMC. *Genomics* 10: S5
20. Braissant O, Fufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366
21. Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA (1998) Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of monoclonal antibodies. *Hybridoma* 17: 47-53
22. Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, Kelly CJ (2002) Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol* 168: 2795-2802
23. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE (2002) Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out



- mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 277: 26089-26097
24. Ferre P (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53: S43-50
  25. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart J-C, Auwerx J, Staels B (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 269: 31012-31018
  26. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B (2000) CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101: 2411-2417
  27. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert J-M, Winegar DA, Willson TM, Fruchart J-C, Berge RK, Staels B (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275: 16638-16642
  28. Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P, Andre J, Poitout V, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart J-C, Reach G, Staels B (2001) PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 50: 2809-2814
  29. Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J, Semenkovich CF (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138: 476-488
  30. Sarma S, Ardehali H, Gheorghide M (2010) Enhancing the metabolic substrate: PPAR-alpha agonists in heart failure. *Heart Fail Rev* 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]
  31. Evans RM, Barish GD, Wang YX (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10: 355-361
  32. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7921-7925
  33. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272: 18779-89
  34. Rosen ED, Walkey, CJ, Puigserver, P, Spiegelman, BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293-1307
  35. Walczak R, Tontonoz P (2002) PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43: 177-186
  36. Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman BM (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol* 20: 5343-5349
  37. Abbott BD (2009) Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 27: 246-257
  38. Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8: 6-15
  39. Matsuyama M, Yoshimura R (2009) A novel approach to anticancer therapies: peroxisome proliferator activator-receptor-gamma as a new target therapy in the treatment of human urological cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9: 76-83
  40. Daynes RA, Jones DC (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 748-759
  41. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819
  42. Luconi M, Cantini G, Serio M (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* 75: 585-594
  43. Nofziger C, Blazer-Yost BL (2009) PPARgamma agonists, modulation of ion transporters, and fluid retention. *J Am Soc Nephrol* 20: 2481-2483
  44. Yki-Jarvinen H (2004) Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351: 1106-1118
  45. Watkins PB, Whitcomb RW (1998) Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* 338: 916-917
  46. Jha RJ (1999) Thiazolidinediones—the new insulin enhancers. *Clin Exp Hypertens* 21: 157-166
  47. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators (2006) Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368: 1096-1105
  48. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G; ADOPT Study Group (2006) Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 355: 2427-2443
  49. Nissen SE, Wolski K (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356: 2457-2471
  50. Higgins LS, Depaoli AM (2010) Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr* 91: 267S-272S
  51. Gregoire FM, Zhang F, Clarke HJ, Gustafson TA, Sears DD, Favelyukis S, Lenhard J, Rentzperis D, Clemens LE, Mu Y, Lavan BE (2009) MBX-102/JNJ39659100, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-ligand with weak transactivation activity retains antidiabetic properties in the absence of weight gain and edema. *Mol Endocrinol* 23: 975-988
  52. Motani A, Wang Z, Weiszmann J, McGee LR, Lee G, Liu Q, Staunton J, Fang Z, Fuentes H, Lindstrom M, Liu J, Biermann DH, Jaen J, Walker NP, Learned RM, Chen JL, Li Y (2009) INT131: a selective modulator of PPAR gamma. *J Mol Biol* 386: 1301-1311
  53. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887
  54. Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 3: 590-597
  55. Lee C-H, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM (2003) Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302: 453-457
  56. Wang N (2008) PPAR-delta in vascular pathophysiology. *PPAR Res* 2008: 164163
  57. Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4312-4317
  58. Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11: 779-791
  59. Chawla A, Lee C-H, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM (2003) PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1268-1273
  60. Shaw N, Elholm M, Noy N (2003) Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 278: 41589-41592

61. Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, Sierra ML, LeGrumelec C, Xu HE, Montana VG, Lambert MH, Willson TM, Oliver WR Jr, Sternbach DD (2003) Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR-delta) – synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 1517–1521
62. Bassene CE, Suzenet F, Hennuyer N, Staels B, Caignard DH, Dacquet C, Renard P, Guillaumet G (2006) Studies towards the conception of new selective PPAR beta/delta ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 4528–4532
63. <http://www.kalypsys.com/pipeline/clinical.shtml>
64. <http://www.metabolex.com/MBX-8025.html>
65. Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M (2007) PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol Res* 56: 91–98
66. Foley-Comer AJ, Young AM, Russell-Yarde F, Jordan P (2011) Aleglitazar, a balanced PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonist, has no clinically relevant pharmacokinetic interaction with high-dose atorvastatin or rosuvastatin. *Expert Opin Investig Drugs* 20: 3–12
67. Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, Rabbia M, Chognot C, Herz M (2009) Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet* 374: 126–135
68. Cho N, Momose Y (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem* 8: 1483–1507

## Nuclear receptors PPAR as a drug target in metabolic disorders

Marta Stolarczyk<sup>1</sup>, Wojciech Gutman<sup>2</sup>, Rafał A. Derlacz<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Metabolic Regulation, Institute of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Research and Development Department, Adamed Sp. z o.o., Pienkow 149, 05-152 Czosnow, Poland

✉e-mail: rderlacz@biol.uw.edu.pl or e-mail: rafal.derlacz@adamed.com.pl

**Key words:** type 2 diabetes, PPAR, nuclear receptors, rosiglitazone

### ABSTRACT

Nuclear receptors regulate many basic cellular processes and their malfunction can lead to serious consequences including metabolic disorders, obesity and type 2 diabetes. Among many nuclear receptor families, the best known for their therapeutic use are the PPARs. These are key transcription factors determining: proper cellular metabolism of glucose and lipids, tissue sensitivity to insulin, appropriate immune responses including inflammatory processes and finally cell division and differentiation. Currently two types of PPAR activators are in medical use: in the therapy of type 2 diabetes – thiazolidinediones (TZDs), which act *via* PPAR $\gamma$  receptors and in the treatment of dyslipidemia – fibrates, which act *via* PPAR $\alpha$  receptors. The search for new drugs acting through PPAR mechanism consists in the design of new molecules with tissue specific properties, which would selectively bind and modulate the activity of appropriate receptors, thus reducing the number of adverse events typically observed with the use of full agonists. These molecules have been named selective nuclear receptor modulators (SNuRMs).

# Mitofuzyna 2 – ważne białko obwodowego układu nerwowego i powszechnie występujący regulator metabolizmu

## STRESZCZENIE

Istnieje grupa chorób metabolicznych o wyraźnej ekspresji jednonarządowej występującej na tle łagodnych objawów ze strony innych narządów. Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT), polegająca na postępującym zaniku ośmiernych mięśni kończyn, występuje w dwóch odmianach, w których dochodzi pierwotnie do demielinizacji nerwu obwodowego (CMT1) i uszkodzenia aksonu (CMT2). W grupie CMT2 najczęstsza jest choroba CMT2A, powodowana mutacjami w genie mitofuzyny 2 (MFN2). Mfn2 jest białkiem zewnątrz błony mitochondrialnej kodowanym w genomie jądrowym. Uczestniczy w procesach fuzji mitochondriów oraz ich oddziaływaniach z siateczką śródplazmatyczną. Zaburzenie równowagi fuzji i fragmentacji sieci mitochondrialnej zwiększa wrażliwość komórki na stres oksydacyjny. Prawdopodobnie Mfn2 ma też funkcje regulatorowe oraz bierze udział w regulacji transkrypcji genów kodujących białka łańcucha oddechowego. Zmiany ilości Mfn2 oraz mutacje wpływające na jej sekwencję aminokwasową wykrywa się w niektórych przypadkach neuropatii obwodowej, cukrzycy i chorób serca. Przykład mitofuzyny 2 ilustruje „wędrówkę” intelektualną, której początek leży w uszkodzeniu obwodowego układu nerwowego u chorych z CMT2A i znalezieniu mutacji w genie kodującym to białko. Zainicjowane tymi obserwacjami biologiczne badania udziału białka Mfn2 w metabolizmie komórek pozwalają lepiej zrozumieć zaburzenia systemowe dotyczące różnych narządów i szerzej spojrzeć na patologię CMT2A.

## WPROWADZENIE

Na początku ubiegłego stulecia angielski lekarz Archibald Garrod zwrócił uwagę na występowanie związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy izolowanym defektem biochemicznym, a występowaniem alkaptonurii – choroby metabolicznej spowodowanej defektem oksydazy homogentyzynianowej [1]. Większość znanych chorób metabolicznych zasadniczo mieści się w ramach nakreślonych przez Garroda i jego następców, istnieje jednak grupa chorób metabolicznych o wyraźnej ekspresji jednonarządowej występującej na tle dość łagodnie zaznaczonych objawów ze strony innych narządów. Dla przykładu zanik nerwów wzrokowych typu Lebera manifestuje się przede

### In vivo

#### Mózg

Rozrost gleju, łagodna demielinizacja istoty białej mózgu – CMT2A.  
Zanik nerwu wzrokowego – CMT6

#### Serce i układ krążenia

Rozrost mięśni gładkich naczyń krwionośnych poprzedzający incydenty ischemiczno-reperfuzyjne

#### Mięśnie szkieletowe

Postępujące osłabienie mięśni, CMT2A

#### Obwodowy układ nerwowy

Zanik aksonów nerwów obwodowych, łagodna demielinizacja, CMT2A



### In vitro

#### Komórki Purkiniego pozbawione Mfn2

Zaburzenia bioenergetyki i fuzji mitochondriów, zaburzenia neurogenety

#### Kardiomiocyty

wzrost poziomu Mfn2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny, apoptoza kardiomiocytów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych indukowana nadprodukcją Mfn2; Ingerencja Mfn2 w szlak Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK

#### Miocyty

Zależność pomiędzy poziomem Mfn2 a insulinopornością, udział w różnicowaniu miocytów

#### MEF:

zaburzenia fuzji mitochondriów i ich oddziaływań z ER, aktywności łańcucha oddechowego, homeostazy wapniowej, skłonność do apoptozy

Rycina 1. Udział mitofuzyny 2 w patologii wielonarządowej. Obserwacje *in vivo*, przypisane konkretnym jednostkom chorobowym oraz pochodzące z doświadczeń *in vitro* w zwierzęcych modelach chorób człowieka. Skutki mutacji w genie MFN2 są widoczne w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz w układzie krążenia. Badania *in vitro* wykazały udział Mfn2 w neurogeniezie komórek Purkiniego mózdzku, regulacji śmierci oraz proliferacji kardiomiocytów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, różnicowaniu miocytów oraz ich wrażliwości na insulinę. Mfn2 wpływa na fuzję mitochondriów i ich oddziaływanie z siateczką śródplazmatyczną (ER), bioenergetykę komórek, homeostazę wapniową, co wykazano w badaniach mysich embrionalnych fibroblastów (MEF). Wpływ mitofuzyny 2 na metabolizm odbywa się poprzez regulację fuzji mitochondriów oraz pośredniczenie w szlakach przekazywania sygnału, m. in. w kaskadzie Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK. Elementy ryciny pochodzą z materiałów Servier Medical Art, [http://www.servier.com/Smart/ImageBank.aspx?id\\_=729](http://www.servier.com/Smart/ImageBank.aspx?id_=729); Les Laboratoires Servier

Maria Kawalec<sup>1,\*</sup>

Katarzyna Kotruchow<sup>2,\*</sup>

Andrzej Kochański<sup>2</sup>

Barbara Zabłocka<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologii Molekularnej i <sup>2</sup>Zespół Badawczo-Lecznicy Chorób Nerwowo-Mięśniowych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

✉Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN; ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, e-mail: zablocka@cmdik.pan.pl

\*Autorzy w jednakowym stopniu przyczynili się do powstania pracy

Artykuł otrzymano 14 lutego 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 9 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** Charcot-Marie-Tooth, mitofuzyna 2, neurodegeneracja, fuzja mitochondriów, metabolizm

**Wykaz skrótów:** CMT2A – choroba Charcot-Marie-Tooth typ 2A; ER (ang. *endoplasmatic retikulum*) – siateczka śródplazmatyczna; ER $\alpha$  – ang. *estrogen-related receptor  $\alpha$* ; HSG – ang. *hyperplasia suppressor gene*; IP<sub>3</sub> – inozytolotrisfosforan; MAPK – ang. *mitogen-activated protein kinase*; MFN2 – mitofuzyna 2; OPA1 – ang. *optic atrophy 1 protein*; PGC-1 – ang. *peroxisome proliferator-activated receptor coactivator*; PPAR $\delta$  – ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*

**Podziękowanie:** Niniejszego opracowanie powstało w ramach projektu badawczego nr 4746/B/P01/2011/40 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

wszystkim ślepotą, jednakże u chorych opisywane są również objawy dodatkowe (polineuropatia obwodowa) [2]. Kolejnym przykładem może być choroba Pompego, gdzie obserwuje się współistnienie uszkodzenia mięśnia sercowego (kardiomiopatia) z uszkodzeniem mięśni szkieletowych [3].

