



Aproximació terapèutica per a la malaltia de Gaucher basada en xaperones

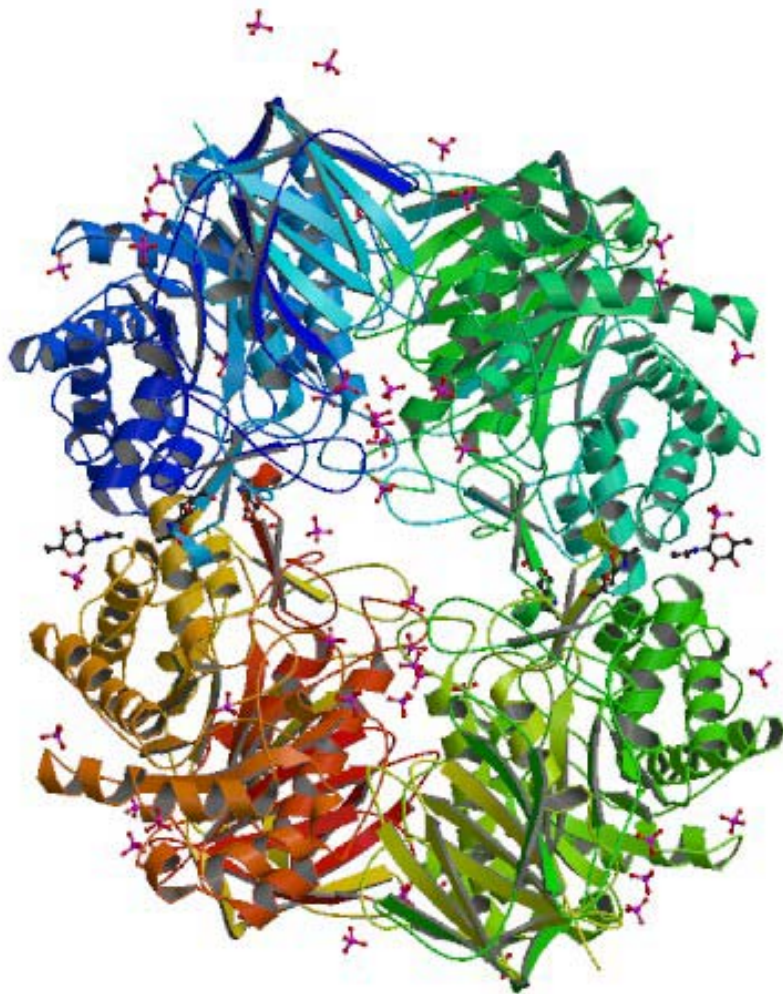
Gessamí Sànchez Ollé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

APROXIMACIÓ TERAPÈUTICA PER A LA
MALALTIA DE GAUCHER BASADA EN
XAPERONES



GESSAMÍ SÁNCHEZ OLLÉ

2011

Portada: Estructura cristalogràfica de la glucocerebrosidasa a pH4,5, extet de <http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?outformat=&qrid=9F0DBE71&tabtoshow=Current>.

Aproximació terapèutica per a la malaltia de Gaucher basada en xaperones

Memòria presentada per
Gessamí Sánchez Ollé

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués i el Dr. Daniel
Grinberg Vaisman al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la
Universitat de Barcelona

Programa de Genètica (Bienni 2004-2006)

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Gessamí Sánchez Ollé

Barcelona, juny 2011

Al meu pare,
per ensenyar-me “el que volen dir les Itagues”.

ÍNDEX

INDEX GENERAL**1. INTRODUCCIÓ**

<i>1.1 El lisosoma</i>	3
<i>1.2 Les malalties d'acumul lisosòmic</i>	6
1.2.1 Les esfingolipidosis	8
1.2.2 Els esfingolípid	9
<i>1.3 La malaltia de Gaucher</i>	12
1.3.1 Història de la malaltia	12
1.3.2 Prevalença i consell genètic	13
1.3.3 Etiologia	14
1.3.4 Clínica	15
1.3.4.1 Tipus 1	15
1.3.4.2 Tipus 2	16
1.3.4.3 Tipus 3	16
1.3.5 Bioquímica	17
1.3.5.1 El substrat: la glucosilcermida	18
1.3.5.2 L'enzim: la glucocerebrosidasa	18
1.3.5.3 L'activador: la saposina C	19
1.3.5.4 La reacció	19
1.3.6 Genètica	20
1.3.6.1 Polimorfismes	22
1.3.6.2 Mutacions	22
1.3.6.3 Saposina	24
1.3.6.4 Correlació genotip-fenotip	25
1.3.7 Patogènia	26
1.3.8 Diagnòstic	27
1.3.9 La teràpia actual	28
1.3.9.1 Tractament simptomàtic	28
1.3.9.2 Tractament específic	29
1.3.10 Prognosi i biomarcadors	34
<i>1.4 Estudis cel·lulars: expressió d'al·lels mutants in vitro</i>	35
<i>1.5 Models animals</i>	36
<i>1.6 Les xaperones farmacològiques</i>	38

2. OBJECTIUS	45
3. RESULTATS	49
<i>3.1 Informe dels directors de tesi</i>	51
<i>3.2 Publicacions</i>	53
3.2.1 Capítol 1: Expressió i origen de l'al·lel D409H;H255Q	
3.2.1.1 Article Michelakakis i col·laboradors 2006	53
3.2.1.2 Article Santamaria i col·laboradors 2008	59
3.2.2 Capítol 2: Expressió en COS-7 i xaperones farmacològiques	
3.2.2.1 Article Sanchez-Ollé i col·laboradors 2009	71
3.2.2.2 Article en preparació:	
3.2.2.2.1 Diaz i col·laboradors 2011	81
3.2.2.2.2 Figures i dades suplementàries	95
4. DISCUSSIÓ GLOBAL	103
<i>4.1 Sobre l'expressió d'al·lels mutats</i>	105
<i>4.2 Sobre les xaperones farmacològiques</i>	109
5. CONCLUSIONS	117
6. BIBLIOGRAFIA	121
7. ADDENDUM	151
<i>7.1 Mètodes</i>	153
<i>7.2 Article Macías-Vidal i col·laboradors 2010</i>	163

INDEX DE FIGURES I TAULES

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Figures

Figura I.1 Cèl·lula eucariota.	3
Figura I.2 Esquema d'un lisosoma.	3
Figura I.3 Via de senyalització que segueixen les glicoproteïnes.	4
Figura I.4 Esquema de l'arribada dels enzims al lisosoma.	5
Figura I.5 Catabolisme dels glicoesfingolípid.	8
Figura I.6 Estructura dels esfingolípid.	9
Figura I.7 Formació dels esfingolípid.	10
Figura I.8 Funcionament normal de l'enzim GBA.	14
Figura I.9 Reacció de degradació de la glucosilceramida.	17
Figura I.10 Estructura bidimensional de la glucocerebrosidasa.	18
Figura I.11 Diagrama de la saposina C humana.	19
Figura I.12 Model per a la degradació del glucocerebròsid.	19
Figura I.13 Estructura del gen (<i>GBA</i>) i del pseudogèn (<i>GBAP</i>).	20
Figura I.14 Diferències entre el gen i el pseudogèn.	21
Figura I.15 Regió genòmica flanquejant del gen <i>GBA</i>.	21
Figura I.16 Al·lels recombinants.	24
Figura I.17 Estructura del gen de la <i>PSAP</i>.	25
Figura I.18 Macròfag normal i cèl·lula de Gaucher.	26
Figura I.19 Model murí descrit per Enquist.	36
Figura I.20 Esquema de funcionament de les xaperones.	38
Figura I.21 Mecanismes d'acció de la NB-DNJ.	40

1.2 Taules

Taula I.1 Classificació de les malalties d'acumul lisosòmic.	6
Taula I.2 Classificació de la malaltia de Gaucher.	15
Taula I.3 Assaigs clínics realitzats en pacients amb la GD.	32
Taula I.4 Xaperones farmacològiques i els seus efectes.	41

2. DISCUSSIÓ

2.1 Figures

Figura D.1 Estructura química dels iminosucres.	110
Figura D.2 Aminociclitols emprats.	112
Figura D.3 Estructura dels compostos.	114

2.2 Taules

Taula D.1 Característiques dels compostos estudiats.	114
---	------------

3. ADDENDUM

3.1 Figures

Figura A.1 Esquema de la reacció de la mutagènesi dirigida.	148
Figura A.2 Aspecte de les cèl·lules COS-7 al microscopi òptic.	156
Figura A.3 Imatge del RE, la GBA i el nucli.	161
Figura A.4 Imatge de la GBA.	161
Figura A.5 Imatge de l'AG, la GBA i el nucli.	162
Figura A.6 Imatge del lisosoma, la GBA i el nucli.	162

3.2 Taules

Taula A.1 Encebadors utilitzats en la mutagènesi dirigida.	153
Taula A.2 Encebadors emprats per a seqüenciar.	155
Taula A.3 Protocol PCR.	155

ABREVIATURES

ADN àcid desoxiribonucleic

ARN àcid ribonucleic

BMT transplantament de medul·la òssia (de l'anglès *Bone Marrow Transplantation*)

CBE epòxid- β -conduritol (de l'anglès *Conduritol- β -Epoxide*)

ERT teràpia de substitució enzimàtica (de l'anglès *Enzyme Replacement Therapy*)

ER reticle endoplasmàtic (de l'anglès *Endoplasmic Reticulum*)

GA aparell de Golgi (de l'anglès *Golgi Apparatus*)

GBA gen que codifica la glucocerebrosidasa

GBA glucocerebrosidasa

GBAP pseudogèn de *GBA*

GCS gen que codifica la glucosilceramida sintasa en humans

GD malaltia de Gaucher (de l'anglès *Gaucher Disease*)

GSL glicoesfingolípid

IFG isofagomina

LSD malaltia d'acumul lisosòmic (de l'anglès *Lysosomal Storage Disease*)

M6P manosa-6-fosfat

M6PR receptor de la manosa-6-fosfat

NB-DNJ *N*-butildeoxinojirimicina

NN-DNJ *N*-(*n*-nonil)-deoxinojirimicina

PSAP prosaposina, precursor de la proteïna activadora d'esfingolípid

PSAP gen que codifica la prosaposina

Rec recombinant

RER reticle endoplasmàtic rugós (de l'anglès *Rough Endoplasmic Reticulum*)

RNAi interferència d'RNA

SAP saposina, proteïna activadora d'esfingolípid (de l'anglès *Sphingolipid Activator Protein*)

shRNA *short hairpin RNA*

siRNA *small interfering RNA*

SRT teràpia de reducció de substrat (de l'anglès *Substrate Reduction Therapy*)

1. INTRODUCCIÓ

1.1 El lisosoma

Els primers estudis de la cèl.lula, durant el segle XVII, van ser possibles gràcies a l'aparició a finals del segle XVI dels primers microscopis. La cèl.lula, unitat fonamental de tota matèria viva, segueix una organització de les seves estructures i en base a aquesta podem dividir-la en dos grans grups: procariota i eucariota.

A diferència de les cèl.lules procariotes, les eucariotes presenten un citoplasma molt compartimentat, amb orgànuls separats o interconnectats, limitats per membranes biològiques que són de la mateixa naturalesa essencial que la membrana plàsmatica (Figura I.1).

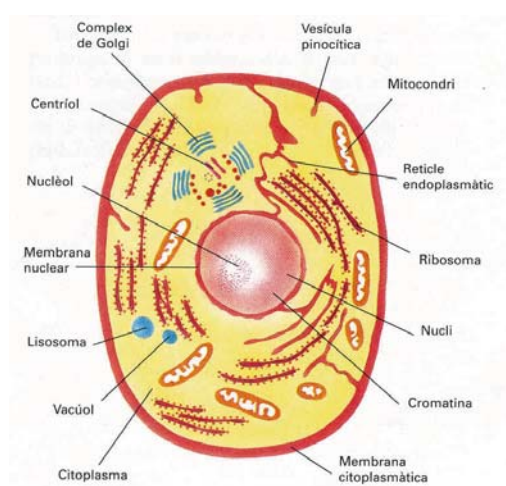


Figura I.1. Cèl.lula eucariota en què veiem els diferents orgànuls. Extret de <http://naturals2n.blogspot.com/2010/05/la-cel·lula-animal-i-la-vegetal.html>.

Els lisosomes són orgànuls subcel·lulars heterogenis que contenen hidrolases específiques, les quals permeten el processament o la degradació de proteïnes, àcids nucleics, carbohidrats i lípids (figura I.2). Van ser descoberts pel metge i químic belga Christian de Duve al 1949, però no va ser fins al 1955 que se'ls va donar aquest nom (De Duve et al., 1955). La descripció de l'estructura i funció dels lisosomes, juntament amb la dels peroxisomes, li va donar el premi Nobel al 1974, amb Albert Claude i George E. Palade.

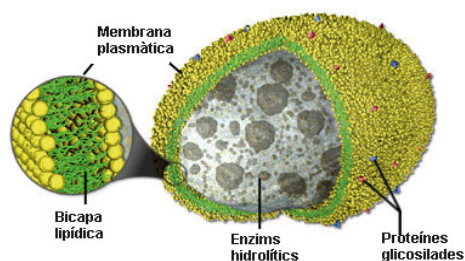


Figura I.2. Esquema d'un lisosoma. Adaptat de <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/lysosomes/lysosomes.html>.

Els lisosomes es van identificar con un nou grup de partícules citoplasmàtiques, que es caracteritzaven perquè contenien enzims hidrolítics i el seu pH àcid i ja es creia que podien estar involucrats en processos de digestió intracel·lular (De Duve, 1963).

Les seves funcions van ser identificades ràpidament gràcies al treball de De Duve, entre d'altres, i es poden resumir en el fet d'estar implicats en la digestió de material extracel·lular, provinent de l'endocitosi o la fagocitosi, i del material intracel·lular provinent de l'autofagia. Per tant segons el seu origen, s'han classificat en dos tipus:

- Els **lisosomes primaris** són aquells acabats de formar a partir de l'aparell de Golgi. Tenen forma rodona o ovalada i el seu contingut és homogeni. No han intervingut en cap procés digestiu.
- Els **lisosomes secundaris** es formen quan un lisosoma primari es fusiona amb altres partícules com, per exemple, les que provenen de l'exterior de la cèl·lula, en un procés de digestió. S'han proposat quatre models de la seva biogènesi: maduració, transport vesicular, "kiss-and-run" i fusió-fissió (Mullins and Bonifacino, 2001).

L'origen dels enzims lisosòmics el trobem al reticle endoplasmàtic rugós (RER), des d'on passen al lumen del reticle endoplasmàtic (ER) i se'ls excindeix el pèptid-senyal. Abans de passar al compartiment intermig *cis* de l'aparell de Golgi (GA) on seran fosforilats, són reconeguts per GlcNAc-P-T. Posteriorment arriben al *trans*-Golgi, on una fosfodiester glicosidasa fa la seva funció. Més enllà d'aquest punt, el transport està mediat pel receptor de la manosa-6-fosfat (M6PR) des dels endosomes primerencs fins als tardans, on s'alliberen els enzims. Petites quantitats dels

enzims lisosòmics poden escapar del M6PR i ser excretats al citosol. Posteriorment poden entrar al lisosoma, mitjançant la unió al M6PR de la membrana i la conseqüent endocitosi.

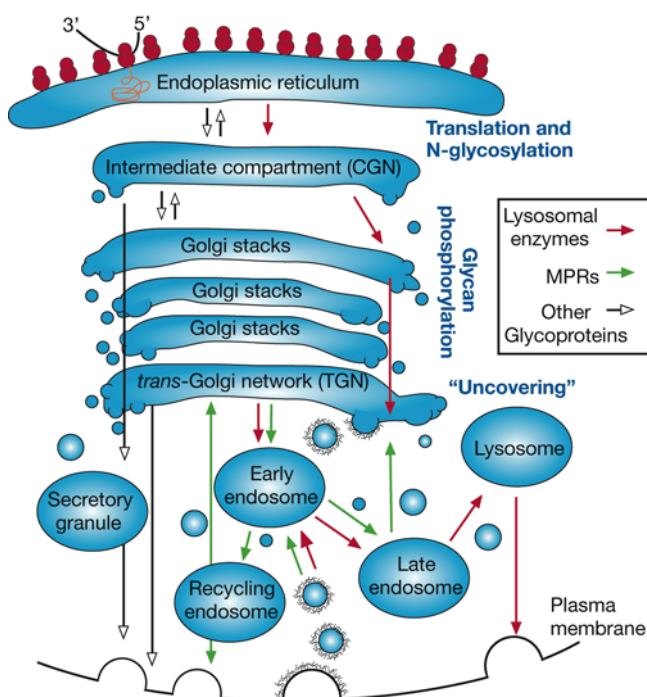


Figura I.3. Via de senyalització que segueixen les glicoproteïnes i els enzims lisosòmics, que són reconeguts i fosforilats. De *Essentials of glycobiology* (Varki and Kornfeld, 2009).

No tots els enzims lisosòmics es dirigeixen al seu destí mitjançant el M6PR. Una de les excepcions és la glucocerebrosidasa, enzim deficient en la malaltia de Gaucher, que és reconeguda per una proteïna de membrana lisosòmica, LIMP-2 (Reczek et al., 2007). En la figura I.4 podem veure un esquema simplificat dels dos mecanismes.

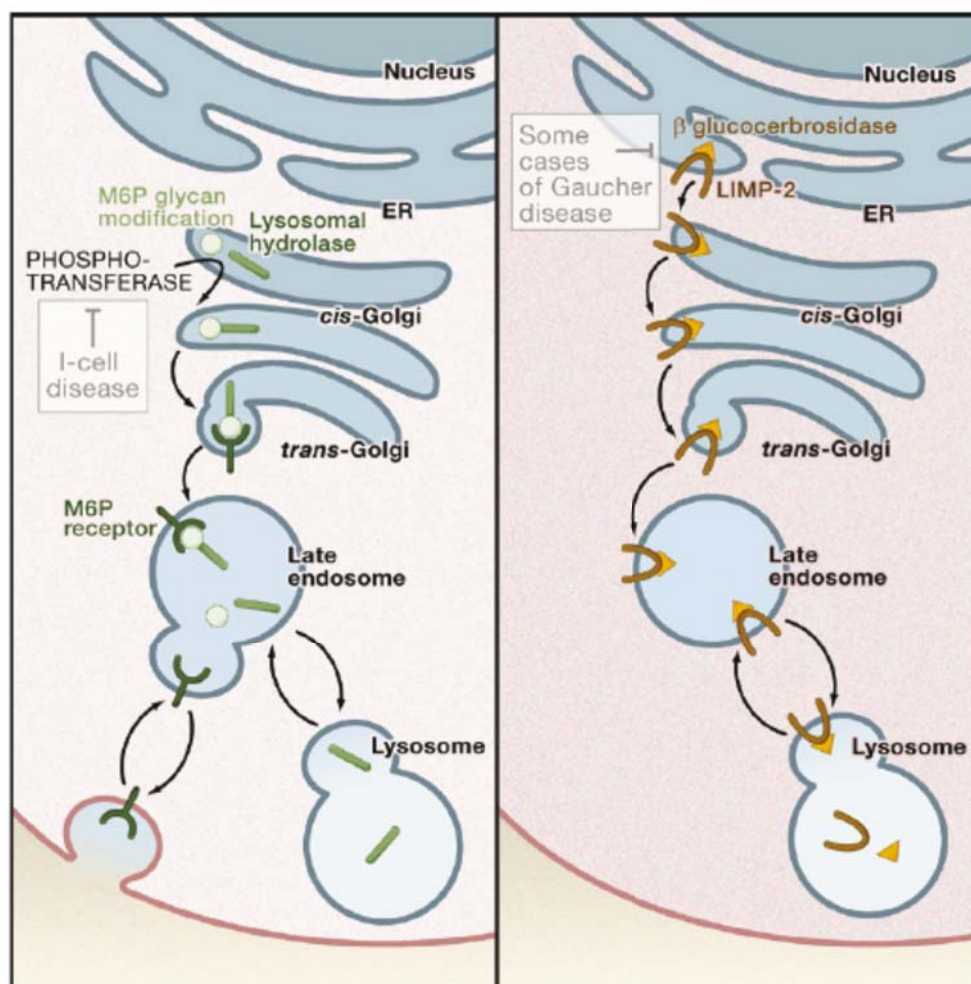


Figura I.4. Esquema de l'arribada dels enzims al lisosoma. En la part esquerra de la figura podem veure de manera simplificada com arriben les hidrolases lisosòmiques mitjançant el receptor de manosa-6-fosfat i en la de la dreta com ho fa la glucocerebrosidasa. Adaptat de Reczek et al. (2007).

1.2 Les malalties d'acumul lisosòmic

Tot i que la primera malaltia d'acumul lisosòmic (LSD) descrita va ser la malaltia de Tay-Sachs al 1881, els lisosomes van ser descoberts per Christian de Duve set dècades més tard. Henri-Géry Hers, gràcies a la identificació de l'òrganul per part de De Duve i als seus propis estudis sobre els defectes en el metabolisme, va generalitzar el concepte de malaltia d'acumul lisosòmic i va proposar-lo com a explicació de diversos defectes congènits d'acumul de mucopolisacàrids i lípids entre altres (Hers, 1965).

La primera connexió entre el dèficit d'un enzim (α -glucosidasa) i una LSD (malaltia de Pompe), pel mateix Hers al 1963, va cimentar els fonaments per a una sèrie de descobriments sobre els enzims i els seus substrats (Hers, 1963).

La majoria de les LSD estan causades pel dèficit d'un enzim, que no pot hidrolitzar macromolècules, amb la conseqüent acumulació d'aquestes. En algun cas el defecte pot estar en proteïnes de membrana, proteïnes activadores o altres proteïnes relacionades.

S'han descrit més de quaranta tipus diferents de LSD (Neufeld, 1991) i la majoria es caracteritzen per ser multisistèmiques i degeneratives, tot i que en diferents graus. El sistema reticuloendotelial està implicat en la patogènia i són palesos els efectes hematològics com l'hepatoesplenomegàlia i la citopènia (revisat a Vellodi, 2005).

Les LSD es classifiquen segons el substrat acumulat i/o l'enzim deficient (veure revisió a Futerman i Van Meer, 2004). En la taula I.1 les podem veure classificades:

Taula I.1. Classificació de les malalties d'acumul lisosòmic [modificat de Futerman i Van Meer (2004)].

Malaltia	Proteïna deficient	Material acumulat majoritari
Esfingolipidosis		
Fabry	α -Galactosidasa A	Globotriasilceramida
Lipogranulomatosi de Farber	Ceramidasa	Ceramida
Gaucher	β -Glucosidasa Saposina C (activador)	Glucosilceramida Glucosilceramida
Leucodistròfia cel·lular globoide (Krabbe)	Galactocerebròsid- β -Galactosidasa	Galactosilceramida
Leucodistròfia metacromàtica	Arisulfatasa A Saposina B (activador)	Glicolípids sulfatats Glicolípids sulfatats i GM1
Niemann-Pick A i B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Deficiència de l'activador d'esfingolípids	Proteïna activadora d'esfingolípids (SAP)	Glicolípids
Gangliosidosi GM1	β -Galactosidasa	Gangliòsid GM1
Gangliosidosi GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminadasa A	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminadasa A i B	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (deficiència d'activador de GM2)	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2

Mucopolisacaridosis		
MPS I (Hurler, Scheie)	α -Iduronidasa	Dermatà sulfat i Heparà sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Dermatà sulfat i Heparà sulfat
MPS IIIA (Sanfilippo tipus A)	Heparà-N-sulfatasa (sulfamidasa)	Heparà sulfat
MPS IIIB (Sanfilippo tipus B)	N-Acetil- α -glucosaminidasa	Heparà sulfat
MPS IIIC (Sanfilippo tipus C)	Acetil-Co A α -glucosamida N-acetiltransferasa	Heparà sulfat
MPS IIID (Sanfilippo tipus D)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparà sulfat
MPS IVA (Morquio-A)	N-acetilgalactosamina-6-sulfat-sulfatasa	Queratà sulfat i condroití-6-sulfat
MPS IVB (Morquio-B)	β -Galactosidasa	Queratà sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arilsulfatasa B	Dermatà sulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Heparà sulfat, dermatà sulfat i condroití-4 i -6-sulfats
MPS IX	Hialuronidasa	Hialuronà
Oligosacaridosis i glicoproteïnosis		
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
Fucosidosi	α -Fucosidasa	Fucòsids i glicolípids
α -Manosidosi	α -Manosidasa	Oligosacàrids que contenen manosa
β -Manosidosi	β -Manosidasa	Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc
Pompe	α -Glucosidasa	Glicogen
Sialidosi	Sialidasa	Sialiloligosacàrids I sialilglicopèptids
Schindler	α -N-Acetilgalactosaminidasa	Glico-conjugats que contenen α -N-Acetilgalactosaminil
Lipidosis		
Wolman i malaltia d'acumul de colesterol	Lipasa àcida	Esters de colesterol i triglicèrids
Malalties causades per defectes en proteïnes de membrana		
Cistinosi	Cistinosina	Cistina
Malaltia de Danon	LAMP2	Restes citoplasmàtiques i glicogen
Malaltia de Salla i malaltia infantil d'acumul d'àcid siàlic	Sialina	Àcid siàlic
Mucopolipidosi (ML) IV	Mucolipina-1	Lípids i mucopolisacàrids àcids
Niemann-Pick C (NPC)	NPC1 i 2	Colesterol i esfingolípids
Ceroide Lipofusinosi neuronal		
NCL1	Palmitoilproteïnatioesterasa	Tioèsters lipídats
NCL2	Tripeptidilpeptidasa I	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
NCL3 (Batten)	Transportador d'arginina	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
Altres		
Galactosialidosi	Catepsina A	Sialiloligosacàrids
ML II i ML III	UPD-N-acetilglucosamina: enzim lisosòmic N-acetilglucosaminil-1-fosoftransferasa	Oligosacàrids, mucopolisacàrids i lípids
Deficiència múltiple de sulfatases	SUMF1	Sulfàtids
Picnodisotiosi	Catepsina K	Proteïnes de l'ós, incloent fibres de col·lagen

Les malalties d'acumul lisosòmic són poc freqüents, però dintre d'aquestes les majoritàries són les esfingolipidosis; la més prevalent de les quals és la malaltia de Gaucher (GD, OMIM 230800, 230900 i 231000).

1.2.1 Les esfingolipidosis

Les malalties associades a la degradació dels esfingolípids (esfingolipidosis) són errors congènits del metabolisme, en què la proteïna que intervé en la degradació d'un glicoesfingolípid de tres o menys residus de carbohidrats és deficient (Watts, 2003).

Cada reacció està realitzada per una exoglicosidasa específica i, en la majoria dels casos, necessita d'una proteïna activadora d'esfingolípids (saposina o SAP), que permet presentar el substrat a l'enzim per la seva degradació (figura I.5).

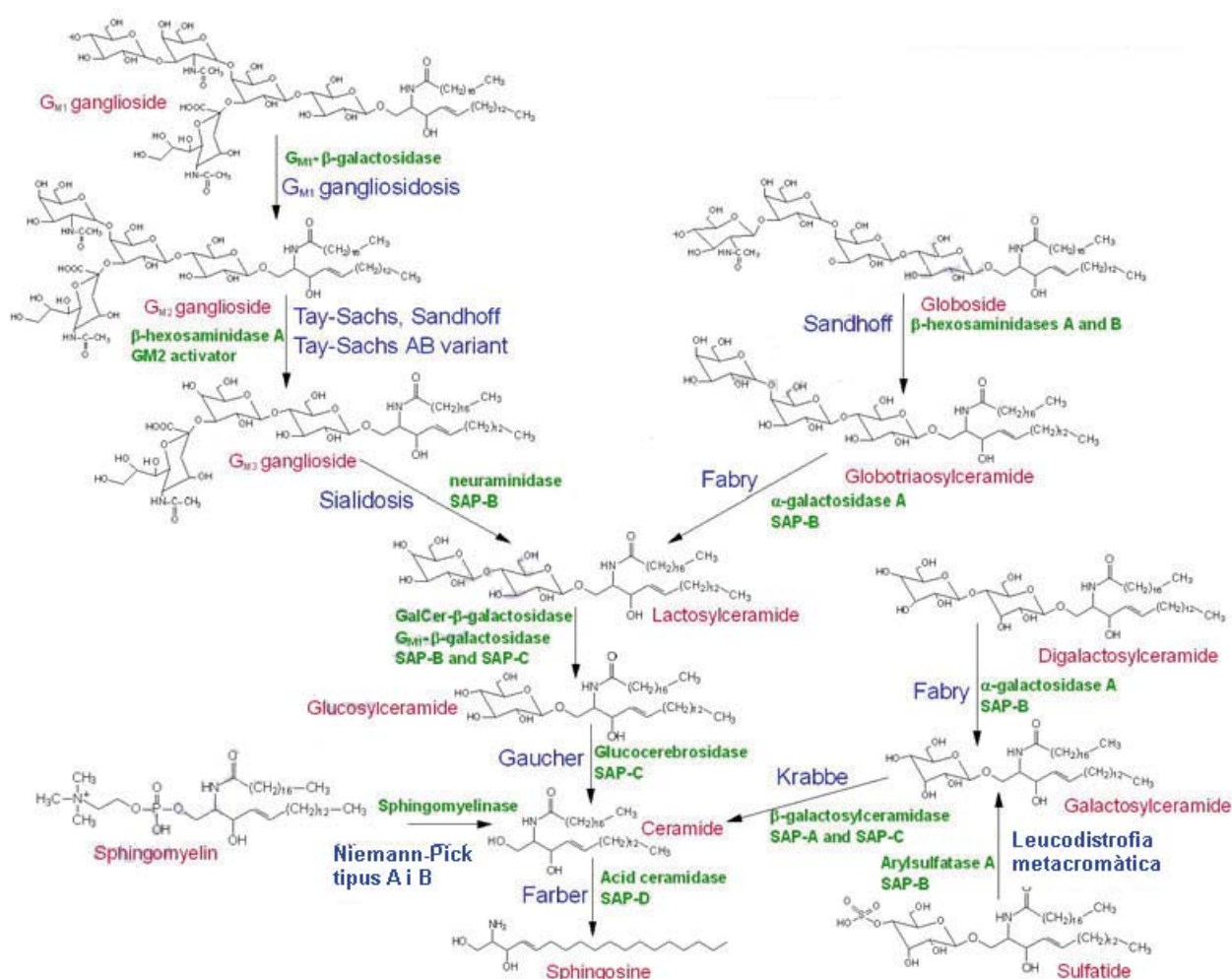


Figura I.5. Catabolisme dels glicoesfingolípids i malalties d'acumulació associades. Adaptat de <http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.html>.

Exceptuant la malaltia de Fabry, amb una herència lligada al cromosoma X, les esfingolipidosis tenen una herència autosòmica recessiva.

1.2.2 Els esfingolípidis

Els esfingolípidis són lípids complexos derivats de l'aminoalcohol esfingosina (1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadecè), la qual està unida a un àcid gras de cadena llarga mitjançant un enllaç amida, formant així la ceramida.

Van ser nomenats per J.L.W. Thudichum al 1884 donada la seva naturalesa misteriosa pensant en l'esfinx de la mitologia grega (Thudichum, 1884). Els esfingolípidis són presents en totes les membranes eucariotes (Maceyka et al., 2005), però també es troben en alguns bacteris (Hannun and Obeid, 2008). Els esfingolípidis constitueixen un 30% del total de lípids de la membrana plasmàtica, però la recerca actual ha establert que alguns esfingolípidis, incloent la ceramida, l'esfingosina i les seves formes fosforilades (ceramida-1-fosfat i esfingosina-1-fosfat, respectivament), són bioactius i poden controlar funcions biològiques vitals (Hannun and Obeid, 2008). Els estudis sobre el metabolisme i la funció dels esfingolípidis han demostrat que els seus metabòlits són capaços de regular les vies de transducció de senyal.

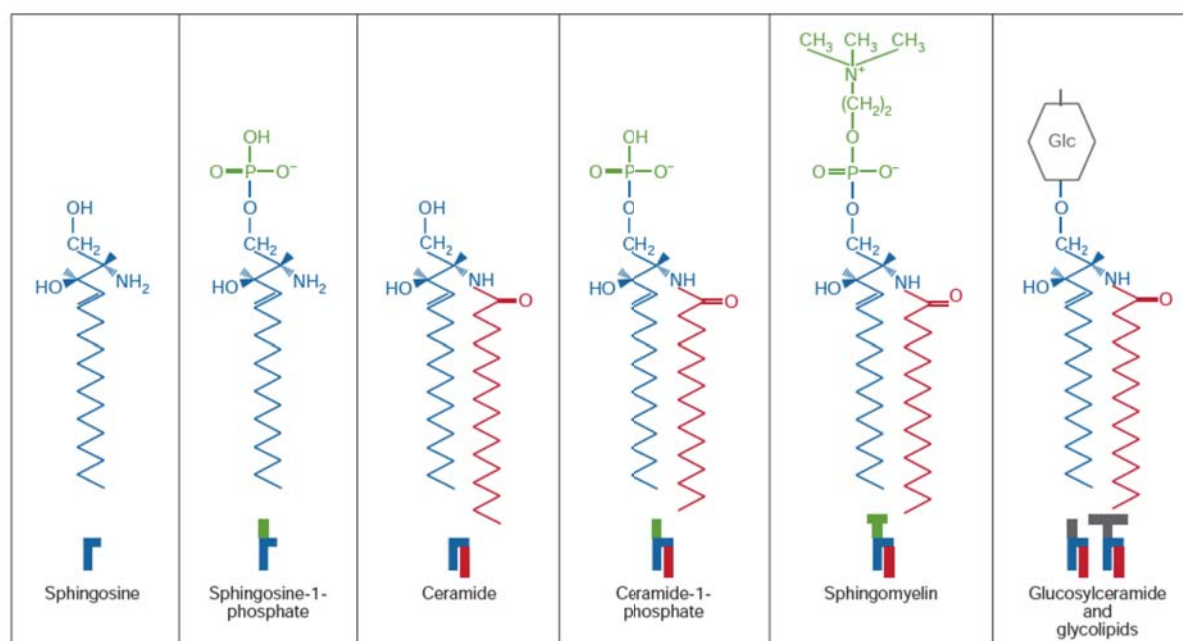


Figura I.6. Estructura dels esfingolípidis. La base esfingoide utilitzada d'exemple (blau) és l'esfingosina. L'àcid gras emprat d'exemple (vermell) és l'àcid palmític. En negre hi ha un glicoesfingolípid, la glucosilceramida. Extret de Futerman i Hannun (2004).

La síntesi *de novo* dels esfingolípids comença amb la formació de la 3-ceto-dihidroesfingosina, mitjançant l'enzim serina palmitoiltransferasa (Merrill, 1983), a partir del palmitoil-CoA i la serina. Posteriorment, la 3-ceto-dihidroesfingosina es redueix per a formar la dihidroesfingosina. La dihidroesfingosina està acilada per la dihidroceramida sintasa i es forma form dihidroceramida (Pewzner-Jung et al., 2006) que és desaturada per a formar la ceramida (Causeret et al., 2000).

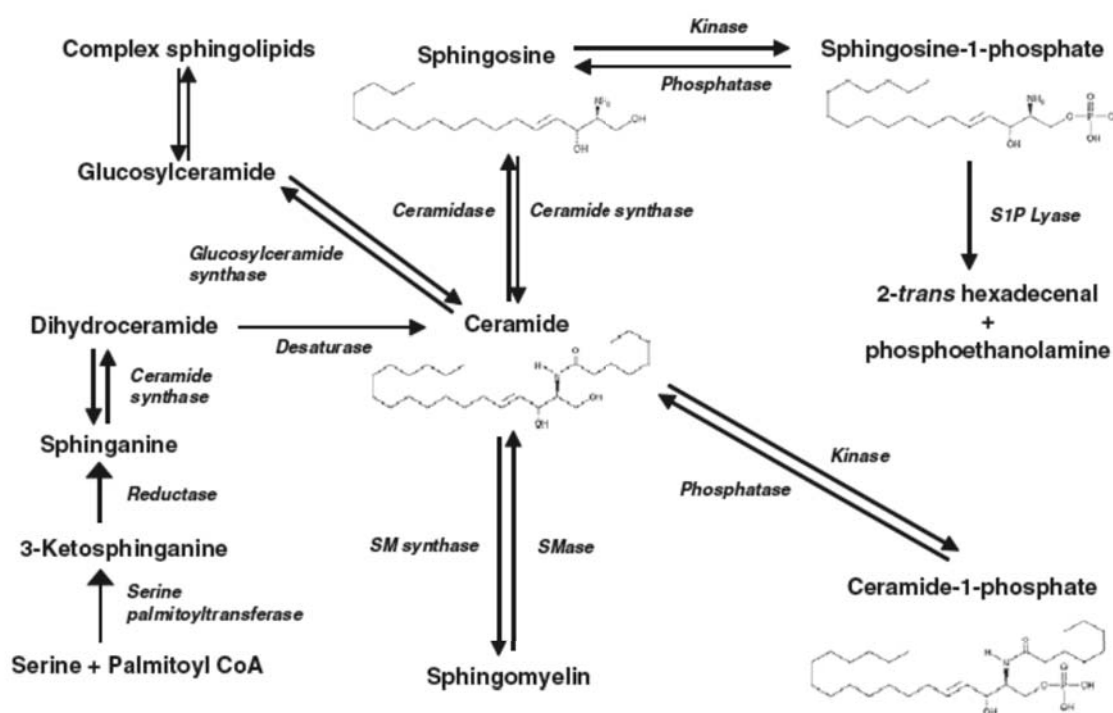


Figura I.7. Formació dels esfingolípids en cèl·lules de mamífer, extret de Gangoiti et al. (2010).

La ceramida té diferents destins:

- Fosforilació: mitjançant la ceramida quinasa.
 - Glicosilació: mitjançant la glucosilceramida sintasa o la galactosilceramida sintasa.
 - Pot ser convertida en esfingomielina afegint fosforilcolina amb l'esfingomielina sintasa.
 - Pot ser catabolitzada per a formar l'esfingosina, mitjançant una ceramidasa.
- L'esfingosina pot ser fosforilada.

Els esfingolípids es divideixen en dos grans grups: els fosfoesfingolípids (esfingomielines) i els glucoesfingolípids (gangliòsids, cerebròsids).

Les esfingomielines contenen un grup fosfat, unit al grupo hidroxil 1 de la ceramida, que s'esterifica amb la colina (fosfocolina) o l'etanolamina (fosfoetanolamina) per formar el grup polar de la molècula. Les esfingomielinas es troben en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules animals, en la vaina de mielina que recobreix i aïlla els axons de les neurones.

Els glucoesfingolípid o glucolípid tenen units al grup hidroxil 1 de la ceramida, mitjançant un enllaç glucosídic, un monosacàrid o un oligosacàrid que normalment es projecten cap a la cara externa de la membrana plasmàtica. Els monosacàrids més habituales són D-glucosa, D-galactosa i N-acetilgalactosamina.

Podem distingir tres tipus de glucolípid:

- Gangliòsids: són els esfingolípid més complexos, ja que contenen caps polars molt grans, formats per unitats d'oligosacàrids carregats negativament.
- Cerebròsids: tenen un únic sucre unit per un enllaç β -glucosídic al grup hidroxil de la ceramida.
- Globòsids: tenen units oligosacàrids neutres units a la ceramida.

A més del paper estructural en les membranes plasmàtiques, als esfingolípid se'ls ha reconegut un nombre creixent de bioactivitats. Han estat implicats en major o menor grau, en l'apoptosi, la senescència cel·lular, la diferenciació, la migració, l'angiogènesi, la proliferació, la infecció, l'inflamació i l'autofagia (Carpinteiro et al., 2008; Gangoití et al., 2010; Hannun and Obeid, 2008; Ogretmen and Hannun, 2004; Pettus et al., 2004).

1.3 La malaltia de Gaucher

S'empra el terme malaltia de Gaucher (GD) per a designar un grup de trastorns del metabolisme dels glucocerebròsids, ocasionats pel dèficit de l'enzim β -glucocerebrosidasa, que catalitza la formació de ceramida i glucosa a partir dels glucocerebròsids. L'excés de glucocerebròsids s'acumula en les cèl·lules reticuloendotelials de la melsa, del fetge o dels ganglis limfàtics, i alteren sovint l'estructura dels ossos, els pulmons i, en major o menor grau, el sistema nerviós central.

1.3.1 Història de la malaltia

Aquesta malaltia va ser descrita per primera vegada l'any 1882 pel metge francès Phillippe Charles Ernest Gaucher (1854-1918), en la seva tesi doctoral, que portava per títol "*De l'épithélioma primitif de la rate; hypertrophie de la rate sans leucémie*" (Paris, Doin). Gaucher hi descrivia el cas clínic d'una pacient de 32 anys amb hepatomegàlia i esplenomegàlia i suggeria que la causa era un tumor a la melsa amb infiltració del parènquima, per part d'una cèl·lules amb nucli gran. No va ser fins al 1905, que Brill va emprar el terme malaltia de Gaucher.

Al 1924, el metge alemany H. Lieb va aïllar un compost lipídic de la melsa dels pacients amb aquesta malaltia i, una dècada després, el metge francès A. Aghion va identificar-ho com a un component de les membranes cel·lulars de eritròcits i dels leucòcits.

Paral·lelament als treballs de Henri-Géry Hers de 1965, sobre els defectes en el metabolisme (Hers, 1965), Roscoe O. Brady i els seus col·laboradors van demostrar que l'acumulació de glucocerebròsids és conseqüència del dèficit de l'enzim glucocerebrosidasa. Tres anys més tard, Weinreb va descriure la localització lisosòmica de l'acúmulo de glucocerebròsid (Weinreb et al., 1968).

El co-activador de la glucocerebrosidasa va ser identificat al 1971 per O'Brien, però no va rebre el seu nom (saposina C) fins al 1988 (O'Brien et al., 1988).

No hi havia un tractament específic per a la malaltia de Gaucher, fins que va sorgir la teràpia de reemplaçament enzimàtic (ERT) arrel del descobriment de Brady. Alguns dels símptomes de la malaltia, com l'anèmia i la trombocitopènia, poden ser pal·liats amb tractament quirúrgic (esplenectomia). A l'apartat 1.3.9 es descriuen les teràpies existents per a la malaltia.

Des del punt de vista social, és una malaltia que ha donat lloc a l'existència de nombroses associacions d'afectats, de familiars i de científics preocupats per la mateixa arreu del món. A Espanya, per exemple, hi ha la *Fundación española para el estudio y terapéutica de la enfermedad de Gaucher* (<http://www.feeteg.org>).

1.3.2 Prevalença i consell genètic

La malaltia de Gaucher està considerada una malaltia minoritària o òrfena (<5 casos/10.000 habitants) degut a la seva baixa prevalença en la població mundial [aproximadament 1/60.000 habitants (Meikle et al., 1999)]. Els estudis més acurats de la freqüència de la malaltia són de la població jueva asquenazita (1/400-850 habitants) (Beutler et al., 1993; Grabowski, 1993). Els jueus asquenazites són els descendents de les comunitats jueves que durant l'edat mitjana se situaven en la zona germànica, de l'Alsàcia fins a Rhineland i que més tard van emigrar cap a l'est d'Europa i hi van formar noves comunitats.

Tant en la literatura mèdica com en la de genètica de poblacions, existeixen múltiples referències a aquest grup ètnic degut a la gran quantitat d'estudis genètics de diferents malalties que han estat realitzats. Les raons per haver dut a terme aquests estudis són diverses, entre elles la taxa més elevada de malalties genètiques degut a l'endogàmia entre els membres d'aquest grup. Habitualment el rastreig molecular que es realitza en aquest grup ètnic cobreix, com a mínim, la malaltia de Tay-Sachs, la malaltia de Canavan i la fibrosi quística, segons recomana *The American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) (Klugman and Gross, 2010). Quan el rastreig és més exhaustiu, s'incou la malaltia de Gaucher, entre les següents malalties:

- La síndrome de Bloom, amb herència autosòmica recessiva, es caracteritza per la manca de l'helicasa d'ADN RecQ, implicada en la reparació de l'ADN. El gen *BLM* es troba situat al 15q26.1. Una única mutació és la responsable de la malaltia en el 98% de jueus asquenazites afectats.
- La malaltia de Canavan, d'herència autosòmica recessiva, està causada pel dèficit en l'enzim aspartoacilasa, que trenca l'àcid N-acetil aspàrtic. El gen *ASPA* està localitzat al cromosoma 17p13-pter. Quatre mutacions són les identificades en el 98% dels individus afectats.
- La disautonomia familiar, d'herència autosòmica recessiva, es produeix quan el gen *IKBKAP*, situat al cromosoma 9q31, està mutat. El 99% dels individus malalts són portadors de dues mutacions conegudes.
- L'anèmia de Fanconi (grup C), amb herència autosòmica recessiva, està causada per les mutacions trobades al gen *FANCC*, situat al cromosoma 9 (9q22.3). Dues mutacions són les responsables del 99% dels individus afectats.
- La mucopolisidiosi tipus IV, d'herència autosòmica recessiva, causat per les mutacions al gen *MCOLN1* situat al cromosoma 19 (19p13.3). Dues mutacions al gen *MCOLN1* són les responsables del 95% dels individus afectats.

- La malaltia de Niemann-Pick tipus A i B (NPA i NPB) està caracteritzada per l'acúmul d'esfingomielina i colesterol, entre d'altres lípids. Habitualment es busca la presència de 4 mutacions conegudes (3 per a NPA i 1 per a NPB) al gen *SMPD1*, situat al cromosoma 11 (11p15.4), responsables del 95% dels individus afectats.
- La malaltia de Tay-Sachs, d'herència autosòmica recessiva, es caracteritza per la deficiència de l'enzim Hex-A. El gen *HEXA* està situat al cromosoma 15 (15q23-q24) i 3 mutacions són les responsables del 99% dels individus afectats. Aquesta malaltia també té una elevada freqüència en la població canadenca francesa i als cajuns.
- Malaltia d'acúmul del glicogen tipus I.

En la malaltia de Gaucher les mutacions més freqüents en la població jueva són la N370S, c.84dupG, IVS2+1G>A, L444P.

La consulta a un servei de consell genètic és molt recomanable quan els dos progenitors pertanyen a aquest grup ètnic, degut a l'herència recessiva característica i a l'elevada prevalença (Abel, 2001).

1.3.3 Etiologia

La malaltia de Gaucher està causada, en la majoria dels casos, per un dèficit de l'enzim glucocerebrosidasa (GBA), que catalitza la formació de D-glucosa i ceramida a partir del glucocerebròsid, tal i com veiem representat en la figura I.8. Aquest dèficit causa l'acúmul de glucocerebròsid o glucosilceramida.

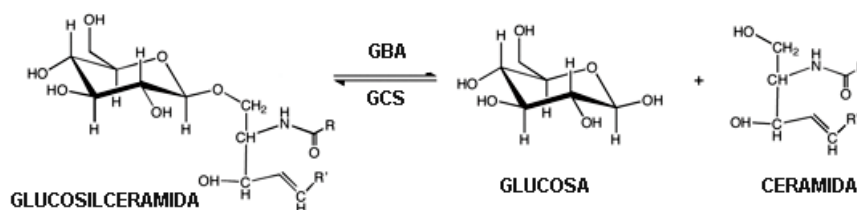


Figura I.8. En aquest esquema veiem el funcionament normal de l'enzim GBA (metabolització de la glucosilceramida, que dona lloc a ceramida i D-glucosa). Modificat de www.proteopedia.org.

Cal mencionar que, tot i que en un percentatge molt baix, les alteracions en el gen de la prosaposina també són causa d'aquesta malaltia.

1.3.4 Clínica

La malaltia de Gaucher té una clínica molt heterogènia i poden diferenciar-se tres varietats clíniques, depenent de la presència/absència de neuronopatia i de l'edat d'inici de la malaltia: tipus 1 o malaltia de Gaucher no neuronopàtica crònica (forma adulta, OMIM #230800), tipus 2 o malaltia de Gaucher neuronopàtica aguda (forma infantil o cerebral o maligna, OMIM #230900) i tipus 3 o malaltia de Gaucher neuronopàtica subaguda (forma juvenil, OMIM #231000) (Taula I.2).

Taula I.2. Classificació de la malaltia de Gaucher en funció de la presència/absència de neuronopatia i de l'edat d'inici.

	Tipus 1 (no neuronopàtica)	Tipus 2 (neuronopàtica aguda)	Tipus 3 (neuronopàtica subaguda)
Pacients afectes	Nens, adults	Nens	Nens i adolescents
Edat d'inici	Totes les edats	4-5 Mesos	Edat preescolar
Òrgans afectes	Melsa, fetge i os	Melsa, fetge, cervell	Melsa, fetge, os i cervell
Síntomes neurològics	Absents	+++	De + a +++
Evolució	Lenta, variable	Ràpida	Intermitja, variable
Esperança de vida	6 a 80 anys	Mort abans dels 2 anys	20 a 30 anys
Grup ètnic	Panètnica, amb predilecció ètnica per als jueus d'origen Ashkenazi	Panètnica	Panètnica
Freqüència	1/60000 -1/200000 1/500 (Jueus Ashkenazi)	Menys 1/100000	Menys 1/50000

Cadascuna d'aquestes tres formes no es pot diferenciar bioquímicament de les altres i té característiques comunes: hepatomegàlia i/o esplenomegàlia degut al dipòsit de glucocerebròsids, presència de cèl·lules de Gaucher (cèl·lules reticuloendotelials amb un diàmetre entre 20 i 100 µm) en el moll de l'os i augment de les fosfatases àcides sèriques.

1.3.4.1 Tipus 1

Aproximadament el 90% dels casos de la malaltia són tipus 1, és a dir, és el més freqüent i, a més a més, el que té una clínica menys severa. Les característiques més importants de la malaltia de tipus 1 o malaltia de Gaucher no neuronopàtica crònica (forma adulta) són:

- L'absència de símptomes neurològics, ja que el sistema nerviós central (medul·la i encèfal) no està afectat.

- Aparició dels símptomes a qualsevol edat, des del naixement fins a la vellesa, tot i que la mitjana d'edat al diagnòstic se situa als 30 anys. Fins i tot s'han descrit casos asimptomàtics.
- Supervivència relativament prolongada.
- Malformacions esquelètiques, on s'inclou l'osteopènia, el dolor ossi i les fractures òssies, degut a l'hiperactivitat dels osteoclasts.
- Anèmia ferropènica i cansament.
- Trombocitopènia.
- Leucopènia, associada amb les dues anteriors a l'hiperesplenisme.
- Pingueculae o punts grocs a la conjuntiva de l'ull.
- Retard en la pubertat.
- Epistaxi.

Cal mencionar que en l'actualitat, s'ha trobat alguns pacients que manifesten símptomes extrapiramidals, semblants al parkinsonisme durant l'edat adulta. S'han publicat diversos articles en el que es demostra que la presència de mutacions en el gen *GBA* pot ser un determinant genètic per a la malaltia de Parkinson (Bultron et al., 2010; Lesage et al., 2011; Rosenbloom et al., 2011).

1.3.4.2 Tipus 2

La malaltia tipus 2 és poc freqüent i molt més greu que els altres dos tipus. Els malalts de tipus 2 o amb malaltia de Gaucher neuronopàtica aguda (forma infantil o cerebral o maligna) manifesten els símptomes abans dels sis mesos d'edat i tenen una evolució fatal cap als 2 anys de vida. Els infants presenten dany cerebral que empitjora ràpidament. A part dels signes i símptomes mencionats pels malalts de tipus 1, poden presentar alguns dels següents:

- Deteriorament cognitiu, incloent el retard mental o la demència als sis mesos de vida.
- Infeccions pulmonars i infiltració parenquimatososa de les cèl·lules de Gaucher.
- Rigidesa, poca flexibilitat.
- Accident vascular cerebral.

1.3.4.3 Tipus 3

Els pacients de tipus 3 o malalts de Gaucher neuronopàtics subaguts (forma juvenil) manifesten la clínica més tard que en el tipus 2 (primera dècada de la vida) i la mort no s'esdevé fins a

l'adolescència o més tard, fins i tot vers la tercera dècada de la vida. Els símptomes poden ser els següents:

- Epistaxi.
- Atàxia, marxa anormal.
- Apràxia oculomotora, incapacitat per a executar actes motors voluntaris apresos, malgrat que existeixi la capacitat física i la voluntat de fer-ho.
- Retard psicomotor i/o demència.
- Alteracions òssies i visceral.
- L'afectació pulmonar que causa fibrosi intersticial o l'ocupació dels alvèols són poc freqüents. Com a conseqüència s'origina la consolidació pulmonar progressiva i la hipertensió pulmonar.
- Complicacions hematològiques, durant la joventut.

Un subgrup ben caracteritzat d'aquests pacients de tipus 3 són els del tipus "Norbottnian", localitzats al nord de Suècia (Dahl et al., 1990).

1.3.5 Bioquímica

En la degradació de la glucosilceramida (figura I.9), alterada en la malaltia de Gaucher, hi intervenen dues proteïnes: la glucocerebrosidasa, una hidrolasa, i la saposina C, l'activador.

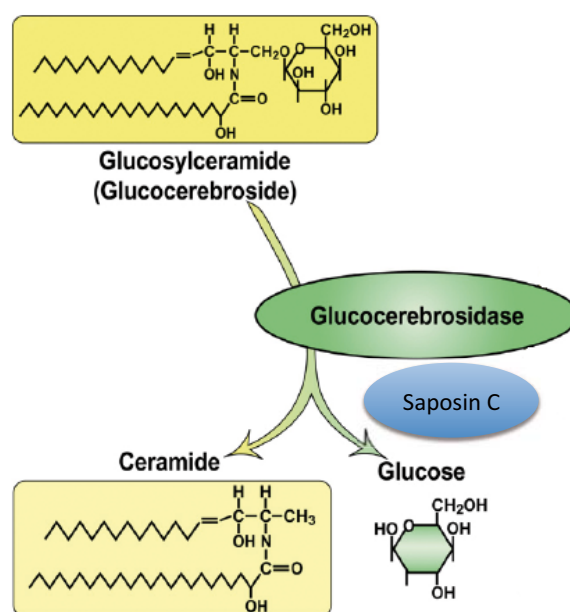


Figura I.9. Reacció de degradació de la glucosilceramida catalitzada per la glucocerebrosidasa, modificada de Sidransky (2004).

1.3.5.1 El Substrat: la glucosilceramida

La glucosilceramida és dels glicoesfingolípids més abundants a les cèl·lules, on serveix de precursor per a la formació d'aproximadament 200 glicoesfingolípids coneguts. Es forma per la glicosilació de la ceramida a l'aparell de Golgi a través de l'enzim glucosilceramida sintasa (GCS) o per l'anihilació del complex glicoesfingolípids (GSLs) a través de l'acció d'enzims hidrolítics específics. Al seu torn, certes β -glucosidases hidrolitzen aquests lípids per regenerar ceramida (Hakomori, 2000; Ichikawa and Hirabayashi, 1998).

A més del seu paper com a part de la construcció de la membrana biològica, els glicoesfingolípids mereixen ser estudiats per la seva suposada relació amb el creixement i la diferenciació cel·lular i la formació de tumors (Hannun and Obeid, 2008).

1.3.5.2 L'enzim: la glucocerebrosidasa

La glucocerebrosidasa (D-glucosil acilesfingosina glicohidrolasa, EC 3.2.1.45), també coneguda com a β -glucosidasa àcida o glucosilceramidasa (GBA; EC 3.2.1.45), és un enzim lisosòmic de 497 aminoàcids i 55kDa que catabolitza el glicolípido glucosilceramida en ceramida i glucosa (Beutler, 1992).

La proteïna té quatre llocs de glicosilació: N19, N59, N146 i N270 (p.As58, p.As98, p.As185 i p.As309 respectivament) (Berg-Fussman et al., 1993; Martin et al., 1989) i els residus catalítics es troben a E235 i E340 (p.Glu274 i p.Glu379, respectivament, segons la nomenclatura recomanada per la *Human Genome Variation Society*) (Dvir et al., 2003; Fabrega et al., 2000; Miao et al., 1994). El pes molecular de la forma glicosilada és 65 kDa.

La seva estructura (figura I.10) té 3 dominis:

- Domini I: on hi trobem 4 làmines beta (rosa).
- Domini II: on hi trobem 2 làmines beta (verd).
- Domini III: domini catalític on hi trobem 8 hèlix alfa i 8 làmines beta (blau).

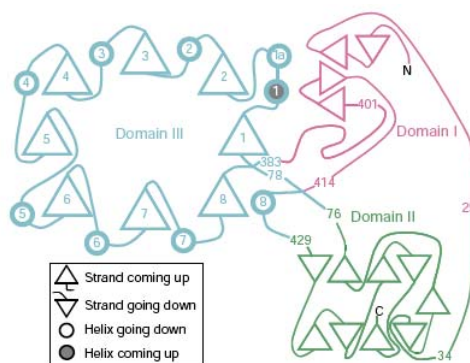


Figura I.10. Estructura bidimensional de la glucocerebrosidasa, modificada de Dvir et al. (2003).

1.3.5.3 L'activador: la saposina C

Les proteïnes activadores d'esfingolípids (SAPs) són glicoproteïnes enzimàticament inactives. La seva funció és actuar com a cofactors essencials en la degradació dels glicoesfingolípids amb cadena curta d'oligosacàrids, permetent la interacció entre els enzims solubles i els seus substrats, que estan units a la membrana.

Les saposines (A, B, C i D) es generen a partir d'un únic precursor, la prosaposina, que és processat. La prosaposina és una glicoproteïna de 70 kDa.

La saposina C és una proteïna de 81 aminoàcids que s'uneix a la glucocerebrosidasa, formant un complex. La seva estructura tridimensional, establerta al 2003, consta de 5 hèlix alfa i la podem veure a la figura I.11 (de Alba et al., 2003).

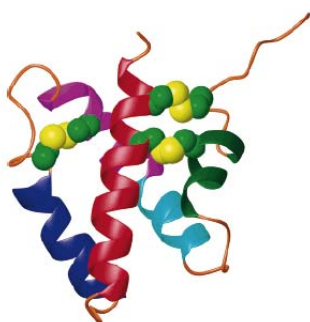


Figura I.11. Diagrama de la saposina C humana. Els àtoms de sulfur dels ponts disulfur estan en groc. Hèlix I en vermell, hèlix II en blau fosc, hèlix III en magenta, hèlix IV en blau clar i hèlix V en verd. Extret de de Alba (2003).

1.3.5.4 La reacció

La glucocerebrosidasa i la saposina C s'uneixen formant un complex (Berent and Radin, 1981). La saposina C, en adquirir propietats hidròfobiques a pH àcid, té alta afinitat per a la membrana i facilita la degradació de la glucosilceramida per la glucocerebrosidasa (Vaccaro et al., 1999).

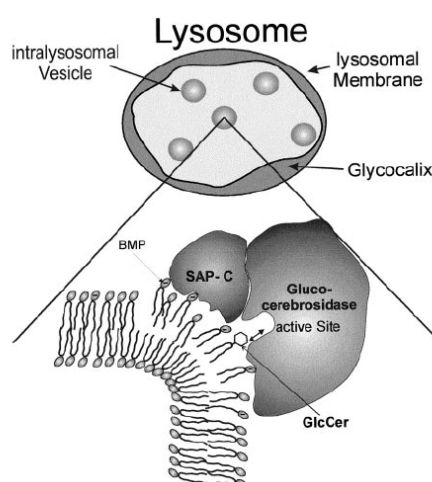


Figura I.12. Model per a la degradació del glucocerebròsid unit a la membrana, mitjançant la glucocerebrosidasa i la saposina C. Obtingut de Wilkening et al. (1998).

1.3.6 Genètica

Groen, al 1948, va ser el primer que va suggerir una herència autosòmica recessiva de la malaltia. El gen de la glucocerebrosidasa (*GBA*; OMIM *606463) va ser localitzat a 1q21-31 (Barneveld et al., 1983) i posteriorment va ser clonat i seqüenciat (Ginns et al., 1984; Horowitz et al., 1989; Sorge et al., 1985a).

Existeix un pseudogèn (*GBAP*) a 16 kb de distància respecte a l'extrem 3' del gen *GBA*. Les seves estructures són molt similars (11 exons i 10 introns) i van ser caracteritzats el 1988 (Horowitz et al., 1989; Reiner et al., 1988).

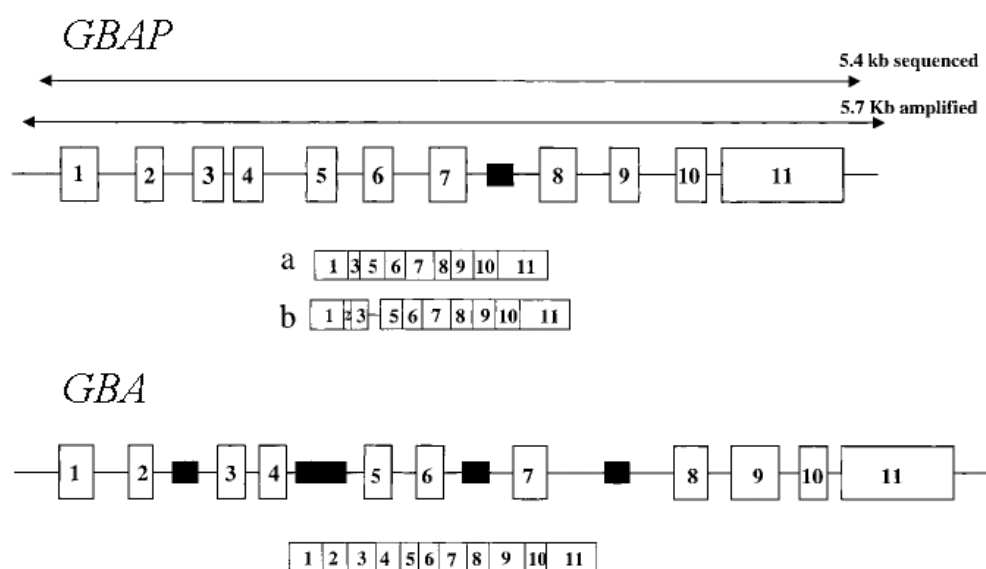


Figura I.13. Estructura del gen (*GBA*) i del pseudogèn (*GBAP*), adaptat de Martínez-Arias (2001a). Veiem els exons en capses amb números a l'interior. Les seqüències *Alu* estan representades com a capses negres. Les zones amplificades i seqüenciades estan indicades a la part superior. Els transcrits per a les dues regions estan representades amb capses més petites sota cada regió: (a) *psGBA* transcrit descrit per Sorge et al. (1990); (b) *psGBA* transcrit descrit per Imai et al. (1993).

Malgrat la diferència en llargada de les respectives seqüències (7,5 kb del *GBA* respecte 5,7 kb del *GBAP*), comparteixen el 96% en identitat nucleotídica (Horowitz et al., 1989).

En el gen *GBA* codifica un cDNA d'aproximadament 2,5 kb (Reiner et al., 1987; Sorge et al., 1985a; Tsuji et al., 1986). Sorge, a l'any 1987, va demostrar que el cDNA contenia dos ATG (Sorge et al., 1987). No s'ha establert encara la funció que poden tenir aquests dos ATG, però sembla que els pèptids senyals generats per cada ATG tenen una hidrofobicitat diferent i els dos ATG donen un enzim actiu.

A més dels canvis puntuals, les diferències més importants entre el gen i el pseudogèn són dues (Horowitz et al., 1989):

- Dues delecions en els exons 4 i 9 del pseudogèn, de 5bp i 55 bp respectivament. A nivell de diagnòstic molecular, la delecio de 55 parells de bases en l'exó 9 del pseudogèn és de gran utilitat.
- La presència de 3 seqüències *Alu* en els introns 2 (313pb), 4 (626pb) i 6 (320pb) del gen, respectivament.

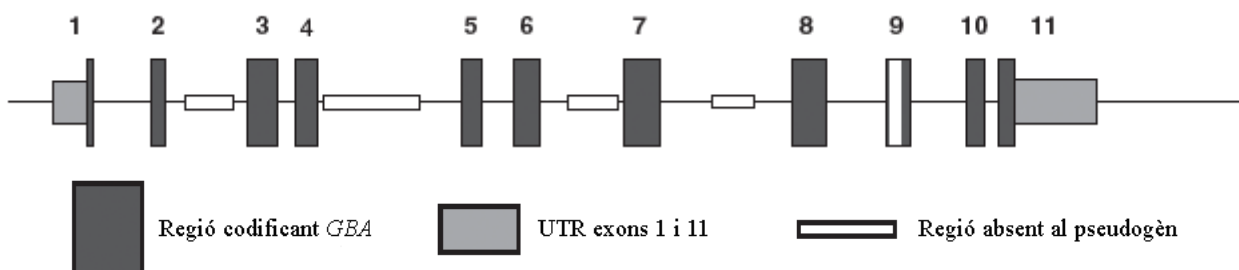


Figura I.14. Diferències entre el gen i el pseudogèn, adaptat de Hruska et al. (2008).

Tot i la gran homologia entre el gen i el pseudogèn, el fet que existeixin aquestes diferències impedeix la traducció, però no la transcripció del pseudogèn (Sorge et al., 1990).

Pel que fa a altres espècies d'animals, el gen *GBA* ha estat trobat en ratolí, porc o cavall, però el *GBAP* només ha estat identificat en primats i és probable que aparegués a partir d'una duplicació del gen *GBA* fa 40 milions d'anys (Wafaei and Choy, 2005).

Al voltant dels gens *GBA* i *GBAP* es troben molts altres gens, amb funcions tant conegudes com no:

- *COTE1* i *PROPINI*, situats a 5' del gen *GBA*.
- *CLK2*, gen que codifica per a una serina-treonina quinasa (Winfield et al., 1997), situat a 5' del gen *GBA*, però més a prop del telòmer del cromosoma 1.
- El pseudogèn de la metaxina (*MTXP*), i el gen de la metaxina (*MTP*), situats a 3' del gen *GBA*. La metaxina està implicada en el transport de proteïnes mitocondrials (Armstrong et al., 1997). Ambdós estan situats en sentit oposat a *GBA*.
- *THBS3*, situat a 3' del gen *GBA*.
- *MUC1*, situat a 3' del gen *GBA*, més a prop del centròmer del cromosoma 1.
- *PKLR*, situat a 5' del gen *GBA* a 70kb, codifica per la piruvat quinasa. Els polimorfismes que es troben en la regió que els separa estan en desequilibri de lligament.



Figura I.15. Regió genòmica flanquejant del gen *GBA* i el pseudogèn, modificada de Winfield et al. (1997).

Tal i com descriuen Winfield i els seus col·laboradors (Winfield et al., 1997), sembla ser que hi ha hagut una duplicació en el bloc genòmic format pels gens *GBA* i *MTX*, sense conseqüències per als gens propers.

1.3.6.1 Polimorfismes

Dins la regió genòmica del gen *GBA* s'han trobat diversos polimorfismes, que es troben en desequilibri de lligament entre ells (Beutler et al., 1992; Tylki-Szymanska et al., 2006; Zimran et al., 1990).

Utilitzant l'enzim de restricció *PvuII*, es va posar de manifest un polimorfisme de longitud de fragments de restricció; els al·lels que generaven un fragment de restricció de 1,1kb es van anomenar $Pv1.1^+$ i als que els mancava aquest fragment se'ls va anomenar $Pv1.1^-$ (Sorge et al., 1985b). Amb el temps, aquest polimorfisme va ser identificat com una substitució en l'intró 6 (g.4813G>A) (Zimran et al., 1990) i també s'ha trobat 8 polimorfismes en regions intròniques i 3 en la regió no traduïda. Totes d'aquestes variacions estan en desequilibri de lligament i constitueixen dos haplotips majoritaris (Beutler et al., 1992).

Els haplotips $Pv1.1^-$ i $Pv1.1^+$ tenen diferents freqüències en la població caucàsica (70 i 30%, respectivament), amb proporcions invertides en les poblacions asiàtica i africana (Cormand et al., 1997a; Glenn et al., 1994; Masuno et al., 1989; Mateu et al., 2002; Sorge et al., 1985b).

Les variacions del *GBAP* inclouen 17 substitucions nucleotídiques, 1 deleció de tres nucleòtids i una zona poliadenilada (Martinez-Arias et al., 2001a; Martinez-Arias et al., 2001b). Aquests polimorfismes en el *GBAP* són importants per a diferenciar el *GBAP* del *GBA* (Martinez-Arias et al., 2001a) i poder dissenyar primers específics de gen.

1.3.6.2 Mutacions

Han estat descrites més de 300 mutacions en el gen *GBA* (www.hgmd.org):

- 271 mutacions de canvi d'aminoàcid.
- 18 mutacions que aturen la pauta de lectura prematurament.
- 36 petites insercions o delecions amb o sense canvi de pauta de lectura.
- 16 canvis en el llocs de *splicing*.
- 16 recombinacions entre el gen i el pseudogèn: al·lels Rec o al·lels complexos, que comporten dues o més mutacions en *cis*, que s'acostumen a produir a la regió 3' del gen.
- 1 mutació reguladora.
- 27 petites i 4 grans delecions.
- 13 petites i 1 gran inserció.

- 4 petis indels.

Les dues primeres mutacions descrites van ser la c.1448T>C (L444P) i la c.1226A>G (N370S) a finals dels anys 80 (Tsuji and Suzuki, 1987; Tsuji et al., 1988). Aquests dos al·lells són els més prevalents en la majoria de poblacions de pacients estudiades. En el cas de la població espanyola, també aquestes dues són les mutacions més prevalents a més a més de la D409H (Cormand et al., 1998):

- El canvi A>G a la posició 1226 del cDNA, que produeix la substitució Asn>Ser a l'aminoàcid 370 (N370S), representa el 43,4% del total de mutacions. La seva elevada freqüència també va permetre estudiar el seu origen (Diaz et al., 1999; Diaz et al., 2000; Rodriguez-Mari et al., 2001). Després d'establir un haplotip comú en les poblacions jueva i no jueva, es va determinar que l'origen és comú.
- El canvi T>C al nucleòtid 1448 del cDNA, que produeix la substitució Leu>Pro a l'aminoàcid 444 de la proteïna (L444P), representa el 22,7%.
- El canvi G>C a la posició 1342 del cDNA, que produeix la substitució Asp>His a l'aminoàcid 409 de la proteïna (D409H), representa el 4,7%.

L'ètnia contribueix significativament a la distribució de mutacions. En el 90% dels pacients de tipus 1 d'ascendència jueva asquenazita les mutacions més prevalents són: N370S (c.1226A>G), L444P (c.1448T>C), c.84dupG, IVS2+1G>A (c.115+1G>A), R463C (c.1504C>T) i R496H (c.1604G>A) (Beutler et al., 1993; Grabowski, 1997; Koprivica et al., 2000). Concretament la mutació N370S està present en el 70% dels pacients i la c.84dupG en un 10%. Pel que fa als pacients no jueus asquenazites, el rastreig de les 6 mutacions anteriors només permet identificar el 25-50% de les mutacions.

Els al·lells complexos, es formen a partir de la recombinació entre regions homòlogues del gen i del pseudogèn. Només es troben en heterozigosi i els pocs casos descrits en homozigosi han estat letals (Reissner et al., 1998; Sidransky et al., 1996; Strasberg et al., 1994; Tayebi et al., 1997). Els al·lells complexos més freqüents són els RecNcil i el RecTL que combinen els canvis que podem observar en la figura I.16.

Cal tenir en compte que en identificar mutacions com la D409H i la L444P, derivades del pseudogèn, s'ha de comprovar que no formin part d'un al·lel recombinant (Tayebi et al., 2003).

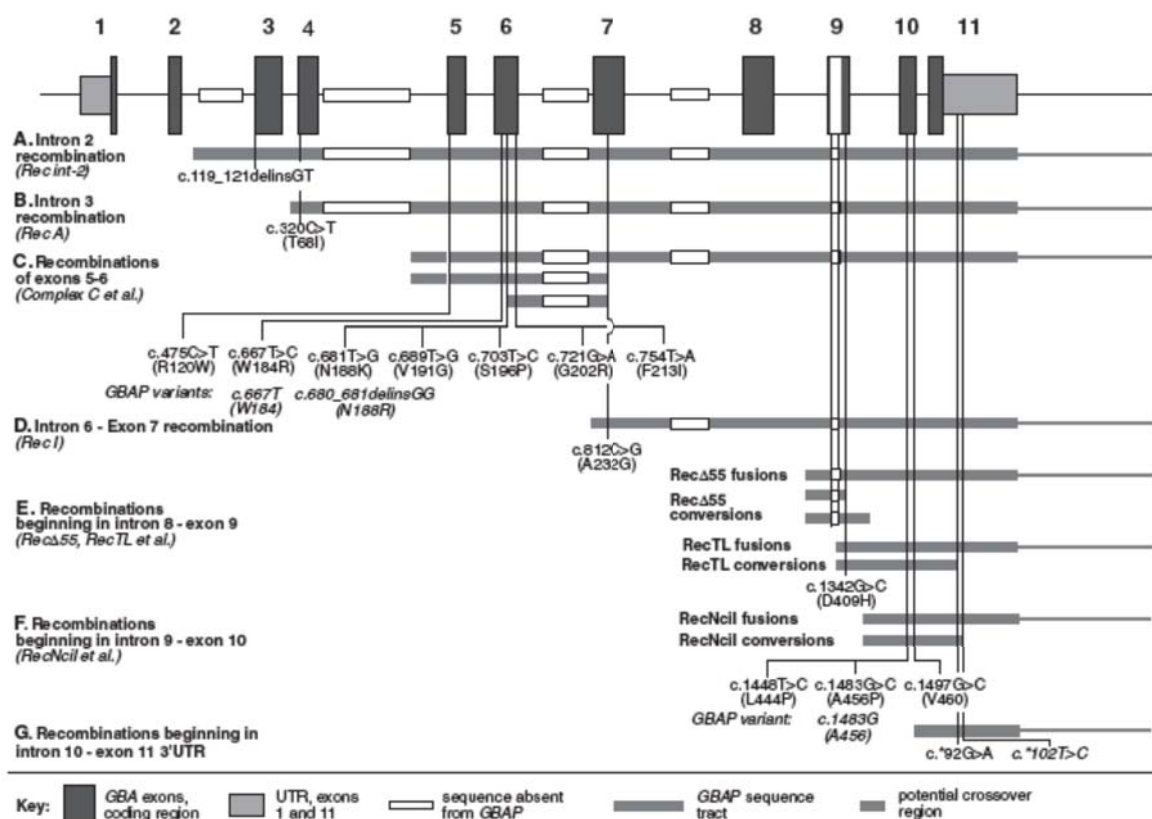


Figura I.16. Al·lels recombinats, extret de Hruska et al. (2008).

Cal mencionar que la nomenclatura que s'ha fet servir en aquest treball en parlar de les mutacions és la clàssica, és a dir, no la recomanada per la *Human Genome Variation Society* (HGVS, <http://www.hgvs.org>), però emprada habitualment per la majoria d'autors a l'hora de referir-se a les mutacions del gen *GBA*.

Les mutacions del gen *GBA* havien estat clàssicament descrites basant-se en la posició del primer aminoàcid de l'enzim madur, essent la p.Ala40 el primer residu. La normativa recomana per la HGVS diu que cal nombrar els aminoàcids des de la primera metionina, és a dir, 39 residus abans.