Mitofuzyna 2 (Mfn2) jest białkiem błony mitochondrialnej występującym w wielu tkankach i narządach, a jednak najsilniej wyrażonym efektem uszkodzenia genu *MFN2* jest zwyrodnienie aksonalne nerwów obwodowych [4]. Inne skutki uszkodzenia genu mitofuzyny ujawniają się, w ośrodkowym układzie nerwowym w nieporównanie bardziej dyskretny sposób (łagodna demielinizacja). A zatem białko Mfn2, którego funkcja początkowo była wiązana z ograniczonym procesem zwyrodnienia aksonalnego okazuje się być ważnym regulatorem metabolizmu w ośrodkowym układzie nerwowym. Przykład mitofuzyny wydaje się interesującą ilustracją pewnej „wędrówki” intelektualnej, której początku należy szukać w uszkodzeniu jednej tkanki – obwodowego układu nerwowego, a która już dziś pozwala lepiej zrozumieć zaburzenia systemowe dotyczące różnych narządów, na które, jak się okazuje, mają wpływ defekty w mitofuzynie 2. Tak właśnie, w ujęciu patologii wielonarządowej przedstawiono w pracy funkcje mitofuzyny 2 (Ryc. 1).

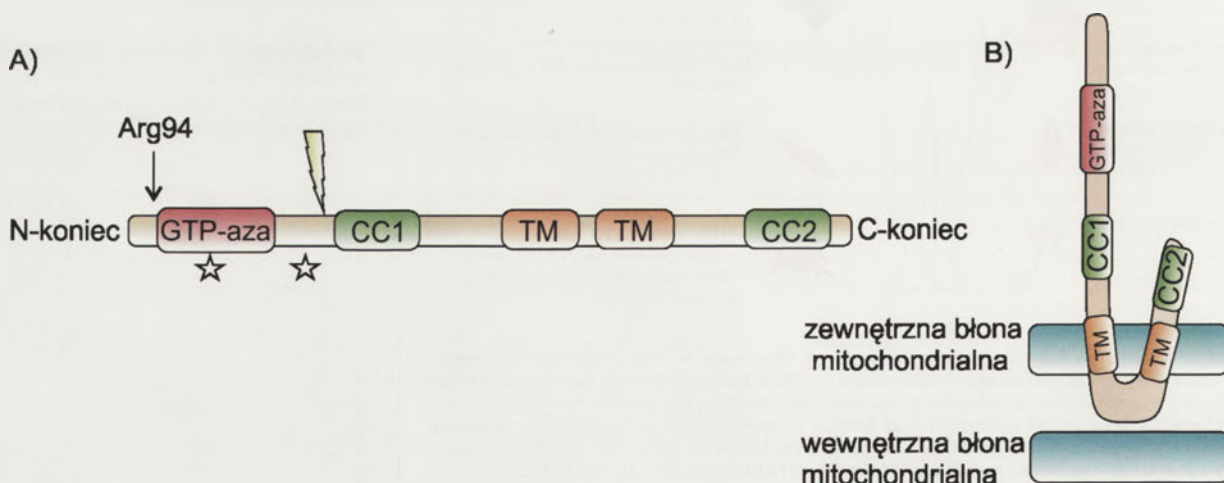
## MITOFUZYN 2

Białko Mfn2 ma wiele funkcji. Początkowo mitofuzyna 2 została zidentyfikowana w mięśniach otyłych szczurów szczepu Zucker [5], w których występowała jako białko MARF (ang. *mitochondrial assembly regulatory factor*), następnie w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych u szczurów z dziedzicznym nadciśnieniem, jako gen supresorowy hiperplazji (ang. *hyperplasia suppressor gene HSG*) [6]. W badaniach na modelach chorób *in vivo* i *in vitro* wykazano rolę mitofuzyny 2 w proliferacji komórek i utrzymaniu prawidłowej morfologii mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej [7,8]. Zmiany wpływające na aktywność mitofuzyny 2 modyfikują oddychanie komórkowe i

ekspresję genów kodujących podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego w hodowlach różnych typów komórek m.in. mięśniowych [7]. Nieprawidłowości w sekwencji nukleotydowej oraz zmiany w ekspresji genu mitofuzyny 2 są przyczyną rozwoju chorób, obejmujących wiele narządów. Zmiany ilości białka Mfn2 oraz zaburzenia jego sekwencji aminokwasowej obserwuje się w cukrzycy, chorobach serca oraz polineuropatii aksonalnej (CMT2A) [9].

Mitofuzyna 2 jest białkiem mitochondrialnym kodowanym przez genom jądrowy. U człowieka składa się z 757 reszt aminokwasowych, budujących funkcjonalne domeny. Białko Mfn2 jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej domeną transbłonową podzieloną na dwie części (Ryc. 2). Zarówno C-, jak i N-koniec białka skierowane są do cytoplazmy i formują domeny coiled-coil (CC1 i CC2), zawierające powtórzenia 7 hydrofobowych aminokwasów (ang. *heptad repeats*), nazywane czasem domenami HR1 i HR2. Domeny HR odgrywają kluczową rolę w fuzji błon, w której pośredniczą m. in. białka SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) [10]. Są one odpowiedzialne także za połączenia Mfn2 z innymi białkami. Na N-końcu znajduje się domena GTPazowa. Domena ta, odpowiadająca za hydrolizę GTP, jest niezbędna do przeprowadzania procesu fuzji mitochondriów, natomiast domeny CC1 i CC2 stanowią podstawę połączeń z innymi białkami, m. in. tworząc homodimery Mfn2 oraz mitofuzyny 1 i 2, tworząc heterodimery [11]. Szczególne znaczenie dla homeostazy wapniowej wykazuje domena mitofuzyny 2 wiążąca białka Ras (Ryc. 2). Jest ona konieczna do oddziaływań mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną (ER) oraz warunkuje prawidłową morfologię ER [12].

Gen mitofuzyny 2 zmapowano w *locus* 1p36.22. Zawiera 19 eksonów, których sekwencja nukleotydowa jest konserwowana ewolucyjnie. Stwierdzono znaczną homologię genu *MFN2* oraz genu fuzji mitochondriów *D. melanogaster* (*Fzo*) [13]. Stwierdzono także 95% podobieństwo genu mitofuzyny 2 człowieka do genu szczura [5].



**Rycina 2.** Schemat budowy domeny mitofuzyny 2. A) Mfn2 składa się z domeny hydrolizującej GTP (GTPaza), z domen CC1 i CC2 (zwane też HR1, HR2), tworzących połączenia z innymi białkami oraz z domeny transbłonowej (TM), podzielonej na dwie części, które kotwiczą białko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz domeny potencjalnie wiążącej białko Ras (błyskawica). Na schemacie zaznaczono obszar tzw. „hot spot” mutacji w kodonie 94 oraz gwiazdkami zaznaczono regiony, w których zidentyfikowano najwięcej mutacji. B) Schematyczne przedstawienie lokalizacji mitofuzyny 2 w komórce.

## MUTACJE

W genie mitofuzyny 2 znanych jest niemal 60 mutacji. Większość z nich jest mutacjami punktowymi zmiany sensu. Jednak znane są także mutacje typu delecja/insercja nukleotydów. Zdecydowana większość mutacji lokalizuje się w domenie hydrolizującej GTP oraz pomiędzy domeną GTPazową oraz domeną CCI, odpowiedzialną za większość oddziaływań białko-białko [11]. W obu rejonach sekwencji zidentyfikowano miejsca, ulegające mutacjom częściej niż inne. Są to tzw. „hot spots”. Najczęściej spotykana mutacją wśród niespokrewnionych pacjentów z CMT2A jest mutacja 94 kodonu, w wyniku której reszta arginy ulega zamianie na resztę glutaminy lub tryptofanu. Mutacje w genie mitofuzyny 2 mają efekt plejotropowy. Wpływają na szereg procesów w komórce, wywołując dysfunkcje dotyczące wielu organów, choć główne nasilenie skutków mutacji obserwowane jest w obwodowym układzie nerwowym. Powodują selektywne defekty fuzji mitochondriów, nieprawidłowości w morfologii siateczki śródplazmatycznej, zmniejszenie transportu mitochondriów do aksonów, defekty w tworzeniu sieci mitochondrialnych, prowadzące do spadku aktywności metabolicznej mitochondriów [14].

## REGULACJA EKSPRESJI GENU KODUJĄCEGO MITOFUZYNĘ

Mitofuzyna 2 jest białkiem powszechnie występującym w organizmie, jednak w większości tkanek i narządów w małej ilości. Największą ilość Mfn2 obserwuje się w mięśniach szkieletowych, w sercu i w mózgu [15]. Związane jest to z rolą mitofuzyny 2 w mitochondriach, których większą ilość notuje się w komórkach ze zwiększonym zapotrzebowaniem na energię. Defekty w mitofuzynie 2 mają związek z chorobą Charcot-Marie-Tooth typu 2A, a także z otyłością oraz cukrzycą typu 2 [9]. W grupie tych chorych ilość białka Mfn2 w mięśniach był obniżony [16]. Dotychczas zidentyfikowano dwa silne pozytywne regulatory ekspresji genu *MFN2* w komórkach mięśniowych – PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator*) [15]. Ponadto, białko ERR $\alpha$  (ang. *estrogen-related receptor- $\alpha$* ) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który rekrutuje oba wymienione wyżej białka regulatorowe. Stwierdzono, że ekspozycja na niską temperaturę, traktowanie sznurów agonistami receptorów adrenergicznych typu  $\beta_3$  oraz ćwiczenia fizyczne powodują zwiększenie ekspresji genu *Mfn2* w mięśniach i w brunatnej tkance tłuszczowej [16]. PGC-1 $\alpha$  bierze udział w stymulacji transkrypcji genu *Mfn2* w warunkach wzmożonego wydatkowania energii. Indukcja ta zachodzi na zasadzie koaktywacji czynnika transkrypcyjnego ERR $\alpha$  oraz koaktywatora PGC-1 $\alpha$  [7]. Jednak zwiększenie ilości mRNA, zarówno mitofuzyny 2, jak i PGC-1 $\alpha$  i ERR $\alpha$ , nie powodowało zwiększenia ilości białka Mfn2 w komórkach mięśniowych u ludzi po ćwiczeniach fizycznych, np. po 10 km jeździe na rowerze [17]. Natomiast w badaniach z wykorzystaniem hodowli komórek myszy (MEF, C2C12, 10T1/2) oraz człowieka (HeLa i HEK293A), w warunkach normalnych, nie wymagających większego wykorzystania energii, czynnik transkrypcyjny ERR $\alpha$  rekrutuje koaktywator PGC-1 $\beta$ , który przyłącza się do genu *Mfn2*. Po aktywacji transkrypcji, czyli zwiększonej syntezie mRNA, w tym przypadku, następuje zwiększenie ilości białka mitofuzyny 2 [14].

Promotor genu mitofuzyny 2 zawiera 3 potencjalne miejsca (rejony) wiązania receptorów jądrowych. Stwierdzono jednak, że to rejon 2 jest niezbędny do koaktywacji transkrypcji przez PGC-1 $\alpha$  lub PGC-1 $\beta$  oraz ERR $\alpha$ . Aktywacja ta zachodzi na zasadzie połączenia ERR $\alpha$  z promotorem genu mitofuzyny 2, pomiędzy nukleotydami -413 i -398 [16].

Badano także ekspresję genu *Mfn2* w komórkach mięśnia sercowego. Jako model badawczy wykorzystano myszy pozbawione genu PPAR $\delta$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$* ) oraz niemodyfikowane genetycznie [15]. U myszy niemodyfikowanych poddanych 48-godzinnemu głodzeniu zaobserwowano znacznie zwiększoną ilość transkryptu mitofuzyny 2, niż u myszy karmionych tradycyjną paszą. U głodzonych myszy pozbawionych genu PPAR $\delta$  zaobserwowano słabszą indukcję ekspresji genu *Mfn2*. Prawidłowa transkrypcja genu mitofuzyny 2 (wyrażona ilością mRNA) w kardiomiocytach zależy od dostępności białka PPAR $\delta$  w normalnych warunkach oraz, przynajmniej częściowo, w warunkach głodzenia. Potencjalne miejsce wiązania białka PPAR $\delta$  znaleziono między nukleotydem -837 i -817 przed promotorem w genie mitofuzyny 2 u myszy [15]. Niedobór mitofuzyny 2 może prowadzić do patologicznego rozrostu mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Natomiast, w badaniach *in vitro*, nadekspresja genu *Mfn2* skutkuje apoptozą kardiomiocytów indukowaną nadtlenkiem wodoru [18]. Poziom ekspresji genu mitofuzyny 2 jest ściśle zależny od stanu metabolicznego mięśnia sercowego [15].

W innych badaniach wykazano, że ekspresja genu mitofuzyny 2 może być regulowana przez białko p53. Białko p53, tzw. „strażnik genomu” jest czynnikiem integrującym wiele ścieżek sygnałowych w komórce i wpływa na wiele procesów kluczowych dla życia komórki, jak apoptoza, zatrzymanie cyklu podziałowego komórki, czy różnicowanie. W promotorze mitofuzyny 2 znajduje się sekwencja nukleotydowa homologiczna do sekwencji, do której w innych genach przyłączane jest białko p53. Tezę tę potwierdzono doświadczalnie, co umożliwia jeszcze szersze spojrzenie na funkcje mitofuzyny 2, np. w hamowaniu proliferacji komórek, promowaniu apoptozy lub supresji nowotworów [19].