1.3.6.3 Saposina

En uns pocs casos, 7 coneguts fins la data d'avui (Vaccaro et al., 2010), s'ha descrit que la malaltia està causada per deficiències en la proteïna activadora de la glucocerebrosidasa, la saposina C, codificada pel gen de la prosaposina (*PSAP*), que es troba a 10q21-q22 (Bar-Am et al., 1996; Cormand et al., 1997a).

El gen *PSAP* es transcriu en un transcrit que codifica un polipèptid de 524 aminoàcids (Furst et al., 1988; Nakano et al., 1989; Rorman and Grabowski, 1989), amb 4 dominis homòlegs corresponents

a les saposines A, B, C i D. Les quatre proteïnes tenen 15 aminoàcids conservats, entre els quals trobem 6 residus de cisteïna i una senyal de N-glicosilació.

El gen té 15 exons i es troba força conservat en diferents espècies. Es creu que el gen *PSAP* prové de dues duplicacions en tàndem d'un gen ancestral que codificava per un sol domini SAP (Hazkani-Covo et al., 2002).

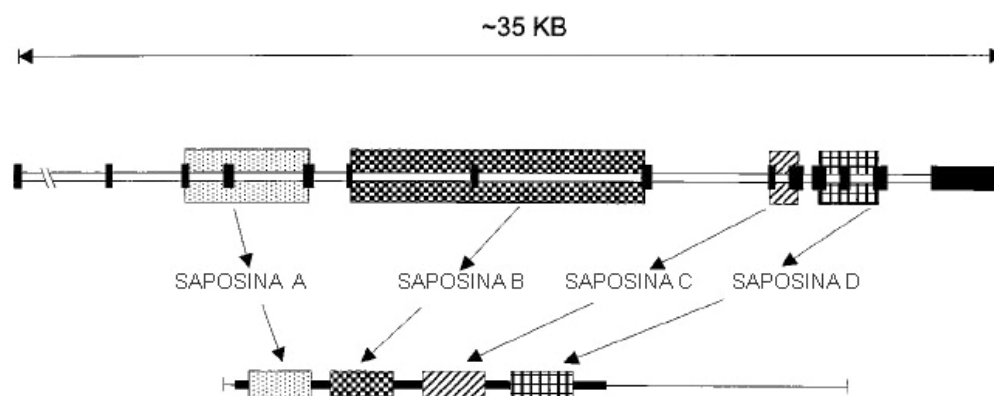


Figura I.17. Estructura del gen de la *PSAP*, modificada de Qi X et al. (2006).

Les mutacions en aquest gen, degut a que codifica per a quatre proteïnes, poden causar diferents malalties. En el cas que les mutacions afectin a tota la prosaposina, ens trobem davant d'una esfingolipidosi complexa.

Les mutacions que afecten la saposina C (exons 10 i 11), causaran la malaltia de Gaucher, com la C315S (Amsallem et al., 2005), la C382G (Rafi et al., 1993), o la C382F (Schnabel et al., 1991). En alguns casos la malaltia de Gaucher pot estar causada per mutacions heterozigosi composta, en la que un al·lel porta una mutació en el domini saposina C i l'altre al·lel mutat està el domini saposina D (Diaz-Font et al., 2005).

1.3.6.4 Correlació genotip-fenotip

Tot i que s'ha avançat molt en el coneixement de les mutacions causants d'aquesta malaltia, no existeix una sòlida relació genotip-fenotip. Per altra banda, cal mencionar que la gran majoria de mutacions identificades no acostumen a trobar-se en homozigosi i són privades, per tant la gravetat de cada mutació és difícil de predir.

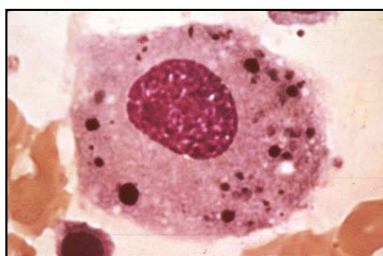
Segons el casos en què es pot establir una relació genotip-fenotip, les mutacions trobades es poden classificar en:

- Mutacions lleus: aquelles trobades en absència d'afectació del sistema nerviós central (tipus 1). La mutació per excel·lència és la N370S. El fenotip és lleu quan es presenta en homozigosi i també en heterozigosi amb una de greu o nul·la (Zimran et al., 1989). Altres mutacions lleus són la I402T o la V375L (Cormand et al., 1997b).
- Mutacions greus: aquelles associades amb un fenotip neuronopàtic. La mutació més característica és la L444P, que en homozigosi pot manifestar-se com a tipus 2 o tipus 3. Com ja hem mencionat anteriorment, la població norrbottniana es caracteritza per ser portadora d'aquesta mutació (Dahl et al., 1990).
- Mutacions nul·les: aquelles que impedeixen que es formi l'enzim. Les més comú en la població mundial i molt prevalent en població jueva asquenazita és la c.84dupG i, en el cas de la població espanyola, la RecNcil. No han estat trobades en homozigosi ni tampoc en heterozigosi composta amb una altra nul·la, pel que es dedueix que serien letals.

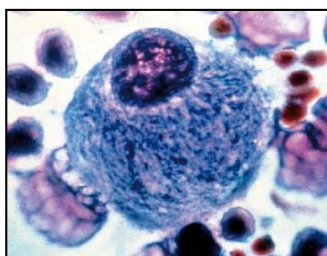
Cal destacar que un mateix genotip pot associar-se a diferents fenotips (Sibille et al., 1993) i les raons poden ser diverses: factors ambientals o factors genètics. En aquest segon cas, tant l'expressió de la saposina C o altres hidrolases (Goker-Alpan et al., 2005), com els polimorfismes modificadors, per exemple el E326K (Chabas et al., 2005; Montfort et al., 2004), poden ser importants.

1.3.7 Patogènia

L'excés de glucocerebròsids s'acumula en les cèl·lules reticuloendotelials de la melsa, del fetge i/o dels ganglis limfàtics i altera sovint l'estructura dels ossos, els pulmons i, en major o menor grau, el sistema nerviós central. Les cèl·lules, anomenades de Gaucher, esdevenen escumoses degut a que els lípids ocupen la majoria de l'espai, augmentant la mida i desplaçant el nucli a la perifèria (Figura I.18).



Macròfag normal



Cèl·lula de Gaucher

Figura I.18. En aquestes imatges podem observar a l'esquerra un macròfag normal i a la dreta una cèl·lula de Gaucher, que evidencia un acúmulo de glucocerebròsids en tot el citoplasma. Extret de www.cecm.usp.br.

Com a conseqüència dels efectes mencionats, es dona una alteració en els diferents òrgans, aparells i sistemes següents:

- El sistema hematopoètic: cal destacar la trombocitopènia aïllada o acompanyada de leucopènia i anèmia microcítica moderades.
- El fetge: hi ha alteracions en l'arquitectura lobular i s'hi detecta fibrosi, que pot provocar hipertensió portal i ascites.
- El sistema limfàtic: s'evidencien les limfoadenopaties perifèriques, com l'afectació del tim, de les plaques de Peyer intestinals i de les amígdals faríngies.
- El sistema esquelètic: l'estructura dels ossos queda malmesa per les cèl·lules de Gaucher, efecte que pot causar fractures patològiques o bé episodis de dolor.
- L'aparell respiratori: l'estructura dels pulmons es veu alterada i les seves conseqüències destacables, entre d'altres, són la pneumonitis i el destret respiratori.

Les alteracions al SNC poden ser explicades per l'acúmulo de material i altres canvis bioquímics que indueixen l'alliberament de factors inflamatoris, com citocines i quimocines, i inicien la cascada de canvis patològics (Cox, 2001; Futerman and van Meer, 2004).

1.3.8 Diagnòstic

El diagnòstic de la malaltia es basa en dades de diferents tipus:

- Clínic: la combinació dels següents signes i símptomes ens fa sospitar de l'existència de la malaltia de Gaucher.
 - Compromís visceral: la esplenomegàlia, la hepatomegàlia i/o la icterícia.
 - Compromís hematològic: pell i/o mucoses pàlides, petèquies, equimosi, epistaxi recurrents, gingivorragia i/o infeccions freqüents.
 - Compromís ossi: dolor en articulacions o superfícies d'ossos llargs, deformacions òssies, fractures patològiques i/o osteoporosi en pacients joves.

Cal fer un diagnòstic diferencial de la malaltia de Gaucher respecte a d'altres malalties amb manifestacions clíniques semblants. Per exemple, en la malaltia de Niemann-Pick tipus B també trobem hepatoesplenomegàlia o pancitopènia. Per altra banda, les leucèmies o les anèmies hemolítiques han de ser descartades en infants (Martins et al., 2009).

- Anatomopatològiques: la presència de cèl·lules de Gaucher al moll de l'ós, la melsa o el fetge. Excepcionalment podrien trobar-se a la sang.

La cèl·lula de Gaucher és un histiòcit de 20 a 80 µm de diàmetre, amb el nucli picnòtic, excèntric, únic o múltiple, el citoplasma del qual té un aspecte diferent segons la quantitat i l'estat

fisicoquímic del glucocerebròsid emmagatzemat. En la majoria dels casos adquireix un aspecte de paper de pergami o de seda arrugada.

Si s'observa al microscopi electrònic de transmissió es poden apreciar clarament estructures tubulars molt típiques i nombroses microvellositats.

És poc habitual que en trobem en sang perifèrica, però sí que hi trobarem monòcits amb fosfatasa àcida tartrat-resistent.

- Bioquímiques: La disminució en l'activitat glucocerebrosidasa. Aquesta pot ser detectada tant a leucòcits, fibroblasts provinents de cultiu, cèl·lules de l'amni o cèl·lules de les vellositats coriòniques. És la que ens aporta un diagnòstic de certesa.

- Genètiques: detecció de mutacions en el gen *GBA*. Habitualment es busquen les mutacions més prevalents en la població estudiada.

1.3.9 La teràpia actual

L'objectiu principal del tractament d'aquesta malaltia és disminuir la quantitat de substrat acumulat en les cèl·lules del pacient i per fer-ho existeixen diferents estratègies. Per altra banda, la simptomatologia característica de la malaltia necessita ser pal·liada. D'això se'n deriven dos tipus de tractaments: el simptomàtic i l'específic.

1.3.9.1 Tractament simptomàtic

El tractament simptomàtic està dirigit a alleujar els símptomes de la malaltia, però no tracta la causa específica del trastorn. Destaquem:

- L'esplenectomia parcial o total, si hi ha una trombocitopènia severa persistent (Fleshner et al., 1991).
- Transfusió de productes sanguinis, en cas d'anèmia severa.
- Analgèsics per al dolor ossi.
- Cirurgia ortopèdica per a reemplaçar articulacions (Goldblatt et al., 1988).

El trasplantament de medul·la òssia (Rindgen et al., 1995) ha estat limitat per la seva morbiditat i mortalitat, en aparèixer tractaments específics (Santoro, 2002; Sirrs et al., 2002).

1.3.9.2 Tractament específic

a) Teràpia enzimàtica

A l'any 1964 ja es va hipotetitzar la teoria que les malalties d'acúmul lisosòmic es podrien tractar utilitzant enzim actiu, per part de De Duve.

Prèviament al desenvolupament dels tractaments actuals, ja s'havien realitzat experiments amb fibroblasts de pacients amb diverses malalties d'acúmul lisosòmic: la malaltia de Sandhoff (Cantz and Kresse, 1974), la malaltia de Sanfilippo tipus B (O'Brien et al., 1973) i la leucodistrofia metacromàtica (Porter et al., 1971).

Respecte a la malaltia de Gaucher, es van realitzar diversos intents de tractament durant les dècades dels anys 70 i 80, tant utilitzant glucocerebrosidasa de placenta sense modificar (Brady et al., 1974), com sintetitzant enzim recombinant i exposant els residus de manosa per a que fossin reconeguts pels macròfags (Furbish et al., 1981). Però no va ser fins al 1991 que es va aprovar l'administració intravenosa de l'enzim o teràpia de substitució enzimàtica (ERT).

En primer lloc es va emprar la Ceredase[®] (Genzyme Corporation), que es basava en la infusió d'alglucerasa, purificada a partir de l'enzim que provenia de la placenta humana. Posteriorment s'exposaven els residus de manosa per a que fossin reconeguts pels macròfags.

Actualment, el fàrmac emprat en la malaltia de Gaucher és l'enzim obtingut mitjançant tècniques recombinants (imiglucerasa, Cerezyme[®] de Genzyme Corporation) (Barton et al., 1990) i s'ha utilitzat exitosament durant més de 20 anys per a pal·liar els símptomes viscerals i hematològics dels pacients de tipus 1. Actualment és el tractament estàndard establert i aprovat per a millorar les manifestacions de la malaltia de Gaucher (Charrow et al., 2007; Damiano et al., 1998; Masek et al., 1999; Schmitz et al., 2007; Weinreb et al., 2007; Weinreb et al., 2002; Wenstrup et al., 2007).

Aquest tractament es recomana als pacients de tipus 1, independentment de l'edat. Desgraciadament, aquest fàrmac és incapaç de creuar la barrera hematoencefàlica i qualsevol efecte sobre els símptomes neurològics, si existeix, és molt limitat. Cal destacar que és un tractament crònic car i que necessita ser infusionat amb elevada freqüència (un cop cada dues setmanes).

Alguns autors també el recomanen als pacients de tipus 3 també, ja que també millora la qualitat de vida, així com els símptomes hematològics i el volum visceral (Erikson, 1986; Erikson et al., 2006; Ono et al., 2001).

Tot i que el Cerezyme segueix essent el tractament estàndard per a la malaltia de Gaucher, dos productes biosimilars, que també empren el sistema receptor de membrana per a manosa dels

macròfags, s'estan introduint. El primer d'aquests és l' α -velaglucerasa (VRIPV[®], Shire Human Genetic Therapies), produïda a partir de línies cel·lulars de fibrosarcoma. El segon és l' α -taliglucerasa (Protalix), produïda en cèl·lules de plantes [revisat a Cox (2010)].

b) Teràpia de reducció de substrat

Una altra estratègia de tractament ha estat la teràpia de reducció de substrat (SRT), que utilitza inhibidors de la glucosilceramida sintasa (Dwek et al., 2002) com la *N*-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ), conegut com a Miglustat o Zavesca[®] (via oral). La glucosilceramida sintasa és l'enzim responsable de la síntesi del substrat acumulat en la malaltia de Gaucher. En els malalts de tipus 1 amb poca o moderada afectació, s'utilitza com a segona línia de tractament.

El petit tamany de la NB-DNJ feia pensar en aquesta molècula com una bona candidata a ser utilitzada en casos amb afectació neurològica, però l'assaig clínic no va demostrar cap millora per als símptomes neurològics (Schiffmann et al., 2008).

El producte Genz-112638 o tartrat eliglustat va sorgir amb la mateixa idea d'inhibir enzims implicats en la síntesi de glicoesfingolípid. S'han dut a terme els estudis preclínic en un model múri de la malaltia de Gaucher (Marshall et al., 2010). També s'han realitzat assaigs clínics (fase II, veure taula I.3).

c) Teràpia gènica

La teràpia gènica, dissenyada per a que corregís permanentment el defecte de les malalties monogèniques mitjançant la transferència del gen normal, no ha donat els resultats esperats en la malaltia de Gaucher (Barranger and Novelli, 2001). Els primers assaigs clínics que utilitzaven vectors del tipus lentivirus per a transferir el gen de la glucocerebrosidasa a macròfags van tenir baixa eficiència de transducció i cap benefici clínic, tot i que anteriorment s'havia descrit un mètode que transformava progenitors hematopoètics (Migita et al., 1995).

Més tard, s'han desenvolupat models murins (Enquist et al., 2006) que han estat emprats per a evaluar la teràpia amb lentivirus en una fase preclínica (Enquist et al., 2009). Un altre exemple és la utilització de virus adenoassociats (AAV) (McEachern et al., 2006), on el vector indueix, de manera sostinguda, que el fetge secreti l'enzim, essent suficient per a prevenir l'acumulació de glucosilceramida, tant al fetge, com a la melsa i als pulmons.

d) Altres alternatives

Altres mètodes que s'han assajat com a possible estratègia terapèutica per a la malaltia de Gaucher, són els quimeraplasts i l'ARN d'interferència (RNAi).

Els quimeraplasts es basen en les tècniques de reparació gènica dirigida i són molècules quimèriques d'ARN-ADN capaces de corregir un gen mutat en cèl·lules en cultiu, ja que permeten el canvi d'un nucleòtid mutat per un altre. S'ha proposat que el mecanisme d'acció es basa en la capacitat que podrien tenir els quimeraplasts per induir la recombinació homòloga amb l'ADN que es vol corregir (Gamper et al., 2000).

En la malaltia de Gaucher, el nostre grup va utilitzar aquesta tècnica, però els resultats no van ser positius a l'hora de corregir mutacions (Diaz-Font et al., 2003).

Aquest mètode ha estat posat en dubte per la comunitat científica (Taubes, 2002), degut a que la majoria d'articles van ser publicats per un sol grup o per grups que col·laboraven amb aquest. Posteriorment, van aparèixer altres articles amb resultats negatius en utilitzar quimeraplasts (Manzano et al., 2003; Ruitter et al., 2003; Tagalakis et al., 2005).

La tècnica d'RNAi es basa en que un ARN de doble cadena (dsRNA) pot reprimir l'expressió d'un gen homòleg. El dsRNA es processa en fragments de 21-28 nucleòtids, que s'anomenen siRNAs. Un cop generats els siRNA poden reconèixer la seqüència nucleotídica del gen objecte d'interès i així es produeix el silenciament del gen. La inhibició de la transcripció o de la traducció del gen diana està causada per la unió dels siRNA a ribonucleoproteïnes formant un complex anomenat RISC (RNA-induced silencing complex) que permet degradar l'ARNm (Hammond et al., 2000).

Pel que fa a l'RNAi com a teràpia de diferents malalties, ha estat utilitzada en cultius cel·lulars (Miller et al., 2003), en models animals (Harper et al., 2005) i, fins i tot, s'ha arribat a assaigs clínics (Check, 2005; Whelan, 2005). Aquesta tècnica, s'utilitza per a inhibir l'expressió de diferents gens, tant exògens com endògens. En la malaltia de Gaucher, el nostre grup (Diaz-Font et al., 2006) ha aconseguit inhibir el gen de la glucosilceramida sintasa (GCS) humana, no tan sols amb dos siRNA diferents, sinó que també amb shRNA. Els shRNA són siRNA transcrits a partir de la seqüència introduïda en un plàsmid.

En la taula I.3 estan recopilats els assaigs clínics que es fan en l'actualitat i els que s'han dut a terme prèviament (www.clinicaltrials.org).

Taula I.3. Assaigs clínics realitzats en pacients amb malaltia de Gaucher.

Producte	Tipus	Fase	Farmacèutica	Estat	Duració	Referència
Alglucerase: Ceredase®	Tipus I	-	Genzyme Corp.	Complet	-	(Barton et al., 1990)
Imiglucerase Cerezyme®	Tipus I	-	Genzyme Corp.	Complet	-	(Grabowski et al., 1995; Zimran et al., 1995b)
OGT 918 (Miglustat, Zavesca, Vevesca)	Tipus I-III	I/II	Oxford Glycosciences	Complet	2002-2007	(Cox et al., 2000)
		III	Actelion	Actiu	2006-2010	
AT2101: Tartrat d'isofagomina (IFG) : Plicera™	Tipus I	Observacional	Amicus Therapeutics	Complet	2007-2008	-
		I		Complet	2009	
		II		Complet	2007-2009	
		II		Complet	2007-2010	
		II		Actiu	2008-2010	
Lysodase	Tipus I/III	I/II	-	Complet	1993-2001	(Martin et al., 1989)
Alfa velaglucerasa	Tipus I	II/III	Shire Human Genetic Therapies, Inc.	Complet	2007-2009	(Aerts et al., 2010; Zimran et al., 2010)
		III		Complet	2007-2009	
		III		Complet	2008-2009	
		I/II		Actiu	2005-2013	
		III		Actiu	2008-2014	

Tartrat eliglustat (Genz-112638)	Tipus I	II	Genzyme Corp.	Actiu	2006-2011	(Lukina et al., 2010)
		III (ENCORE)		Reclutant pacients	2009-2012	
		III (ENGAGE)		Reclutant pacients	2009-2014	
		III (EDGE)		Reclutant pacients	2010-2015	
Alfa Taliglucerasa o Glucocerebrosidasa recombinant expressada en cèl·lules de planta (prGCD)	Pacients pediàtrics	I	Protalix	Complet	2005-2006	(Aviezer et al., 2009)
		III		Complet	2006-2009	
		III		Reclutant pacients	2008-2010	
		III		Reclutant pacients	2008-2011	
		IV		Reclutant pacients	2010	
		-		Expansió	2009-2011	
ISU302	Tipus I	III	ISU Abxis Co., Ltd.	No obert encara	2011	-
Gen de la glucocerebrosidasa humana transferida a cèl·lules mare sanguínies	Tipus I	I	-	Complet	1999-2005	-
cDNA humà de la glucocerebrosidasa	-	I	-	Complet	1988-2002	-

1.3.10 Prognosi i biomarcadors

Tots els pacients diagnosticats de la malaltia de Gaucher han de ser monitoritzats des d'un punt de vista tant clínic com molecular, abans de l'administració del tractament i durant aquest.

Cal tenir en compte, que el pronòstic de la malaltia de Gaucher és molt variable. En la malaltia de tipus 2, els pacients generalment moren als pocs mesos de vida. En canvi, hi ha pacients tipus 1 en què el diagnòstic es realitza durant la senectut.

Per a determinar la progressió de la malaltia o la seva resposta als tractaments en nens i adults, s'utilitza l'anàlisi de biomarcadors, com la quitotriosidasa. Els nivells elevats de quitotriosidasa són reflex d'un excés d'emmagatzemament de lípids (Hollak et al., 1994). Aquests nivells acostumen a disminuir i segueixen estables després del tractament amb imiglucerasa.

Altres biomarcadors suggerits són:

- Quimocina CCL18/PARC: els nivells plasmàtics poden servir com un marcadors en pacients amb malaltia de Gaucher i la monitorització dels nivells pot servir per a determinar l'eficàcia terapèutica (Boot et al., 2004), especialment en pacients amb una activitat quitotriosidasa deficient (Cox et al., 2008).
- MIP-1 α i MIP-1 β : l'elevació dels nivells plasmàtics es correlaciona amb les manifestacions esquelètiques de la malaltia i la disminució es produeix quan el tractament és efectiu (van Breemen et al., 2007).
- TNF- α : es detecten elevats nivells plasmàtics en els casos més severos d'afectació neuronopàtica (Michelakakis et al., 1996).

1.4 Estudis cel·lulars: expressió d'al·lels mutats *in vitro*

L'objectiu principal dels estudis d'expressió d'al·lels mutats *in vitro* és comprovar que un canvi nucleotídic trobat en un pacient té un efecte sobre l'activitat de l'enzim.

La manca d'una bona correlació genotip-fenotip complica el tractament dels pacients. Els estudis d'expressió poden contribuir a establir correlacions genotip-fenotip. En el cas concret de la malaltia de Gaucher, s'han realitzat diferents estudis d'expressió *in vitro*, tant de la proteïna salvatge, com de diferents mutants en baculovirus (Amaral et al., 2000; Choy et al., 1996; Grace et al., 1990; Grace et al., 1994; Grace et al., 1999; Kim et al., 1996), virus vaccinia (Hodanova et al., 2003; Pasmanik-Chor et al., 1997), cèl·lules NIH 3T3 (Ohashi et al., 1991), cèl·lules COS (Alfonso et al., 2004; Grabowski et al., 1989; Torralba et al., 2001); gràcies als valors d'activitat obtinguda per a cada proteïna mutant i a les troballes anatomopatològiques es pot aprofundir en la fisiopatologia de la malaltia de Gaucher.

El sistema d'expressió que utilitza baculovirus és un mètode molt eficient per a produir enzim recombinant. Concretament, el sistema Bac-to-Bac utilitzat pel nostre grup anteriorment permet una ràpida selecció dels baculovirus recombinants i l'al·lel salvatge sobreexpressat té una activitat entre 7 i 10 vegades major que en fibroblasts (Montfort et al., 2004). Per altra banda, no es pot explicar la baixa activitat residual de la mutació N370S, associada a un fenotip lleu.

Pasmanik-Chor i col·laboradors al 1997, van emprar el sistema d'expressió híbrid T7/encefalomiocarditis (EMC)/virus vaccinia que té les avantatges següents:

- Transcripció eficient i traducció del gen objecte d'estudi.
- Disminució de la síntesi de la proteïna endògena de l'hoste, evitant fer el seguiment de la proteïna sobreexpressada amb anticossos.

El mateix sistema modificat va ser emprat per Hodanova (Hodanova et al., 2003) utilitzant fibroblasts i línies cel·lulars BSC40. Les diferències en els resultats obtinguts no semblen ser degudes al mètode utilitzat, ja que un ampli rang de resultats han estat obtingut utilitzant el mateix mètode [revisat a Montfort et al. (2004)].

El sistema d'expressió mitjançant cèl·lules COS havia estat emprat anteriorment per diversos autors (Alfonso et al., 2004; Grabowski et al., 1989; Torralba et al., 2001). No tan sols és un sistema d'expressió heteròloga en cèl·lules de mamífer per a expressar de forma ràpida i senzilla, sinó que també permet obtenir gran quantitat de ARN (Laub and Rutter, 1983) i reproduceix fidelment el procés de transcripció que es duu a terme *in vivo* (Mellon et al., 1981).

1.5 Models animals

El primer model animal natural descrit per a la malaltia de Gaucher va ser caní (Van De Water et al., 1979). Tretze anys més tard, va arribar el model murí (Tybulewicz et al., 1992) mitjançant la tècnica de disrupció dirigida. S'obtenia un ratolí *knock-out*, mitjançant cèl·lules mare embrionàries modificades per un al·lel nul. Els ratolins homozigots per a la mutació tenien un percentatge molt baix d'activitat glucocerebrosidasa (4%) i morien a les 24 hores d'haver nascut, tot i que es restablí la glucocerebrosidasa als lisosomes de les cèl·lules del sistema reticuloendotelial.

Al 1998 van arribar els models murins per a mutacions puntuals, utilitzant la mutagènesi dirigida (Liu et al., 1998). Els ratolins eren portadors de les mutacions L444P i RecNcil que es corresponien amb el tipus 3 i 2. Tot i que els ratolins homozigots per a la mutació L444P tenien alts nivells d'activitat glucocerebrosidasa, no superaven les 48 hores de vida degut als defectes de la permeabilitat de la barrera epidèrmica.

Més endavant es van generar models per altres mutacions: N370S, V394L, D409H i D409L (Xu et al., 2003). Tot i que es pensava que el ratolí portador de la mutació N370S tindria una fenotip lleu, aquest tenia una elevada taxa de mortalitat neonatal.

Al 2007, Enquist i col·laboradors van generar un ratolí transgènic amb una baixa expressió del gen en la pell, evitant la letalitat precoç (figura I.19). Els ratolins mostraven un fenotip similar a la forma neuronopàtica severa de la malaltia de Gaucher, és a dir, ràpida disfunció motora, convulsions i hiperextensió del coll associada amb neurodegeneració greu i mort neuronal per apoptosi.



Figura I.19. Model murí de la malaltia de Gaucher, extret de Enquist et al. (2007).

Un segon model amb deficiència de GBA a cèl·lules progenitores tant de neurones com de cèl·lules de la glia, va demostrar una patologia neuronal similar, però un retard en l'inici i una lenta progressió de la malaltia. Aquestes troballes indiquen que la deficiència de la GBA en les cèl·lules de la microglia amb origen hematopoètic pot influenciar en la progressió de la malaltia, però no és

el més determinant en la patogènia del SNC. Per altra banda les cèl·lules de la microglia amb origen hematopoètic no poden rescatar el fenotip neurodegeneratiu.

Pel que fa al gen *PSAP*, es van generar models animals per a la deficiència total de les saposines (Fujita et al., 1996; Matsuda et al., 2001). Posteriorment, es van generar ratolins mutants per al *PSAP* (Sun et al., 2003) i per a *PSAP* i *GBA* (Sun et al., 2005). Aquests ratolins es caracteritzen per ser nuls per al gen *PSAP* i homozigots per a les mutacions D409H o V394L del gen *GBA*. Fenotípicament són similars als dels mutants per al gen *GBA*, però també presenten alteracions en el sistema nerviós central.

Un nou model de ratolí va ser generat creuant ratolins homozigots per a la mutació V394L i ratolins nuls per a la saposina C (Sun et al., 2010). La deficiència en la saposina C va portar a majors disminucions en la glucocerebrosidasa i augments en els nivells de glucosilceramida i glucosilesfingosina. Les característiques dels ratolins eren similars al tipus 3 i el fenotip era intermig.

1.6 Les xaperones farmacològiques

Fins ara, només dues teràpies farmacològiques específiques han estat aprovades i aplicades amb èxit per els pacients de tipus 1: la ERT i la SRT. Una nova línia d'investigació basada en petites molècules (xaperones farmacològiques) s'ha obert per a poder oferir un tractament complementari als pacients que no es poden beneficiar de la ERT o de la SRT.

Les xaperones farmacològiques són compostos no proteics de baix pes molecular que mimetitzen l'efecte de les xaperones cel·lulars (Ringe and Petsko, 2009), ja que estableixen les proteïnes mal plegades contra la desnaturalització tèrmica i la degradació per proteòlisi. Així ho veiem en la figura I.20.

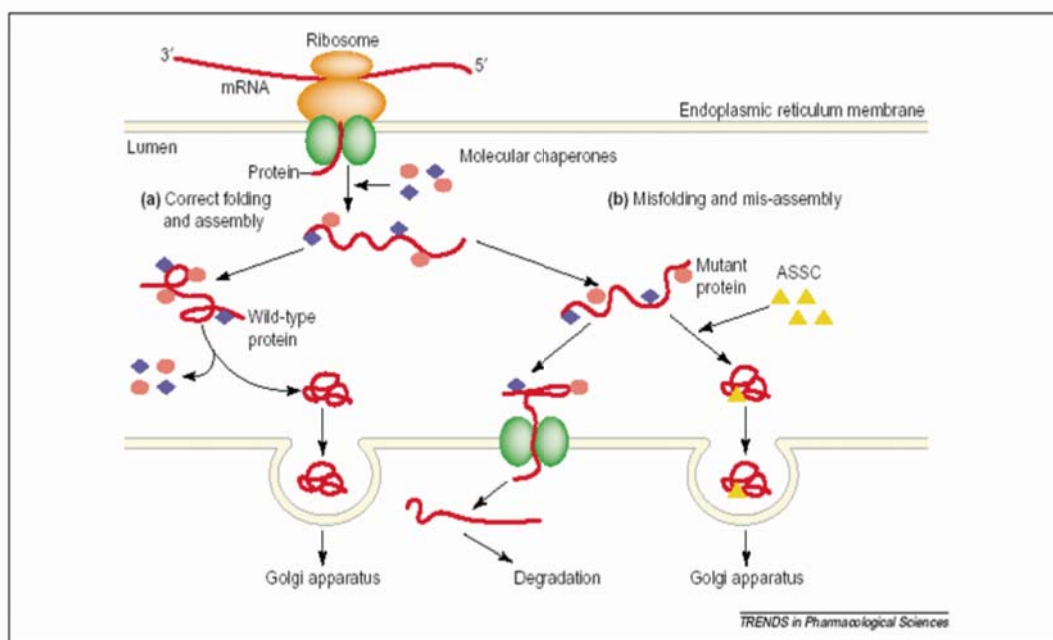


Figura I.20. Esquema del funcionament de les xaperones cel·lulars i de les xaperones farmacològiques, extret de Fan et al. (2003).

Les xaperones farmacològiques són un subtipus de xaperones químiques que es caracteritzen per la seva especificitat.

S'uneixen al centre catalític a través de diferents interaccions favorables (electrostàtiques, van der Waals i ponts d'hidrogen), millorant el replegament o l'estabilitat de la proteïna mutada (Sawkar et al., 2002) i així permeten que aquesta arribi a l'aparell de Golgi i continuï la seva maduració, evitant la degradació per part del sistema del proteasoma, tal i com s'evidencia en la figura anterior.

Cal destacar el comportament paradoxal que tenen sobre l'enzim alterat, ja que a elevades concentracions actuen com a inhibidor competitiu de l'enzim i a concentracions inferiors al llindar d'inhibició actuen incrementant l'activitat enzimàtica del mateix enzim (Sawkar et al., 2002).

S'ha testat l'ús de xaperones farmacològiques en malalties genètiques originades per mutacions que donen lloc a proteïnes alterades, però amb una certa activitat residual, com és el cas de la fibrosi quística ($\Delta F508$) (Brown et al., 1996) i el de la deficiència d' α -antitripsina (p.E342K) (Fan, 2003). També s'ha descrit una millora farmacològica demostrada per a algunes malalties d'origen lisosòmic utilitzant cultius cel·lulars *in vitro* i models animals, com és el cas de les malalties que es detallen a continuació:

- Fabry (Asano et al., 2000; Fan et al., 1999; Frustaci et al., 2001).
- Gangliosidosi GM1 (Matsuda et al., 2003).
- Gangliosidosi GM2: Tay Sachs (Tropak et al., 2004).

En el cas concret de la malaltia de Gaucher s'han assajat l'efecte de l'iminosucre *N*-(*n*-nonil)-deoxinojirimicina (NN-DNJ) i altres anàlegs amb cadena alquílica de diferent llargada i s'ha evidenciat, a elevades concentracions, la inhibició de diferents enzims, entre ells la glucocerebrosidasa (Sawkar et al., 2002).

Sawkar i col. (2002) descriuen la funció que realitza la NN-DNJ, sobre les proteïnes produïes per l'al·lel salvatge i pel portador de la mutació N370S: l'enzim estabilitzat a pH neutre pot passar del reticle endoplasmàtic, on es produeix la glicosilació, fins a l'aparell de Golgi; d'aquesta manera es permet el transport de la proteïna fins al lisosoma, on realitza la seva funció. En darrer terme aquest efecte té com a conseqüència l'increment de l'activitat en l'al·lel salvatge i en l'al·lel portador de la mutació N370S. Aquest efecte no es produeix en el portador de la L444P (Sawkar et al., 2002).

Per altra banda, un altre iminosucre (*N*-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ)), aprovat al 2003 com a tractament terapèutic i conegut comercialment amb el nom de Miglustat (Zavesca[®]), utilitzat per a inhibir l'enzim glucosilceramida sintasa (GCS) responsable de la formació del substrat (glucosilceramida) que s'acumula en la malaltia de Gaucher, té capacitat d'actuar com a xaperona a baixa concentració sobre la GBA; el seu mecanisme d'acció es representa a la figura I.21.

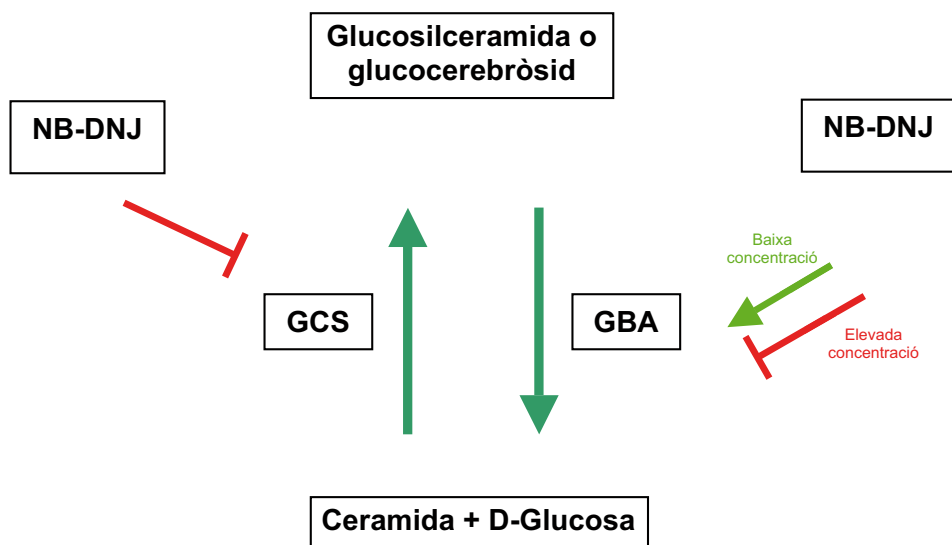


Figura I.21. El mecanisme d'acció de la NB-DNJ està representat aquí: a concentracions terapèutiques inhibeix la GCS, evitant l'acumulació dels glucocerebròsids als macròfags; a concentracions subinhibidores per a la GCS, actua sobre la GBA com a xaperona química.

A partir dels iminosucres NN-DNJ i NB-DNJ, diversos autors han sintetitzat derivats que tenen activitat sobre la mutació N370S (Chang et al., 2006; Steet et al., 2006) i també sobre altres mutacions que causen la malaltia de Gaucher (Lin et al., 2004; Sawkar et al., 2005; Yu et al., 2007). Per altra banda, altres inhibidors de la GBA no derivats dels glúcids (Zheng et al., 2007) i la isofagomina (Lieberman et al., 2007) també han estat testats sobre l'enzim mutat N370S en cèl·lules de pacients. En el cas de la isofagomina (tartrat d'isofagomina, AT2101), s'ha arribat a dur a terme un assaig clínic fase II. Posteriorment, l'assaig clínic fase III s'ha aturat (<http://ir.amicustherapeutics.com/Release-Detail.cfm?ReleaseID=413437>).

A més a més, un grup d'anàlegs de la quinazolina ha estat testat en fibroblasts de pacients (Marugan et al., 2011) amb resultats positius, evidenciats per canvis en l'acúmulo cel·lular de glucocerebròsid, mitjançant la immunofluorescència.

Cal mencionar que els nous compostos que s'han desenvolupat no són derivats d'iminosucres, poc selectius i estabilitzadors de l'estat intermig enzim-substrat, sinó que una gran varietat de possibles xaperones farmacològiques tenen capacitat inhibidora però han de ser reversibles, per tal que el substrat doni pas al producte.

En la taula I.4 es presenta un resum dels compostos testats fins ara i els efectes que produeixen sobre diferents GBAs mutades.

Taula I.4. Xaperones farmacològiques testades i els seus efectes.

COMPOST	CÈL·LULES	MUTACIONS	ACTIVITAT (COMPOST)	DIES	TIPUS	CONCENTRACIÓ (RANG)	AUTOR
NN-DNJ (A), NB-DNJ (B), N-octil-DNJ (C), N-7-oxadecil-DNJ (D), N-dodecil-DNJ (E)	Fibroblasts	WT N370S/N370S L444P/L444P	Augment amb A Augment amb A Disminució amb A	1-9	Intactes Lisades	5 µM (0-100 µM)	(Sawkar et al., 2002)
NB-DNJ	COS-7 estables	WT, V15M, 123T, S364R i N370S L444P i S465del P266L i L336P	Augment Sense efecte Disminució	6	Lisades	10 µM	(Alfonso et al., 2005)
IFG (A), N-dodecil deoxinojirimicin (B), calistegines A3, B1, B2 i C1 (C), 1,5-dideoxi-1,5-iminoxilitol (D)	Fibroblasts	N370S/N370S	Augment amb A	5	Lisades	50 µM (1-50 µM)	(Chang et al., 2006)
IFG	Fibroblasts	WT N370S/N370S	Augment Augment	5 3-5	Lisades	30 µM 30-100 µM	(Steet et al., 2006)

INTRODUCCIÓ

NOV (A), DGJ (B), NOEV (C)	Fibroblasts	F2131/F2131 i F2131/L444P N370S/84GG, L444P/RecNcil i L444P/L444P	Augment amb A Sense efectes amb A	4 (4-9)	Lisades	30 µM (20-100µM)	(Lin et al., 2004)
D-glucosilceramida (A), 8 derivats de la glucosa (B), 11 anàlegs del C-glicòsid (C), 7 anàlegs de la DNJ (D), 6 altres (E)	Fibroblasts	WT N370S/N370S G202R/G202R L444P/L444P	Augment amb D i E Augment amb D i E Augment amb D i E Sense efectes amb A-E	5	Intactes	10 nM–100 µM	(Sawkar et al., 2005)
3 anàlegs de la IFG (A), 2 anàlegs del 2,5-anhidro-2,5-imino- D-glucitol (B)		N370S/N370S G202R/G202R L444P/L444P	Augment amb A i B Augment amb A i B Sense efectes amb A i B	5	Intactes	0-150 µM	(Yu et al., 2007b)
NN-DNJ (A), NB-DNJ (B), anàlegs d'aminoquinolines (C), anàlegs de sulfonamides (D), anàlegs de triazines (E)		WT N370S/N370S	Augment amb A i C Augment amb A, C-E	2-3	Intactes	13,3 µM - 40µM	(Zheng et al., 2007)
IFG	Fibroblasts	N370S/N370S	Augment	5	Lisades	0-300 µM	(Lieberman et al., 2007)
Derivats de 1,5-Dideoxi-1,5-imino- D-xilitol (DIX)	Fibroblasts	N370S/N370S	Augment	4	Lisades	10 nm	(Compain et al., 2006)

INTRODUCCIÓ

2-O-hexyl-DIX (+)	Fibroblasts	N370S/N370S	Augment	4	Lisades	10 nm	(Oulaidi et al., 2011)
δ -lactams N-substituïts	Limfoblasts	N370S/N370S	Augment	3	Lisades	50 μ M	(Wang et al., 2009)
IFG	Limfoblasts	N370S/N370S	Augment	5	Lisades	0-60 μ M	(Khanna et al., 2010)
	Fibroblasts	L444P/L444P	Augment				
Alfa-1-C-octil-1-deoxinojirimicina	Fibroblasts	N370S/N370S L444P/L444P	Augment Sense efectes	4	Lisades	0-50 μ M	(Yu et al., 2006)
Diltiazem (A), Verapamil (B), IFG (C)	Fibroblasts	N370S/N370S L444P/L444P F2311/L444P	Augment amb A, B, C, A+C Augment amb A, C, A+C Augment amb A, C, A+C	7	Lisades	5-30 μ M	(Rigat and Mahuran, 2009)
Ambroxol	Fibroblasts	N370S/N370S L444P/L444P F2311/L444P	Disminució dels nivells de glucocerebròsid	10-15	Lisades	20 μ M	(Maegawa et al., 2009)
	Limfoblasts	WT N370S					
Anàlegs de quinazolina	Fibroblasts	WT N370S/N370S	Augment de la GBA localitzada al lisosoma	5	Immunofluorescència	1nm-25 μ M	(Marugan et al., 2011)

WT: Al·lel salvatge, IFG: Isofagomina, NOV: N-octil-beta-valienamina, DGJ: 1-deoxi-galactonojirimicina, NOEV: N-octil-h-epivalienamina

2. OBJECTIUS

Enmarcat en el grup d'estudi de malalties lisosòmiques del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, l'objectiu general del treball era desenvolupar una possible estratègia terapèutica per a la malaltia de Gaucher basada en l'ús de xaperones farmacològiques.

Els objectius concrets plantejats van ser:

1. L'expressió *in vitro*, mitjançant cèl·lules COS-7, de diversos al·lels mutats del gen *GBA* i la caracterització de les proteïnes *GBA* mutades.
2. Assajar l'efecte dels iminosucres (NN-DNJ i NB-DNJ), aminociclitols i dels seus derivats com a possibles xaperones farmacològiques sobre les proteïnes mutades, tant en cèl·lules COS-7 transfectades amb cDNAs mutats com en fibroblasts de pacients.

3. RESULTATS

3.1 Informe dels directors de tesi

Aquest és l'informe dels directors de tesi sobre la contribució de la doctorand a les publicacions d'aquesta tesi doctoral.

Títol de la Tesi: “Aproximació terapèutica per a la malaltia de Gaucher basada en xaperones”

Autor: Gessamí Sánchez Ollé

Directors: Dr. Daniel Grinberg Vaisman i Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

ARTICLE 1

Títol: *Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease*

Autors: Helen Michelakakis, Marina Moraitou, Evagelia Dimitriou, Raül Santamaria, Gessamí Sánchez, Laura Gort, Amparo Chabás, Daniel Grinberg, Maria Dassopoulou, Spyros Fotopoulos, Lluïsa Vilageliu.

Publicació: Journal of Inherited and Metabolic Diseases (2006) 29:591

Online citation: JIMD Short Report #011 (2006) Online.

Índexs de qualitat: IF 2009=3,598

Aportació de la doctorand a l'article: Participació en l'anàlisi de mutacions i en l'edició final.

ARTICLE 2

Títol: *Haplotype Analysis Suggests a Single Balkan Origin for the Gaucher Disease [D409H;H255Q] Double Mutant Allele*

Autors: Raül Santamaria, Helen Michelakakis, Marina Moraitou, Evangelia Dimitriou, Silvia Dominissini, Serena Grossi, Gessamí Sánchez-Ollé, Amparo Chabás, María Gabriela Pittis, Mirella Filocamo, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg

Publicació: HUMAN MUTATION Mutation in Brief #1010, 29:E58-E67, 2008

Índexs de qualitat: IF 2009=6,887

Aportació de la doctorand a l'article: Clonació i mutagènesi dirigida. Transfecció en cèl·lules COS-7. Mesura de l'activitat de cèl·lules COS-7. Participació en l'edició final.

ARTICLE 3

Títol: *Promising results of the chaperone effect caused by imino sugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease.*

Autors: Gessamí Sánchez-Ollé, Joana Duque, Meritxell Egido-Gabás, Josefina Casas, Montserrat Lluch, Amparo Chabás, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu

Publicació: Blood Cells, Molecules, and Diseases 42 (2009) 159–166

Índexs de qualitat: IF 2009=2,901

Aportació de la doctorand a l'article: Clonació i mutagènesi dirigida. Cultiu de cèl·lules COS-7. Transfecció en cèl·lules COS-7. Tractament de les cèl·lules COS-7 amb els productes (NB-DNJ, NN-DNJ, aminociclitols 1-4). Mesura de l'activitat de cèl·lules COS-7. Anàlisi estadística i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

ARTICLE 4

Títol: *Chaperone effects caused by new aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease.*

Autors: Lucía Díaz, Gessamí Sánchez-Ollé, Josefina Casas, Daniel Grinberg, Antonio Delgado and Lluïsa Vilageliu

Publicació: Manuscrit en preparació

Aportació de la doctorand a l'article: Cultiu de fibroblasts de pacients. Mesura de l'activitat GBA en fibroblasts de pacients i del nombre de cèl·lules. Tractament dels fibroblasts amb els productes (NB-DNJ, NN-DNJ, IFG, aminociclitols 1-6). Anàlisi estadística i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Barcelona, 8 de juny de 2011

Signat pels directors

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

3.2 Publicacions

3.2.1 Capítol 1: Expressió i origen de l'al·lel D409H;H255Q

3.2.1.1 Article Michelakakis i col·laboradors 2006.

RESUM:

L'homozigositat per a l'al·lel D409H ha estat associada amb un subtipus especial del tipus 3 de la malaltia que presenta un fenotip dominat per una greu implicació cardiovascular, mentre que els símptomes neurològics, si hi son presents, estan restringits a l'apràxia oculomotora i la hepatoesplenomegàlia és mínima o absent. Utilitzant l'amplificació per PCR i l'anàlisi per enzims de restricció, es va identificar el genotip de 3 pacients (1 d'origen grec, 2 d'origen albanès) com a D409H/D409H. Tots compartien un fenotip molt sever de manifestació primerenca, que els classificava com a tipus 2. L'amplificació i la seqüenciació de tota la regió codificant del gen *GBA* va revelar que tots tres pacients eren homozigots, no només per a la mutació D409H, sinó també per a la H255Q. Ambdues mutacions estaven presents en el mateix al·lel, com es va demostrar per l'anàlisi de l'ADN dels progenitors. L'al·lel doble D409H+H255Q va ser trobat en heterozigositat en pacients grecs, búlgars i argentins, però no va ser identificat en cap pacient espanyol portador de la mutació D409H.

Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease

Helen Michelakakis · Marina Moraitou ·
Evagelia Dimitriou · Raul Santamaria ·
Gessami Sanchez · Laura Gort · Amparo Chabas ·
Daniel Grinberg · Maria Dassopoulou ·
Spyros Fotopoulos · Lluisa Vilageliu

Received: 21 December 2005 / Accepted: 2 May 2006
© SSIEM and Springer 2006

Summary Homozygosity for D409H has been associated with a unique type III subtype of the disease with a phenotype dominated by severe cardiovascular involvement, whereas neurological findings, if present, are restricted to oculomotor apraxia and features such as visceromegaly are either minimal or absent. Using PCR amplification followed by restriction enzyme analysis, 3 patients (1 Greek, 2 Albanians) were identified with the D409H/D409H genotype. All shared a very severe early-onset neurological phenotype that classified them as type II. Amplification and sequencing of the full coding region of the *GBA* gene revealed that all three patients were homozygous not only for D409H but also for H255Q. Both mutations were present on the same allele, as shown by analysis of the parental DNA. The double D409H+H255Q allele was found in heterozygosity in Greek, Bulgarian and

Argentinian patients but was not identified in any Spanish patients carrying the D409H mutation.

Abbreviations

ER endoplasmic reticulum
PCR polymerase chain reaction
PARC pulmonary and activation regulated CC chemokine

Homozygosity for D409H has been associated with the IIIc subtype of Gaucher disease (McKusick 230900006). Its phenotype is dominated by severe cardiovascular involvement (Beutler and Grabowski 2001), whereas neurological findings, if present, are restricted to oculomotor apraxia and visceromegaly is either minimal or absent. D409H is the second most frequent mutation in Greek Gaucher disease patients, accounting for 17.5% of the identified mutated alleles. Using PCR amplification and restriction analysis, three patients with the D409H/D409H genotype were identified. All shared a very severe early-onset phenotype that differentiated them from the patients described previously (Table 1). A full description of patient A (Greek origin) has been reported (Michelakakis et al 2002). Patient B (Albanian origin) presented at birth with hepatosplenomegaly and petechial rash. By the time of death, 2 months later, severe opisthotonus and spasticity without oculomotor apraxia were evident, liver and spleen size had increased and ascites developed. Patient C (Albanian origin) was hospitalized on the 28th day of life owing to acute respiratory distress. Hepatosplenomegaly, marked hypertonia and opisthotonus were noted. The patient's condition deteriorated rapidly and she died at 5 months of age. Laboratory findings in patients B and C included thrombocytopenia and increased transaminases, bilirubin, PARC levels and chitotriosidase activity. Foam cells were present in bone marrow aspiration. β -Glucosidase

Communicating editor: Irene Maire

Competing interests: None declared

Reference to electronic base: OMIM 230900006

H. Michelakakis (✉) · M. Moraitou · E. Dimitriou
Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of
Child Health, Athens, Greece
e-mail: inchildh@otenet.gr

R. Santamaria · G. Sanchez · D. Grinberg · L. Vilageliu
Department de Genetica, Facultat de Biologia, Universitat de
Barcelona, Spain

L. Gort · A. Chabas · S. Fotopoulos
Institut de Bioquímica Clínica, Corporació Sanitària Clínic,
Barcelona, Spain

M. Dassopoulou
NICU, "Alexandra" Hospital Athens, and "Ag. Sophia" Children's
Hospital, Athens, Greece

Table 1 Brief clinical description of our patients and the phenotype associated with type IIIc Gaucher disease

	Patient A	Patient B	Patient C	Type IIIc
Onset	3 months	birth	birth	2–20 years
Hepatosplenomegaly	+++	+++	+++	+
Neurological involvement	Oculomotor apraxia, sucking and swallowing difficulties, hypertonia, generalized tonic-clonic convulsions	Severe opisthotonus, spasticity	Sucking and swallowing difficulties, opisthotonus, hypertonia of the limbs	Oculomotor apraxia
Cardiac involvement	Increased ventricular septal thickness, trivial insufficiency of the aortic valve	–	–	Progressive thickening and calcification of mitral and aortic valves
Corneal opacities	+	–	–	+
Age of death	15 months (received ERT for 3 months)	2 months	5 months	>20 years

ERT, enzyme replacement therapy

(EC 3.2.1.45) activity in white blood cells of the patients was 2.1–3.7% of the mean normal value.

Sequencing of the full coding region of the *GBA* gene revealed that the three patients were in fact homozygous not only for the D409H but also for the H255Q mutation. Investigation of the parental DNA showed both mutations to be in the same allele.

This prompted us to reanalyse the patients bearing the D409H mutation for the presence of the H255Q change, including Greek ($n = 6$), Spanish ($n = 7$), Bulgarian ($n = 3$) and Argentinian ($n = 4$) patients. The double D409H+H255Q allele was found to be present in heterozygosity in all the Greek (four type I, two type II), all the Bulgarian and two of the Argentinian patients tested. However, the mutation was not identified in any Spanish patients (two homozygous and five heterozygous for the D409H mutations) or in two Argentinian patients (heterozygous for D409H). The H255Q mutation was not found in 100 control individuals of Greek (50) and Spanish (50) origin. The high frequency of the double allele in the Balkans is intriguing and haplotype analysis is underway.

H255Q was first described in a type II Gaucher disease patient of Greek descent in heterozygosity with the severe RecTL (Stone et al 2000). So far, this is the only patient in whom H255Q was found alone and not with D409H. While our study was in progress, homozygosity for D409H and H255Q was reported in a patient of Albanian origin, described as an atypical Gaucher patient, intermediate between type II and type III (Filocamo et al 2005).

Phenotype–genotype correlation has been an issue since the discovery of the responsible gene and disease causing-mutations in Gaucher disease. Although by now some

conclusions can be drawn, there are several patients who cannot be classified in the classic three types of the disorder, and often patients bearing the same genotype exhibit clear differences in their phenotypes.

Genotyping relying solely on PCR methodologies can be a source of such discrepancies (Tayebi et al 2003). In our patients, sequencing of the whole *GBA* gene revealed that they were actually homozygous for the complex allele D409H+H255Q, thus explaining the discordance between their phenotype and that of type IIIc.

On the other hand, our patients had a more severe phenotype than that of the patient described earlier (Filocamo et al 2005). It has been suggested that such differences could result from specific genetic modifiers such as loci affecting chaperone binding, protein folding and intracellular trafficking (Goker-Alpan et al 2005). In that context, it is of interest that recent data strongly suggest that the degree of ER retention and proteosomal degradation of mutant glucocerebrosidase variants is one of the factors that determine the severity of Gaucher disease (Ron and Horowitz 2005). Such an effect remains to be established in our patients.

Acknowledgements We are grateful to the Laboratorio de Neuroquímica “Dr N. A. Chamoles” Buenos Aires, Argentina, and to Professor I. Kremensky and Dr E. Michayolova, Laboratory of Molecular Pathology, Medical University, Sofia, Bulgaria. Research in the laboratories of Barcelona was partially funded by CICYT (SAF 2003–00386).

References

Beutler E, Grabowski GA (2001) Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzel KW,

- Volgestein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, **3**: 3635–3668.
- Filocamo M, Grossi S, Stroppiano M, et al (2005) Homozygosity for a non-pseudogene complex glucocerebrosidase allele as cause of an atypical neuronopathic form of Gaucher disease. *Am J Med Genet* **134A**: 95–96.
- Goker-Alpan O, Hruska KS, Orvisky E, et al (2005) Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. *J Med Genet* **42**: e27.
- Michelakakis H, Skardoutsou A, Mathioudakis J, et al (2002) Early onset severe neurological involvement and D409H homozygosity in Gaucher disease. Outcome of enzyme replacement therapy. *Blood Cells Mol Dis* **28**: 1–4.
- Ron I, Horowitz M (2005) ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum Mol Genet* **14**: 2387–2398.
- Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sindransky E (2000) Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat* **15**: 181–188.
- Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, et al (2003) Reciprocal and non-reciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implication for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* **75**: 519–534.

3.2.1.2 Article Santamaria i col·laboradors 2008.

RESUM:

La malaltia de Gaucher és una malaltia d'acumulació lisosòmica autosòmica recessiva, deguda principalment a mutacions en el gen *GBA*. La majoria d'al·lels mutats descrits porten una única mutació. No obstant, hi ha alguns al·lels que en porten dues o més. S'ha descrit que pacients homozigots per a l'al·lel doble mutant [D409H;H255Q] (nomenclatura aprovada per HGVS, p.[D448H;H294Q]) presenten un fenotip més greu que els pacients homozigots per a la mutació D409H, relativament freqüent. En aquest treball, hem confirmat l'efecte negatiu acumulatiu d'aquestes dues mutacions a nivell d'activitat enzimàtica, gràcies a l'expressió heteròloga dels al·lels únics i doble mutant. A més a més, hem trobat una elevada freqüència de l'al·lel [D409H;H255Q] en pacients dels Balcans i de la zona adriàtica d'Itàlia. Això va portar-nos a analitzar els haplotips, utilitzant cinc polimorfismes del tipus microsatèl·lit propers al gen *GBA*, per a determinar l'origen d'aquest al·lel. El resultat dels 37 cromosomes analitzats mostra que la majoria comparteixen un haplotip comú i això és consistent amb un únic origen als Balcans i a la zona adriàtica d'Itàlia per a l'al·lel [D409H;H255Q].

MUTATION IN BRIEF

Haplotype Analysis Suggests a Single Balkan Origin for the Gaucher Disease [D409H;H255Q] Double Mutant Allele

Raül Santamaria,^{1,2,3#} Helen Michelakakis,^{4#} Marina Moraitou,⁴ Evangelia Dimitriou,⁴ Silvia Dominissini,⁵ Serena Grossi,⁶ Gessamí Sánchez-Ollé,^{1,2,3} Amparo Chabás,^{7,2} María Gabriela Pittis,^{5ξ} Mirella Filocamo,⁶ Lluïsa Vilageliu^{1,2,3} and Daniel Grinberg^{1,2,3*}

¹ *Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;* ² *CIBERER, Barcelona, Spain;* ³ *IBUB, Barcelona, Spain;* ⁴ *Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of Child Health, Athens, Greece;* ⁵ *Unità Malattie Metaboliche, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy;* ⁶ *Laboratorio Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche, IRCCS G. Gaslini, Genoa, Italy;* ⁷ *Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.*

[#]These authors contributed equally to this work. ^ξ Present address: Shire HGT Latin America, Buenos Aires, Argentina.

*Correspondence to Daniel Grinberg, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: dgrinberg@ub.edu.

Contract grant sponsor: Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, Spanish FIS and Catalan AGAUR; Contract grant number: SAF2006-12276, PI042350 and 2005SGR00848.

Communicated by Elizabeth F. Neufeld

Gaucher disease is an autosomal recessive lysosomal storage disease that is mainly due to mutations in the *GBA* gene. Most of the mutant alleles described so far bear a single mutation. However, there are a few alleles bearing two or more DNA changes. It has been reported that patients homozygous for the [D409H;H255Q] double mutant allele (HGVS-approved nomenclature, p.[D448H;H294Q]) present a more severe phenotype than patients homozygous for the relatively common D409H mutation. In this study, we confirmed the detrimental cumulative effect of these two mutations at the enzymatic activity level by the heterologous expression of the single and double mutant alleles. Additionally, we found a high frequency of the [D409H;H255Q] allele in patients from the Balkans and the Adriatic area of Italy. This prompted us to perform a haplotype analysis, using five microsatellite polymorphisms close to the *GBA* gene, to determine the origin of this allele. The results of the 37 chromosomes analysed showed that most of them share a common haplotype and are consistent with a single origin in the Balkans and the Adriatic area of Italy for the [D409H;H255Q] allele. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Gaucher disease; *GBA*; haplotype analysis; expression studies

INTRODUCTION

Gaucher disease (GD), an autosomal recessive disorder, is mainly due to mutations in the glucocerebrosidase gene (*GBA*; MIM# 606463; GenBank accession no. J03059.1) encoding the lysosomal enzyme acid β -glucosidase

Received 3 December 2007; accepted revised manuscript 31 January 2008.

(D-glucosyl acylsphingosine glucohydrolase, EC 3.2.1.45). The disease has classically been divided into three types on the basis of clinical symptoms and neurological involvement: type I (non-neuronopathic; MIM# 230800), type II (acute neuronopathic, MIM# 230900) and type III (subacute neuronopathic, MIM# 231000), although there is growing evidence that it would be more correctly characterized as a continuum of phenotypes [Sidransky, 2004]. For a review on Gaucher disease see Beutler and Grabowski [Beutler and Grabowski, 2001].

To date, more than 200 mutations have been identified in the GBA gene [Stenson et al., 2003; Beutler et al., 2005] (see also: <http://www.hgmd.org>). Some genotype-phenotype correlations have been established, such as the presence of mutation c.1226A>G (N370S), either in homozygosity or heterozygosity, with type 1, non-neuronopathic disease; or that of the allele c.1448T>C (L444P), in the absence of a mild mutation, in the neuronopathic forms of the disease [Theophilus et al., 1989]. The [D409H]+[D409H] genotype has been associated with a special type 3 phenotype that presents severe cardiac involvement and oculomotor apraxia [Abrahamov et al., 1995; Chabás et al., 1995].

Most of the GBA mutant alleles bear a single DNA change. However, there is an increasing number of cases in which a known disease-causing mutation can also occur as part of a double mutant allele. In general, one of them is a known disease-causing mutation and is also found alone; while the other is not normally found as the single change in a mutant allele. Although the latter could be considered a neutral polymorphism, it has been shown that its presence as a second in cis variation on a mutant allele can have a cumulative detrimental effect on the mutant protein [Montfort et al., 2004; Chabas et al., 2005; Ron et al., 2005]. A typical example of this type of mutant is E326K. The E326K change can be present, as an isolated variation, in healthy individuals [Park et al., 2002]. However, it can also coexist in cis with L444P, N188S or D140H in GD patients. The double mutant allele [L444P;E326K] was found to further decrease enzyme activity and to be associated with a more severe phenotype than that expected from the single L444P allele [Chabás et al., 2005]. In the case of the double mutant [E326K;D140H], Ron et al. [2005] found an activity of 30% of that of the wild type enzyme both for E326K alone and for the double mutant, but a high activity (70-80% of wild-type) for D140H, suggesting that E326K was the pathogenic mutation.

In this study we present the characterization of another double mutant allele, in which D409H coexists in cis with the H255Q [D409H;H255Q] (HGVS-approved nomenclature, p.[D448H;H294Q]). Homozygosity for this double mutant allele has been associated with a phenotype that is more severe than that expected from the homozygosity for D409H [Filocamo et al., 2005; Michelakakis et al., 2006]. We now report a series of thirty-two unrelated patients, who are homozygous for [D409H;H255Q] or compound heterozygous for this double mutant allele in combination with known or new mutations. We performed haplotype analyses on thirty-seven [D409H;H255Q] alleles from these patients. Most of them were from the Balkans, including Albania, Bulgaria, Greece and Serbia, and from the Adriatic area of Italy. The results suggest that this double mutant allele has a single origin.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The patients were diagnosed at the Institute of Child Health, Athens, Greece; the Laboratory of Molecular Pathology, Medical University, Sofia, Bulgaria; “Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche” Laboratory, Genova, Italy; “Unità di Malattie Metaboliche”, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy; and the “Laboratorio Dr. N. A. Chamoles”, Buenos Aires, Argentina. Their origin, clinical type and age of onset are listed in Table 1. Patients that have been described previously are indicated. The control group consisted of DNA samples from unrelated healthy subjects. Following ethical and legal rules, samples were collected after obtaining written informed consent.

Mutation Detection

For the samples of patients who have not been described previously, the whole coding region of the *GBA* gene, and the intronic flanking sequences were PCR-amplified and sequenced. New mutations were confirmed by restriction analysis and were not found in 50 Spanish and 50 Greek healthy individuals.

TABLE 1. GBA Genotype, origin and clinical features of patients bearing the [D409H;H255Q] allele

Patient	Genotype*	Origin	Clinical features	
			Type	Age of onset
1 ^a	[D409H;H255Q]+[D409H;H255Q]	Evia (Greece)	II	3m
2 ^a	[D409H;H255Q]+[D409H;H255Q]	Albania	II	birth
3 ^a	[D409H;H255Q]+[D409H;H255Q]	Albania/Iperus (Greece)	II	birth
4	[D409H;H255Q]+[D409H;H255Q]	Albania	II	birth
5 ^b	[D409H;H255Q]+[D409H;H255Q]	Albania	II/III	5m
6	[D409H;H255Q]+[N370S]	Minor Asia/East Thrace	I	?
7	[D409H;H255Q]+[N370S]	Athens (Greece)	I	?
8	[D409H;H255Q]+[N370S]	Northern Greece	I	69 y
9	[D409H;H255Q]+[N370S]	Greece	I	?
10	[D409H;H255Q]+[N370S]	Athens (Greece)	I	?
11	[D409H;H255Q]+[N370S]	Central Greece	I	?
12	[D409H;H255Q]+[N370S]	Albania	I	3.5 y
13	[D409H;H255Q]+[L444P]	Lesvos (Greece)	III	2 y
14	[D409H;H255Q]+[N370S]	Albania	I	23y
15	[D409H;H255Q]+[N370S]	Evia (Greece)	I	birth
16	[D409H;H255Q]+[R120W]	Athens (Greece)	II	birth
17	[D409H;H255Q]+[N370S]	Iperus (Greece)	I	?
18	[D409H;H255Q]+[Y108C]	Black sea area	III	?
19	[D409H;H255Q]+[N370S]	Bulgaria (Turkish origin)	I	?
20	[D409H;H255Q]+[L444P]	Bulgaria (Turkish origin)	III	?
21	[D409H;H255Q]+[c.1279_1281del]	Bulgaria	II	?
22	[D409H;H255Q]+[N370S]	Puglia (Italy)	I	38 y
23	[D409H;H255Q]+[G46E]	Puglia (Italy)	I	4 y
24	[D409H;H255Q]+[F213I]	Albania	III	5 y
25	[D409H;H255Q]+[N370S]	Albania	I	?
26	[D409H;H255Q]+[N370S]	Abruzzo (Italy)	I	?
27	[D409H;H255Q]+[N370S]	Albania-Kosovo	I	7 y
28	[D409H;H255Q]+[N370S]	Emilia Romagna (Italy)	I	12 y
29	[D409H;H255Q]+[N370S]	Puglia (Italy)	I	?
30	[D409H;H255Q]+[L444P]	Serbia	III	18 m
31 ^c	[D409H;H255Q]+[F411I]	Argentinean	I	1 y
32	[D409H;H255Q]+[D380Y]	Argentinean ^d	II	4 m

^a Described in Michelakakis et al. [2006]; ^b Described in Filocamo et al. [2005]; ^c Described in Cormand et al. [1998] (as D409H/F411I);

^d The mother (bearing allele [D409H;H255Q]) has an Italian surname; m:months; y:years .

*After the traditional GBA protein mutation numbering. See Table 2 for approved systematic nomenclature.

Mutation Nomenclature

Mutations at the protein level are described following the traditional nomenclature within the Gaucher field, which considers amino acid 1 the first amino acid after the signal peptide. To convert this nomenclature into the one that follows the recommendation by den Dunnen and Antonarakis [2001] and the HGVS (www.hgvs.org/mutnomen/), i.e. considering the first ATG as codon 1, 39 amino acids should be added. Table 2 shows the cDNA nomenclature, which reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the first ATG translation initiation codon in the reference cDNA sequence (M16328.1), together with the two protein-based nomenclatures, the one used by the GD community and the systematic one, following the HGVS recommendation. Note that for the double mutant alleles, only the single mutations are included, except for the [D409H;H255Q] allele, the main topic of the present study.

Site-directed Mutagenesis

The H255Q and D409H mutations were introduced in the wild type full length cDNA GBA, cloned in pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), by site-directed mutagenesis using the Quikchange Site-Directed Mutagenesis

Kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. The primers used for the H255Q mutation were 5'-GGCTTCACCCCTGAACAGCAGCGA-3' (sense) and 5'-GAAGTCTCGCTGCTGTTTCAGGGGTGAAGCC-3' (antisense). The primers used for the D409H mutation were 5'-GTCCCATCATTGTAGACATCACCAAGCACACGTTTT-3' (sense) and 5'-GTAAAACGTGTGCTTGGTGATGTCTACAATGATGGG-3' (antisense). The double mutant was obtained using pcDNA3-H255Q as the template. Each clone was entirely sequenced to confirm that no other mutations were introduced by the PCR-based mutagenesis procedure.

TABLE 2. GBA Mutation Nomenclature

cDNA ^a	Protein (traditional in GD ^b)	Protein (as recommended by HGVS ^c)
c.254G>A	G46E	p.G85E
c.440A>G	Y108C	p.Y147C
c.475C>T	R120W	p.R159W
c.535G>C	D140H	p.D179H
c.680A>G	N188S	p.N227S
c.754T>A	F213I	p.F252I
c.882T>G	H255Q	p.H294Q
c.1093G>A	E326K	p.E365K
c.1226A>G	N370S	p.N409S
c.1255G>T	D380Y	p.D419Y
c.1279_1281del	E388del	p.E427del
c.1342G>C	D409H	p.D448H
c.1348T>A	F411I	p.F450I
c.1448T>C	L444P	p.L483P
c.1483G>C	A456P	p.A495P
c.1497G>C	V460V	p.V499V
[c.1342G>C;c.882T>G]	[D409H;H255Q]	[p.D448H; p.H294Q]

^a Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the first ATG translation initiation codon in the reference cDNA sequence (M16328.1).

^b Traditional codon numbering begins 39 codons downstream from the first ATG.

^c HGVS-recommended nomenclature numbers codons beginning with the first ATG as codon 1.

Cell Culture and Transient Transfection

COS-1 cells were grown on monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum, 2mM L-glutamine and 50 mg/ml penicillin/streptomycin (Gibco, Paisley, UK) and transfected with the wild type and mutant constructs using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Each construct was transfected in triplicate for three independent experiments, using different DNA preparations. Cells were harvested after 48 h and assayed for acid β -glucosidase activity and Western blot.

Enzyme Activity Assay

Acid β -glucosidase activity was measured using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (Sigma, St. Louis, MO, USA) in the presence of sodium deoxytaurocholate [Raghavan et al., 1980]. The protein concentration of the samples was determined by the Lowry method.

Western Immunoblot Analysis

Lysates from COS-1 transfected cells (10 μ g of protein/lane) were resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred onto a nitrocellulose membrane (Biorad, Hercules, CA, USA). Blotted membranes were probed with a purified IgG fraction against acid β -glucosidase, as previously described [Miocic et al., 2005]. An anti-rabbit HRP conjugated antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) was used as a second antibody. Development was performed by enhanced chemiluminescence (ECL Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Haplotype Analysis

Previously described microsatellites (5GC3.2, ITG6.2, D1S2777, D1S1595, D1S2721) were used to establish haplotypes in the [D409H;H255Q] alleles. Briefly, microsatellites were PCR-amplified with the primers and conditions described elsewhere [Rodriguez Mari et al., 2001]. Forward primers were fluorescently labelled. In particular, ITG6.2 and 5GC3.2 were labelled with FAM; D1S2777 with PET; D1S1595 with VIC; and D1S2721 with NED. Genotyping was performed in an ABI PRISM 3710 analyzer from Applied Biosystems. Different dilutions of the PCR products were mixed with 12 μ l of formamide and 0.1 μ l of the Genescan- 500 LIZ Size Standard. Data were analyzed with ABI PRISM Genemapper v3.0 software.

RESULTS

Mutation Analysis

The genotypes of all the patients are presented in Table 1. They all bear the double mutant allele [D409H;H255Q]. Five of them were homozygous for this allele, whereas the rest of the twenty-seven cases were compound heterozygous for double mutant allele and known mutations (N370S, L444P, G46E, R120W, F213I and F411I) or new mutations (Y108C, c.1279_1281del and D380Y). The new missense mutations were due to an A>G transition at position c.440 and a G>T transversion at position c.1255, which led to the substitution of tyrosine to cysteine at codon 108 (Y108C) and of aspartic acid to tyrosine at codon 380 (D380Y) respectively. The three base-pair deletion c.1279_1281del resulted in the loss of a glutamic acid residue at position 388.

Genotype-Phenotype Correlations

The homozygous [H255Q;D409H] patients showed a phenotype that was more severe than that of D409H homozygotes. Four of them were type II patients [Michelakakis et al., 2006], while the other was already reported as presenting an intermediate phenotype II/III [Filocamo et al., 2005]. This patient recently died at the age of 3 years. In the cases of compound heterozygosity, the clinical type is in agreement with the severity associated with the other (non-[H255Q;D409H]) allele. As expected, all carriers of a N370S allele are type I patients. In addition, all those bearing the L444P allele are type III patients. For the new mutations, the phenotypes of the patients suggest that Y108C can be associated with type III while c.1279_1281del and D380Y with type II.

Expression Studies

The possible deleterious effect of H255Q and D409H on the enzyme function was evaluated by *in vitro* expression. Wild type *GBA* cDNA, as well as single and double mutant constructs, were transiently transfected in COS-1 cells. To determine endogenous activity, COS-1 cells were mock-transfected with pCDNA3-ALDP (adrenoleukodystrophy protein), a peroxisomal transmembrane protein that is not correlated with Gaucher disease. As shown in Figure 1A, transfection of wild type cDNA *GBA* resulted in about a 10-fold increase of acid β -glucosidase activity (204.6 ± 15.8 nmol/mg/h) compared to baseline levels (22.2 ± 7.7 nmol/mg/h). Constructs bearing the single H255Q or D409H retained significant residual activity of 56.4 and 32.2 % of the wild type value respectively. In contrast, the mutant allele carrying both mutations *in cis* abrogated enzyme activity. Similar results were obtained using COS-7 cells (not shown).

Western blot analysis revealed a similar pattern of bands in the wild type and the mutant proteins. The antibody used recognized a multi-band pattern corresponding to differently glycosylated forms of the acid β -glucosidase with a predominant band of 56 kDa (Fig. 1B), suggesting that the concomitant presence of both H255Q and D409H mutations interferes with catalytic activity rather than protein stability.

Haplotype Analysis

Haplotype analysis was performed using five microsatellite polymorphisms close to the *GBA* gene (Fig. 2A). As shown in Figure 2B, 11 out of the 37 alleles bore the same haplotype: ITG6.2-322, 5GC3.2-222, D1S2777-1, D1S1595-8, D1S2721-8. Moreover, 14 other alleles, for which the phases could not be completely established, bore haplotypes that were consistent with the common one mentioned above. Thus, the conserved haplotype could be present in 25/37 chromosomes (68%). Nine of the remaining alleles bore haplotypes (or are consistent with a haplotype) that have only one change (at the D1S1595 marker) with respect to the common haplotype. Finally, the haplotypes of the last three alleles also have a single change, in the farthest marker D1S2721.