## UDZIAŁ MITOFUZYN W FUZJI MITOCHONDRIÓW ORAZ ZNACZENIE TEGO PROCESU W FIZJOLOGII KOMÓRKI

Mfn2 jest białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej, uczestniczącym w procesach jej fuzji. Równowaga pomiędzy procesami fuzji i podziału mitochondriów warunkuje nie tylko ich prawidłową morfologię, biogenezę i rozmieszczenie w komórce, ale pośrednio reguluje kondycję całej komórki [20]. Wiele badań *in vitro* dowodzi, że zaburzenie dynamicznej równowagi fuzji i podziału sieci mitochondrialnej zwiększa wrażliwość komórki na stres oksydacyjny [20,21]. Zaburzenia funkcji białek fuzyjnych zewnętrznej błony mitochondrialnej, jak mitofuzyny 1 i 2 oraz OPA1 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej nie tylko zwiększają stopień fragmentacji mitochondriów, ale brak mitofuzyn zwiększa wrażliwość komórek na bodźce proapoptotyczne [20]. Można przypuszczać więc, że prawidłowe procesy

fuzji i podziału mitochondriów mogą stanowić mechanizm ochronny komórki na czynniki pro-apoptyczne.

Fuzja obu błon mitochondrialnych przebiega na drodze oddzielnych, ale nie niezależnych od siebie procesów. Kluczową rolę odgrywają trzy spokrewnione z dynaminami białka o aktywności GTPazowej, niezbędnej dla ich aktywności fuzyjnej [11,20]. Obok Mfn2 oraz jej izoformy Mfn1, warunkujących fuzję zewnętrznej błony mitochondrialnej, trzecim białkiem, niezbędnym do fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej, jest OPA1. Ich identyfikacja w jednym kompleksie funkcyjnym wskazuje na współzależność fuzji obu błon [22]. Białko OPA1 oddziałuje prawdopodobnie z Mfn1 zlokalizowaną w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, ale nie z Mfn2 [23]. Przypuszcza się więc, że Mfn1 może pośredniczyć (sama lub wraz z innymi, nierozpoznanymi dotąd białkami) w koordynacji mechanizmu fuzji obu błon mitochondrialnych [20].

### **ROLA MFN2 W ODDZIAŁYWANIACH MITOCHONDRIOW Z SIATECZKĄ ŚRÓDPLAZMATYCZNĄ – WPLYW NA SYGNAŁ WAPNIOWY**

W prawidłowej komórce mitochondria oddziałują ze sobą tworząc dynamiczny układ, na którego morfologię i funkcje składają się procesy fuzji i podziału [20]. Tempo i intensywność tych procesów kształtuje charakter sieci mitochondrialnej komórki. Mitochondria oddziałują także ze strukturami siateczki śródplazmatycznej (ER), o czym, do pewnego stopnia, świadczy współwystępowanie tych dwóch sieci w komórce [8,12]. Bliska lokalizacja mitochondriów i ER umożliwia współdziałanie w regulacji procesów komórkowych, zależnych od jonów wapnia [12].

Mitofuzyna 2 wydaje się odgrywać kluczową rolę w morfologii oraz fizjologii siateczki śródplazmatycznej [12]. Brak Mfn2 objawia się zaburzeniami struktury siateczki (agregaty i skupiska), dezorganizacją oraz ograniczeniem jej połączeń z mitochondriami oraz znacznym obniżeniem efektywności pobierania jonów wapnia w odpowiedzi na inozytolotrisfosforan ( $IP_3$ ) [12]. W badaniach *in vitro*, w mysich komórkach MEF, zwiększenie ekspresji genu *Mfn2*, ale nie *Mfn1*, przywracało morfologię siateczki śródplazmatycznej oraz jej połączenia z mitochondriami [23]. Ponadto mutanty mitofuzyny 2 pozbawione domeny GTPazowej lub domeny oddziałującej z białkami Ras, choć przywracały prawidłową morfologię sieci mitochondrialnej, nie wpływały na siateczkę śródplazmatyczną [8]. Prawdopodobnie więc domeny te są w różnym stopniu zaangażowane w proces fuzji i oddziaływań pomiędzy mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną.

Połączenia mitofuzyn mitochondriów i błon ER mają charakter homo- i heterodimerów, w których oddziałują ze sobą przeciwnoległe domeny superhelikalne Mfn2 w błonie ER oraz Mfn1 lub Mfn2 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (układ trans) [23]. Na podstawie obserwacji znacznego zmniejszenia obszarów oddziaływań w komórkach MEF pozbawionych genu *Mfn2* ( $MEF^{Mfn2-/-}$ ) i braku tego efektu w komórkach  $MEF^{Mfn1-/-}$  podejrzewa się, że udział prawidłowej Mfn1 w procesach fuzji i oddziaływań mito-

chondriów z siateczką śródplazmatyczną może łagodzić niekorzystny efekt mutantów Mfn2, ale nie może w pełni rekompensować braku Mfn2 [8].

Prawidłowe umiejscowienie względem siebie mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej, a zatem również udział mitofuzyn, wydaje się kluczowe dla funkcjonowania komórki [8,23]. Mutacje w genie *Mfn2* skutkują zmianą odległości pomiędzy błonami siateczki i mitochondriów [23]. De Britto i Scorrano stworzyli hipotezę mikrodomen, w której postulują, że zwiększona odległość pomiędzy mitochondriami a siateczką związana z defektem Mfn2 powoduje przedłużenie sygnału wapniowego w komórkach [8]. Brak prawidłowej Mfn2 upośledza pobieranie jonów wapnia przez mitochondria po ich wypływie z siateczki śródplazmatycznej, stymulowanym przez  $IP_3$  [12]. Natomiast w przypadku nadekspresji genu prawidłowej Mfn2 może dochodzić do przedłużenia oddziaływania, przeładowania mitochondriów i ER jonami wapnia i wynikającej z zaburzeń sygnału wapniowego apoptozy [8].

### **WPLYW MFN2 NA METABOLIZM MITOCHONDRIALNY**

Mitofuzyna 2, wydaje się nasilać procesy oksydoredukcyjne w mitochondriach [22,24]. W komórkach pozbawionych Mfn2 obserwowano obniżenie wartości potencjału błonowego oraz aktywności cyklu kwasu cytrynowego, obserwowano także zmniejszenie utleniania glukozy oraz odpowiadające mu zmniejszenie pobierania tlenu [24]. W komórkach mięśniowych brak Mfn2 powodował nasilenie beztlenowej glikolizy [5]. Przypuszcza się, że mitofuzyna 2 wpływa na procesy bioenergetyczne komórki pośrednio, poprzez udział w fuzji mitochondriów i ich oddziaływań z siateczką śródplazmatyczną oraz poprzez wpływ na syntezę kodowanych w genomie jądrowym białek łańcucha oddechowego [24]. Sugeruje się, że może to być nowa, niezależna od aktywności fuzyjnej, funkcja Mfn2. Szczegółowe badania wykazały związek Mfn2 z ekspresją genów, kodujących białka podjednostek łańcucha oddechowego. Zależność ta nie ma symetrycznego charakteru. Brak Mfn2 znacząco obniża syntezę białek kompleksów I, II, III i V, natomiast jej zwiększona zawartość skutkuje wzrostem syntezy białek kompleksu I, IV i V, pozostając bez wpływu na kompleks II i III [24]. Nie wiadomo jednak, czy Mfn2 bezpośrednio oddziałuje na mechanizmy ekspresji genów, kodujących powyższe białka, czy raczej inicjuje kaskadę sygnałową prowadzącą do pobudzenia transkrypcji odpowiednich genów.

Obserwacje biochemiczne w badaniach *in vitro* mają swoje odzwierciedlenie w danych klinicznych. Analizując schorzenia, których patogenezą może mieć związek z nieprawidłowym działaniem Mfn2, zauważalne staje się, że schorzenia te dotyczą przede wszystkim układu nerwowego, mięśni szkieletowych oraz kardiomiocytów, najbardziej zależnych od metabolizmu tlenowego i prawidłowej bioenergetyki mitochondriów. Co ciekawe, zaburzenia aktywności enzymów łańcucha oddechowego zaobserwowano w chorobach neurodegeneracyjnych, np. obniżenie aktywności kompleksu I opisano w parkinsonizmie, ale dotychczas nie znane są powiązania tej choroby z mitofuzyną 2 [24].

## TRANSPORT AKSONALNY

Od czasu, kiedy połączono występowanie mutacji w genie mitofuzyny 2 z chorobą Charcot-Marie-Tooth 2A, nierozwikłane pozostaje pytanie, w jaki sposób mutacje te wpływają na rozwój choroby. Zauważono, że w neuronach ze zmienionymi formami białka Mfn2 znacznemu uszkodzeniu ulega transport mitochondriów wzdłuż aksonów [25]. Badania *in vitro* na hodowlach neuronów, wykazały zaburzenia rozmieszczenia mitochondriów niezależne od ilości ATP w komórkach, potencjału błon mitochondrialnych, czy też aktywności łańcucha oddechowego. Obserwowano obniżenie ruchliwości mitochondriów, a co za tym idzie, ich agregację oraz zaburzenia w rozlokowaniu, zarówno w ciele komórki nerwowej, jak i w aksonie [25].

Rozmieszczenie mitochondriów w komórce, będące wynikiem prawidłowej dynamiki procesów mitochondrialnych, jest podyktowane jej zapotrzebowaniem na energię. W myśl hipotezy Skulacheva dzięki istnieniu sieci mitochondrialnej w komórce potencjał może być przenoszony wzdłuż mitochondrialnych filamentów z miejsc, gdzie sprawnie działa łańcuch oddechowy do miejsc o dużym zapotrzebowaniu na energię, czyli miejsc syntezy ATP [22]. Komórkami szczególnie narażonymi na uszkodzenia związane z zaburzeniami energetycznymi są neurony. Aby zapewnić ich prawidłową aktywność mitochondria muszą być rozmieszczone także w odległych od ciała komórki aksonach. W neuronach, w których dochodziło do nadekspresji zmutowanego genu *Mfn2*, mitochondria nie tworzyły równomiernej sieci. Aksony były prawie pozbawione mitochondriów. [26].

Aby zachodził transport mitochondriów do odległych obszarów aksonów konieczne jest połączenie organelli z białkami motorycznymi – kinezyną i dyneiną. Stwierdzono, że mitofuzyna 2 jest łącznikiem pomiędzy mitochondrium a mikrotubulami, wzdłuż których odbywa się transport organelli [25]. Białko *Mfn2* wchodzi w oddziaływanie z kompleksem Miro/Milton, od którego zależy połączenie *Mfn2* z białkami motorycznymi, a zatem także transport mitochondriów [27]. Kompleks Miro2/*Mfn2* bierze udział w transporcie zależnym od kinezyn, czyli w stronę dodatniego bieguna mikrotubuli, oraz w zmianie kierunku poruszania się mitochondriów poprzez „przekazanie” organelli do dynein, prowadzących transport w kierunku bieguna ujemnego mikrotubuli [28]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób dochodzi do kontroli transportu przez mitofuzynę 2. Zaburzenia transportu mitochondriów w komórce uważa się za jedną z możliwych przyczyn uszkodzenia i zaniku aksonów w neuropatii CMT typu 2A [25].

## CHOROBA CHARCOT-MARIE-TOOTH 2A

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT), która polega na powoli postępującym zaniku odsiebnych mięśni kończyn górnych i dolnych występuje zasadniczo w dwóch odmianach: CMT1 – w której dochodzi pierwotnie do demielinizacji nerwu obwodowego i CMT2 – w której pierwotnie dochodzi do uszkodzenia aksonu. W grupie CMT2 najczęściej spotyka się chorobę CMT2A, której rozpoznanie wymaga stwierdzenia mutacji w genie *MFN2* [29].

Spektrum objawów CMT2A jest bardzo szerokie, od bardzo łagodnego osłabienia odsiebnych mięśni kończyn, aż do unieruchomienia chorych. Zwykle choroba CMT2A rozpoczyna się we wczesnym dzieciństwie, ale też zanotowano przypadki zachorowania w 5. dekadzie życia. W 2004 roku, po wielu latach badań, Züchner odkrył, że przyczyną tej choroby są mutacje w genie kodującym mitofuzynę 2. Do tej chwili zidentyfikowano niemal 60 mutacji w genie *MFN2*, jednak patogeneza molekularna nie jest do końca wyjaśniona. Prawdopodobnie ma to związek z transportem mitochondriów w aksonie, który może być uszkodzony w wyniku niektórych mutacji genu *MFN2*. Jednak uważa się, że nie jest to jedyny mechanizm patogenezy, z uwagi na liczne funkcje mitofuzyny 2 w komórce [29]. U niektórych chorych z rozpoznaniem CMT2A występują zmiany o charakterze łagodnej demielinizacji w ośrodkowym układzie nerwowym [26]. Zaburzenia te dotyczą przede wszystkim istoty białej mózgu, skupiającej wypustki neuronów. U części pacjentów dotkniętych mutacjami *MFN2* wykonano także badania histologiczne nerwu łydkowego. Wykazano w nich współistnienie dwóch procesów tj. znacznego ubytku aksonów i łagodnej demielinizacji [26].