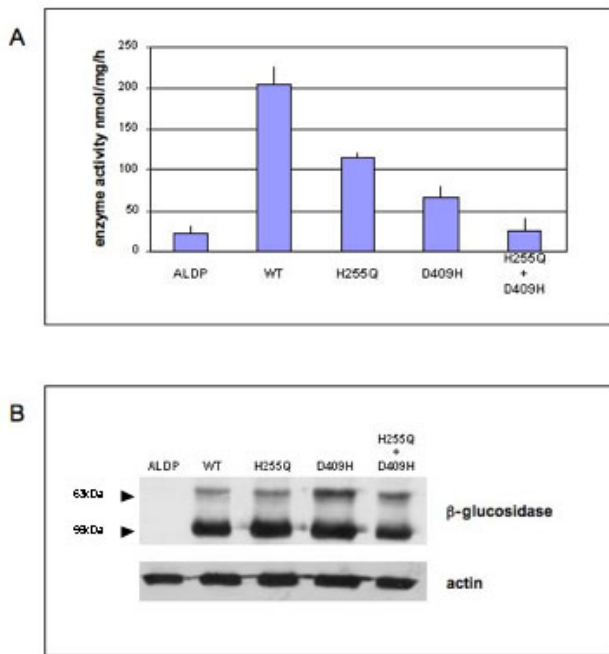
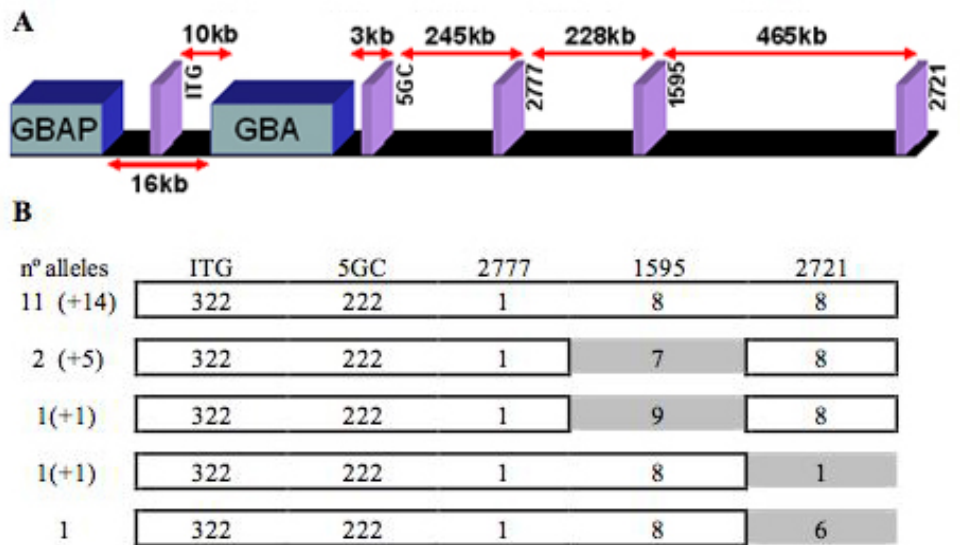


Figure 1. A: acid β -glucosidase activity in COS-1 cells transiently transfected with the wild type and mutant constructs, measured using the fluorogenic substrate 4-MU-D-glucopyranoside. A construct containing the cDNA for the adrenoleukodystrophy protein was used as a negative control. **B:** Western blot analysis of COS-1 cells transiently transfected with wild type pCDNA3-GBA and the mutant constructs.

Figure 2. A: Location of the polymorphic markers ITG6.2 (ITG), 5GC3.2 (5GC), D1S2777, D1S1595, and D1S2721, in relation to the glucocerebrosidase gene (*GBA*) and pseudogene (*GBAP*). **B:** Haplotype analysis for markers shown in *A* in chromosomes bearing the double mutant allele. The number of alleles bearing each haplotype and those consistent with it (in brackets) are indicated. The conserved parts of the haplotypes are boxed.



DISCUSSION

In this study we present the mutation characterization and the haplotype analyses performed on a large group of Gaucher disease patients who are homozygous or compound heterozygous for the double mutant allele [D409H;H255Q]. The D409H change has frequently been reported as an isolated point mutation, and its presence in homozygous status has been associated with a less severe phenotype than that observed in the four previously reported patients homozygous for the double mutant [D409H;H255Q] [Filocamo et al., 2005; Michelakakis et al., 2006].

Stone et al. [2000] reported a type II patient who was compound heterozygous for the H255Q allele in association with a recombinant allele (RecC). According to these authors, the RecC allele resulting from a crossover at the 3' end of exon 9, contained the following changes: D409H, L444P, A456P, and V460V. This allele is generally known as RecTL, as described by Eyal et al. [1990]. However, there is another more frequent recombinant allele, Rec*Nci*I, which contains the last three changes, but not D409H. No phases were described in the paper by Stone et al. Therefore, it might be assumed that the genotype was [D409H;H255Q]+[Rec*Nci*I] instead of [H255Q]+[RecC]. If that were the case, the H255Q mutation would never have been present as an isolated change in a GD mutant allele.

In vitro expression studies were carried out in order to evaluate the functional consequence on enzyme activity of the two mutations D409H and H255Q, both singly and in combination on the double mutant allele. The results showed that the concomitant presence *in cis* of H255Q and D409H mutations practically abrogated enzyme activity (see Fig. 1). Hence, similarly to previous reports for the E326K allele [Montfort et al., 2004], H255Q, when present in a double mutant allele, seemed to have a cumulative effect leading to a worsening of the associated phenotype.

Genotype-phenotype correlation studies, as summarized in Table 1, confirmed the detrimental effect of this double mutant allele [D409H;H255Q], as a severe GD form was found in the homozygous patients (#1,2,3,4,5). The phenotype of the remaining twenty-seven patients, who were compound heterozygotes, depended on the severity grade of the other allele. Accordingly, all seventeen carriers of N370S were type I GD patients while those bearing the L444P mutation (patients #13, 20 and 30) were type III. In four cases, the other allele bore a previously described, uncommon, GD-causing mutation. A type II patient (#16) carried the R120W mutation, which was previously described as a neuronopathic mutation [Beutler et al., 1996]. The G46E mutation was present in a type I patient (#23), which is consistent with its description as a non-neuronopathic mutation [Kim et al., 1996]. The data describing the F213I mutation in patients with neurological involvement [Kawame and Eto, 1991] are consistent with the type III phenotype of the patient (#24) reported here. Finally, the F411I mutation was first described in combination with the D409H allele [Cormand et al., 1998] in the same type I patient (#31), whose genotype we redefined in the present study as [D409H;H255Q]+[F411I]. Additionally, to confirm the observed phenotypic correlation, mutation F411I has recently been found in several other Latin American type I GD patients (Santamaria et al., in prep.).

The novel mutations, Y108C, D380Y and E388del (c.1279_1281del) were found associated with neurological phenotypes. E388del leads to the deletion of a glutamic acid residue, while Y108C and D380Y are non-conservative mutations resulting in chemical-physical property changes including charge, mass and side chain type. In particular, Y108C was found in a classical type III patient (#18), and E388del and D380Y were found in two type II patients (#21 and #32 respectively).

The results of the haplotype analysis on the 37 [H255Q;D409H] alleles strongly suggest that this double mutant allele has a single origin. Most of the alleles (25/37) were associated (or could be associated) with the [ITG6.2-322, 5GC3.2-222, D1S2777-1, D1S1595-8, D1S2721-8] haplotype. Nine of them present (or are consistent with) a single change in the haplotype, in the D1S1595 marker. They carried either alleles 7 or 9, instead of allele 8. As these alleles are consecutive in size, the change implies the deletion or the insertion of just one repeat. This could be caused by the polymerase slippage. Thus, the haplotype would still be consistent with the single origin hypothesis. Finally, in the remaining three cases, the change occurred in the farthest marker D1S2721, located at 941 kb from the *GBA* gene. In this case, the alleles differed from the common allele (8) in several repeats. The

distance between gene and marker makes a recombination (the probability of which is close to 1%) the most probable cause of the change from the conserved haplotype.

The origin of these patients has been successfully traced in nearly all cases. The map in Figure 3 shows the approximate location of the patients' origin, or that of the parent bearing the double mutant allele. It is clear that all the locations are circumscribed to a relatively small part of Europe around Albania, including the Balkans and the Adriatic area of Italy. The origin of the parents of the two Argentinean patients (#31 and 32) remains unknown. However, the mother of patient #32, who bears the double mutant allele, has an Italian surname. Therefore, this allele could have originated in the same Adriatic area of Italy. Although we do not have any details about the mother (the double allele carrier) of the remaining Argentinean patient (#31), a possible common origin might be hypothesized, based on the large number of Italian and Greek immigrants who arrived in Argentina in the 19th and 20th century. Interestingly, the aforementioned case reported by Stone et al. [2000] was a Greek patient.

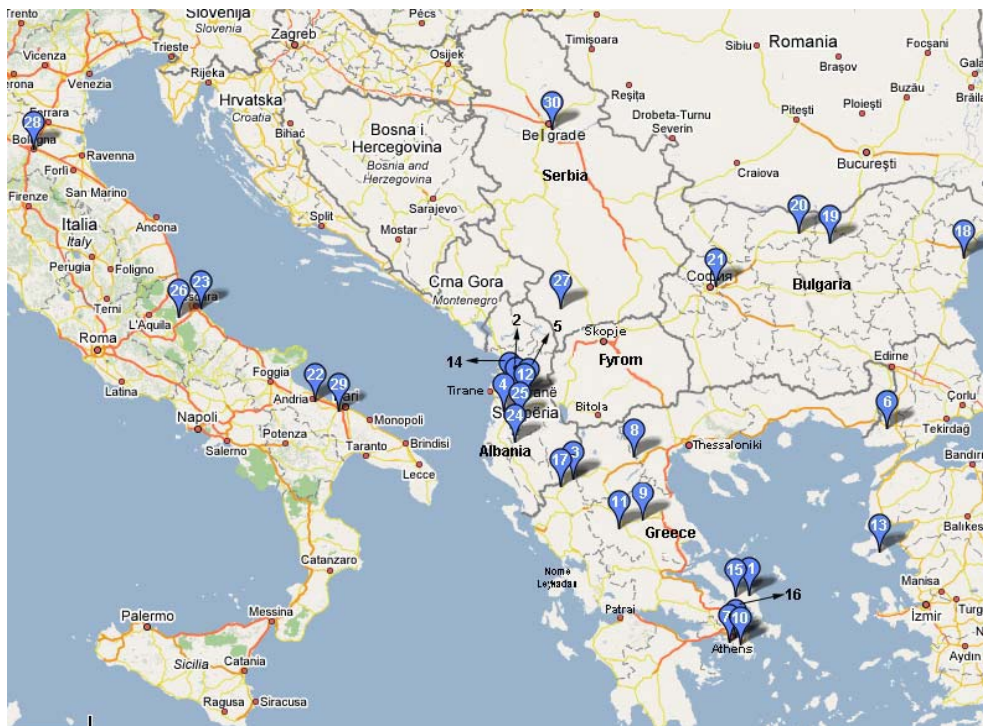


Figure 3. Map of the Balkans and Adriatic area indicating the place of origin for most of the patients bearing the double mutant allele. Numbers refer to patients in Table 1 (note that the patients # 31 and #32 are not shown in the figure).

In conclusion, the present study enabled us to demonstrate *in vitro* the detrimental cumulative effect of the two mutations of the [D409H;H255Q] allele. The origin of this allele, one of the few double mutant alleles described in the *GBA* gene, has been studied by analysing the haplotype in 37 chromosomes. The results showed that most chromosomes share a common haplotype and are consistent with a single origin for the allele in a region around Albania, comprising the Balkans and the Adriatic area of Italy.

ACKNOWLEDGMENTS

Some of the samples were obtained from the “Cell Line and DNA Bank from Patients affected by Genetic Diseases” collection (<http://www.gaslini.org/labppm.htm>), supported by Italian Telethon grants. We are grateful to the physicians and colleagues who referred the patients, in particular to Prof. Kremensky (Laboratory of Molecular Pathology, Medical University, Sofia, Bulgaria), Prof. Zafeiriou (Aristotle University, Thessaloniki, Greece), Dr. B. Bembi (IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy), Dr. M. Di Rocco (IRCCS G. Gaslini, Genoa, Italy),

Dr. F. Giona ("La Sapienza" University, Rome, Italy), Laboratorio Dr. N. Chamoles (Buenos Aires, Argentina). RS was a recipient of fellowship from the Spanish Ministry of Education. The authors are grateful to R. Rycroft for revising the English.

REFERENCES

- Abrahamov A, Elstein D, Grosstur V, Farber B, Glaser Y, Hadashalpern I, Ronen S, Tafakjdi M, Horowitz M, Zimran A. 1995. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 346:1000-3.
- Beutler E, Gelbart T, Balicki D, Demina A, Adusumalli J, Elsas L, 2nd, Grinzaid KA, Gitzelmann R, Superti-Furga A, Kattamis C and others. 1996. Gaucher disease: four families with previously undescribed mutations. *Proc Assoc Am Physicians* 108:179-84.
- Beutler E, Gelbart T, Scott CR. 2005. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 35:355-64.
- Beutler E, Grabowski GA. 2001. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. p 3635-68.
- Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. 1998. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: High prevalence of the RecNciI mutation. *Am J Med Genet*. 80:343-51.
- Chabás A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, Mate I, Sobrino JA, Gonzalez-Duarte R, Vilageliu L. 1995. Unusual expression of Gaucher's disease: Cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet* 32:740-2.
- Chabás A, Gort L, Diaz-Font A, Montfort M, Santamaria R, Cidras M, Grinberg D, Vilageliu L. 2005. Perinatal lethal phenotype with generalized ichthyosis in a type 2 Gaucher disease patient with the [L444P;E326K]/P182L genotype: effect of the E326K change in neonatal and classic forms of the disease. *Blood Cells Mol Dis* 35:253-8.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2001. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-4.
- Eyal N, Wilder S, Horowitz M. 1990. Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene* 96:277-83.
- Filocamo M, Grossi S, Stroppiano M, Tortori-Donati P, Regis S, Allegri A, Di Rocco M. 2005. Homozygosity for a non-pseudogene complex glucocerebrosidase allele as cause of an atypical neuronopathic form of Gaucher disease. *Am J Med Genet A* 134:95-6.
- Kawame H, Eto Y. 1991. A new glucocerebrosidase-gene missense mutation responsible for neuronopathic Gaucher disease in Japanese patients. *Am J Hum Genet* 49:1378-80.
- Kim JW, Liou BB, Lai MY, Ponce E, Grabowski GA. 1996. Gaucher disease: Identification of three new mutations in the Korean and Chinese (Taiwanese) populations. *Hum Mutat* 7:214-8.
- Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Santamaria R, Sanchez G, Gort L, Chabas A, Grinberg D, Dassopoulou M, Fotopoulos S, Vilageliu L. 2006. Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 29:591.
- Miocic S, Filocamo M, Dominissini S, Montalvo AL, Vlahovick K, Deganuto M, Mazzotti R, Cariati R, Bembi B, Pittis MG. 2005. Identification and functional characterization of five novel mutant alleles in 58 Italian patients with Gaucher disease type 1. *Hum Mutat* 25:100.
- Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. 2004. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat* 23:567-75.
- Park JK, Tauebi N, Stubblefield BK, LaMarca ME, MacKenzie JJ, Stone DL, Sidransky E. 2002. The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin Genet* 61:32-4.
- Raghavan SS, Topol J, Kolodny EH. 1980. Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 32:158-73.

- Rodriguez Mari A, Diaz-Font A, Chabás A, Pastores GM, Grinberg D, Vilageliu L. 2001. New insights into the origin of the Gaucher disease-causing mutation N370S: Extended haplotype analysis using the 5GC3.2, 5470 G/A, and ITG6.2 polymorphisms. *Blood Cell Mol Dis* 27:950-9.
- Ron I, Dagan A, Gatt S, Pasmanik-Chor M, Horowitz M. 2005. Use of fluorescent substrates for characterization of Gaucher disease mutations. *Blood Cell Mol Dis* 35:57-65.
- Sidransky E. 2004. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab* 83:6-15.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. 2003. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 21:577-81.
- Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sidransky E. 2000. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat* 15:181-8.
- Theophilus B, Latham T, Grabowski GA, Smith FI. 1989. Gaucher disease: Molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* 45:212-25.

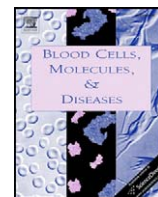
3.2.2 Capítol 2: Expressió en COS-7 i xaperones farmacològiques.

3.2.2.1 Article Sanchez-Ollé i col·laboradors 2009.

RESUM:

La malaltia de Gaucher és un trastorn autosòmic recessiu. Es caracteritza per l'acumul de glucosilceramida als lisosomes del sistema fagocític mononuclear, degut a la deficiència en β -glucosidasa àcida.

Les principals conseqüències d'aquesta malaltia són l'hepatoesplenomegàlia, les lesions esquelètiques i, a vegades, les manifestacions neurològiques. A concentracions sub-inhidores, diversos inhibidors competitiu es comporten com a xaperones químiques, induint l'estabilització de proteïnes i augmentant l'activitat enzimàtica. Aquí hem testat dos iminosucres (NB-DNJ i NN-DNJ) i quatre aminociclitols amb diferents graus de lipofilitat com a xaperones farmacològiques per a la glucocerebrosidasa (GBA). Descriuim un augment de l'activitat de la GBA quan s'utilitza NN-DNJ, NB-DNJ i l'aminociclitol 1 en cèl·lules transfectades estables i un augment amb NN-DNJ i l'aminociclitol 4 en fibroblasts de pacients. Aquests resultats en mutacions específiques validen l'ús de xaperones químiques com una aproximació terapèutica per a la malaltia de Gaucher. No obstant, són necessaris el desenvolupament i l'anàlisi de nous compostos, per tal de trobar agents terapèutics més efectius en un rang més ampli de mutacions.



Promising results of the chaperone effect caused by iminosugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease

Gessamí Sánchez-Ollé^a, Joana Duque^b, Meritxell Egido-Gabás^c, Josefina Casas^c, Montserrat Lluch^b, Amparo Chabás^b, Daniel Grinberg^a, Lluïsa Vilageliu^{a,*}

^a Departament de Genètica, Universitat de Barcelona; IBUB; CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Av. Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain

^b Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic; CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

^c Research Unit on BioActive Molecules (RUBAM), Departamento de Química BioMédica, Instituto de Química Avanzada de Catalunya, CSIC, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 8 September 2008

Revised 17 November 2008

Available online 22 January 2009

(Communicated by M. Lichtman, M.D.,
18 November 2008)

Keywords:

Gaucher disease
Therapeutic strategy
Chaperones
GBA mutations
Enzyme activity

ABSTRACT

Gaucher disease is an autosomal recessive disorder. It is characterized by the accumulation of glucosylceramide in lysosomes of mononuclear phagocyte system, attributable to acid β -glucosidase deficiency. The main consequences of this disease are hepatosplenomegaly, skeletal lesions and, sometimes, neurological manifestations. At sub-inhibitory concentrations, several competitive inhibitors act as chemical chaperones by inducing protein stabilization and increasing enzymatic activity. Here we tested two iminosugars (NB-DNJ and NN-DNJ) and four aminocyclitols with distinct degrees of lipophilicity as pharmacological chaperones for glucocerebrosidase (GBA). We report an increase in the activity of GBA using NN-DNJ, NB-DNJ and aminocyclitol 1 in stably transfected cell lines, and an increment with NN-DNJ and aminocyclitol 4 in patient fibroblasts. These results on specific mutations validate the use of chemical chaperones as a therapeutic approach for Gaucher disease. However, the development and analysis of new compounds is required in order to find more effective therapeutic agents that are active on a broader range of mutations.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Lysosomal storage diseases are a group of disorders caused by the loss of function of lysosomal enzymes, which leads to the intralysosomal storage of non-degraded substrates. The disorders are classified on the basis of the substrate that is accumulated. Gaucher disease (GD, OMIM 230800) is the most prevalent sphingolipidosis caused by deficiency of glucocerebrosidase (GBA, E.C. 3.2.1.45), which produces the progressive accumulation of glucosylceramide. Clinically, GD is classified into three major types depending on the absence (Type I) or presence (Type II and III) of central nervous system involvement. The main symptoms of GD are anaemia, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and skeletal disease. For a review see Beutler and Grabowski [1].

Two disease-specific therapies have been approved to treat GD. Enzyme replacement therapy (ERT) has been applied for more than 15 years and has proved successful mainly for visceral and haematological symptoms of type I patients. However, since the recombinant enzyme does not cross the blood–brain barrier, its efficacy in neurological involvement is, if any, limited [2]. Moreover, it is an expensive lifetime treatment that requires frequent intravenous infusion of enzyme. The other approved treatment is substrate reduction therapy, which is based on the inhibition of glucosylceramide synthase (GCS), the rate-limiting first step

in the glycosphingolipid biosynthetic pathway, by the oral administration of *N*-butyl-deoxyojirimycin (NB-DNJ) [3]. This reduction therapy is used for type I patients for whom ERT is not a therapeutic option. The small size of NB-DNJ makes it of potential use for neurological cases.

To date, other alternative strategies, such as gene therapy, have had very limited success in the treatment of GD. However, new experimental approaches in cellular and animal models have been assayed either for conventional gene therapy [4,5] or based on the partial inhibition of the GCS gene using siRNAs [6].

In the last few years, a new line of research, using small molecules that act as chemical chaperones, has emerged [7]. This approach is based on the assumption that some mutations cause the misfolding of lysosomal enzymes after their synthesis. Misfolding is responsible for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum (ER), thereby preventing enzyme transport to the lysosome. In this scenario, the chaperone stabilizes the mutant protein, thereby allowing that, at least, some molecules reach their final destination. A number of iminosugars and aminocyclitols show a chaperone-like profile *in vitro* towards GBA [8]. However, the first molecule reported to act as a chaperone *in vivo* for GD was the iminosugar *N*-(*n*-nonyl) deoxyojirimycin (NN-DNJ) [9]. The addition of sub-inhibitory concentrations of NN-DNJ to fibroblasts of a GD patient, homozygous for the N370S mutation, resulted in a two-fold increase in GBA activity. Furthermore, several mutant GBA enzymes were shown to increase their activity following the addition of *N*-(*n*-butyl)deoxyojirimycin (NB-DNJ, miglustat, Zavesca[®]) to COS

* Corresponding author. Fax: +34934034420.

E-mail address: lvilageliu@ub.edu (L. Vilageliu).

cells transfected with the corresponding mutant cDNAs [10]. Other iminosugars are also active on the N370S mutation [11,12] and also on several mutations that cause GD [13–15]. In addition, some non-sugar GBA inhibitors [16] and isofagomine [17] also have a chaperone effect on the N370S mutant enzyme in GD patient cells. Clinical trials using isofagomine tartrate (AT2101) are currently being conducted [18].

Here we analyzed the effect of six compounds, namely iminosugars NB-DNJ and NN-DNJ and aminocyclitols 1–4 [19] (Fig. 1), on COS cells transfected with either the wild-type or mutant GBA cDNAs. Ten distinct mutants were assayed. The effect of these compounds was also tested on the residual β -glucosidase activity of fibroblasts from patients with diverse genotypes.

Materials and methods

Iminosugars and aminocyclitols

NB-DNJ was purchased from Sigma. NN-DNJ was obtained from tetra-*O*-benzyldeoxynojirimycin [20] followed by reductive alkylation using described protocols [21]. Aminocyclitols 1–4 were obtained as previously described [19].

Plasmid construction and mutagenesis

Wild-type and mutant GBA cDNAs (N188S, N188S;E326K, E326K, N370S, I402T, D409H and L444P) cloned in pUC18 were obtained as described in Montfort et al. [22]. Alleles bearing mutations G202R, H255Q, and G377S, and the double mutant H255Q;D409H were generated using the Quick-Change[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, California, USA) and primers containing the desired mutation. Primer information is available on request. The wild-type and all mutant cDNAs were subcloned into the expression vector pCDNA3.1 (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). The plasmid was purified using HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Transient and stable GBA transfections

African green monkey kidney cells (COS-7) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, Deisenhofen, Germany) supplemented with 10% (v/v) bovine serum (BS) (Gibco[®] Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco[®] Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ incubator. Cells were transfected with 6 mg of Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). After transfection, cells were grown for 2 days without selection.

Stable transfectants were obtained with geneticin (G418) selection (500 mg/mL). Clones were grown in DMEM, 10% BS, 1% penicillin/streptomycin, and 500 mg/mL G418/Geneticin[®] (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). The presence of the transfected gene in the selected clones was assessed by Western blot.

SDS-PAGE and Western blotting analysis

Proteins were subjected to SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and electrophoretically transferred onto Immobilon-P Transfer nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). About 5 μ g was loaded per lane and the membrane was blocked 2 h at room temperature with 5% non-fat milk in PBS, containing 0.1% Tween 20 (MTP). After incubation overnight at 4 °C with anti-GBA monoclonal antibody (Abnova[®] Corporation, Taipei City, Taiwan) (or anti- α -tubulin monoclonal antibody, Sigma, Deisenhofen, Germany) in MTP, the membrane was washed three times with PBT and three times with PBS. Membranes were then incubated with a secondary antibody sheep anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, Deisenhofen, Germany) (1:10,000 in MTP) for 2 h at room temperature, followed by three washes with PBT and three washes with PBS. Detection reaction was performed by incubating the membrane in a luminol solution (100 mM Tris-HCl pH 9, coumaric acid 0.2 mM, luminol 1.25 mM and 0.3% H₂O₂) for 2 min at RT. The membrane was exposed to Amersham Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK).

Inhibition studies

To establish the best range of concentrations of the compounds to be used in the chaperone assays, the inhibitory effect of the aminocyclitols and iminosugars on β -glucosidase activity was assayed in crude extract of COS-cells and fibroblasts. The analysis was performed using the 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside substrate (4MU-Glc; 5 mM), in 0.5 M citrate buffer, pH 5.5, in the presence of Triton X-100 and taurocholate [23].

β -Glucosidase assay in lysed or intact COS-7 cells

Transient transfected cells were washed once in PBS, trypsinized, harvested by centrifugation and stored at -80 °C. β -glucosidase activity was measured with 4MU-Glc as described [23]. Stable COS-7 transfectants were cultured in 24-well assay plates during 6 days in DMEM, 10% BS at 37 °C under 5% CO₂ either with or without NB-DNJ, NN-DNJ, or aminocyclitols 1–4 (see Fig. 1). Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with the corresponding compound, and cells were washed, harvested and stored as indicated above. Cell pellets were resuspended in 100 ml of PBS. Protein levels were determined by the Bradford method, using bovine serum albumin standards (BSA, Sigma, Deisenhofen, Germany) and Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Cells were sonicated and the levels of acid β -glucosidase activity were monitored by enzyme assay using 4MU-Glc, following the protocol by Sawkar et al. [9]. The amount of 4-methylumbelliferone was analyzed with a fluorometer Spectramax Gemini XPS (Molecular Devices Corporation; excitation wavelength 355 nm, emission wavelength 460 nm). The ratio of enzyme activity with/without aminocyclitol/iminosugar was calculated. The values shown are the results of at least two experiments with 3 or 4 replicates. For intact cells, the protocol

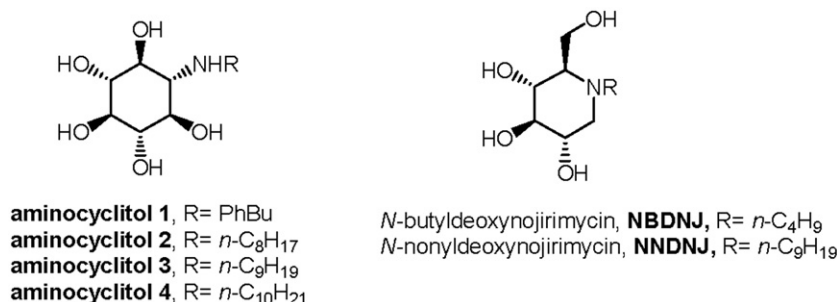


Fig. 1. Iminosugars (NN-DNJ and NB-DNJ) and aminocyclitols 1–4 used in this study.

was similar to the one described above except that the reaction was performed directly in the plate well, without trypsinizing and harvesting the cells.

Fibroblast culture assays

Skin fibroblasts were obtained from non-neurological (type 1) and neurological (types 2 and 3) GD patients with distinct genotypes, which were previously diagnosed at the *Institut de Bioquímica Clínica*. Fibroblasts from healthy individuals were used as controls. Fibroblast cultures were established following routine procedures in Eagle's minimal essential medium (MEM) with 15% inactivated fetal calf serum. The cells used were between the 3rd and the 10th passage.

For the β -glucosidase assay in lysed cells, 200,000 cells were placed in flat tubes (10 cm²) with MEM containing the aminocyclitol or the iminosugar dissolved in DMSO. For each experiment, four to five flat tubes with the compound at concentrations ranging between 2.5 and 60 μ M were set up. Untreated and treated cells were incubated for 4 days at 37 °C. When incubations were longer, media were replaced after 3 days. Prior to the β -glucosidase activity assay, media supplemented with aminocyclitols 1–4, NN-DNJ or NB-DNJ were removed, and cells were rinsed with PBS and incubated in routine culture medium for 15 min at 37 °C in order to assure complete removal of the compound. Cells were rinsed again twice with PBS and harvested after trypsin treatment. After centrifugation, the cell pellets were resuspended in water, lysed by sonication and used for assaying β -glucosidase activity, β -hexosaminidase activity (as control lysosomal enzyme), and total protein. The β -glucosidase activity assay was

performed with substrate (4MU-Glc; 20 mM). Cells were incubated for 1 h at 37 °C, the enzyme reaction was stopped with 3 ml of sodium carbonate–bicarbonate buffer (pH 10.7), and fluorescence was measured. β -hexosaminidase activity was measured with the fluorogenic 4-methylumbelliferyl derivative and protein content estimated following Lowry [24]. The effect of iminosugars or aminocyclitols as potential chaperones was evaluated in triplicate for each experiment.

For the assay of acid β -glucosidase in intact cells, these were plated into 24-well assay plates with MEM containing several concentrations of the aminocyclitol product or NN-DNJ or NB-DNJ and incubated as described above. Cells were washed and the enzyme assay performed as follows: substrate (100 μ l, 5 mM 4MU-Glc) in 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) was added to each well up to a total volume of 260 μ l; incubation was for 1 h at 37 °C. Enzyme reaction was stopped with 2 ml of carbonate–bicarbonate buffer (pH 10.7) and the fluorescence released was measured. For each experiment untreated (no compound added) and treated cells were plated in quadruplicate.

The non-specific β -glucosidase activity was evaluated by addition of conduritol B-epoxide to control wells and was shown to account for about 1% of the activity in control fibroblasts.

Statistical analysis

For all measures, the hypothesis of normality was rejected and non-parametric Mann–Whitney *U* test was used. Normal distribution was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. SPSS statistical programme was used for the statistical analysis. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

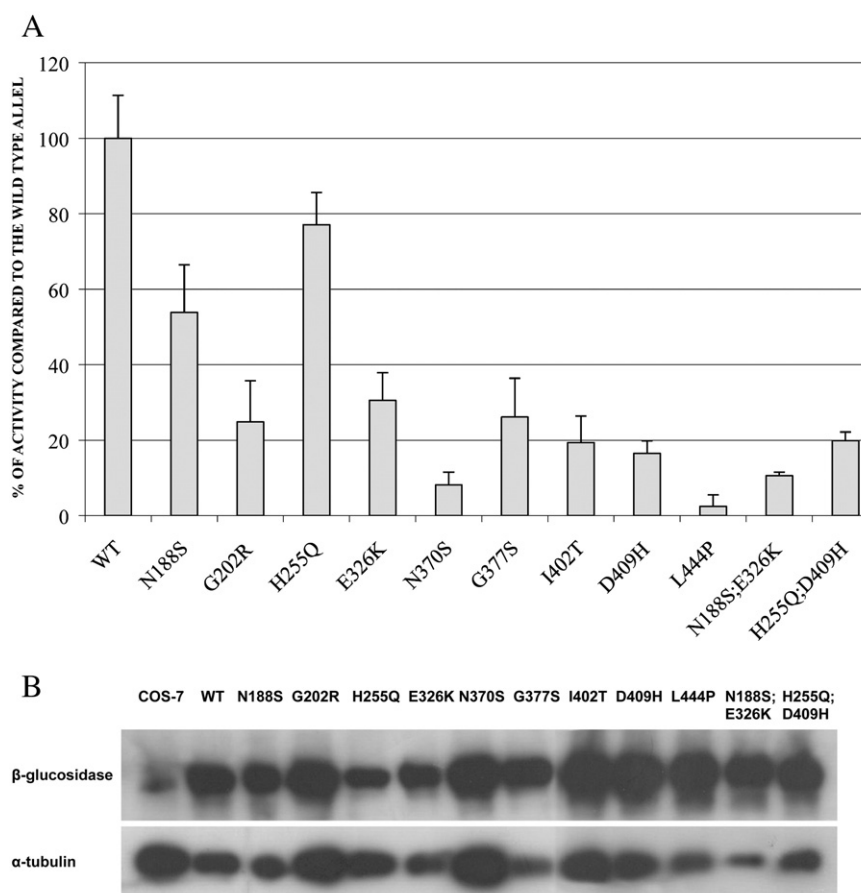


Fig. 2. Characterization of mutant glucocerebrosidases expressed in COS cells. (A) Mean activity, normalized by mg of protein, and SE for the mutant proteins, expressed as a percentage of that of wild-type enzyme. (B) Western blot analysis of the mutant proteins. α -tubulin was used as a reference loading control.

Results

Enzyme activity of mutant GBAs

COS-7 cells were transiently transfected with wild-type *GBA* cDNA and cDNAs bearing the following mutations: N188S, G202R, H255Q, E326K, N370S, G377S, I402T, D409H and L444P, and the double mutants N188S;E326K and H255Q;D409H. The activities of the enzymes produced by these constructs are shown in Fig. 2A. The N188S, H255Q, and E326K changes showed the highest residual activity: 53.84% (SD: 12.59), 77.09% (SD: 8.58), and 30.51% (SD: 7.34) of wild-type, respectively. To further characterize the mutant products, immunoblots of the normal and mutant proteins were performed. A unique band pattern, similar to that of the wild-type, was detected using monoclonal anti-human acid β -glucosidase for all the mutant enzymes, albeit with some differences in intensity (Fig. 2B).

Effect of treatment with NN-DNJ or NB-DNJ on enzyme activity in transfected cells

Iminosugars NN-DNJ and NB-DNJ (Fig. 1), previously described as having a chaperone effect on specific *GBA* mutations, were tested on mutations described in our series of patients. COS-7 cells stably transfected with constructs bearing the distinct mutations were treated with 2.5 and 5 μ M of NN-DNJ for six days and the *GBA* activity was determined and compared with *GBA* activity in cells treated only with vehicle. Since we were not able to obtain stably transfected cells bearing the H255Q mutation alone, the effects of compounds on this mutation could not be analysed. Results using lysed cells for the enzyme activity assay are shown (Fig. 3A). Treatment with 2.5 μ M NN-DNJ led to a 1.4-fold increase in the activity of the N188S mutant enzyme. For G377S, the double mutant N188S;E326K and the wild-type enzymes, an increase in activity

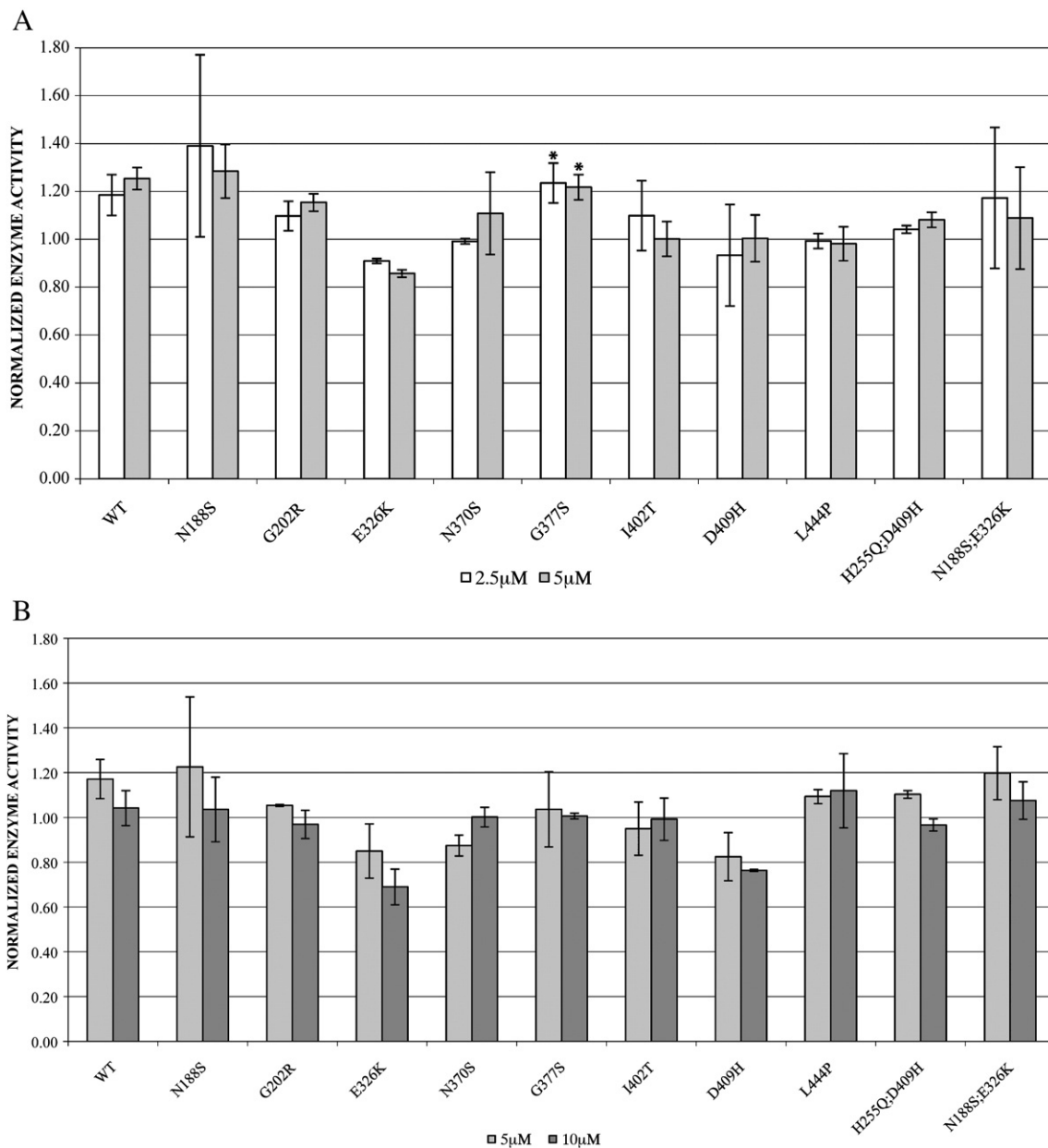


Fig. 3. Normalized β -glucosidase activity in COS-7 cells after the treatment with iminosugars for 6 days. (A) Mean and SE values after treatment with NN-DNJ. (B) Mean and SE values after treatment with NB-DNJ. The normalized enzyme activity is calculated by the ratio between treated cells and untreated cells. * $p < 0.05$.