## MFN2 W USZKODZENIU WIELONARZĄDOWYM

Coraz szersza jest wiedza na temat zaangażowania *Mfn2* w inne niż neuropatie procesy chorobowe, często, przy najmniej pozornie, ze sobą niepowiązane. Z jednej strony taka sytuacja podkreśla rolę mitochondriów i białek mitochondrialnych w fizjologii całego organizmu, z drugiej zaś ukazuje mitofuzynę 2 jako białko zaangażowane w fundamentalne procesy komórkowe, jak zdolność do podziału lub apoptozy oraz procesy biochemiczne [24]. To właśnie w komórkach najbardziej uzależnionych od stałej dostępności substratów energetycznych, komórkach układu nerwowego oraz komórkach mięśniowych, zaburzenia funkcji *Mfn2* są najmocniej zaznaczone [5].

Coraz więcej doniesień potwierdza przypuszczenia, że *Mfn2* ma funkcje regulatorowe w komórce, które są niezależne od jej aktywności fuzyjnej, bowiem białko to wydaje się uczestniczyć w szlakach przekazywania sygnału [30]. Jednocześnie, mając na uwadze wpływ mitofuzyny na ekspresję genów poszczególnych białek łańcucha oddechowego, nie można wykluczyć udziału *Mfn2* w regulacji transkrypcji [24].

Badania patogenezy cukrzycy wykazały, że dysfunkcjom mięśni szkieletowych pacjentów z insulinopornością towarzyszy spadek masy i aktywności metabolicznej mitochondriów. W cukrzycy typu II obserwuje się obniżony poziom ekspresji *Mfn2* [22]. Może mieć to związek z ekspresją genów czynników PGC1 $\alpha$  oraz PGC1 $\beta$ , których ilość w cukrzycy jest również zmniejszona [22]. Istnieje pozytywna zależność pomiędzy insulinopornością a poziomem ekspresji genu *Mfn2* [22,31]. U zdrowych osób insulina stymuluje ekspresję genów kodujących białka mitochondrialne oraz nasila aktywność metaboliczną mitochondriów [22]. Natomiast stan insulinoporności charakteryzuje się niezdolnością do właściwego metabolizmu cukrów i lipidów, co może być związane z zaburzeniami

ekspresji kluczowych dla metabolizmu komórkowego genów, w tym *Mfn2* [22].

Współdziałanie *Mfn2* i insuliny wydaje się towarzyszyć także zależności od insuliny miogenezie [32]. Podejrzewa się, że insulina stymuluje ekspresję genu *Mfn2*. Białko to poprzez oddziaływanie z białkami Ras i zahamowanie szlaku kinaz MEK stymuluje procesy różnicowania komórek mięśniowych. Prawdopodobny wydaje się mechanizm, w którym *Mfn2* „wylacza” zależną od białka Ras kaskadę kinaz MAP, czym blokuje aktywność podziałową komórki, kierując ją na szlak różnicowania. Jednocześnie zależne od insuliny nasilenie ekspresji genu *Mfn2* nie jest procesem natychmiastowym, co sugeruje udział mechanizmów transkrypcyjnych [32].

Przypuszczenia te są zgodne z obserwacjami poczynionymi przez Chen’a i współpracowników (2004), którzy wykazali zbieżność pomiędzy zmniejszoną ilością *Mfn2* a nadmiernym rozrostem komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, w tym w sercu [6]. Przerost mięśnia sercowego towarzyszy chorobom układu naczyniowego, jak nadciśnienie i arytmia, i stanowi czynnik ryzyka incydentów krążeniowych, wśród których najpoważniejszym jest zawał mięśnia sercowego. Może również rozwinąć się w zespole metabolicznym. Udział *Mfn2* (znanej wcześniej pod nazwą HSG, ang. *hyperplasia suppressor gene*) w chorobach rozrostowych naczyń został opisany zanim odkryto jej związek z neuropatiami obwodowymi. Chen wykazał, że antyproliferacyjne działanie *Mfn2* odbywa się poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego na granicy faz G0/G1, związane z zahamowaniem aktywności regulowanej przez białko Ras kinazy ERK1/2, w szlaku Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK [9]. Rozrost mięśni gładkich naczyń przy niedobrze *Mfn2* może więc być związany z brakiem sygnału hamującego podział komórek. Zaburzenia kaskady sygnału Ras-Raf-MAPK, towarzyszą także rozwojowi nowotworów [19]. Ponieważ w badaniach *in vitro* wykazano antynowotworowe działanie *Mfn2*, potencjalnie związane z jej ingerencją w kaskadę Ras oraz obecność sekwencji aminokwasowej wiążącej się z białkiem p53 [9], nie można wykluczyć udziału *Mfn2* w zmienionym transformacją nowotworową metabolizmie komórki.

Udział *Mfn2* w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego nie został w pełni poznany, a dotychczasowe badania wykazały zarówno pro- jak i antyapoptotyczne właściwości tego białka [9]. Nadekspresję genu kodującego endogenną *Mfn2* opisano w kardiomiocytach w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany nadtlenkiem wodoru lub epizodem ischemiczno-reperfuzyjnym, a w dalszych badaniach *in vitro* wykazano, że indukowana nadekspresja *Mfn2* wywołuje ubytek komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [9]. Jednak liczne dane wskazują raczej na kardioprotekcyjny efekt nadekspresji *Mfn2* w zaburzeniach ischemiczno-reperfuzyjnych serca oraz ich związek z zahamowaniem otwarcia megakanatu mitochondrialnego (mPTP) [21]. Istnieją doniesienia, że zorganizowane w sieci mitochondria wykazują większą zdolność buforowania jonów wapnia oraz neutralizacji reaktywnych form tlenu, co skutkuje mniejszą wrażliwością komórki na czynniki proapoptotyczne [30]. Jednocześnie procesy fuzji mitochondriów mogą zapobiegać na-

gromadzeniu uszkodzeń w komórce [9] oraz stabilizować błony mitochondrialne, opóźniając lub uniemożliwiając wypływ cytochromu c oraz aktywację proapoptotycznego białka Bax [21].

Nieprawidłowa fuzja mitochondriów zaburza aktywność kompleksów oddechowych oraz uniemożliwia prawidłowe rozmieszczenie mitochondriów, co jest szczególnie dotkliwe dla komórek wrażliwych na zaburzenia energetyczne, jak neurony [33]. W badaniach *in vitro* wykazano, że brak *Mfn2* u myszy zaburzał powstawanie i różnicowanie charakterystycznych dla mózdzku komórek Purkiniego, jednych z najdłuższych neuronów mózgu, charakteryzujących się znaczną ilością wypustek dendrytycznych [33]. Ponadto, embriony mysie pozbawione *Mfn2* umierają w okresie prenatalnym [34]. Można przypuszczać, że u ludzi mutacje w genie *MFN2* powodujące skrócenie białka i występujące w układach homozygotycznych są prawdopodobnie letalne, ponieważ jak dotąd nie opisano takiego przypadku. *MFN2* jest więc niezbędnym białkiem do prawidłowego rozwoju całego organizmu [35], na co wskazują zarówno dane laboratoryjne, jak i kliniczne.

## PIŚMIENNICTWO

1. Harper PS (2008) Human Biochemical Genetics, w: A short history of medical genetics. Oxford University Press, str. 171-193
2. Mnatsakanyan L, Ross-Cisneros FN, Carelli V, Wang MY, Sadun AA (2011) Axonal degeneration in peripheral nerves in a case of Leber hereditary optic neuropathy. J Neuroophthalmol 684: 134-141
3. van der Ploeg AT, Reuser AJJ (2008) Lysosomal storage disease 2 - Pompe's disease. Lancet 372: 1342-1353
4. Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, Schroder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den BP, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic R,V, Nevo Y, Tournev I, Guegueltcheva V, Roelens F, Vierregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V (2006) *MFN2* mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. Brain 129: 2093-2102
5. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daaugard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. J Biol Chem 278: 17190-17197
6. Chen KH, Guo XM, Ma DL, Guo YH, Li QA, Yang DM, Li PF, Qiu XY, Wen SJ, Xiao RP, Tang JA (2004) Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. Nature Cell Biol 6: 872-8U8
7. Zorzano A (2009) Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. Appl Physiol Nutr Metab 34: 433-439
8. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. Nature 456: 605-610
9. Zheng M, Xiao RP (2010) Role of mitofusin 2 in cardiovascular oxidative injury. J Mol Med 88: 987-991
10. Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 116: 153-166
11. Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M (2010) Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. Semin Cell Dev Biol 21: 566-574
12. de Brito OM, Scorrano L (2009) Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. Mitochondrion 9: 222-226
13. Santel A, Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J Cell Sci 114: 867-874



14. Liesa M, Borda-d'Agua B, Medina-Gomez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, Palacin M, Vidal-Puig A, Zorzano A (2008) Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. *PLoS 3*: e3613
15. Li Y, Yin R, Liu J, Wang P, Wu S, Luo J, Zhelyabovska O, Yang Q (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulates mitofusin 2 expression in the heart. *J Mol Cell Cardiol 46*: 876-882
16. Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A (2006) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes 55*: 1783-1791
17. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol 567*: 349-358
18. Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, Cheng H, Chen KH, Xiao RP (2007) Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem 282*: 23354-23361
19. Wang W, Cheng X, Lu J, Wei J, Fu G, Zhu F, Jia C, Zhou L, Xie H, Zheng S (2010) Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. *Biochem Biophys Res Commun 400*: 587-592
20. Cho DH, Nakamura T, Lipton SA (2010) Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci 67*: 3435-3447
21. Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem 280*: 25060-25070
22. Zorzano A, Liesa M, Palacin M (2009) Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol. 41*: 1846-1854
23. Merkwirth C, Langer T (2008) Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell 135*: 1165-1167
24. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet 14*: 1405-1415
25. Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci 27*: 422-430
26. Brockmann K, Dreha-Kulaczewski S, Dechent P, Bonnemann C, Helms G, Kyllerman M, Bruck W, Frahm J, Huehne K, Gartner J, Rautenstrauss B (2008) Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol 255*: 1049-1058
27. Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci 30*: 4232-4240
28. Russo GJ, Louie K, Wellington A, Macleod GT, Hu F, Panchumarthi S, Zinsmaier KE (2009) Drosophila Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci 29*: 5443-5455
29. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet 36*: 449-451
30. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ (2010) Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation 121*: 2012-2022
31. Zorzano A, Hernandez-Alvarez MI, Palacin M, Mingrone G (2010) Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-1beta and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta 1797*: 1028-1033
32. Pawlikowska P, Gajkowska B, Orzechowski A (2007) Mitofusin 2 (Mfn2): a key player in insulin-dependent myogenesis *in vitro*. *Cell Tissue Res. 327*: 571-581
33. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell 130*: 548-562
34. Cartoni R, Arnaud E, Medard JJ, Poirot O, Courvoisier DS, Chrast R, Martinou JC (2010) Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain 133*: 1460-1469
35. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol 160*: 189-200

## Mitofusin 2 as a crucial peripheral nervous system protein and a common regulator of cell metabolism

Maria Kawalec<sup>1</sup>, Katarzyna Kotruchow<sup>2</sup>, Andrzej Kochański<sup>2</sup>, Barbara Zabłocka<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology Unit, <sup>2</sup>Neuromuscular Unit, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 5 Pawinskiego Str., 02-106 Warsaw, Poland

✉e-mail: zablocka@cmdik.pan.pl

**Key words:** Charcot-Marie-Tooth, mitofusin 2, neurodegeneration, mitochondrial fusion, metabolism

### ABSTRACT

Some of the metabolic disorders are manifested by a predominantly expressed symptoms from the single organ, however, they display discrete symptoms from other tissues. Charcot Marie Tooth disease (CMT) divided into demyelinating (CMT1) and axonal (CMT2) subtypes is characterized by a slowly progressive wasting of distal muscles. CMT2A form diagnosis requires identification of mutation in a gene coding for mitofusin 2 (MFN2). Mitofusin 2 is a protein of an outer mitochondrial membrane encoded in the nuclear genome and characterized by numerous biochemical functions. Mfn2 is involved mainly in the fusion of mitochondria and the cooperation between endoplasmic reticulum and mitochondria. It seems probably that Mfn2 possesses also some regulatory functions and takes part in a regulation of respiratory chain activity, transcription of several proteins and in intracellular signals transduction. Mfn2-linked pathology is also observed in diabetes and heart diseases. Here, we aim to show that mitofusin 2 is a protein crucial not only for peripheral nerve disorders but is a one of the common regulator of cell metabolism.

# Choroby spowodowane mutacjami w mitochondrialnym DNA

Marta Wojewoda<sup>1</sup>

Krzysztof Zabłocki<sup>2</sup>

Joanna Szczepanowska<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych, <sup>2</sup>Pracownia Metabolizmu Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN

✉Pracownia Metabolizmu Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: j.szczepanowska@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 20 kwietnia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 17 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** choroby mitochondrialne, MELAS, MERRF, LHON, NARP, MIDD

**Podziękowanie:** Praca finansowana przez MNiSW ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy 1189/COS2007/01.

## STRESZCZENIE

Do szerokiej kategorii chorób metabolicznych należą niewątpliwie tzw. choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mitochondrialnym DNA (mtDNA). Ich częstą konsekwencją metaboliczną jest ograniczona wydajność oksydacyjnej fosforylacji i w efekcie niedobór ATP. Większość białek mitochondrialnych (~1500) jest kodowana przez genom jądrowy, natomiast w genomie mitochondrialnym kodowanych jest jedynie 11 podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego i 2 podjednostki syntazy ATP oraz 22 rodzaje tRNA i 2 rodzaje rRNA. Mutacje w mtDNA są przyczyną poważnych anomalii. Do tej pory opisano ponad 250 patogennych mutacji w obszarze mitochondrialnego DNA. Do najczęściej występujących należą mutacje punktowe genów kodujących mitochondrialne tRNA takie jak: 3243A→G powodująca zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów) lub zespół MIDD (dziedziczona po matce cukrzyca z głuchotą), oraz 8344A→G powodująca zespół MERRF (padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami mięśniowymi). Zidentyfikowano również mutacje w obszarze genów kodujących podjednostki syntazy ATP, z których najczęstszą jest mutacja 8993T→G związana z zespołem NARP (neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki). Choroby mitochondrialne mogą być również spowodowane mutacjami w genach kodujących białka mitochondrialne, w obszarze jądrowego DNA.

## WPROWADZENIE

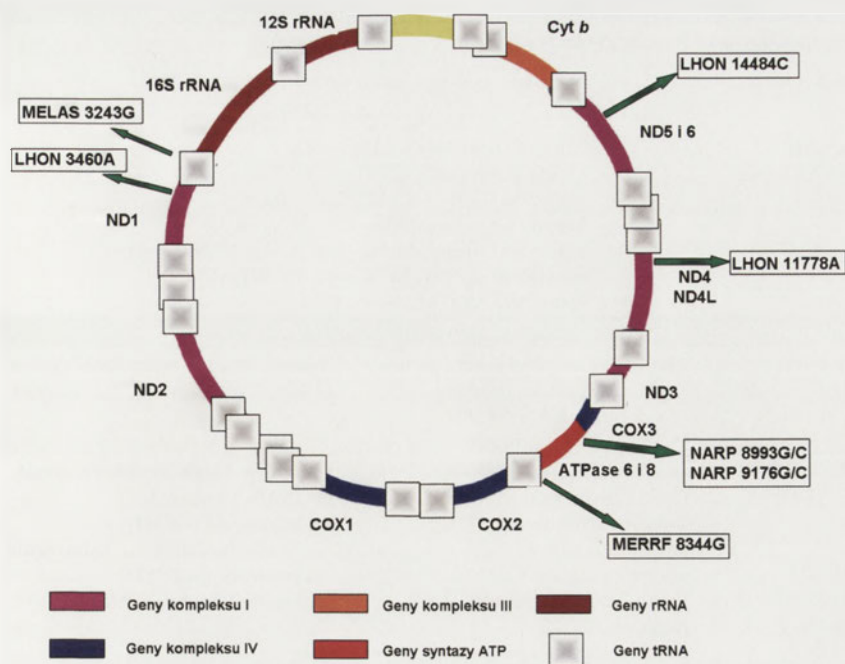
Mitochondria są organellami pełniącymi w komórce wiele funkcji spośród, których najważniejszą jest wytwarzanie ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej [1]. W organellach tych zachodzi wiele procesów metabolicznych takich jak cykl kwasów trikarboksylowych,  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych, a także pierwsze etapy glukoneogenezy (w wątrobie i korze nerek) oraz pierwsze etapy cyklu ornitynowego (w wątrobie), a także niektóre reakcje steroidogenezy i wiele innych [4]. Organelle te biorą również udział w utrzymaniu homeostazy jonów  $Ca^{2+}$  w komórce [2], w inicjacji procesu apoptozy [3] i są głównym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu. W mitochondriach zachodzi synteza centrów żelazo-siarkowych i hemu [5]. Zaburzenia funkcji mitochondriów wiążą się z wieloma zespołami chorobowymi o złożonej i często nie do końca wyjaśnionej etiologii takimi jak choroby metaboliczne (w tym cukrzyca), nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne i psychiczne [6-10]. Uważa się również, że zaburzenia funkcjonowania mitochondriów wywołane mutacjami genomu mitochondrialnego leżą u podstaw starzenia się organizmów [1,10,11].

## GENOM MITOCHONDRIALNY

Mitochondria mają własny genom, który ma postać dwuniciowej, kolistej cząsteczki DNA. W komórce człowieka występuje od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy kopii cząsteczek mitochondrialnego DNA, a każda z nich koduje 11 białek będących podjednostkami kompleksów łańcucha oddechowego, 2 podjednostki syntazy ATP, 22 rodzaje tRNA i 2 rodzaje rRNA (Ryc. 1) [12]. Częstość mutacji mitochondrialnego DNA jest od 10 do 20 razy większa niż częstość mutacji DNA jądrowego, gdyż genom mitochondrialny nie jest osłonięty białkami histonowymi i przez to jest bezpośrednio narażony na mutagenne działanie reaktywnych form tlenu (RFT) wytwarzanych w mitochondriach. Do tej pory opisano ponad 250 patogennych mutacji w obszarze mitochondrialnego genomu mających charakter mutacji punktowych lub delecji [13,14].

## HETEROPLAZMIA

Zjawisko jednoczesnego występowania w jednej komórce cząsteczek zmutowanego DNA obok mtDNA bez mutacji zwane jest heteroplazmią. Stopień heteroplazmii (czyli proporcja między ilością DNA zmutowanego i prawidłowego w komórce) decyduje o tym, czy dojdzie do zaburzenia funkcji mitochondriów, a



**Rycina 1.** Mapa mitochondrialnego DNA człowieka z zaznaczonymi głównymi patogennymi mutacjami. Skrót: NARP – neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (ang. *neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa*); MELAS – miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów (ang. *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*); LHON – dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (ang. *Leber’s hereditary optic neuropathy*); MERRF – padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami (ang. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*). Rycina wykonana w/g [65].

zatem decyduje o fenotypie komórki [15]. Ze względu na to, że prawie wszystkie patogenne mutacje mitochondrialnego DNA są funkcjonalnie recesywne, krytyczny stopień heteroplazmii jest zazwyczaj stosunkowo wysoki (>70–80%). Po jego przekroczeniu pojawiają się charakterystyczne objawy towarzyszące chorobom mitochondrialnym takie jak ataki epilepsji, osłabienie mięśni szkieletowych, kardiomiopatia, atrofia nerwu wzrokowego czy zaburzenia funkcji nerek i cukrzyca. Wystąpienie objawów i stopień ich nasilenia zależą od zapotrzebowania energetycznego danej tkanki czy narządu i w pierwszej kolejności występują w tkankach i narządach o dużej intensywności metabolizmu tlenowego takich jak mięśnie i układ nerwowy. Badania epidemiologiczne przeprowadzone przez zespoły badawcze w różnych częściach świata wykazały, że pełnoobjawowe choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mtDNA występują ze średnią częstością 1 na 5000, natomiast częstość patogennych mutacji mtDNA nie dających zmian fenotypowych (niski stopień heteroplazmii) jest o wiele wyższa (1 przypadek na kilkaset przebadanych osób) [16].

## GENETYCZNA KLASYFIKACJA CHOROBY MITOCHONDRIALNYCH

Choroby mitochondrialne związane z mutacjami w genomie mitochondrialnym są dziedziczone w linii matczynej. Ich przyczyną są mutacje punktowe. Do najczęściej występujących należą mutacje 3243A→G i 8344A→G, które występują w obszarze genów kodujących, odpowiednio, tRNA<sup>Leu</sup> i tRNA<sup>Lys</sup>, natomiast najbardziej znanymi muta-

cjami punktowymi w genach kodujących rRNA są 1555A→G i 1494T→C. Choroby spowodowane przez te mutacje zostały wymienione w tabeli 1.I. W obszarze mitochondrialnego genomu mogą również występować chorobotwórcze zmiany o charakterze delecji.

Ponieważ ponad 99% białek mitochondrialnych jest kodowanych w DNA jądrowym, definicja chorób mitochondrialnych obejmuje także zaburzenia mitochondriów spowodowane mutacjami w tych genach. Do najbardziej znanych należą mutacje w genie *POLG* kodującym podjednostkę katalityczną mitochondrialnej polimerazy gamma DNA, a najczęściej występującą jednostką chorobową związaną z mutacjami w obszarze tego genu jest zespół Alpers-Huttenlocher’a. Częstymi chorobami mitochondrialnymi są również zespoły chorobowe związane ze spadkiem zawartości mtDNA, spowodowane mutacjami niektórych genów jądrowych (*TK2*, *DGUOK*, *SUCLA*, *SUCLG*, *RRM2B*, *MPV17*, *TWINKLE*, *TP*). Kolejne grupy genów, których mutacje mogą powodować choroby mitochondrialne, to geny kodujące podjednostki łańcucha oddechowego i syntazy ATP, białka uczestniczące w formowaniu kompleksów z poszczególnych podjednostek oraz białka wchodzące w skład mitochondrialnego aparatu translacyjnego. Przykłady chorób mitochondrialnych spowodowanych przez mutacje genów jądrowych zostały przedstawione w tabeli 1.II.

Dodatkowo, choroby mitochondrialne mogą być również spowodowane mutacjami w genach kodujących białka szlaku biosyntezy koenzymu CoQ10 (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *CABC1*, *COQ9*) oraz w wielu innych genach jądrowych. Dziedziczenie chorób mitochondrialnych spowodowanych mutacjami w jądrowym DNA jest zgodne z zasadami genetyki mendelowskiej [15].

## BUDOWA I DZIAŁANIE ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO

Chorobom mitochondrialnym często towarzyszy zaburzenie funkcji kompleksów łańcucha oddechowego, które może prowadzić do deficytu energetycznego i zwiększonego wytwarzania RFT uszkadzających struktury komórki. Elektrony pochodzące z utlenienia substratów oddechowych są przenoszone przez łańcuch oddechowy na tlen (Ryc. 2) zgodnie z wzrastającym potencjałem oksydoredukcyjnym kolejnych kompleksów łańcucha oddechowego. Energia uwalniana podczas kolejnych reakcji redoks jest wykorzystywana do transportu protonów przez błonę mitochondrialną do przestrzeni międzybłonowej przez kompleksy I, III i IV łańcucha oddechowego. Różnica stężeń protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta pH$ ) i wynikający z tego potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej ( $\Delta\psi$ ) stanowią siłę protonomotoryczną,

Tabela 1. Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w genomie mitochondrialnym i genomie jądrowym.