(about 1.2-fold) was also observed. This enhancement in activity was also detected for these enzymes when treated with 5 μ M NN-DNJ, although to a lesser extent in the cases of N188S and the double mutant N188S;E326K. Smaller increases in enzyme activity occurred for other mutant alleles such as G202R, N370S and I402T, either at one or both concentrations. For E326K a small decrease in activity was observed. No change in activity was found for the rest of the mutant enzymes.

Iminosugar NB-DNJ was tested at 5 and 10 μ M. A 20% increase in activity was observed for N188S and the double mutant N188S;E326K when treated with 5 μ M (but not 10 μ M) NB-DNJ (Fig. 3B). The treated wild-type enzyme showed a similar increase. It should be noted that these enzymes were also activated by NN-DNJ. However, G377S activity, which was positively affected by NN-DNJ treatment, showed no increase when treated with NB-DNJ. As with NN-DNJ, a decrease in E326K β -glucosidase activity was also observed with NB-DNJ. A similar negative effect was detected for D409H. No other significant changes in activity were detected for the rest of the mutant proteins, except for a slight increase for L444P and the double mutant H255Q; D409H. For most mutant enzymes, assays with intact cells were also performed and similar results were obtained (not shown).

Effect of treatment with aminocyclitols on enzyme activity in transfected COS cells

Aminocyclitols 1–4 (Fig. 1) were also tested at a range of concentrations in COS-7 cells stably transfected for 6 days with constructs bearing the distinct mutations. While for linear *N*-alkyl aminocyclitol derivatives 2–4 no effect was detected on any of the enzymes studied, a positive effect was observed for aminocyclitol 1 on some of the mutant enzymes (Fig. 4). A 1.3- to 1.4-fold increase in activity was observed for the wild-type and N188S enzymes, at 15 and 20 μ M concentrations. The double mutant N188S;E326K GBA displayed a 1.2-fold increase in activity at 15 μ M. At a concentration of 20 μ M, N370S showed a 15% increase in activation. The effect of the compound on the activities of the other GBA mutations was either null or negative. As for the above iminosugars, intact cell assays were also performed and comparable results were obtained (not shown).

Effect of treatment with iminosugars and aminocyclitols on β -glucosidase activity in fibroblasts from GD patients

The compounds were also tested on the residual enzyme activity of fibroblasts from GD patients with distinct genotypes, which have been previously characterized [25]. The genotypes were: N370S/N370S, N370S/L444P, L444P/L444P, D409H/N188S;E326K, D409H/D409H, I402T/I402T, L444P/G202R, D409H/L444P;E326K, and L444P;E326K/G202R. Results using lysed cells for enzyme activity assay are shown (Figs. 5 and 6). Treatment with NN-DNJ caused a remarkable increase in enzyme activity of fibroblasts with genotypes N370S/N370S, D409H/N188S;E326K, and N370S/L444P (Fig. 5). For the N370S/N370S enzyme, a 1.7-fold increase was observed at low concentrations. Using intact cells, a 1.9-fold increase was observed upon addition of 5 and 10 μ M NN-DNJ to the culture media. At higher concentrations (20–60 μ M NN-DNJ), a sustained increase in enzyme activity (1.8-fold) was still observed (results not shown). Cells from patients with genotype N370S/L444P showed a moderate increase in activity (1.2 to 1.4-fold) at low NN-DNJ concentrations (2.5–10 μ M). For D409H/N188S;E326K fibroblasts, obtained from a patient with GD type I, the increase was 1.2- to 1.4-fold, at concentrations of 5 and 10 μ M. No effect was observed on the residual enzyme activity of the related genotype D409H/L444P;E326K, identified in a patient with GD type III [26]. Smaller effects were observed for fibroblasts bearing the L444P;E326K/G202R and L444P/G202R genotypes (not shown). NN-DNJ did not affect β -glucosidase activity in lysed cells bearing genotypes homozygous for mutation D409H (Fig. 5), L444P or I402T (not shown).

Treatment with NB-DNJ produced minor increases in enzyme activity (about 1.2-fold) in some cases, similarly to that observed in lysed wild-type cells. In contrast, a clear inhibition of enzyme activity was observed in lysed cells with genotypes D409H/D409H, D409H/L444P;E326K (but no effect on D409H/N188S;E326K) and I402T/I402T in the 5 to 60 μ M NB-DNJ concentration range (results not shown).

Fibroblasts from GD patients with distinct genotypes were treated with aminocyclitols 1–4. A positive response was obtained only for those bearing the L444P/G202R and L444P;E326K/G202R genotypes after treatment with compound 4 (Fig. 6). A 1.5- to 1.7-fold increase in β -glucosidase activity was reached in the L444P/G202R and L444P;

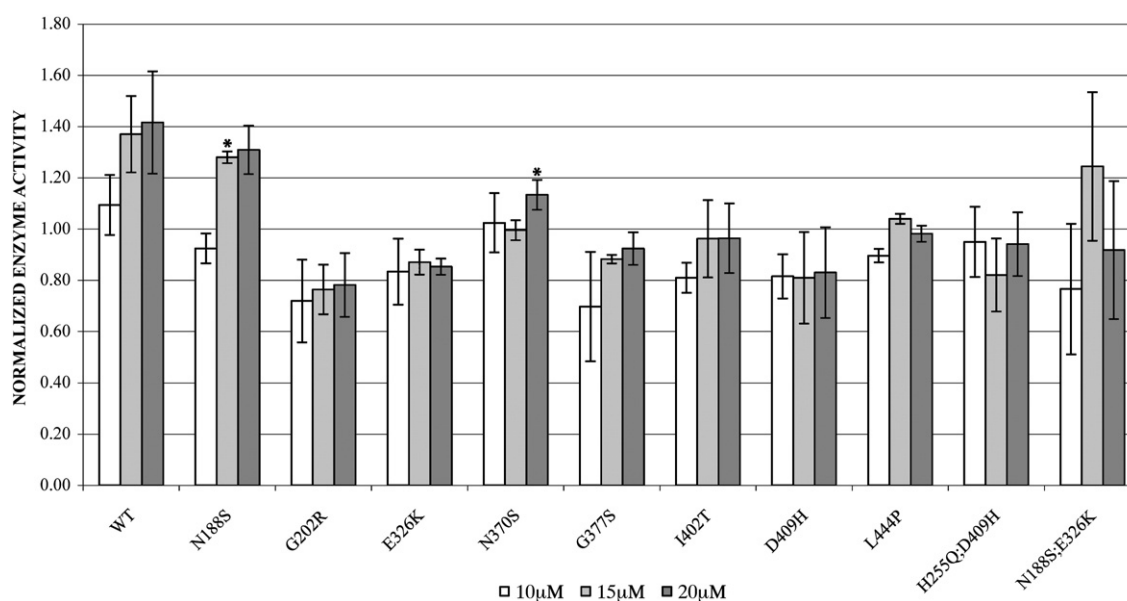


Fig. 4. Normalized β -glucosidase activity in COS-7 cells after the treatment with aminocyclitol 1 for 6 days. Mean values and SE are indicated. The normalized enzyme activity is calculated by the ratio between treated cells and untreated cells. * $p < 0.05$.

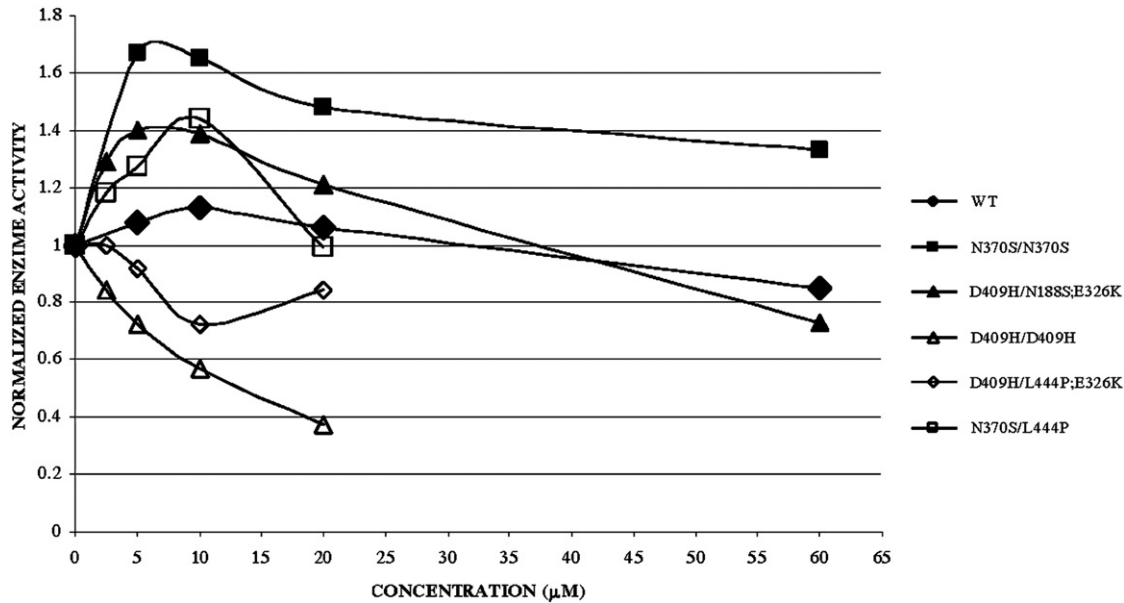


Fig. 5. Effect of NN-DNJ on β -glucosidase activity of fibroblast lines. Fibroblasts (from healthy individuals and from GD patients) were cultured for 4 days with NN-DNJ and lysed cells were assayed for β -glucosidase activity. Enzyme activity was normalized to untreated cells, which were assigned a value of 1. Means of three separate experiments are presented (SE <20%).

E326K/G202R fibroblast-lysates at 20–30 μ M concentrations. In fact, a moderate enhancement of enzyme activity was observed for compound 4 at all the concentrations tested. In contrast, activity inhibition up to 60% was detected in the N370S/N370S lysed cells. Assays with intact fibroblasts grown in the presence of compound 4 were also performed and similar results were obtained. The other aminocyclitols assayed did not affect or, even, inhibited β -glucosidase (results not shown).

Discussion

Iminosugar inhibitors have been used to treat glycosphingolipidoses, such as Fabry disease [27,28], gangliosidosis GM1 [29], and gangliosidosis GM2 [30], in cellular and mouse models. For GD, iminosugars NN-DNJ [9] and NB-DNJ [10] have been tested in fibroblasts from GD patients and in stably transfected COS-7 cell lines, respectively.

Here we tested NB-DNJ and NN-DNJ and aminocyclitols 1–4, which show distinct degrees of lipophilicity, on COS-7 cells stably transfected either with the wild-type GBA cDNA or with cDNAs bearing the mutations N188S, G202R, E326K, N370S, G377S, I402T, D409H, L444P, N188S;E326K, and H255Q;D409H. Moreover, we also analysed fibroblasts from GD patients with distinct genotypes, including the above-mentioned mutations. We found an increase in β -glucosidase activity induced by some of the compounds tested on specific mutations.

NN-DNJ was the first to be reported to have chaperone effect on wild-type and the N370S GBA enzymes in fibroblasts from GD patients [9]. In agreement with these findings, we reproduced these results in fibroblasts with the N370S/N370S genotype, and we also found a positive effect on N370S/L444P and D409H/N188S;E326K fibroblasts, in the latter case probably increasing the residual enzymatic activity derived from the N188S allele. This finding was consistent with results in COS cells transfected with the N188S mutation. In these cells, the effect on the N370S enzyme was lower, while the wild-type enzyme and the mutant G377S exhibited a significant increment of activity over untreated cells.

Iminosugar NB-DNJ had not previously been assayed in fibroblasts. Our results showed no significant enhancement of enzyme activity in any patient fibroblasts analyzed, with a clear inhibition of the D409H/D409H and I402T/I402T mutant enzyme activities. In contrast, a clear

stimulation was observed using COS cells transfected with the N188S and N188S;E326K cDNAs. A moderate increase in enzymatic activity was detected for the wild-type allele, in fibroblasts and COS cells. Alfonso et al. [10], working on COS cells, reported stimulation of the wild-type and some mutant enzymes, most of them differing from those studied here. Mutation N370S was common to both studies, but while Alfonso et al. found a clear stimulation (although with a very large SD), we did not observe any clear effect.

Aminocyclitols 2 and 3 did not show any chaperone effect either on fibroblasts from GD patients or in transfected COS cells. However, a positive effect was observed for aminocyclitol 4 in fibroblasts bearing the L444P/G202R and L444P;E326K/G202R genotypes. This increase

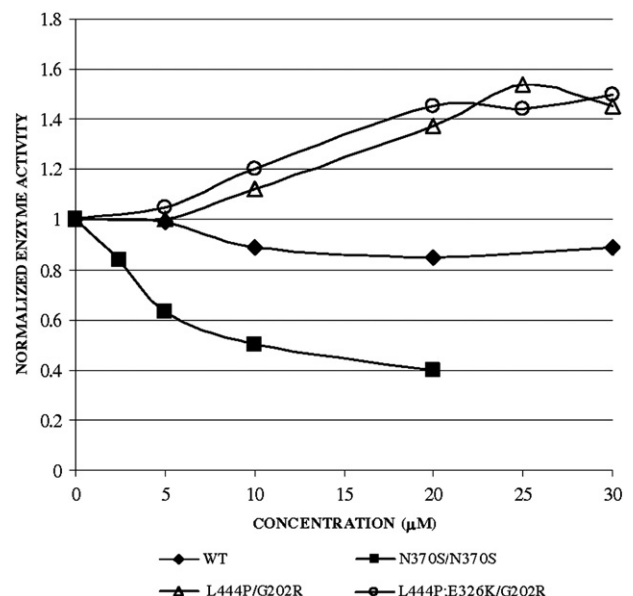


Fig. 6. Effect of the aminocyclitol 4 on β -glucosidase activity of fibroblast lines. The compound was added to the culture media for 4 days and β -glucosidase activity was measured in lysed cells. Enzyme activity was normalized to untreated cells, which were assigned a value of 1. Means of three separate experiments are presented (SE <20%).

might derive from the G202R mutant enzyme since no effect was observed for other genotypes with the L444P mutation. In contrast, the effect of this compound on COS cells was mainly inhibitory at all the concentrations assayed, including lower concentrations such as 2.5 and 5 μM . In contrast, aminocyclitol 1 stimulated the wild-type enzyme and those bearing the N188S, and N188S;E326K mutations in COS cells, while it consistently acted as an inhibitor when assayed on patient fibroblasts.

Most of the previous studies on the chaperone effect of different compounds were performed either in patients' fibroblasts [9, 11–17] or in transfected cells [10], but not in both. Only Lei et al. [31] performed the assays in both systems. The different effect for some of the compounds on transfected COS cells and patients' fibroblasts found in the present study makes it necessary to further investigate this issue and to take the results of this and other studies with caution, until the different responses of different cells lines be understood. It is difficult to speculate on the causes of these differences, but the cell type, the genetic background, the gene copy number or the effect of the endogenous enzyme of the COS cells could be partially responsible for the discrepancies. The fact that many of the fibroblasts are compound heterozygotes, adds the effect of the other allele as another variable to be considered. This is of particular interest due to the differential responses of the different mutations. In this regard, the homogeneous background of COS cells makes this heterologous expression system a good one, in spite of the limitations mentioned above.

A clear positive effect was observed for mutations that conserved a relatively high residual activity, such as N188S and E326K, and the double mutant containing them, in COS cells and fibroblasts. This observation is consistent with the expected chaperone effect, since chemical chaperones act on enzymes that retain some degree of activity. These results could be considered proof of concept for this therapeutic approach. However, for the most severely affected enzymes, the synthesis and assay of more effective compounds is required. In this regard, the long-term results of the clinical trials with isofagomine (IFG), and the pre-clinical studies that are currently being performed for several IFG-derived compounds [32] will be of interest.

The strategy followed to select the compounds tested in our study was based on the general idea that effective competitive inhibitors are more likely to show a potent chaperone effect. The compounds developed for the present study showed good inhibitory properties (IC_{50} between 1.8 and 27.6 μM) and the most active inhibitors showed a correlation with lipophilicity and, thus, with the length of the alkyl chain [33]. Moreover, they showed no toxicity either in fibroblasts or in COS cells at the range of concentrations tested. However, we achieved only partial and suboptimal results. These findings are consistent with the assumption that the most effective chaperones are not necessarily the best inhibitors, as shown also by Lei et al. [31], since the enhancement of activity could arise from more than one mechanism of action [32] or be influenced by other compound properties (membrane permeability, metabolism, enzyme selectivity or intracellular localization, among others), which may be relevant for the desired activity enhancement effects on cellular GBA enzymes.

Crystal structure analyses show that NB-DNJ and NN-DNJ bind at the active site of the GBA enzyme [34]. To date, no direct structural information on the binding of the aminocyclitols 1–4 to GBA is available, although they display substrate competitive kinetics *in vitro* [33] and, therefore, it is assumed that these compounds bind to the GBA catalytic site. Interestingly, the aminocyclitol 4 is active on fibroblasts bearing mutations L444P and/or E326K, which have been reported to be located in the GBA–SAP interaction region [35]. This observation points to a second site of action for this compound, apart from the catalytic site. This information might be useful to study and predict the effects of the different compounds. Current studies addressed at the synthesis of new aminocyclitols with improved physico-chemical properties are currently underway.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Amadeu Llebaria and Dr. Gemma Fabriás (from RUBAM, CSIC), and Dr. Antonio Delgado (from Universitat de Barcelona and RUBAM–CSIC) for helpful discussion of the MS and the project, Anna Yudego for technical help, and Robin Rycroft for revising the English. Partial financial support from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-12276), Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI042350, PI040767 and PI040867), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project MCYT CTQ2005-00175/BQU), Fondos Feder (EU), and from the Generalitat de Catalunya (SGR2005-00848) are acknowledged. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII.

References

- [1] E. Beutler, G.A. Grabowski, Gaucher disease, in: CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle (Eds.), ed 8th, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3635–3668.
- [2] R. Schiffmann, M.P. Heyes, J.M. Aerts, J.M. Dambrosia, M.C. Patterson, T. Degraba, C.C. Parker, G.C. Zirzow, K. Oliver, G. Tedeschi, R.O. Brady, N.W. Barton, Prospective study of neurological responses to treatment with macrophage-targeted glucocerebrosidase in patients with type 3 Gaucher's disease, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 613–621.
- [3] T. Cox, R. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. Van Weely, M. Hrebicek, F. Platt, T. Butters, R. Dwek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein, A. Zimran, Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis, *Lancet* 355 (2000) 1481–1485.
- [4] I.B. Enquist, E. Nilsson, A. Ooka, J.E. Mansson, K. Olsson, M. Ehinger, R.O. Brady, J. Richter, S. Karlsson, Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13819–13824.
- [5] K.A. Mceachern, J.B. Nietupski, W.L. Chuang, D. Armentano, J. Johnson, E. Hutto, G.A. Grabowski, S.H. Cheng, J. Marshall, AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease, *J. Gene Med.* 8 (2006) 719–729.
- [6] A. Diaz-Font, A. Chabas, D. Grinberg, L. Vilageliu, RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: a preliminary study towards a therapeutic strategy for Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases, *Blood Cells Mol. Dis.* 37 (2006) 197–203.
- [7] J.Q. Fan, A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity, *Trends Pharmacol. Sci.* 24 (2003) 355–360.
- [8] A. Delgado, J. Casas, A. Llebaria, J.L. Abad, G. Fabriás, Chemical tools to investigate sphingolipid metabolism and functions, *Chem. Med. Chem.* 2 (2007) 580–606.
- [9] A.R. Sawkar, W.C. Cheng, E. Beutler, C.H. Wong, W.E. Balch, J.W. Kelly, Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 15428–15433.
- [10] P. Alfonso, S. Pampin, J. Estrada, J.C. Rodriguez-Rey, P. Giraldo, J. Sancho, M. Pocovi, Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations, *Blood Cells Mol. Dis.* 35 (2005) 268–276.
- [11] H.H. Chang, N. Asano, S. Ishii, Y. Ichikawa, J.Q. Fan, Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients, *FEBS J.* 273 (2006) 4082–4092.
- [12] R.A. Steet, S. Chung, B. Wustman, A. Powe, H. Do, S.A. Kornfeld, The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13813–13818.
- [13] H. Lin, Y. Sugimoto, Y. Ohsaki, H. Ninomiya, A. Oka, M. Taniguchi, H. Ida, Y. Eto, S. Ogawa, Y. Matsuzaki, M. Sawa, T. Inoue, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1689 (2004) 219–228.
- [14] A.R. Sawkar, S.L. Adamski-Werner, W.C. Cheng, C.H. Wong, E. Beutler, K.P. Zimmer, J.W. Kelly, Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles, *Chem. Biol.* 12 (2005) 1235–1244.
- [15] Z. Yu, A.R. Sawkar, L.J. Whalen, C.H. Wong, J.W. Kelly, Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 94–100.
- [16] W. Zheng, J. Padia, D.J. Urban, A. Jadhav, O. Goker-Alpan, A. Simeonov, E. Goldin, D. Auld, M.E. Lamarca, J. Inglesse, C.P. Austin, E. Sidransky, Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13192–13197.
- [17] R.L. Lieberman, B.A. Wustman, P. Huertas, A.C. Powe Jr., C.W. Pine, R. Khanna, M.G. Schlossmacher, D. Ringe, G.A. Petsko, Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 101–107.
- [18] N.J. Weinreb, A phase 2 clinical trial of the pharmacological chaperone AT2101 for the treatment of Gaucher disease, 8th European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD) Meeting, Budapest; 2008:43.
- [19] M. Egidio-Gabas, P. Serrano, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, New aminocyclitols as modulators of glucosylceramide metabolism, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 1195–1201.

- [20] H.S. Overkleef, J. Van Wiltenburg, U.K. Pandit, A facile transformation of sugar lactones to azasugars, *Tetrahedron* 50 (1994) 4215–4224.
- [21] J.W. Kelly, A.R. Sawkar, E. Beutler, C.H. Wong, W.E. Balch, Chemical chaperones and their effect upon cellular activity of beta-glucosidase, WO 2004/037373 A2; The Scripps Research Institute (2004) 54.
- [22] M. Montfort, A. Chabas, L. Vilageliu, D. Grinberg, Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: pathogenic changes and “modifier” polymorphisms, *Hum. Mutat.* 23 (2004) 567–575.
- [23] A. Chabas, B. Cormand, D. Grinberg, J.M. Burguera, S. Balcells, J.L. Merino, I. Mate, J.A. Sobrino, R. Gonzalez-Duarte, L. Vilageliu, Unusual expression of Gaucher’s disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation, *J. Med. Genet.* 32 (1995) 740–742.
- [24] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [25] B. Cormand, D. Grinberg, L. Gort, A. Chabas, L. Vilageliu, Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome, *Hum. Mutat.* 11 (1998) 295–305.
- [26] A. Chabas, L. Gort, A. Diaz-Font, M. Montfort, R. Santamaria, M. Cidras, D. Grinberg, L. Vilageliu, Perinatal lethal phenotype with generalized ichthyosis in a type 2 Gaucher disease patient with the [L444P;E326K]/P182L genotype: effect of the E326K change in neonatal and classic forms of the disease, *Blood Cells Mol. Dis.* 35 (2005) 253–258.
- [27] J.Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor, *Nat. Med.* 5 (1999) 112–115.
- [28] N. Asano, S. Ishii, H. Kizu, K. Ikeda, K. Yasuda, A. Kato, O.R. Martin, J.Q. Fan, In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4179–4186.
- [29] J. Matsuda, O. Suzuki, A. Oshima, Y. Yamamoto, A. Noguchi, K. Takimoto, M. Itoh, Y. Matsuzaki, Y. Yasuda, S. Ogawa, Y. Sakata, E. Nanba, K. Higaki, Y. Ogawa, L. Tominaga, K. Ohno, H. Iwasaki, H. Watanabe, R.O. Brady, Y. Suzuki, Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 15912–15917.
- [30] M.B. Tropak, S.P. Reid, M. Guiral, S.G. Withers, D. Mahuran, Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13478–13487.
- [31] K. Lei, H. Ninomiya, M. Suzuki, T. Inoue, M. Sawa, M. Iida, H. Ida, Y. Eto, S. Ogawa, K. Ohno, Y. Suzuki, Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 587–596.
- [32] T.D. Butters, Gaucher disease, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 412–418.
- [33] M. Egidio-Gabas, D. Canals, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, Aminocyclitols as pharmacological chaperones for glucocerebrosidase, a defective enzyme in Gaucher disease, *Chem. Med. Chem.* 2 (2007) 992–994.
- [34] B. Brumshtein, H.M. Greenblatt, T.D. Butters, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, I. Silman, A.H. Futerman, J.L. Sussman, Crystal structures of complexes of N-butyl- and N-nonyl-deoxyojirimycin bound to acid beta-glucosidase: insights into the mechanism of chemical chaperone action in Gaucher disease, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 29052–29058.
- [35] S. Atrian, E. Lopez-Vinas, P. Gomez-Puertas, A. Chabas, L. Vilageliu, D. Grinberg, An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions – relevance for Gaucher disease, *Proteins* 70 (2008) 882–891.

3.2.2.2 Article en preparació:**3.2.2.2.1 Diaz i col·laboradors 2011.**

RESUM:

La malaltia de Gaucher (GD) és un trastorn lisosòmic autosòmic recessiu caracteritzat per l'acúmulo de glucosilceramida, com a conseqüència de la deficiència de l'enzim glucocerebrosidasa (GBA). Diversos inhibidors competitiu de la GBA són capaços d'actuar com a xaperones farmacològiques per a millorar les formes mutades i mal plegades de l'enzim. D'acord amb aquest principi, en aquest treball describim la capacitat de diferents aminociclitols per a augmentar l'activitat residual de la GBA en fibroblasts de pacients amb diferents genotips. Amb l'excepció del compost 6, els altres compostos van augmentar l'activitat residual de la GBA en la mutació N370S/N370S i alguns d'ells també van augmentar l'activitat de la N370S/L444P. Curiosament, el compost 2 va tenir activitat sobre la mutació L444P, involucrada en simptomatologia neuronopàtica associada als tipus 2 i 3 de la malaltia, pels quals no hi ha un tractament eficaç disponible.

Chaperone effects caused by new aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease.

Lucía Díaz,^{a,b} Gessamí Sánchez-Ollé,^c Josefina Casas,^b Daniel Grinberg,^c Antonio Delgado,^{*a,b} and Lluïsa Vilageliu^{*c}

*Corresponding authors:

e-mail: lvilageliu@ub.edu

e-mail: antonio.delgado@ub.edu

(a) Universitat de Barcelona (UB), Facultat de Farmàcia, Unitat de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Avda. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain.

(b) Consejo Superior de Investigaciones Científicas, (CSIC); Instituto de Química Avanzada de Catalunya (IQAC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Departamento de Química Biomédica, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

(c) Departament de Genètica, Universitat de Barcelona (UB); IBUB; CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Av. Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain

Abstract

Gaucher disease (GD) is an autosomal recessive lysosomal disorder characterized by the accumulation of glucosylceramide as a result of a deficiency of the enzyme glucocerebrosidase (GBA). Several competitive GBA inhibitors are able to act as pharmacological chaperones for an efficient rescue of the mutated, misfolded forms of the enzyme. Along this line, we report in this work on the ability of several aminocyclitols to increase the residual GBA activity in patient fibroblasts with different genotypes. With the exception of compound **6**, the remaining compounds were able to increase the residual GBA activity in the most common N370/N370 mutation and some of them were also active on the N370S/L444P. Interestingly, compound **2** was active for the L444P mutation involved in the neurological disorders associated with GD types 2 and 3, for which no efficient treatment is currently available.

Introduction

Lysosomal storage diseases are a group of disorders caused by the loss of function of lysosomal enzymes, which leads to the intralysosomal storage of nondegraded substrates. The disorders are classified on the basis of the substrate that is

accumulated. Gaucher disease (GD, OMIM 230800) is the most prevalent sphingolipidosis caused by the deficiency of glucocerebrosidase (GBA, E.C. 3.2.1.45), which produces the progressive accumulation of glucosylceramide. Clinically, GD is classified into three major types depending on the absence (type I) or presence (type II and III) of central nervous system involvement. The main symptoms of GD are anemia, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and skeletal disease^{1,2}.

Two disease-specific therapies have been approved to treat GD. Enzyme replacement therapy (ERT) has been applied for more than 20 years and has proved successful mainly for visceral and hematological symptoms of type I patients. However, since the recombinant enzyme does not cross the blood–brain barrier (BBB), its efficacy in neurological involvement is, if any, limited³. Moreover, it is an expensive lifetime treatment that requires frequent intravenous infusion of the enzyme. The other approved treatment is substrate reduction therapy. It is based on the inhibition of glucosylceramide synthase (GCS), the enzyme involved in the rate-limiting first step in the glycosphingolipid biosynthetic pathway, by the oral administration of *N*-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat, Zavesca[®], Figure 1)⁴. This reduction therapy is used for type I patients for whom ERT is not a therapeutic option. The small size of NB-DNJ makes it of potential use for neurological forms of the disease. To date, other alternative strategies, such as gene therapy, have had very limited success in the treatment of GD. However, new experimental approaches in cellular and animal models have been assayed either for conventional gene therapy^{5,6} or based on the partial inhibition of the GCS gene using siRNAs⁷.

In the last few years, a new line of research based on the use of pharmacological chaperones has emerged⁸. This approach is based on the assumption that some enzyme mutations are responsible for misfolding and enzyme degradation in the endoplasmic reticulum (ER), thereby preventing enzyme transport to the lysosome. In this scenario, a pharmacological chaperone would be able to partly stabilize the mutant protein, thereby allowing its transport to the final destination. A number of iminosugars and aminocyclitols have shown an *in vitro* chaperone-like profile towards GBA⁹.

However, the first molecule reported to act as pharmacological chaperone *in vivo* for GD was the iminosugar *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin (NN-DNJ, Figure 1)¹⁰.

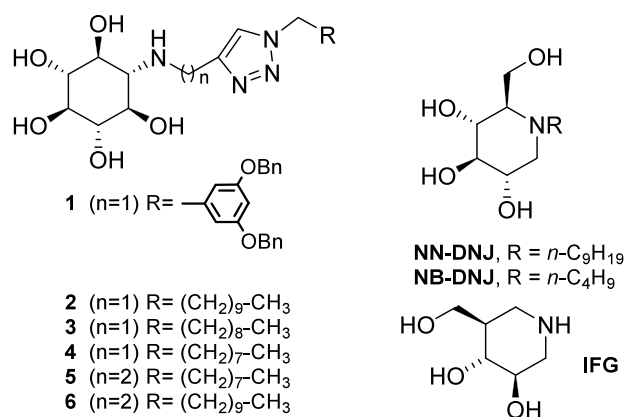


Figure 1. Aminocyclitols (**1-6**) selected for this study and related iminosugars.

The addition of sub-inhibitory concentrations of NNDNJ to fibroblasts of a GD patient, homozygous for the N370S mutation, resulted in a twofold increase in GBA activity¹⁰. Furthermore, several mutant GBA enzymes were shown to increase their activity following the addition of a related iminocyclitol, NB-DNJ (Figure 1) to COS cells transfected with the corresponding mutant cDNAs^{11, 12}. Other iminosugars were also active on the N370S mutation^{13, 14} and also on several mutations that cause GD^{15, 16}. In addition, some non-sugar GBA inhibitors¹⁷⁻¹⁹ and isofagomine (IFG, Figure 1)²⁰ also shown a chaperone effect on the N370S mutant enzyme in GD patient cells. Although clinical trials using isofagomine tartrate (AT2101) were initially conducted and showed promising results, its advancement to phase III has been discontinued (<http://ir.amicustherapeutics.com/ReleaseDetail.cfm?-ReleaseID=413437>).

In a continuation of our work on new aminocyclitols as potential pharmacological chaperones for GD, we wish to report on the activity of a selection of our recently reported aminocyclitols **1-6** (Figure 1)^{22, 23}, whose effects on the residual β -glucosidase activity of fibroblasts from patients with diverse genotypes will be compared with those of NNDNJ (Figure 1).

Materials and methods

Chemicals

NN-DNJ (*N*-nonyldeoxynojirimicin) were purchased from Tocris Bioscience (UK). CBE (condurotol B-epoxide) was obtained from a synthetic route described elsewhere²⁴. Aminocyclitols **1-6** were obtained as previously described^{22,23} (see Figure 1).

Cytotoxicity assay.

The MTT assay has been used previously to test the cytotoxicity of the selected compounds and cell viability^{22,23}. Now, the same assay has been carried out during 6 days. The number of viable cells was quantified by the estimation of its dehydrogenase activity, which reduces 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to water-insoluble formazan. All compounds were dissolved in DMSO and control experiments were performed with DMSO (<1%). Wild type fibroblasts were seeded in medium at 7000 cells per well in 96-well plates. Twenty-four hours later, media were replaced with fresh medium and compounds were added to give final concentrations of 300-0.7 μ M. Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 6 days. As the incubation was longer, media supplemented with compounds were replaced the third day. The last day, media were removed and 100 μ l of MTT:media (1:5) mixture were added. The plate was incubated for 3h at 37 °C, 5% CO₂. Finally, the media were discarded and 100 μ l of DMSO added. Absorbance was measured at 570 nm with a Spectramax M5 plate reader (Molecular devices).

Inhibition studies

The best range of concentrations of the compounds in the chaperone assays was established by determining their inhibitory effect in recombinant GCCase (imiglucerase (Cerezyme)^{22,23}).

Fibroblast culture assay

Skin fibroblasts were obtained from non-neurological (type I) and neurological (types 2 and 3) GD patients with distinct genotypes, which were previously diagnosed at the Institut de Bioquímica Clínica. Fibroblasts from healthy individuals were used as controls. Fibroblast cultures were established following routine procedures in Dulbecco Eagle's minimal essential medium (D-MEM) with 10% inactivated fetal calf serum. The cells used were between the 3rd and the 10th passage.

For the assay of acid β -glucosidase in intact cells, 10,000 cells were plated into 24-well assay plates during 6 days in D-MEM, 10% BS at 37 °C under 5% CO₂ either with or without NN-DNJ, or aminocyclitols **1–6** (see Fig.1) at several concentrations. Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with the corresponding compound, and cells were washed with D-

MEM containing the aminocyclitol dissolved in DMSO. Cells were washed and the enzyme assay performed as follows: substrate (100 μ l, 5 mM 4MU-Glc) in 0.1 M acetate buffer (pH 5.2) was added to each well up to a total volume of 260 μ l; incubation was for 1 h at 37 °C. Enzyme reaction was stopped with 2 ml of NaOH-glycine buffer (pH 10.2) and the fluorescence released was measured. For each experiment untreated (no compound added) and treated cells were plated in quadruplicate. The non-specific β -glucosidase activity was evaluated by addition of conduritol B-epoxide to control wells and was shown to account for about 1% of the activity in control fibroblasts.

Taking into account the cytotoxicity and inhibition results shown in Table 1, the following concentrations for each inhibitor were chosen to carry out the fibroblast culture assay: **1**, **2** and **3** at final concentrations of 10, 1 and 0.1 μ M, **4**, **5** and **6** at final concentrations of 20, 10 and 5 μ M, and **NN-DNJ** at 5 and 2.5 μ M.

Statistical analysis

For all measures, the hypothesis of normality was rejected and nonparametric Mann–Whitney U test was used. Normal distribution was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. SPSS statistical program was used for the statistical analysis. P values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

We have recently reported on a series of new aminocyclitols and their ability to increase thermal stabilization of recombinant GBA (imiglucerase, Cerezyme[®]) in *in vitro* assays^{22,23}. The recovery of enzyme activity after thermal denaturation, referred as “stabilization ratio” (SR), is a widely accepted parameter to uncover potential pharmacological chaperones¹⁰. A selection of our best aminocyclitols as thermal stabilizers is shown in Table 1. Interestingly, with the exception of aminocyclitol **5**, all of them showed better SR values than NN-DNJ.

This trend was paralleled by their ability to act as competitive inhibitors of the target enzyme, as it is commonly accepted for small molecule pharmacological chaperones^{25,26}.

Table 1. Inhibitory activity and stabilization ratio (SR) of aminocyclitols **1-6** against recombinant Imiglucerase

Compound	IC ₅₀ (μ M) pH=5.2	IC ₅₀ (μ M) pH=7.4	K _i (μ M)	SR ^(a)	CC ₅₀ (μ M)(b)	% inh (c)
1	0.05	0.06	0.05	31.2	132	93
2	0.12	0.10	0.05	30.5	138	97
3	0.10	0.09	0.09	21.0	109	90
4	0.20	0.20	0.33	13.0	143	50
5	44.7	11.0	(nd)	7.6	125	<5
6	25.4	4.9	20.2	11.6	80	50
NN-DNJ	1.30	0.30	0.30	9.2	(nd)	(nd)

^a Stabilization ratio^{23, 24}

^b CC: cytotoxic concentration determined by MTT assay after 6 days incubation

(c) % inhibition of imiglucerase after incubation for 24h at 50 μ M inhibitor and 5mM substrate in wt fibroblasts.