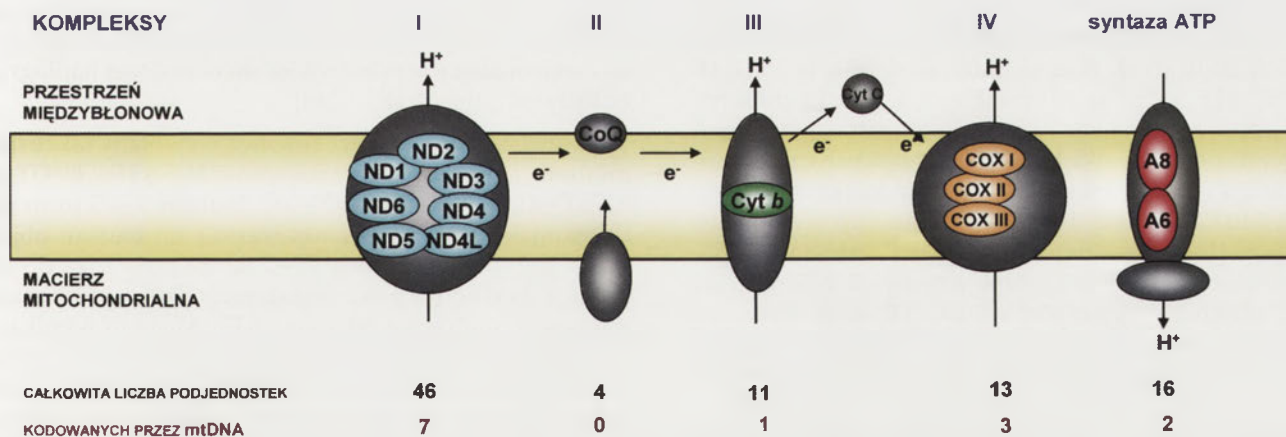
I. Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mtDNA			
przykłady chorób spowodowanych przez rearanżacje w obszarze mtDNA	przykłady chorób spowodowanych przez mutacje punktowe		
	w genach kodujących białka		w genach kodujących tRNA/rRNA
CPEO KSS PS cukrzyca, utrata słuchu	LHON (11778G→A, 14484T→C, 3460G→A); NARP (8993T→G, 8993T→C, 9176T→G, 9176T→C)	MELAS (3243A→G, 3271T→C, 3251A→G); MERRF (8344A→G, 8356T→C); CPEO (3243A→G, 4274T→C); miopatia (1494T→C, 12320A→G); kardiomiopatia (3243A→G, 4269A→G); cukrzyca i utrata słuchu (3243A→G, 12258C→A); encefalomiopatia (1606G→A, 10010T→C); utrata słuchu (7445A→G, 1555A→G)	
II. Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w genomie jądrowym			
spowodowane mutacjami o charakterze delecji, które mogą prowadzić do MDDS (zespół deplecji mtDNA)	spowodowane mutacjami genów kodujących podjednostki łańcucha oddechowego	spowodowane mutacjami genów kodujących białka uczestniczące w składaniu kompleksów łańcucha oddechowego	spowodowane mutacjami genów kodujących czynniki transylacyjne
CPEO ( <i>POLG</i> , <i>POLG2</i> , <i>C10orf2/TWINKLE</i> , <i>SLC25A4/ANT1</i> ) zespół Alpers-Huttenlocher'a ( <i>POLG</i> ) atrofia mięśni rdzenia kręgowego; MDDS ( <i>TK2</i> ) encefalomiopatia i niewydolność wątroby; MDDS ( <i>DGUOK</i> ) hipotonia, zaburzenia ruchu i/lub zespół Leigh'a z kwasicą metylomalonową; MDDS ( <i>SUCLA/SUCLG</i> ) hipotonia, encefalopatia, tubulopatia nerkowa, kwasica mleczanowa; MDDS ( <i>RRM2B</i> ) miopatia i katarakta ( <i>GFER</i> ) ciężka niewydolność wątroby; MDDS ( <i>MPV17</i> ) MDDS ( <i>C10orf2/TWINKLE</i> )	syndrom Leigh'a ( <i>NDUFS1</i> , <i>NDUFS4</i> , <i>NDUFS7</i> , <i>NDUFS8</i> , <i>NDUFV</i> , <i>SDHA</i> ) kardiomiopatia i encefalopatia ( <i>NDUFS2</i> ) optyczna atrofia i ataksja ( <i>SDHA</i> ) (hypokalemia i kwasica mleczanowa ( <i>UQCRB</i> ))	syndrom Leigh'a ( <i>SURF1</i> , <i>LRPPRC</i> ) uszkodzenie wątroby i kwasica ketonowa ( <i>SCO1</i> ) kardiomiopatia i encefalopatia ( <i>SCO2</i> ) leukodystrofia i tubulopatia nerkowa ( <i>COX10</i> ) kardiomiopatia spowodowana hipertrofią ( <i>COX15</i> ) encefalopatia, niewydolność wątroby i tubulopatia nerkowa ( <i>BCS1L</i> ) encefalomiopatia ( <i>ATPAF</i> ) leukodystrofia ( <i>SDHAF1</i> )	syndrom Leigh'a, niewydolność wątroby i kwasica mleczanowa ( <i>GFM1</i> ) kwasica mleczanowa, zaburzenia rozwojowe ( <i>MRPS16</i> ) miopatia i anemia ( <i>PUS1</i> )

W tabeli przedstawiono przykłady chorób mitochondrialnych, spowodowanych przez mutacje w obszarze genomu mitochondrialnego (I): zespół przewlekłej postępującej zewnętrznej oftalmoplegii (CPEO, ang. *chronic progressive external ophthalmoplegia*); zespół Kearnsa-Sayre'a (KSS, ang. *Kearns-Sayre syndrome*); zespół Pearsona (PS, ang. *Pearson syndrome*); dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (LHON, ang. *Leber's hereditary optic neuropathy*); neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki (NARP, ang. *neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa*); miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów (MELAS, ang. *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*); padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami (MERRF, ang. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) i genomu jądrowego (II), którym towarzyszą mutacje w obszarze genów kodujących podjednostki mitochondrialnej polimerazy DNA *POLG* (ang. *polymerase (DNA directed), gamma catalytic subunit*); *POLG2* (ang. *polymerase (DNA directed), gamma 2 accessory subunit*); mitochondrialną helikazę DNA (*C10orf2/TWINKLE*, ang. *chromosome 10 open reading frame 2*); transporter nukleotydów adeninowych (*SLC25A4/ANT1*, ang. *solute carrier family 25*); mitochondrialną izoformę kinazy tymidynowej (*TK2*, ang. *thymidine kinase 2*); mitochondrialną kinazę deoksyguanozynową (*DGUOK*, ang. *deoxyguanosine kinase*); podjednostki ligazy bursztynilo-CoA (*SUCLA/SUCLG*, ang. *succinate-CoA ligase*); reduktazę rybonukleotydów (*RRM2B*, ang. *ribonucleotide reductase M2 B*); czynnik wzrostu stymulujący regenerację wątroby (*GFER*, ang. *growth factor, augmentor of liver regeneration*); *MPV17* (ang. *mitochondrial inner membrane protein*); podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8* (ang. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein*), *NDUFV2* (ang. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein*); podjednostkę kompleksu II łańcucha oddechowego (*SHDA*, ang. *succinate dehydrogenase complex, subunit A*) i czynnik uczestniczący w składaniu tego kompleksu (*SDHAF1*, ang. *succinate dehydrogenase complex assembly factor 1*); podjednostkę kompleksu III łańcucha oddechowego (*UQCRB*, ang. *ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein*) i czynnik uczestniczący w jego składaniu (*BCS1L*, ang. *BCS1-like (S. cerevisiae)*); czynnik uczestniczący w biogenezie kompleksu IV łańcucha oddechowego (*SURF1*, ang. *surfeit locus protein*) i czynniki uczestniczące w składaniu tego kompleksu (*SCO1*, *SCO2*, ang. *cytochrome oxidase deficient homolog*; *COX10*, *COX15*, ang. *cytochrome c oxidase assembly protein*); (*LRPPRC*, ang. *leucine-rich PPR-motif containing*); czynnik uczestniczący w składaniu domeny  $F_1$  syntazy ATP (*ATPAF2*, ang. *ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2*); *GFM1* (ang. *G elongation factor, mitochondrial*); mitochondrialne białko rybosomalne (*MRPS16*, ang. *mitochondrial ribosomal protein S16*); *PUS1* (ang. *tRNA pseudouridylate synthase 1*) [13,66,67].

która jest wykorzystywana przez syntazę ATP do fosforylacji ADP [17].

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej zlokalizowane są cztery rodzaje kompleksów łańcucha oddechowego: oksydoreduktaza NADH: ubichinon (kompleks I), oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon (kompleks II), cytochrom

$bc_1$  (kompleks III) i oksydaza cytochromowa (kompleks IV) [18]. Kompleks I składa się z około 45 podjednostek, z których 7 kodowanych jest przez genom mitochondrialny, natomiast składająca się z 4 podjednostek kodowanych przez genom jądrowy oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon pełni zarówno funkcję kompleksu II łańcucha oddechowego jak i jest jednym z enzymów cyklu kwasu cytrynowego



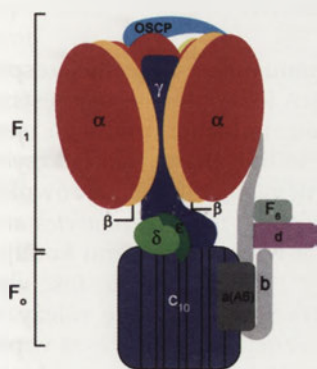
Rycina 2. Budowa łańcucha oddechowego i syntazy ATP. Opis zamieszczony w tekście. Rycinę wykonano w/g [25].

[19]. Kompleks III, występujący w formie natywnej w postaci dimeru, składa się z 11 podjednostek, z których tylko jedna jest kodowana przez genom mitochondrialny [20,21]. Także kompleks IV łańcucha oddechowego występuje w formie natywnej w postaci dimerów i składa się z 13 podjednostek białkowych, z których 3 kodowane są przez genom mitochondrialny [22]. Kompleksy I, III i IV łańcucha oddechowego u ssaków tworzą superkompleksy zwane niekiedy respirasomami, które łączą się w większe oligomeryczne helikalne struktury (ang. *respiratory strings*). Tworzenie respirasomów nie tylko może ułatwiać transport elektronów, ale również stabilizuje tworzące je kompleksy [23].

### BUDOWA I DZIAŁANIE SYNTAZY ATP

Mitochondrialna syntaza ATP wyizolowana z serca wołu zbudowana jest z 16 podjednostek [24], z których dwie [ $\alpha$  (A6) i A6L (A8)] są kodowane przez genom mitochondrialny [25,26]. Pod względem strukturalnym mitochondrialna syntaza ATP składa się dwóch domen: katalitycznej  $F_1$  (ang. *factor 1*) odpowiedzialnej za syntezę/hydrolizę ATP i domeny błonowej  $F_0$  (ang. *factor oligomycin-sensitive*), w obszarze której tworzy się kanał dla jonów  $H^+$ . Domena  $F_1$  składa się z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$ , ale spośród nich tylko podjednostka  $\beta$  wykazuje powinowactwo do nukleotydów. Natomiast domena  $F_0$  utworzona jest przez pierścień zbudowany

z 10 podjednostek  $c$ , podjednostki  $a$  (zwanej również podjednostką  $\alpha$ ) i błonowej części podjednostki  $b$  oraz innych dodatkowych polipeptydów. Podjednostki  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  tworzą centralnie położoną nóżkę wewnętrzną (ang. *central stalk*) łączącą podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  z domeną  $F_0$ . Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  są również połączone z domeną  $F_0$  przez nóżkę zewnętrzną (ang. *peripheral stalk*)



Rycina 3. Budowa mitochondrialnej syntazy ATP. Zmodyfikowano na podstawie [28].

utworzoną przez podjednostki OSCP,  $F_0$ ,  $b$ , oraz  $d$  (Ryc. 3) [26-28].

Syntaza ATP w formie natywnej występuje w postaci dimerów, które łączą się i tworzą w wewnętrznej błonie mitochondrialnej większe oligomeryczne struktury. Tworzenie dimerów nie tylko przyczynia się do stabilizacji enzymu, ale również determinuje morfologię grzebieni mitochondrialnych, ponieważ błonowe części dwóch monomerów połączonych przez podjednostki  $a$  są zorientowane względem siebie pod pewnym, ustalonym kątem. Natomiast oligomeryzacja zachodzi przez połączenie zarówno części błonowych jak i podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  dimerów poprzez dodatkowe białka [23,29].

### CHOROBY MITOCHONDRIALNE ZWIĄZANE Z MUTACJAMI W OBSZARZE mtDNA

#### MELAS

Do najczęściej występujących chorób mitochondrialnych należy zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów). Do tej pory opisano około 30 różnych patogennych mutacji w obszarze mtDNA związanych z tą chorobą, które występują w genach kodujących cząsteczki tRNA i niektóre podjednostki łańcucha oddechowego. Najczęściej występującą jest mutacja punktowa 3243A→G w genie mitochondrialnym kodującym tRNA<sup>Leu</sup>, której obecność stwierdza się w 80% przypadkach tej choroby. Występuje ona z różną częstością na świecie, gdyż w Europie (Finlandia) odnotowano 16,3 a w Australii 236 przypadków na 100 000 osób. Objawy związane z zespołem MELAS pojawiają się najczęściej pomiędzy 2 a 10 rokiem życia i obejmują toniczno-kloniczne napady padaczki, stany zagubienia, nawracające bóle głowy i wymioty, demencję, psychozę, utratę słuchu, karłowatość oraz polineuropatię [30,31].

#### LHON

Dziedziczny zespół Lebera (LHON) charakteryzuje się zanikiem nerwów wzrokowych. Pierwsze objawy choroby zazwyczaj pojawiają się pomiędzy 18 a 30 rokiem życia. U niektórych pacjentów stwierdzono także występowanie do-

datkowych zaburzeń neurologicznych takich jak drżenie, zaburzenia motoryczne, obwodowa neuropatia czy encefalopatia. Do tej pory opisano ponad 60 mutacji punktowych w genach kodujących podjednostki kompleksów I, III, IV i syntazy ATP, które są związane z tą jednostką chorobową. Najczęściej spotykane są mutacje punktowe w genach kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego: 11778G→A (dominuje w populacji kaukaskiej i azjatyckiej), 3460G→A, oraz 14484T→C (dominuje w populacji kanadyjskiej francuskiego pochodzenia). Częstość występowania zespołu LHON w Europie wynosi od 2 (Finlandia) do 3,22 (Anglia) przypadków na 100 000 osób. Mimo, że u większości pacjentów z zespołem LHON stwierdza się zwykle bardzo wysoki stopień wkładu tych mutacji (homoplazmia), jedynie u 10% kobiet i 50% mężczyzn obserwuje się objawy choroby, co wskazuje na istnienie innych czynników warunkujących jej przebieg. Wykazano, że zarówno przynależność pacjenta do określonej haplogrupy mtDNA (u człowieka wyróżnia się ponad 27 haplogrup) jak i działanie środowiska mają wpływ na prawdopodobieństwo wystąpienia i nasilenie objawów związanych z tą jednostką chorobową [32-34].