(nd) not determined

Active-site directed GCase inhibitors are good candidates to act as pharmacological chaperones, and, as such, they are expected to interact with cellular GBA in the endoplasmic reticulum (ER), assisting enzyme folding and trafficking at neutral pH. Consequently, aminocyclitols **1-6** were also evaluated as inhibitors of imiglucerase at pH 7.4 (Table 1) to determine the effect of pH on their activity. Interestingly, aminocyclitols **1-6** inhibited recombinant GBA at pH 7.4 with similar or even better potencies than those observed at pH 5.2, an indication of a similar activity at both ER and lysosome pH's.

The above compounds were also tested on the residual enzyme activity of fibroblasts from GD patients with distinct previously characterized genotypes²⁷. Results using lysed cells for enzyme activity of fibroblasts with genotypes N370S/N370S, L444P/L444P and N370S/L444P were used in this study and are collected in Table 2. For each compound, the fold increase in residual GBA activity at the highest concentration is shown. Concentrations above the indicated value lead to basal activity or enzyme inhibition. The iminosugar NN-DNJ, which is a known chaperone for N370S, but not for L444P GBA mutations, was used as control¹⁰.

Table 2. Effect of treatment with aminocyclitols 1-6 in wt human fibroblasts and maximum observed increases on the residual GBA activity on different genotypes.

Compound	WT ^(a)	N370S/N370S ^(a)	L444P/L444P ^(a)	N370S/L444P ^(a)
1	1.1 ± 0.1 (0.1 μM)	1.1 ± 0.1 (0.1 μM)	(na) (0.1 μM)	(na) (0.1 μM)
2	(na) (0.1 μM)	1.3 ± 0.1 (0.1 μM)	1.2 ± 0.1 (0.1 μM)	1.2 ± 0.1 (0.1 μM)
3	1.2 ± 0.1 (0.1 μM)	1.1 ± 0.1 (0.1 μM)	(na) (5.0 μM)	1.2 ± 0.1 (0.1 μM)
4	(na) (5.0 μM)	1.2 ± 0.1 (5.0 μM)	(na) (5.0 μM)	(na) (5.0 μM)
5	1.1 ± 0.1 (5.0 μM)	1.2 ± 0.1 (5.0 μM)	(na) (5.0 μM)	1.1 ± 0.1 (5.0 μM)
6	(na) (5.0 μM)	(na) (0.1 μM)	(na) (5.0 μM)	(na) (5.0 μM)
NN-DNJ	1.1 ± 0.1 (2.5 μM)	1.3 ± 0.1 (2.5 μM)	(na) (2.5 μM)	1.3 ± 0.1 (2.5 μM)

(a) Data in parentheses correspond to the concentration of the tested compound. Experiments were performed in triplicate, and the mean ± SD is shown. The relative activity was obtained by normalizing the activity corresponding to each compound concentration tested to the activity of untreated cells.

(na) No increase on enzyme activity at the indicated concentration

(nd) Not determined

Analysis of mutations in the GBA gene indicates that N370S is a highly prevalent mutation. It is usually related to the non-neuronopathic GD type I, and its occurrence among Ashkenazi Jews is a hundred of times higher than in the general population. On the other hand, mutation L444P is located in domain II, far from the enzyme active site but close to the interacting surface with the required activator peptide saposin C (SapC). Its frequency is lower than that of N370S but it is linked to the type II and type III neuronopathic forms of the disease²⁸. The severity and the lack of an efficient therapy for these types of GD has boosted the search of new small-molecule pharmacological chaperones able to cross the BBB and thus become an alternative to ERT.

Classically, results from most of the pharmacological chaperones reported for GD have led to the assumption that mimicking the structure of the natural substrate is a requirement for an efficient pharmacological chaperoning for mutations located near the enzyme active site^{15, 29}. This is in agreement with the observed enhancement of residual activity observed for NN-DNJ¹⁰ and several reported aminocyclitols^{15, 30-32} on mutation N370S. However, this assumption is controversial, since the related

iminocyclitol derivatives IFG $\mathbf{1}^{33}$ and α -1-C-Octyl-1-deoxynojirimycin³⁴, are also able to increase GBA activity in L444P Gaucher cells.

In this context, as reported in Table 2, only aminocyclitol **2** show a certain degree of selectivity towards this mutation, with an activity increase of around 20% at 0.1 μ M. It is worthy of mention that all our aminocyclitols, with the exception of **6**, show a noticeable chaperone activity on the most common N370S mutation at concentrations ranging between 0.1 and 5.0 μ M. Interestingly, this is also the case for aminocyclitol **5**, despite its modest activity as GBA inhibitor and as thermal stabilizer (Table 1). This aminocyclitol is also slightly active on the N370S/444P mutation, a genotype for which aminocyclitols **2** and **3** are even more efficient than NN-DNJ (Table 2).

Very recently, as a result of several massive screening programs, several non-substrate related compounds have emerged as promising potential pharmacological chaperones for GD^{17, 19, 35-37}. However, most of them are inefficient on mutations other than the common N370S. Under this scenario, the results reported herein represent an excellent starting point for further studies aimed at the development of alternative therapeutic strategies for this disease. Further studies along this line are underway and will be reported in due course.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish MICINN (CTQ2008-01426/BQU) and “Generalitat de Catalunya” (Grant 2009SGR-1072). L.D. is grateful to CSIC for a JAE-Predoc fellowship. The authors thank Genzyme Corp. for a generous supply of imiglucerase (Cerezyme). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of ISCIII.

REFERENCES

1. Beutler, E., Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* **1992**, 256, (5058), 794-9.
2. Grabowski, G. A., Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs* **2008**, 13, (1), 197-211.
3. Schiffmann, R.; Heyes, M. P.; Aerts, J. M.; Dambrosia, J. M.; Patterson, M. C.; DeGraba, T.; Parker, C. C.; Zirzow, G. C.; Oliver, K.; Tedeschi, G.; Brady, R. O.; Barton, N. W., Prospective study of neurological responses to treatment with macrophage-targeted glucocerebrosidase in patients with type 3 Gaucher's disease.

Ann Neurol **1997**, 42, (4), 613-21.

4. Cox, T.; Lachmann, R.; Hollak, C.; Aerts, J.; van Weely, S.; Hrebicek, M.; Platt, F.; Butters, T.; Dwek, R.; Moyses, C.; Gow, I.; Elstein, D.; Zimran, A., Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* **2000**, 355, (9214), 1481-5.

5. Enquist, I. B.; Nilsson, E.; Ooka, A.; Mansson, J. E.; Olsson, K.; Ehinger, M.; Brady, R. O.; Richter, J.; Karlsson, S., Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (37), 13819-24.

6. McEachern, K. A.; Nietupski, J. B.; Chuang, W. L.; Armentano, D.; Johnson, J.; Hutto, E.; Grabowski, G. A.; Cheng, S. H.; Marshall, J., AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease. *J Gene Med* **2006**, 8, (6), 719-29.

7. Diaz-Font, A.; Chabas, A.; Grinberg, D.; Vilageliu, L., RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: A preliminary study towards a therapeutic strategy for Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. *Blood Cells Mol Dis* **2006**, 37, (3), 197-203.

8. Fan, J. Q., A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci* **2003**, 24, (7), 355-60.

9. Delgado, A.; Casas, J.; Llebaria, A.; Abad, J. L.; Fabrias, G., Chemical tools to investigate sphingolipid metabolism and functions. *ChemMedChem* **2007**, 2, (5), 580-606.

10. Sawkar, A. R.; Cheng, W. C.; Beutler, E.; Wong, C. H.; Balch, W. E.; Kelly, J. W., Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (24), 15428-33.

11. Alfonso, P.; Pampin, S.; Estrada, J.; Rodriguez-Rey, J. C.; Giraldo, P.; Sancho, J.; Pocovi, M., Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid betaglucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells Mol Dis* **2005**, 35, (2), 268-76.

12. Sanchez-Olle, G.; Duque, J.; Egado-Gabas, M.; Casas, J.; Lluch, M.; Chabas, A.; Grinberg, D.; Vilageliu, L., Promising results of the chaperone effect caused by imino sugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* **2009**, 42, (2), 159-66.

13. Chang, H. H.; Asano, N.; Ishii, S.; Ichikawa, Y.; Fan, J. Q., Hydrophilic

iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *Febs J* **2006**, 273, (17), 4082-92.

14. Steet, R. A.; Chung, S.; Wustman, B.; Powe, A.; Do, H.; Kornfeld, S. A., The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (37), 13813-8.

15. Sawkar, A. R.; Adamski-Werner, S. L.; Cheng, W. C.; Wong, C. H.; Beutler, E.; Zimmer, K. P.; Kelly, J. W., Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol* **2005**, 12, (11), 1235-44.

16. Yu, Z.; Sawkar, A. R.; Whalen, L. J.; Wong, C. H.; Kelly, J. W., Isofagomine and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *J Med Chem* **2007**, 50, (1), 94-100.

17. Zheng, W.; Padia, J.; Urban, D. J.; Jadhav, A.; Goker-Alpan, O.; Simeonov, A.; Goldin, E.; Auld, D.; LaMarca, M. E.; Inglese, J.; Austin, C. P.; Sidransky, E., Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, (32), 13192-7.

18. Urban, D. J.; Zheng, W.; Goker-Alpan, O.; Jadhav, A.; Lamarca, M. E.; Inglese, J.; Sidransky, E.; Austin, C. P., Optimization and validation of two miniaturized glucocerebrosidase enzyme assays for high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen* **2008**, 11, (10), 817-24.

19. Huang, W.; Zheng, W.; Urban, D. J.; Inglese, J.; Sidransky, E.; Austin, C. P.; Thomas, C. J., N4-phenyl modifications of N2-(2-hydroxy)ethyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamines enhance glucocerebrosidase inhibition by small molecules with potential as chemical chaperones for Gaucher disease. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (21), 5783-9.

20. Lieberman, R. L.; Wustman, B. A.; Huertas, P.; Powe, A. C., Jr.; Pine, C. W.; Khanna, R.; Schlossmacher, M. G.; Ringe, D.; Petsko, G. A., Structure of acid betaglucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nat Chem Biol* **2007**, 3, (2), 101-7.

21. N.J.Weinreb, A phase 2 clinical trial of the pharmacological chaperone AT2101 for the treatment of Gaucher disease. *8th European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD) Meeting*. Budapest; 2008:43.

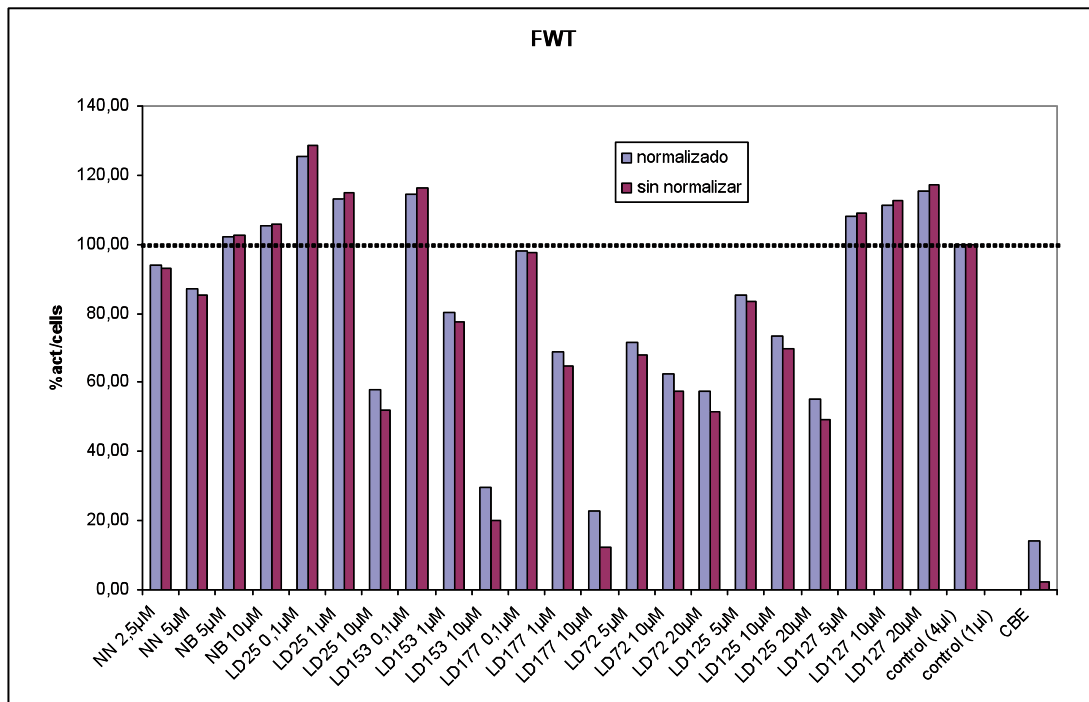
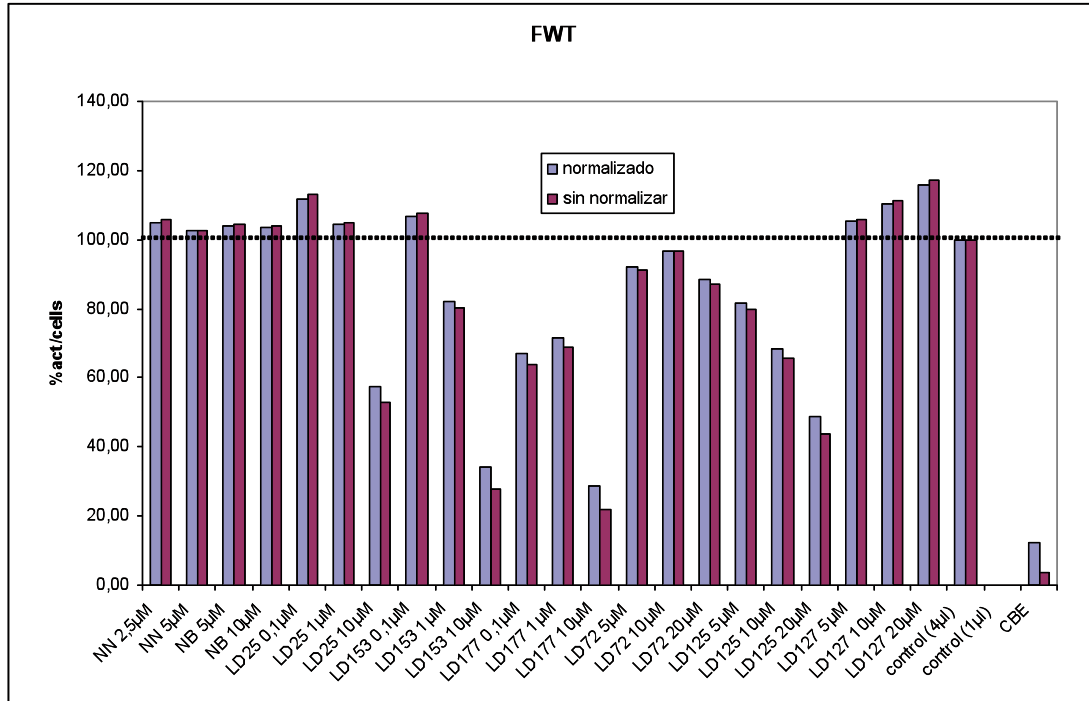
22. Diaz, L.; Bujons, J.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A., Click chemistry approach to new N-substituted aminocyclitols as potential pharmacological chaperones for Gaucher disease. *J Med Chem* **2010**, 53, (14), 5248-55.
23. Diaz, L.; Casas, J.; Bujons, J.; Llebaria, A.; Delgado, A., New glucocerebrosidase inhibitors by exploration of chemical diversity of N substituted aminocyclitols using click chemistry and in situ screening. *J.Med.Chem.* **2011**, in press.
24. Jaramillo, C.; Chiara, J.-L.; Martin-Lomas, M., An Effective Strategy for the Synthesis of 6-O-(2-Amino-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl)-D-chiro- and -D-myoinositol 1-Phosphate Related to Putative Insulin Mimetics. *J. Org. Chem* **1994**, 59, 3135-3141.
25. Futerman, A. H.; Sussman, J. L.; Horowitz, M.; Silman, I.; Zimran, A., New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, 25, (3), 147-51.
26. Ringe, D.; Petsko, G. A., What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol* **2009**, 8, (9), 80.
27. Cormand, B.; Grinberg, D.; Gort, L.; Chabas, A.; Vilageliu, L., Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* **1998**, 11, (4), 295-305.
28. Grabowski, G. A., Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genet Test* **1997**, 1, (1), 5-12.
29. Dvir, H.; Harel, M.; McCarthy, A. A.; Toker, L.; Silman, I.; Futerman, A. H.; Sussman, J. L., X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* **2003**, 4, (7), 704-9.
30. Compain, P.; Martin, O. R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N., Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *Chembiochem* **2006**, 7, (9), 1356-9.
31. Oulaidi, F.; Front-Deschamps, S.; Gallienne, E.; Lesellier, E.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P.; Martin, O. R., Second-Generation Iminoxylitol-Based Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease. *ChemMedChem* **2011**, 6, (2), 353-361.
32. Wang, G. N.; Reinkensmeier, G.; Zhang, S. W.; Zhou, J.; Zhang, L. R.; Zhang, L. H.; Butters, T. D.; Ye, X. S., Rational design and synthesis of highly potent pharmacological chaperones for treatment of N370S mutant Gaucher disease. *J Med Chem* **2009**, 52, (10), 3146-9.

33. Khanna, R.; Benjamin, E. R.; Pellegrino, L.; Schilling, A.; Rigat, B. A.; Soska, R.; Nafar, H.; Ranes, B. E.; Feng, J.; Lun, Y.; Powe, A. C.; Palling, D. J.; Wustman, B. A.; Schiffmann, R.; Mahuran, D. J.; Lockhart, D. J.; Valenzano, K. J., The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *Febs J* **2010**, *277*, (7), 1618-38.
34. Yu, L.; Ikeda, K.; Kato, A.; Adachi, I.; Godin, G.; Compain, P.; Martin, O.; Asano, N., Alpha-1-C-octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, (23), 7736-44.
35. Rigat, B.; Mahuran, D., Diltiazem, a L-type Ca(2+) channel blocker, also acts as a pharmacological chaperone in Gaucher patient cells. *Mol Genet Metab* **2009**, *96*, (4), 225-32.
36. Maegawa, G. H.; Tropak, M. B.; Buttner, J. D.; Rigat, B. A.; Fuller, M.; Pandit, D.; Tang, L.; Kornhaber, G. J.; Hamuro, Y.; Clarke, J. T.; Mahuran, D. J., Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J Biol Chem* **2009**, *284*, (35), 23502-16.
37. Marugan, J. J.; Zheng, W.; Motabar, O.; Southall, N.; Goldin, E.; Westbroek, W.; Stubblefield, B. K.; Sidransky, E.; Aungst, R. A.; Lea, W. A.; Simeonov, A.; Leister, W.; Austin, C. P., Evaluation of Quinazoline Analogues as Glucocerebrosidase Inhibitors with Chaperone Activity. *J Med Chem* **2011**.

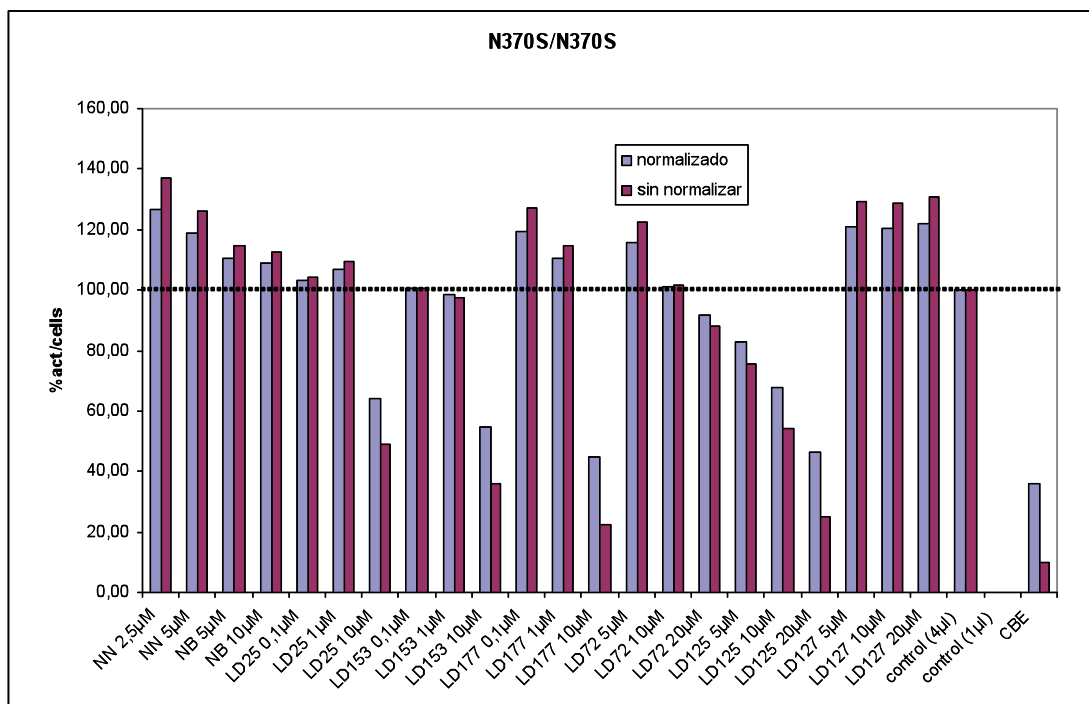
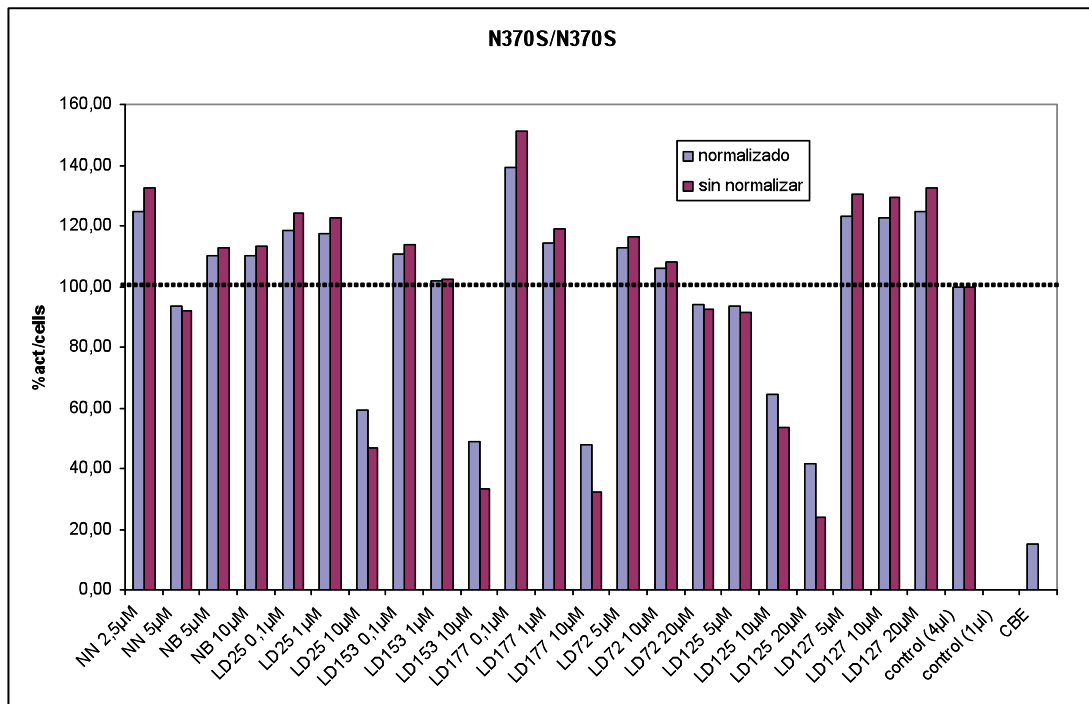
3.2.2.2.2 Figures i dades suplementàries.

Els resultats preliminars:

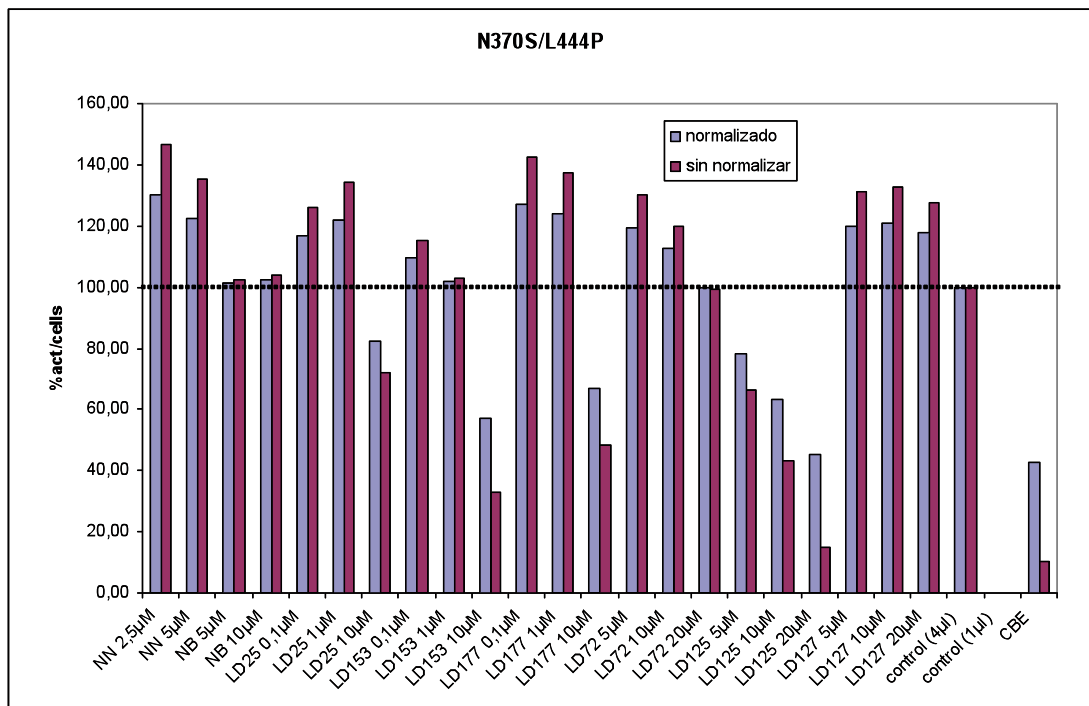
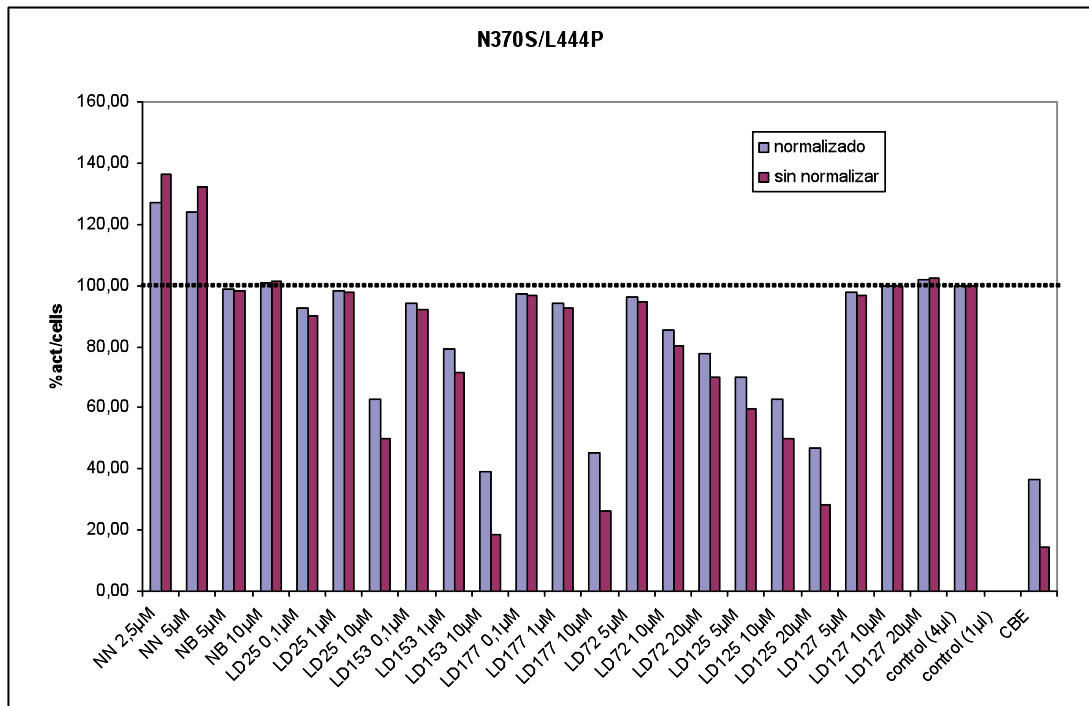
- WT (2 tandes de 3 repeticions).

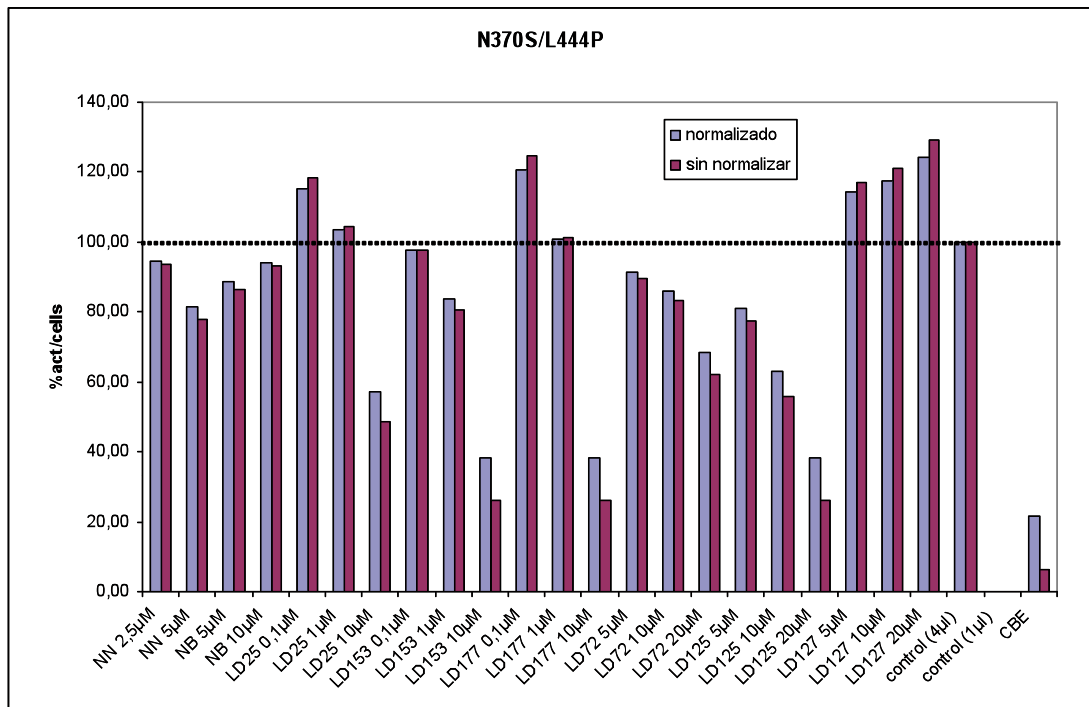


- N370S/N370S (2 tandes de 3 repeticions).

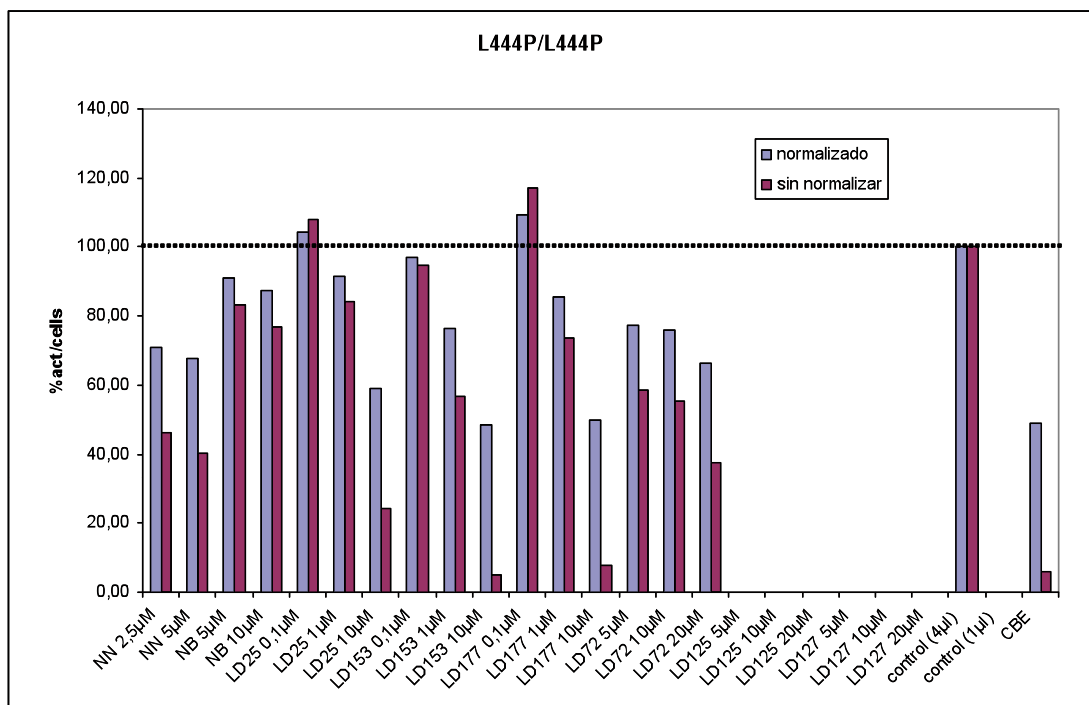


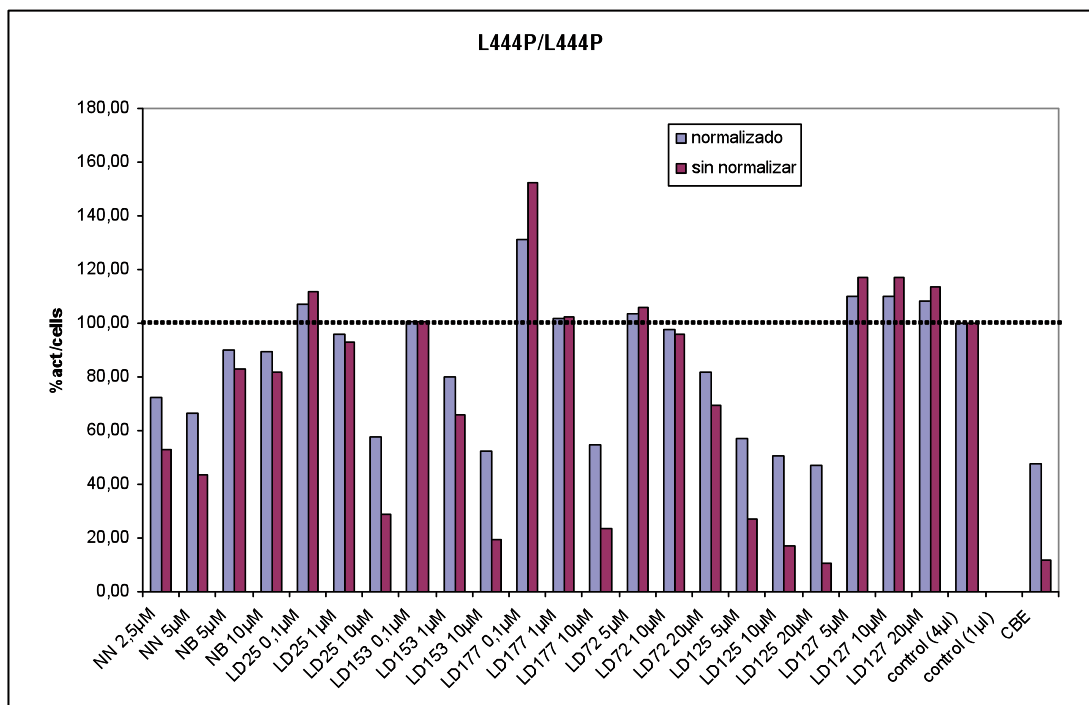
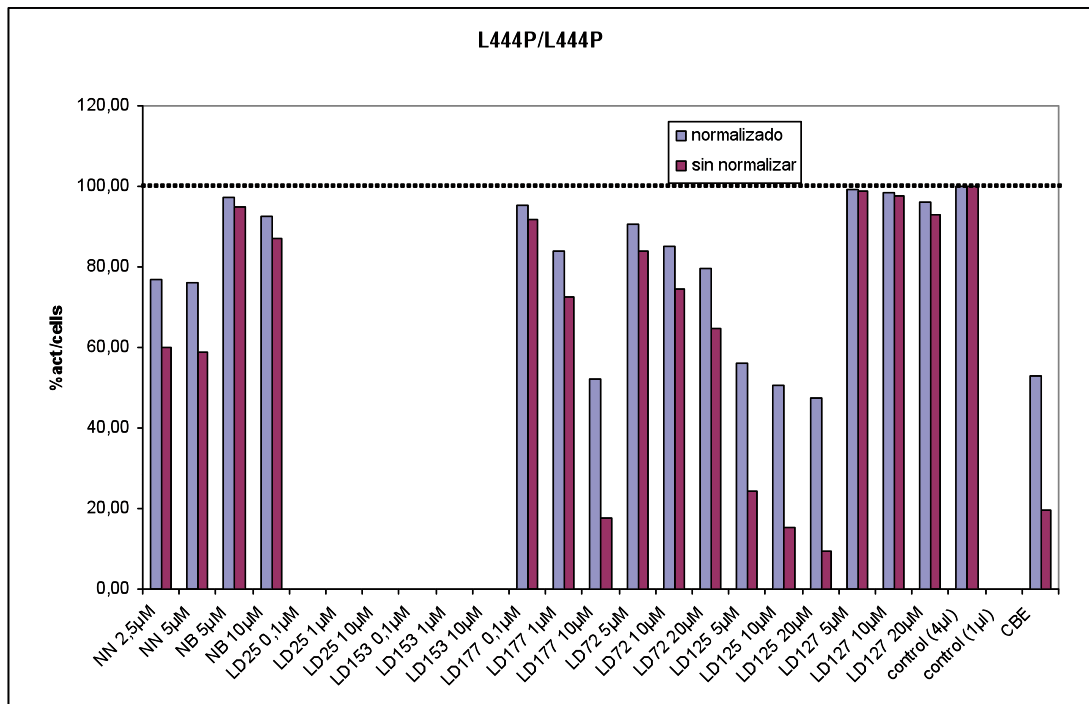
- N370S/L444P (3 tandes de 3 repeticions).