#### MERRF

Stosunkowo częstą chorobą mitochondrialną jest również MERRF (padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami mięśniowymi), której, oprócz ataków epilepsji, towarzyszy karłowatość, miopatia, ataksja mózdkowa, utrata słuchu, demencja i polineuropatia. Pierwsze objawy choroby pojawiają się w wieku dziecięcym. Obecnie znanych jest 7 mutacji punktowych w obszarze mtDNA powodujących zespół MERRF, a najczęstszą z nich jest mutacja 8344A→G w genie kodującym tRNA<sup>Lys</sup>, która jest odpowiedzialna za 80% przypadków tej choroby [30,35]. Częstość występowania tej mutacji w Europie wynosi 0-0,25 przypadków na 100 000 osób [36].

#### NARP/MILS

**Mutacja podjednostki *a* syntazy ATP.** Mutacje punktowe w obszarze genu *MT-ATP6* kodującego podjednostkę *a* syntazy ATP są związane z występowaniem zespołu NARP/MILS (neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki/zespół Leigh'a). Ta jednostka chorobowa została po raz pierwszy opisana przez Holt i wsp. [37] i najczęściej jest wywołana mutacją 8993T→G. Do objawów towarzyszących zespołowi NARP należą: zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, neurogenna wiotkość mięśni proksymalnych, ataksja, napady drgawek, opóźnienie rozwoju i neuropatia czuciowa, a ich występowanie i nasilenie zależy od stopnia heteroplazmii. Jeśli poziom heteroplazmii mutacji 8993T→G jest niższy niż 60%, nie stwierdza się występowania objawów choroby. Przy poziomie heteroplazmii 60-75% obserwuje się retinopatię, natomiast pełnobjawowy zespół NARP stwierdza się przy poziomie heteroplazmii 75-90%. Powyżej 90% występuje zespół MILS, zwany również syndromem Leigh'a, który cechuje postępująca encefalopatia prowadząca w wieku niemowlęcym do śmierci pacjenta [25,38]. Nie zawsze jednak nasilenie objawów koreluje z wysokim poziomem heteroplazmii [39], co podobnie jak w przypadku innych

chorób mitochondrialnych, wskazuje na istnienie dodatkowych czynników wpływających na przebieg tej choroby. Jednym z nich jest polimorfizm mitochondrialnego genu warunkujący przynależność do określonej haplogrupy mitochondrialnego DNA [40].

Zespół NARP może być również wywołany także innymi mutacjami punktowymi w genie *MT-ATP6*: 8993T→C, 9176T→G, 9176T→C, 9185T→C. Mutacje T→G prowadzą do zamiany Leu→Arg i towarzyszą im cięższe objawy niż w przypadku mutacji T→C, które prowadzą do substytucji Leu→Pro, gdyż substytucja T→G prowadzi do większego obniżenia poziomu ATP. Może to wynikać ze zmniejszenia przepływu protonów przez kanał jonowy znajdujący się w obszarze podjednostki *a* i upośledzenia sprzężenia przepływu protonów z ruchem obrotowym pierścienia *c* [25,41-44]. Zmniejszenie szybkości fosforylacji ADP może być spowodowane nieprawidłowym złożeniem i niestabilnością syntazy ATP [45-48]. Badania prowadzone na materiale uzyskanym od pacjentów oraz na komórkach cybrydowych otrzymywanych poprzez fuzję cytoplasm (komórek pozbawionych jądra komórkowego, pochodzących od pacjentów) z określoną mutacją w obszarze mtDNA z komórkami pozbawionymi mitochondriów, a także z wykorzystaniem modelu drożdżowego ujawniły istnienie jeszcze innych biochemicznych i bioenergetycznych aspektów towarzyszących tej jednostce chorobowej [49,50]. Są nimi wzmożone wytwarzanie RFT, zmiany adaptacyjne systemu antyoksydacyjnego komórki [51-53] oraz zaburzenia organizacji sieci mitochondrialnej i zaburzenia homeostazy jonów wapnia [54]. Uważa się że zespół NARP występuje rzadziej niż 0,71 przypadku na 100 000 osób, chociaż dostępne dane epidemiologiczne są zdecydowanie niepełne. [55].

**Mutacja podjednostki  $\epsilon$  syntazy ATP.** W roku 2010 zidentyfikowano mutację 12Y→C w genie jądrowym *ATP5E* kodującym podjednostkę epsilon ( $\epsilon$ ) syntazy ATP [56], która wchodzi w skład nóżki centralnej domeny F1. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem fibroblastów pacjenta wykazały zmniejszenie aktywności enzymu i syntezy ATP w mitochondriach o 60-70% w stosunku do komórek kontrolnych oraz zmniejszenie ilości prawidłowo złożonego kompleksu syntazy ATP, co wskazuje na znaczącą rolę podjednostki  $\epsilon$  w składaniu domeny F1.

#### CUKRZYCA MITOCHONDRIALNA

Mutacja typowa dla wspomnianego wcześniej zespołu MELAS (3243A→G), będąca jednocześnie najczęstszą mutacją w obszarze genu mitochondrialnego, jest też przyczyną dziedzicznej w linii matczynej cukrzycy współistniejącej z upośledzeniem słuchu (znanej również jako zespół MIDD, ang. *maternally-inherited diabetes and deafness*). Mutacja ta występuje w obszarze genu kodującego mitochondrialne tRNA<sup>Leu</sup>. Jej średnia częstość występowania u pacjentów chorych na cukrzycę zależy w dużym stopniu od grupy etnicznej i jest najwyższa w populacji japońskiej (1,5% wszystkich przypadków cukrzycy), podczas gdy w populacji europejskiej wynosi 0,8%, a w innych grupach etnicznych jest jeszcze niższa (0,6%) [30,57].

Występowanie cukrzycy u pacjentów będących nosicielami mutacji 3243A→G jest częste (>85%), natomiast wiek pacjenta w chwili pojawienia się objawów jest różny (11-68 lat). Powyżej 75% pacjentów z cukrzycą spowodowaną mutacją 3243A→G cierpi również na niedosłuch lub całkowitą utratę słuchu. Do innych objawów, które mogą towarzyszyć tej jednostce chorobowej należą: dystrofia w obszarze płamki żółtej, nadciśnienie i otyłość typu brzuszego, jak również udary i bóle głowy, karłowatość, atrofia kory mózgowej i mózdzku, miopatia, niewydolność serca, niewydolność nerek, zaparcia oraz zaburzenia wchłaniania. Stwierdzono również występowanie zaburzeń psychicznych takich jak depresja czy schizofrenia [57,58].

Mutacja 3243A→G prowadzi do zaburzenia czwartorzędowej struktury mitochondrialnego tRNA<sup>Leu</sup> i dimeryzacji cząsteczek. Stwierdzono, że konsekwencją tego jest obniżenie aktywności I i IV kompleksu łańcucha oddechowego i deficyt energetyczny w tkankach i narządach o wysokim poziomie metabolizmu takich jak trzustka, ślimak, siatkówka, mięśnie, nerki i mózg. W przypadku trzustki dochodzi do zmniejszenia masy komórek β i niedoboru insuliny, który prowadzi do wystąpienia objawów cukrzycy, podczas gdy wrażliwość komórek docelowych na insulinę pozostaje niezmienną lub ulega jedynie nieznacznemu obniżeniu [57]. Przyczyną niedosłuchu/utraty słuchu jest natomiast deficyt energetyczny w komórkach budujących prążek naczyniowy (ang. *stria vascularis*), które zawierają dużą ilość mitochondriów. Ponieważ komórki te produkują endolimfę wypełniającą przewód ślimaka (ang. *scala media*), ich dysfunkcja może zaburzać stężenie jonów w tym roztworze [59] co mogłoby utrudniać powstawanie potencjału czynnościowego w komórkach słuchowych narządu Cortiego leżących na granicy dwóch środowisk o krańcowo różnym składzie elektrolitowym [60]. Dodatkowo, analiza preparatów histopatologicznych pacjentów z zespołem MIDD wykazała atrofię prążka naczyniowego [57].

Cukrzyca o podłożu mitochondrialnym może być również związana z występowaniem innych mutacji punktowych w obszarze genów kodujących mitochondrialne tRNA<sup>Leu</sup> (3256C→T, 3264T→G, 3254C→G i 3271T→C), tRNA<sup>Lys</sup> (8296A→G, 8344A→G i 8356T→C), tRNA<sup>Arg</sup> (10438A→G), tRNA<sup>Ser</sup> (12258C→A) i tRNA<sup>Ser</sup> (14709T→C). Odnotowano również przypadki cukrzycy mitochondrialnej spowodowanej mutacjami punktowymi w obszarze genu ND1 kodującego jedną z podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego (3394T→C i 3398T→C) i w obszarze pętli D (14577T→C). Badania epidemiologiczne wykazały, że mutacje w obszarze genomu mitochondrialnego są odpowiedzialne za około 1% wszystkich przypadków cukrzycy [57].

W przypadku cukrzycy typu 2 charakteryzującej się insulinopornością komórek mięśni, wątroby i tkanki tłuszczowej również zaobserwowano zaburzenia funkcji mitochondriów, ale były one niezwiązane z obecnością mutacji w obszarze mitochondrialnego DNA. Nie wiadomo więc czy zaburzenia mitochondriów są pierwotną przyczyną sprzyjającą rozwojowi insulinoporności, czy mają charakter wtórny i wynikają ze stresu oksydacyjnego spowodowane-

go hiperglikemią. Uważa się, że pierwotna dysfunkcja mitochondriów (polegająca na obniżonej wydajności utleniania kwasów tłuszczowych) może leżeć u podstaw dyslipidemii i insulinoporności. Niezależnie od tego, co jest przyczyną a co skutkiem, wraz z rozwojem cukrzycy obserwuje się nasilenie uszkodzeń mitochondriów, co zwiększa insulinoporność tworząc „samonapędzające się błędne koło”. Mechanizmy te są przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich potencjalne znaczenie w terapii cukrzycy, jednak ich omawianie wykracza poza ramy niniejszego artykułu.

## TERAPIA CHOROÓB MITOCHONDRIALNYCH

Obecnie nie istnieją skuteczne metody leczenia chorób mitochondrialnych. W praktyce klinicznej zaleca się pacjentom aktywność fizyczną. Równocześnie stosuje się leczenie paliatywne, polegające na łagodzeniu objawów poprzez interwencję farmakologiczną i chirurgiczną, oraz na usuwaniu i neutralizowaniu szkodliwych metabolitów. Ze względu na towarzyszący chorobom mitochondrialnym deficyt energetyczny podaje się pacjentom metabolity i ko-faktory takie jak CoQ10, idebenon, L-karnityna i witaminy. Chorobom mitochondrialnym towarzyszy również zwiększona produkcja RFT w mitochondriach i stres oksydacyjny, któremu próbuje się przeciwdziałać podając akceptory elektronów (witaminy E, C, bursztynian) i związki o właściwościach antyoksydacyjnych (CoQ10, idebenon, MitoQ, glutation) [61,62].

Ze względu na brak skutecznych metod leczenia chorób mitochondrialnych nieustannie trwają poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Jednym z obiecujących rozwiązań wydaje się być terapia genowa, której podstawowym ograniczeniem, w przypadku chorób mitochondrialnych wywołanych mutacjami w mtDNA, jest brak możliwości stabilnej transfekcji mitochondrialnego genomu komórek ssaków. Tym większym sukcesem byłaby więc możliwość przesunięcia poziomu heteroplazmii (ang. *heteroplasmic shifting*) w taki sposób by zmniejszyć liczbę cząsteczek mitochondrialnego DNA zawierających chorobotwórczą mutację poniżej wartości progowej. Wśród potencjalnych strategii terapeutycznych wymienia się również regulację biogenezy mitochondriów, modulację dynamiki sieci mitochondrialnej i regulację homeostazy jonów Ca<sup>2+</sup>. Chociaż próby zastosowania tych strategii terapeutycznych w warunkach laboratoryjnych potwierdzają skuteczność takiego rodzaju terapii, żadna z nich nie znalazła do tej pory powszechnego zastosowania w praktyce klinicznej [25,63,64].

## PIŚMIENNICTWO

1. Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407
2. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T (2010) Mitochondria: The calcium connection. *Biochim Biophys Acta* 1797: 607-618
3. Kushnareva Y, Newmeyer DD (2010) Bioenergetics and cell death. *Ann N Y Acad Sci USA* 1201: 50-57
4. Wanders RJ, Ruiter JP, IJlst L, Waterham HR, Houten SM (2010) The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inher Metab Dis* 33: 479-494
5. Schultz IJ, Chen C, Paw BH, Hamza I (2010) Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *J Biol Chem* 285: 26753-26759

6. Jou SH, Chiu NY, Liu CS (2009) Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders *Chang Gung. Med J* 32: 370-379
7. Johannsen DL, Ravussin E (2009) The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 9: 780-786
8. de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B (2010) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen* 51: 391-405
9. Batlevi Y, La Spada AR (2010) Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiol Dis*, w druku
10. Pieczenik SR, Neustadt J (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 83: 84-92
11. Wallace DC, Fan W (2010) Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* 10: 12-31
12. Rinaldi T, Dallabona C, Ferrero I, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M (2010) Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS Yeast Res* 10: 1006-1022
13. Wong LJ (2010) Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev Disabil Res Rev* 16: 154-162
14. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW (2010) Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1797: 113-122
15. Wallace DC (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 51: 440-450
16. DiMauro S (2010) A history of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis*, w druku
17. Mitchell P (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206: 1148-1159
18. Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488-1493
19. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD (2010) Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10: 393-401
20. Bénit P, Lebon S, Rustin P (2009) Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1793: 181-185
21. Crofts AR (2004) The cytochrome bc<sub>1</sub> complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* 66: 689-733
22. Stiburek L, Zeman J (2010) Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1149-1158
23. Wittig I, Schägger H (2009) Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787: 672-680
24. Walker JE, Lutter R, Dupuis A, Runswick MJ (1991) Identification of the subunits of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 30: 5369-5378
25. Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW (2010) Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol Med* 16: 268-276
26. Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R (2003) Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J* 22: 6182-6192
27. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628
28. Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10: 672-679
29. Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2007) How the regulatory protein, IF<sub>1</sub>, inhibits F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15671-15676
30. Finsterer J (2011) Inherited mitochondrial neuropathies. *J Neurol Sci* 15: 9-16
31. DiMauro S, Hirano M (1993-2001) MELAS. *GeneReviews*
32. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF (2002) Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 39: 162-9
33. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF (1993-2000) Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*
34. Koilkonda RD, Guy J (2011) Leber's Hereditary Optic Neuropathy- Gene Therapy: From Benchtop to Bedside. *J Ophthalmol* 2011: 179412
35. DiMauro S, Hirano M (1993-2003) MERRF. *GeneReviews*
36. Remes AM, Kärppä M, Moilanen JS, Rusanen H, Hassinen IE, Majamaa K, Uimonen S, Sorri M, Salmela PI, Karvonen SL, Karvonen SL (2003) Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and ragged red fibres (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1158-1159
37. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 46: 428-433
38. DiMauro S (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658: 80-88
39. Tsao CY, Mendell JR, Bartholomew D (2001) High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *J Child Neurol* 16: 533-535
40. D' Aurelio M, Vives-Bauza C, Davidson MM, Manfredi G (2009) Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum Mol Genet* 19: 374-386
41. Childs AM, Hutchin T, Pysden K, Highet L, Bamford J, Livingston J, Crow YJ (2007) Variable phenotype including Leigh syndrome with a 9185T>C mutation in the MTATP6 gene. *Neuropediatrics* 38: 313-316
42. Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G (2000) Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem* 275: 4177-4182
43. García JJ, Ogilvie I, Robinson BH, Capaldi RA (2000) Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtDNA. *J Biol Chem* 275: 11075-11081
44. Solaini G, Harris DA, Lenaz G, Sgarbi G, Baracca A (2008) The study of the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1777: 941-945
45. Nijtmans LG, Henderson NS, Attardi G, Holt IJ (2001) Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene. *J Biol Chem* 276: 6755-6762
46. Carrozzo R, Wittig I, Santorelli FM, Bertini E, Hofmann S, Brandt U, Schägger H (2006) Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Ann Neurol* 59: 265-275
47. Smet J, Seneca S, De Paeppe B, Meulemans A, Verhelst H, Leroy J, De Meirleir L, Lissens W, Van Coster R (2009) Subcomplexes of mitochondrial complex V reveal mutations in mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 30: 3565-3572
48. Morava E, van den Heuvel L, Hol F, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, Smeitink JA (2006) Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology* 67: 1823-1826
49. Kucharczyk R, Rak M, di Rago JP (2009) Biochemical consequences in yeast of the human mitochondrial DNA 8993T>C mutation in the ATPase6 gene found in NARP/MILS patients. *Biochim Biophys Acta* 1793: 817-824
50. King MP, Attardi G (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264: 304-313
51. Mattiazzini M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G (2004) The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet* 13: 869-879
52. Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzini M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, Moggio M, Lenaz G, Carelli V, Solaini G (2007) Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta* 1767: 913-919
53. Wojewoda M, Duszynski J, Szczepanowska J (2010) Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. *Biochim Biophys Acta* 1797: 890-896



54. Szczepanowska J, Zabłocki K, Duszyński J (2004) Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells. *FEBS Lett* 578: 316-322
55. Thorburn DR, Rahman S (1993-2003) Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. *GeneReviews*
56. Mayr JA, Havlickova V, Zimmermann F, Magler I, Kaplanova V, Jesina P, Pecinova A2, Nuskova H, Koch J, Sperl W, Houstek J (2010) Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Human Molecular Genetics* 19: 3430-3439
57. Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT (2008) Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet Med* 25: 383-99
58. Malecki MT, Skupien J, Klupa T, Naskalska A, Gorczyńska-Kosiorz S, Moczulski DK, Sieradzki J (2006) Maternally inherited diabetes with deafness and obesity: body weight reduction response to treatment with insulin analogues. *Rev Diabet Stud* 3: 205-7
59. Olmos PR, Borzone GR, Olmos JP, Diez A, Santos JL, Serrano V, Cataldo LR, Anabalón JL, Correa CH (2011) Mitochondrial diabetes and deafness: possible dysfunction of strial marginal cells of the inner ear. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 40: 93-103
60. Celichowski J, Krutki P, Rogowski M (2010) *Fizjologia człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL
61. DiMauro S, Hirano M, Schon EA (2006) Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34: 265-283
62. Kerr DS (2010) Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab* 99: 246-255
63. DiMauro S, Rustin P (2009) A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases. *Biochim Biophys Acta* 1792: 1159-1767
64. Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, Lightowlers RN (2008) Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15: 1017-1023
65. Mao CC, Holt IJ (2009) Clinical and molecular aspects of diseases of mitochondrial DNA instability. *Chang Gung Med J* 32: 354-369
66. Chinnery PF (2010) Mitochondrial Disorders Overview. *GeneReviews* - NCBI Bookshelf, Initial Posting: June 8, 2000; Last Update: September 16, 2010
67. Schon EA, Santra S, Pallotti F, Girvin ME (2001) Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Semin Cell Dev Biol* 12: 441-448

## Diseases caused by mutations in mitochondrial DNA

Marta Wojewoda<sup>1</sup>, Krzysztof Zabłocki<sup>2</sup>, Joanna Szczepanowska<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Bioenergetics and Biomembranes, <sup>2</sup>Laboratory of Cellular Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.szczepanowska@nencki.gov.pl

**Key words:** mitochondrial diseases, NARP, ATP synthase, mitochondrial genome

### ABSTRACT

Mitochondrial diseases associated with mutations within mitochondrial genome are a subgroup of metabolic disorders since their common consequence is reduced metabolic efficiency caused by impaired oxidative phosphorylation and shortage of ATP. Although the vast majority of mitochondrial proteins (~1500) is encoded by nuclear genome, mtDNA encodes 11 subunits of respiratory chain complexes, 2 subunits of ATP synthase, 22 tRNAs and 2 rRNAs. Up to now, more than 250 pathogenic mutations have been described within mtDNA. The most common are point mutations in genes encoding mitochondrial tRNAs such as 3243A→G and 8344T→G that cause, respectively, MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) or MIDD (maternally-inherited diabetes and deafness) and MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibres) syndromes. There have been also found mutations in genes encoding subunits of ATP synthase such as 8993T→G substitution associated with NARP (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) syndrome. It is worth to note that mitochondrial dysfunction can also be caused by mutations within nuclear genes coding for mitochondrial proteins.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie wydrukowana w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek odautorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępy Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

## WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępy Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

## PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się przysyłanie prac na płycie CD. Tekst winien być zapisany jako \*.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: \*.tif, \*.cdr, \*.psd lub \*.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

## ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

**Strona 1 (tytułowa)** zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

**Kolejno numerowane strony** obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

**Piśmiennictwo:** Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annul Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikula S (2003) *Blony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
4. Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment. W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
5. Darzynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) *Struktura i funkcja końca 5' (KAPL) mRNA i U snRNA*. W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t. IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

**Tabele** winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

**Ilustracje:** ryciny winny być zapisane jako: \*.tif, \*.cdr, \*.psd, lub \*.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerni i biel).

## PRZESYŁANIE PRAC:

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:

**postepy@nencki.gov.pl**

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

**Sławomir Pikula**, Redaktor Naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marczelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## OPLATA ZA DRUK:

Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Opłata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

**www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm**

## KOREKTA:

Powinna być wykonana na pliku pdf przesłanym przez redakcję, w formie komentarzy lub skreśleń, w programie Adobe Reader V. 8 lub nowsza (program bezpłatny, <http://get.adobe.com/reader/>).

Korekta obejmuje błędy: literówkę, znaki interpunkcyjne oraz błędy zawinione przez redakcję, pozostałe zmiany są objęte dodatkami 10% do opłaty za druk.

# Thermo

SCIENTIFIC

## Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System NOWA JAKOŚĆ Real-Time PCR

**PRECYZYJNY**      **ŁATWY**      **MAŁY**  
**EKONOMICZNY**      **SZYBKI**      **NIEDROGI...**  
**PRZYJAZNY**

*PikoReal Real-Time PCR System to zintegrowane rozwiązanie dla uzyskania najlepszych wyników qPCR*



- Najmniejszy na rynku, osobisty aparat do qPCR
- Pięciokanałowy optyczny system detekcji
- 10 - rzędowy zakres liniowy
- Wysoka czułość i jakość
  - detekcja na poziomie 1 kopii
- Powtarzalność otrzymanywnych wyników
  - precyzyjny system kontroli i równomierny rozkład temperatury na całej powierzchni bloku
- Przyjazne i intuicyjne w obsłudze oprogramowanie (opcja HRM)
- Ekonomiczny - mniejsze zużycie odczynników, plastików i energii
- Szybki i nowoczesny aparat w atrakcyjnej cenie

### Informacje do zamówienia

Numer katalogowy	Opis
TCR0024	24-well PikoReal Real-Time PCR System
TCR0096	96-well PikoReal Real-Time PCR System

Aby dowiedzieć się więcej na temat aparatury do Real-Time PCR, zapraszamy do odwiedzenia strony [www.abo.com.pl](http://www.abo.com.pl) oraz [www.thermoscientific.com/pikoreal](http://www.thermoscientific.com/pikoreal)

**abo**  
<http://rcin.org.pl>

abo Grażyna Tarnowska Boreysza  
ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk  
Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk  
tel.: 58 341 21 43; fax: 58 520 33 80  
e-mail: [abo@abo.com.pl](mailto:abo@abo.com.pl); [www.abo.com.pl](http://www.abo.com.pl)

# Odczynniki do transfekcji

## Odczynniki do transfekcji z rodziny "Juice" zapewniają:

- Doskonałą wydajność zarówno stabilnej jak i przejściowej transfekcji
- Współdziałają z podłożami do hodowli zawierającymi surowice oraz pozbawionymi surowicy
- Minimalną toksyczność dla komórek



Nazwa	Rodzaje hodowli / Materiał do transfekcji	Zastosowanie	Nr kat.	Opk.
<b>Wysoka wydajność transfekcji dla wielu linii komórkowych</b>				
GeneJuice® Transfection Reagent	Ustalone linie komórkowe / Plazmidowe DNA	Ekspresja genów, kotransfekcja w celu wyłączenia genu	70967-5	0,3 ml
			70967-3	1 ml
			70967-6	5 x 1 ml
			70967-4	10 x 1 ml
<b>Najlepsza wydajność reakcji dla trudnych do transfekcji linii komórkowych</b>				
NanoJuice Transfection Kit	Hodowle pierwotne, trudne do transfekcji linie komórkowe / Plazmidowe DNA	Ekspresja genów	71902-3	240 rxn
			71902-4	2400 rxn
NanoJuice Core Transfection Reagent			71900-3	1 ml
NanoJuice Transfection Booster			71901-3	1 ml
<b>Produkcja białek w zawiesinowych hodowlach komórek HEK293</b>				
293-Free Transfection Reagent	Zawiesinowe hodowle komórek HEK293 / Plazmidowe DNA	Ekspresja genów	72181-3	1 ml
			72181-4	5 x 1 ml
			72181-5	10 x 1 ml
<b>Produkcja białek w zawiesinowych hodowlach komórek CHO</b>				
NovaCHOice Transfection Kit	Zawiesinowe hodowle komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) / Plazmidowe DNA	Ekspresja genów	72622-3	1 kit
			72622-4	1 kit
<b>Transfekcja siRNA</b>				
RiboJuice siRNA Transfection Reagent	Różne linie komórkowe* / Syntetyczne oligonukleotydy	Wyłączenie genu	71115-3	0,3 ml
			71115-4	1 ml

\*Wymagana optymalizacja odczynnika do badanej linii komórkowej.

Merck Sp. z o.o.,  
Aleje Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa  
tel.: 022 53 59 770; fax: 022 53 59 945