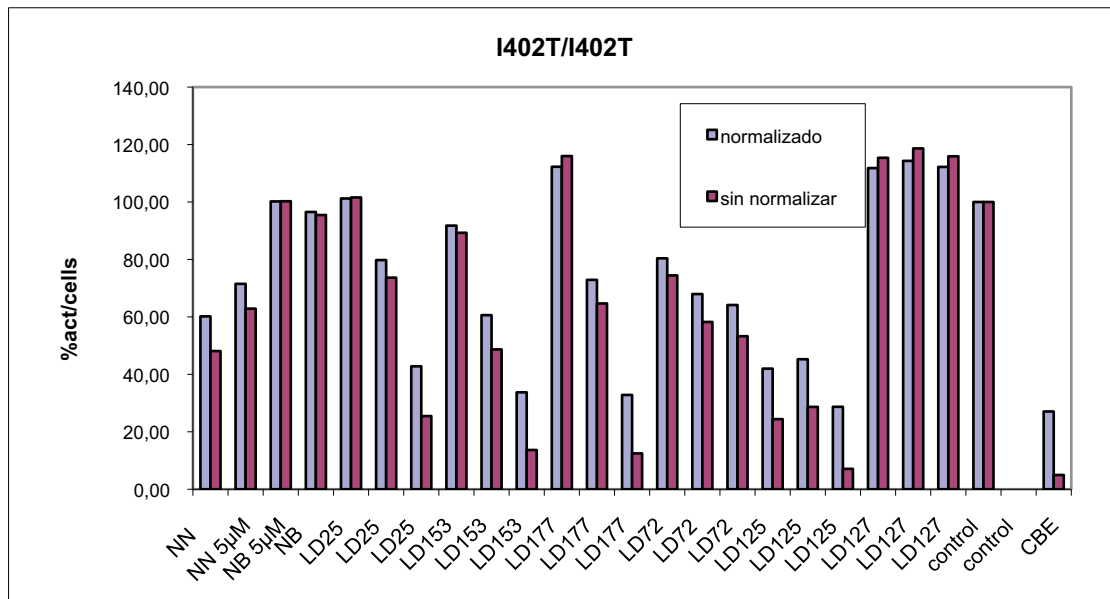


- L444P/L444P (3 tandes de 3 repeticions).

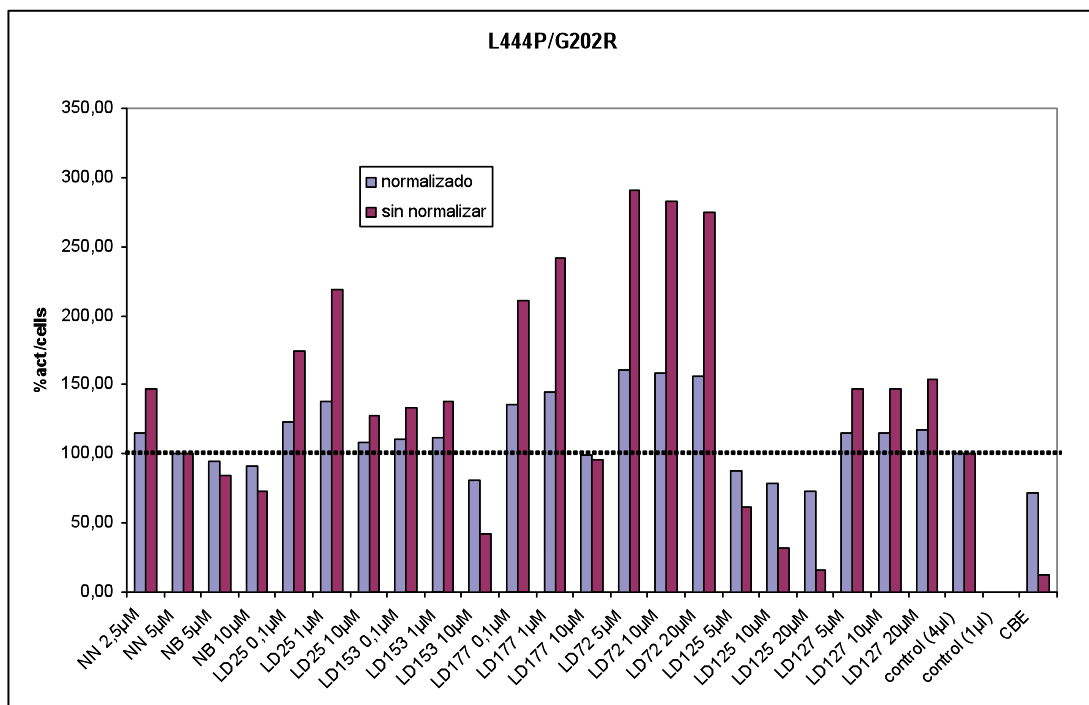




- I402T/I402T (1 tanda de 3 repeticions).



- L444P/G202R (1 tanda de 3 repeticions).



Els resultats del tractament sobre els fibroblasts portadors de les mutacions N370S/N370S, N370S/L444P i L444P/L444P ja han estat comentats en l'article.

Els iminosucres NN-DNJ (2,5 i 5 μ M) i NB-DNJ (5 i 10 μ M) i els aminociclitols 1-3 i 4-6 del manuscrit en preparació (0,1, 1 i 10 μ M i 5, 10 i 20 μ M, respectivament) han estat testats en fibroblasts amb l'al·lel salvatge i en els de pacients portadors de les següents mutacions: L444P/G202R i I402T/I402T.

Els resultats en tractar els fibroblasts de pacients durant 6 dies són els següents:

- L444P/G202R:
 - NN-DNJ: Augment del 50% a 2,5 μ M.
 - NB-DNJ: Disminució a totes les concentracions testades.
 - Aminociclitol 1 (LD153): Augment del 30-40%
 - Aminociclitol 2 (LD177): Augment del 110-140% per sota de 1 μ M.
 - Aminociclitol 3 (LD25): Augment del 75, del 120 i del 30% a cadascuna de les concentracions testades: 0,1, 1 i 10 μ M, respectivament.
 - Aminociclitol 4 (LD72): Augment del 175-190%.
 - Aminociclitol 5 (LD127): Augment del 50%.
 - Aminociclitol 6 (LD125): Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.
- I402T/I402T
 - NN-DNJ: Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.
 - NB-DNJ: Sense efectes significatius.
 - Aminociclitol 1 (LD153): Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.
 - Aminociclitol 2 (LD177): Augment d'un 15% a 0,1 μ M.
 - Aminociclitol 3 (LD25): Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.
 - Aminociclitol 4 (LD72): Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.
 - Aminociclitol 5 (LD127): Augment d'un 20%.
 - Aminociclitol 6 (LD125): Disminució de l'activitat a totes les concentracions testades.

4. DISCUSSIÓ

4.1 Sobre l'expressió d'al·lels mutats

Avui en dia, existeix gran coneixement sobre la diversitat de mutacions causants de la malaltia de Gaucher, però existeix un buit de coneixement entre la relació genotip-fenotip perquè malalts amb un mateix genotip, poden tenir diversos fenotips (Sidransky, 2004). A més a més, és possible identificar els al·lels trobats en els tres tipus de la malaltia, però això té limitada utilitat, ja que és la combinació de mutacions en els dos al·lels la que defineix el fenotip i en diferents tipus de la malaltia de Gaucher s'han trobat una mateixa mutació (Beutler, 1992; Grabowski, 1997; Sidransky et al., 1994). Per altra banda, una gran majoria de mutacions encara no s'han trobat en homozigosi, per tant la gravetat de cada mutació particular és difícil de predir, especialment aquelles trobades en baixa freqüència en la població de malalts.

La caracterització a nivell de proteïna de les mutacions causants de la malaltia de Gaucher, expressant-les individualment en cèl·lules de mamífer, aporta gran informació sobre la base molecular de la malaltia de Gaucher i sobre la relació entre l'estructura de l'enzim mutat i la seva funció residual. Utilitzant la mutagènesi dirigida i la transfecció a cèl·lules COS-7 del cDNAs mutats, hem expressat diverses de les mutacions trobades a la població espanyola de malalts de Gaucher. Per a analitzar l'impacte de cada mutació en particular en la funcionalitat de l'enzim, s'ha expressat cadascuna de les mutacions per separat i, si és el cas, en la seva combinació en al·lel doble mutant.

Tot i que existeixen altres sistemes de sobreexpressió més eficients, com és el cas de l'expressió en cèl·lules d'insecte mitjançant baculovirus (Amaral et al., 2000; Grace et al., 1994), també emprats per el nostre grup (Montfort et al., 2004), s'ha utilitzat el sistema d'expressió en cèl·lules COS per la seva rapidesa i senzillesa.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi s'han expressat en cèl·lules COS 9 mutacions de canvi d'aminoàcid, a més a més de 2 dobles mutants, la majoria identificades en pacients espanyols.

Les mutacions de canvi d'aminoàcid expressades es descriuen a continuació amb les tres nomenclatures: canvi d'aminoàcid expressat amb una lletra, canvi de nucleòtid en l'ADN codificat i canvi d'aminoàcid expressat amb tres lletres, segons la normativa recomanada per la HGVS.

- N188S (c.680 A>G, p.Asn227Ser) (Kim et al., 1996): Mai no ha estat trobada sola i s'ha considerat una mutació que dona un fenotip lleu o possiblement sigui un al·lel modificador (Montfort et al., 2004).

- G202R (c.721 G>A, p.Gly241Arg) (Beutler et al., 1994): Mutació que afecta al transport intracel·lular de la GBA i d'altres proteïnes de membrana associades al lisosoma (Schmitz et al., 2005). Trobada en homozigosi en un pacient de tipus 2 (Zimmer et al., 1999).
- H255Q (c.882 T>G, p.His294Gln) (Stone et al., 2000): Es troba sempre en formant un al·lel doble mutant amb la mutació D409H i empitjora el fenotip respecte a la mutació D409H (Michelakakis et al., 2006); (Santamaria et al., 2008).
- E326K (c.1093G>A, p.Glu365Lys) (Beutler et al., 1994): S'ha suggerit que aquesta mutació podria ser un polimorfisme, ja que mai ha estat trobada sola en un al·lel en pacients i s'ha trobat en individus control. Es considera un al·lel modificador (Chabas et al., 2005; Montfort et al., 2004).
- N370S (c.1226 A>G, p.Asn409Ser) (Tsuji et al., 1988): Mutació trobada en més del 98% dels pacients d'origen jueu i en la meitat dels pacients no jueus. Sempre associada, tant en homozigosi com en heterozigosi amb qualsevol altra mutació, al tipus 1 de la malaltia.
- G377S (c.1246 G>A; , p.Gly416Ser) (Laubscher et al., 1994): Mutació trobada amb certa prevalença en pacients portuguesos i espanyols.
- I402T (c.1322 T>C, p.Ile441Thr) (Cormand et al., 1997b): Detectada en homozigosi en un pacient italià de tipus 1.
- D409H (c.1342 G>C, p.Asp448His) (Eyal et al., 1990; Ohashi and Eto, 1989; Theophilus et al., 1989): Mutació trobada en tercer lloc en l'escala de prevalença en la població espanyola de pacients de Gaucher. Associada en homozigosi a un fenotip especial de tipus 3, que comporta calcificacions a l'aorta (Chabas et al., 1996).
- L444P (c.1448 T>C, p.Leu483Pro) (Tsuji and Suzuki, 1987): Mutació trobada en segon lloc en l'escala de prevalença en malalts no jueus. La mutació L444P en homozigosi s'associa amb un fenotip neuronopàtic 2 o 3. A la població Norrbottnian (Dahl et al., 1990), que es caracteritzen per ser portadors d'aquesta mutació, el fenotip que presenten és de tipus 3.

Els dobles mutants expressant han estat els següents:

- N188S; E326K (c.680 A>G; c.1093 G>A p.[Asn227Ser;Glu365Lys]) (Torrallba et al., 2001): Doble mutant trobat en la nostra sèrie de pacients.
- D409H;H255Q (c.1342 G>C; c.882 T>G, p.[Asp448His; His294Gln]) (Filocamo et al., 2005): Les dues mutacions van ser trobades en el mateix al·lel en homozigosi en tres pacients (1 d'origen grec i 2 d'origen albanès) (Michelakakis et al., 2006) i

posteriorment es van trobar en 5 pacients en homozigosi i en 27 en heterozigosi (Santamaria et al., 2008).

Un cop clonats els cDNA mutats en el vector pcDNA3, es van realitzar transfeccions transitòries en cèl·lules COS-7 i es va analitzar l'efecte sobre l'activitat enzimàtica de les mutacions estudiades. Per una banda, hi ha mutacions que provoquen un descens molt important de l'activitat enzimàtica, com és el cas de la L444P. Per l'altra, hi ha canvis que mantenen un percentatge d'activitat elevat, com per exemple la N188S, la H255Q i la E326K (54,84%, 77,09% i 30,51% respectivament), però no es presenten soles.

Les dades obtingudes, en general, són coherents amb la clínica que presenten els pacients portadors d'aquestes mutacions. La baixa activitat dels dobles mutants N188S;E326K i D409H;H255Q sembla ser deguda a la contribució de les dues mutacions. Podrien ser considerades al·lels modificadors les mutacions N188S i H255Q.

Hi ha casos on trobem contradiccions entre el valor de l'activitat de la proteïna expressada i la clínica del pacient portador d'aquesta mutació. Un exemple és el cas de la mutació N370S, la qual està associada a un fenotip lleu (Grabowski, 1997), però la seva activitat mesurada in vitro és relativament baixa. Una possible explicació és la gran sensibilitat respecte al pH que presenta la proteïna mutada (Lieberman et al., 2009). El lisosoma és un orgànul àcid, amb un pH al voltant de 4,5, que contrasta amb el pH lleugerament basic del citosol (pH 7,2).

Un altre cas és el de la mutació G202R, amb una activitat relativament elevada i que ha estat trobada en homozigosi un pacient de tipus 2. Aquesta mutació s'ha associat a defectes en el *trafficking*, per tant es pot deduir que la proteïna té activitat, però que no arriba al seu destí, el lisosoma (Schmitz et al., 2005).

Malgrat la variabilitat en els resultats que es troben normalment en els estudis d'expressió, els resultats obtinguts en el present treball són similars als d'algun dels estudis previs. En el cas de la mutació N370S, el nostre grup, utilitzant diferents mètodes d'expressió, baculovirus (Montfort et al., 2004) i cèl·lules COS (present treball), ha obtingut resultats similars (7,5% i 8,11%). La dependència de pH d'aquesta proteïna ha estat descrita com a dependent explicaria la gran variabilitat de resultats en diferents sistemes d'expressió, tot i que existeixi una correlació clara genotip-fenotip (mutació lleu, que no s'ha trobat mai en pacients de tipus 2 o 3).

També cal destacar el cas de la mutació L444P, la qual és present en pacients amb un fenotip molt greu. En el nostre estudi veiem un baix percentatge d'activitat, que també ha estat detectat en el grup de Torralba i col. (2001), i això correlaciona amb el fenotip descrit per a aquests pacients (afectació neuronopàtica).

El cas del doble al·lel mutant D409H;H255Q és un clar exemple de com la combinació de dues mutacions provoca un fenotip més sever que la seva presència per separat i com es correlaciona amb les dades bioquímiques que es presenten en el nostre treball, tant en COS-7, com en COS-1.

4.2 Sobres les xaperones farmacològiques

Tot i que és necessària més investigació per a entendre els mecanismes patològics de la malaltia de Gaucher, és evident que l'acumulació de glucoesfingolípids és un factor determinant per al desenvolupament de la malaltia de Gaucher.

La primera estratègia terapèutica, la ERT als anys 90, va anar dirigida a disminuir la concentració cel·lular glicoesfingolípids introduint enzims exògens. Primer va sorgir l'alglucerasa (Barton et al., 1990) i més tard la imiglucerasa, una forma recombinant de glucocerebrosidasa (Zimran et al., 1995). Desgraciadament aquest tractament està només indicat per al tipus 1 de la malaltia, ja que l'enzim és incapaç de creuar la barrera hematoencefàlica. A més a més, s'ha de rebre de manera continuada, durant tota la vida i és molt car.

Posteriorment es va iniciar una aproximació terapèutica diferent basada en la inhibició de la biosíntesi del substrat, la SRT, mitjançant petites molècules com la NB-DNJ (Cox et al., 2000) i es va demostrar una millora dels símptomes dels pacients tipus 1, similars als descrits en pacients tractats amb ERT. La NB-DNJ va ser aprovada al 2003 com a tractament per a la malaltia de Gaucher. Tal i com passa amb l'imiglucerasa, aquest és un tractament que té inconvenients: es necessiten grans dosis i té efectes secundaris. A més a més, tampoc és un tractament que serveixi per a millorar els símptomes neurològics.

La utilització de petites molècules com a teràpia és una nova línia de recerca que ha estat testada en patologies com la diabetes (Milne et al., 2007) i el càncer (Hoeller and Dikic, 2009) amb més o menys èxit.

En el cas de les malalties d'acúmulo lisosòmic, els avenços en la malaltia de Fabry i la de Gaucher han marcat un punt d'inflexió (Fan, 2003). Aquesta nova línia terapèutica està basada en el comportament paradoxal d'inhibidors competitius reversibles, que a baixes concentracions (sub-inhibidores) tenen la capacitat d'actuar com a xaperones que indueixen o estableixen la conformació apropiada de l'enzim mutat. Aquest enfocament contrari a la intuïció ha de ser racionalitzat entenent que l'enzim mutat està mal plegat i/ o és inestable, però encara té intacte el centre catalític (Fan, 2008; Yu et al., 2007a). Els inhibidors competitius reversibles estableixen l'estructura tridimensional de les proteïnes mutades, prevenint la degradació de les mateixes abans de ser transportades al lisosoma (Fan, 2003).

La teràpia amb xaperones farmacològiques és molt prometedora ja que és una estratègia que combina els beneficis d'una teràpia amb molècules petites, com la

biodisponibilitat en fer un tractament oral i la possibilitat de creuar la barrera hematoencefàlica, amb l'especificitat d'una aproximació dirigida a un enzim concret. Entre els productes testats trobem que alguns iminosucres han estat emprats per al tractament d'esfigolipidosis: com la malaltia de Fabry (Asano et al., 2000; Fan et al., 1999), la gangliosidosi GM1 (Matsuda et al., 2003) i GM2 (Tropak et al., 2004), tant en models cel·lulars com animals.

En la malaltia de Fabry (Fan et al., 1999), l'administració oral a ratolins transgènics de la 1-deoxi-galactonojirimicina (DGJ) semblava accelerar el transport i la maduració de l'enzim mutat (α -galactosidasa A).

Més endavant, tractant cultius de limfoblasts de pacients amb la malaltia de Fabry amb la DGJ, l' α -galacto-homonojirimicina, l' α -alo-homonojirimicina i la beta-1-C-butil-deoxigalactonojirimicina es va detectar un augment de l'activitat intracel·lular de l' α -galactosidasa A (Asano et al., 2000).

Tant en cultius de fibroblasts humans com murins (Matsuda et al., 2003), el fet d'afegir N-octil-4-epi-beta-valienamina (NOEV) restablia l'activitat de l'enzim mutat i per tant disminuïa notablement l'emmagatzematge del substrat intracel·lular acumulat en la gangliosidosi GM1.

En fibroblasts de pacients amb malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff (Tropak et al., 2004), es va aconseguir augmentar la proteïna residual i l'activitat de l'hexosaminidasa A amb els següents inhibidors: N-Acetil-galactosamina (GalNAc), NN-DNJ, 2-Acetamido-1,2-dideoxinojirimicina (AdDNJ), 2-Acetamido-2-deoxinojirimicina (ADNJ), N-Acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), castanospermina (CAS), 6-Acetamido-6-deoxycastanospermina (ACAS).

Per a la malaltia de Gaucher, els iminosucres NN-DNJ i IFG han estat testats en fibroblasts de pacients (Sawkar et al., 2002; Steet et al., 2006). En cèl·lules COS-7, s'ha testat la NB-DNJ (Alfonso et al., 2005). En la figura D.1 podem veure les estructures moleculars dels tres iminosucres mencionats.

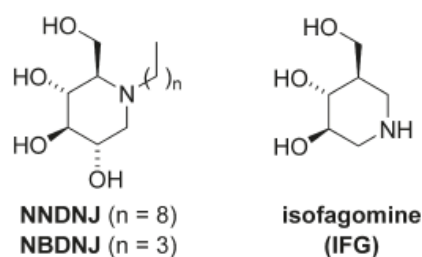


Figura D.1. Estructura química dels iminosucres NN-DNJ, NB-DNJ i IFG.

En afegir la N-(n-nonil)deoxinojirimicina (NN-DNJ) a concentracions subinhibidores en cultius de fibroblasts de pacients portadors de la mutació N370S es va aconseguir augmentar l'activitat de la GBA mutada i mantenir aquest augment fins a 6 dies després del tractament (Sawkar et al., 2002). La NN-DNJ també va augmentar l'activitat de la glucocerebrosidasa salvatge, però no la de la L444P.

Posteriorment, la IFG també es va descriure com un inhibidor que augmentava l'activitat de la glucocerebrosidasa amb la mutació N370S (Steet et al., 2006), mitjançant diversos mecanismes. Principalment, la IFG permetia el plegament i el transport de la glucocerebrosidasa sintetitzada al reticle endoplasmàtic, augmentant així la quantitat de l'enzim al lisosoma.

En afegir la NB-DNJ a cultius de cèl·lules COS-7, es va veure un augment d'activitat tant en les portadores de l'al·lel salvatge com de les mutacions: V15M, M123T, S364R i N370S (Alfonso et al., 2005). En canvi, no es van detectar canvis significatius en les proteïnes mutades L336P, L444P i S465del o fins i tot una disminució en la P266L.

En el nostre estudi, un cop caracteritzades les mutacions mitjançant l'expressió transitoria en cèl·lules COS-7, es va analitzar l'activitat GBA de cèl·lules COS-7 transfectades de manera estable i de fibroblasts de pacients, tractats durant 6 dies amb els iminosucres coneguts (NN-DNJ i NB-DNJ) com a control positiu i deu nous compostos del tipus aminociclitol (Diaz et al., 2010; Egido-Gabas et al. 2005; Sanchez-Olle et al. 2009; Manuscrit en preparació).

L'anàlisi de l'activitat en cèl·lules COS-7 ens serveix per estudiar l'efecte de les mutacions de manera individual i l'efecte de la possible xaperona farmacològica sobre cadascuna d'aquestes proteïnes mutades, podent establir una hipòtesi sobre el mecanisme d'acció de la xaperona en els fibroblasts de pacients.

S'ha establert un paradigma: una mutació un compost. Això s'engloba en el marc de la medicina personalitzada, que comença a ser una realitat en la teràpia molecular, concretament en el món de l'oncologia.

Cal tenir en compte que l'expressió heteròloga es pot utilitzar com una eina de cribatge per la detecció de possibles xaperones, però els resultats s'han de confirmar en cèl·lules de pacients, ja que l'expressió heteròloga pot induir a conclusions errònies. Per exemple, quan mesurem l'activitat de la proteïna amb la mutació N370S,

aquesta pot resultar força variable si no es té en compte el pH òptim en què l'enzim necessita ser testat, com ja hem mencionat anteriorment.

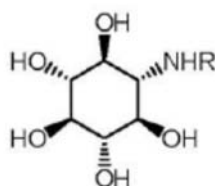
Per altra banda, el fet de treballar amb cèl·lules transfectades estables pot fer que l'expressió de l'enzim sigui clonal i pot donar resultats amb una gran variabilitat entre ells. A més a més, hi ha la manca de control en el lloc d'integració de l'ADN transfectat. És un efecte que s'ha detectat en fer diverses repeticions de l'experiment i que deduïm que és extensible a altres estudis publicats (Alfonso et al., 2005). La gran variabilitat de resultats obtinguts en cèl·lules COS que es plasmen en desviacions estàndard majors del 20% fa que el sistema sigui només una eina de cribatge.

En el nostre primer treball, vam expressar de manera estable tant l'al·lel salvatge com els mutants: N188S, G202R, H255Q, E326K, N370S, G377S, I402T, D409H, L444P, N188S;E326K i H255Q;D409H.

En tractar les cèl·lules durant 6 dies amb NN-DNJ es va detectar un increment de l'activitat en cèl·lules portadores de l'al·lel N188S. No va ser tan significatiu l'augment en les N370S, però sí en les G377S i l'al·lel salvatge.

Els nostres resultats del tractament amb la NB-DNJ van ser similars als publicats prèviament per Alfonso i col·laboradors (Alfonso et al., 2005) en que augmentava l'activitat de la GBA en cèl·lules COS transfectades amb l'al·lel salvatge. No podem dir el mateix per la N370S.

Pel que fa als aminocyclitols testats (figura D.2), només el compost 1 va tenir un efecte clar tant sobre la proteïna salvatge com en les mutades N188S i N188S;E326K en cèl·lules COS. Els altres compostos no van tenir cap efecte (compostos 2 i 3) o aquest va ser inhibitori (compost 4).



aminocyclitol 1, R= PhBu
 aminocyclitol 2, R= $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$
 aminocyclitol 3, R= $n\text{-C}_9\text{H}_{19}$
 aminocyclitol 4, R= $n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$

Figura D.2. Aminocyclitols emprats tant en cèl·lules COS-7 com en fibroblasts de pacients.

Un cop realitzat el cribratge en les cèl·lules COS i seguint els paràmetres publicats per estudis anteriors (Sawkar et al., 2002) es va procedir a l'anàlisi de les activitats sobre fibroblasts de pacients (a l'Institut de Bioquímica Clínica).

En la primera publicació (Sanchez-Olle et al., 2009), disposàvem de fibroblasts de pacients portadors de les següents mutacions: N370S/N370S, N370S/L444P, L444P/L444P, D409H/N188S;E326K, D409H/D409H, I402T/I402T, L444P/G202R, D409H/L444P;E326K i L444P;E326K/G202R.

La NN-DNJ incrementava l'activitat no només dels fibroblasts amb el genotip N370S/N370S, com s'havia publicat anteriorment (Sawkar et al., 2002), sinó també dels que portaven les mutacions N370S/L444P i D409H/N188S;E326K.

Com era la primera vegada que es testava l'aminosucre NB-DNJ en fibroblasts, no disposàvem de referents. Els resultats no van ser positius amb aquests compostos per cap de les proteïnes mutades.

Pel que fa als aminociclitols testats en aquest treball, només el compost 4 va demostrar tenir clars efectes positius i va ser en fibroblasts de pacients portadors de les mutacions L444P/G202R i L444P/E326K;G202R. Els altres compostos van tenir efectes inhibidors (compost 1) o no van tenir cap efecte (compostos 2 i 3).

En conjunt, veiem que els nostres resultats han estat subòptims o parcials. Per aquest motiu, seguint aquesta línia de treball i volent millorar els resultats obtinguts, s'han analitzat una nova sèrie de compostos (Diaz et al., 2010). L'estratègia per a seleccionar-los ha estat la mateixa, és a dir, s'han escollit els compostos que tenien gran capacitat d'inhibició i no eren tòxics a concentracions inhibidores.

En el manuscrit en preparació es descriu com s'han testat nous derivats d'aminociclitols (Diaz et al., 2010) com a possibles xaperones farmacològiques tant en fibroblasts control com en els de pacients portadors de les següents mutacions: L444P/G202R, I402T/I402T, N370S/N370S, N370S/L444P i L444P/L444P .

Alguns dels nous compostos eren millors inhibidors (IC_{50} menor), per tant han estat emprats a menor concentració; concretament han estat testats a 10 i 100 unitats de magnitud menys (0,1 i 1 μ M).

Aquest segon grup de compostos (figura D.3) han donat millor resultat com a xaperones farmacològiques que els anteriors ja que l'augment d'activitat enzimàtica ha estat significatiu, no tan sols en els fibroblasts control, sinó també en els portadors d'al·lels mutants.

Seria interessant testar aquest compostos i altres a concentracions 10 unitats de magnitud menor, ja que encara s'observa, en alguns d'ells, inhibició de l'activitat de la GBA. En la taula podem veure les característiques inhibidores corresponents als diferents compostos.

Taula D.1. Característiques dels compostos estudiats

Compost	IC ₅₀ pH 5,2 (mM)	IC ₅₀ pH 7.4 (mM)	Ki (mM)	% inhibició
1	0,05	0,06	0,05	93
2	0,12	0,10	0,05	97
3	0,10	0,09	0,09	90
4	0,20	0,20	0,33	50
5	44,7	11,0	(nd)	<5
6	25,4	4,9	20,2	50
7	1,5	0,30	0,29	30
8	1,8	1,3	0,89	28
9	3,5	1,2	7,6	20

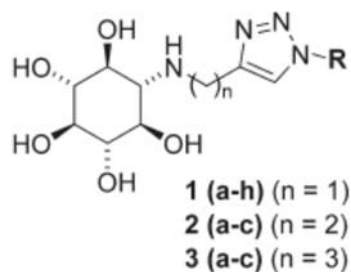


Figura D.3. Estructura dels compostos dissenyats per a aquest estudi.

També seria interessant utilitzar com a control un altre compost: la IFG. S'ha demostrat que té gran efecte en fibroblasts de pacients portadors de diferents mutacions (Lieberman et al., 2007) i els assaigs clínics han arribat a la fase 2 (Weinreb, 2008).

S'ha demostrat que té efecte sobre el mutant N370S ja que permet el transport de l'enzim als lisosomes i augmenta l'activitat (Lieberman et al., 2007; Steet et al., 2006), fet que ja s'havia evidenciat amb altres xaperones farmacològiques. No obstant, la IFG també és capaç d'augmentar l'activitat de la glucocerebrosidasa amb

la mutació L444P (Khanna et al., 2010), tan sols demostrat anteriorment per la α -1-C-octyl-DNJ (CO-DNJ) (Yu et al., 2006).

La majoria de les xaperones estudiades per a millorar l'activitat de la glucocerebrosidasa són iminosucres o anàlegs derivats del substrat natural de l'enzim, la glucosilceramida (Compain et al., 2006; Chang et al., 2006; Egido-Gabas et al., 2007; Lei et al., 2007; Sawkar et al., 2006; Steet et al., 2006; Wang et al., 2009; Yu et al., 2006; Yu et al., 2007b). S'ha demostrat que els iminosucres tenen capacitat per augmentar l'activitat de la glucocerebrosidasa, però els seus derivats són inespecífics i tenen una vida mitja curta dins les cèl·lules (Butters et al., 2005). Per tant, altres petites molècules amb activitat xaperona no derivades de sucres han començat a sorgir com a eines de recerca i com a punt de partida per al desenvolupament de noves teràpies per a la malaltia de Gaucher.

Per exemple, Zheng i col·laboradors descriuen tres tipus d'inhibidors no derivats de sucres: anàlegs d' aminoquinolines, anàlegs de sulfonamides i anàlegs de triazines (Zheng et al., 2007). Aquests compostos tenen potència i eficàcia comparable a la NB-DNJ, a la NN-DNJ, a la IFG i a l'epòxid- β -conduritol.

Més recentment han sorgit altres compostos que han estat testats en fibroblasts de pacients: compostos que bloquegen el canal de calci (diltiazem i verapamil) (Rigat and Mahuran, 2009), inhibidors del canal de sodi (ambroxol) (Maegawa et al., 2009), anàlegs quinazolina (Marugan et al., 2011) i α -1-C-nonylimino-d-xylitol (α -C9-DIX) (Oulaidi et al., 2011).

Les dades recents presentades, tant per Khanna i col·laboradors (2010) com per altres autors, fan pensar que les xaperones farmacològiques podrien arribar a ser un tractament tant per les formes no neuronopàtiques com per a les neuronopàtiques de la malaltia de Gaucher.

5. CONCLUSIONS

Les conclusions principals sobre els estudis d'expressió *in vitro* han estat els següents:

- La presència de la mutació H255Q en el mateix al·lel que la mutació D409H pot explicar les discordàncies de fenotip entre portadors de la mutació D409H.
- Els estudis d'expressió *in vitro* en cèl·lules COS-1 confirmen l'efecte aditiu de les dues mutacions en el doble mutant.
- Els estudis d'expressió *in vitro* en cèl·lules COS-7 transfectades de manera transitòria amb cDNAs portadors de diferents mutacions han posat de manifest que els enzims mutants portadors dels canvis N188S, H255Q i E326K presenten l'activitat residual més elevada (53,84%, 77,09% i 30,51%, respectivament).
- Les mutacions G202R (24,84%), G377S (26,10%) i I402T (19,37%) són bones candidates a ser corregides per a xaperones farmacològiques ja que mantenen una activitat residual relativament alta.

Els efectes com a xaperones farmacològiques sobre l'activitat GBA dels compostos analitzats en cèl·lules COS-7 transfectades de manera estable han estat els següents:

- L'iminosucre NN-DNJ va tenir un efecte positiu per als al·lells: salvatge, N188S, G377S i N188S;E326K.
- L'iminosucre NB-DNJ va tenir efecte positiu per als al·lells N188S i N188S;E326K.
- L'aminociclitol 1 va tenir efecte positiu per als al·lells N188S, N370S i N188S;E326K.
- Els aminociclitols 2, 3 i 4 no van tenir cap efecte positiu significatiu per cap mutació.

Els efectes com a xaperones farmacològiques sobre l'activitat GBA dels compostos analitzats en fibroblasts de pacients han estat els següents:

- L'iminosucre NN-DNJ va tenir efecte positiu per als portadors dels genotips N370S/N370S, N370S/L444P, D409H/N188S;E326K i L444P/G202R.
- L'aminociclitol 4 va tenir efecte positiu per als portadors dels genotips L444P/G202R i L444P;E326K/G202R.
- Els aminociclitols 1, 2, i 4 no van tenir cap efecte positiu sobre els fibroblasts de pacients testats.

Els resultats preliminars dels efectes com a xaperones farmacològiques de la nova serie de productes sobre l'activitat GBA dels compostos analitzats en fibroblasts de pacients han estat els següents:

- El nou compost 1 té efecte positiu sobre els portadors del genotip L444P/G202R.
- El nou compost 2 té efecte positiu sobre els portadors dels genotips: L444P/G202R, N370S/N370S i N370S/L444P.
- El nou compost 3 té efecte positiu sobre els portadors dels genotips: L444P/G202R i N370S/N370S.
- El nou compost 4 té efecte positiu sobre els portadors dels genotips: L444P/G202R i N370S/N370S.
- El nou compost 5 té efecte positiu sobre els portadors dels genotips: L444P/G202R, I402T/I402T, N370S/N370S i N370S/L444P.
- El nou compost 6 no té cap efecte positiu sobre els fibroblasts de pacients testats.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Abel E.L. (2001) *Jewish Genetic Disorders: A Layman's Guide* McFarland and Company, Inc., Jefferson, North Carolina.
- Aerts J.M., Yasothan U., Kirkpatrick P. (2010) Velaglucerase alfa. *Nat Rev Drug Discov* 9:837-8.
- Alfonso P., Rodriguez-Rey J.C., Ganan A., Perez-Calvo J.I., Giralto M., Giraldo P., Pocovi M. (2004) Expression and functional characterization of mutated glucocerebrosidase alleles causing Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis* 32:218-25.
- Alfonso P., Pampin S., Estrada J., Rodriguez-Rey J.C., Giraldo P., Sancho J., Pocovi M. (2005) Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells Mol Dis* 35:268-76.
- Amaral O., Marcao A., Sa Miranda M., Desnick R.J., Grace M.E. (2000) Gaucher disease: expression and characterization of mild and severe acid beta-glucosidase mutations in Portuguese type 1 patients. *Eur J Hum Genet* 8:95-102.
- Amsallem D., Rodriguez D., Vanier M.T., Khayat N., Millat G., Campello M., Guillaume C., Billette De Villemeur T. (2005) Third case of Gaucher disease with SAP-C deficiency and evaluation of twelve months therapy by miglustat. *J Inherit Metab Dis* 28(Suppl 1):1.
- Armstrong L.C., Komiya T., Bergman B.E., Mihara K., Bornstein P. (1997) Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J Biol Chem* 272:6510-8.
- Asano N., Ishii S., Kizu H., Ikeda K., Yasuda K., Kato A., Martin O.R., Fan J.Q. (2000) In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur J Biochem* 267:4179-86.

Aviezer D., Brill-Almon E., Shaaltiel Y., Hashmueli S., Bartfeld D., Mizrachi S., Liberman Y., Freeman A., Zimran A., Galun E. (2009) A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation. *PLoS One* 4:e4792.

B

Bar-Am I., Avivi L., Horowitz M. (1996) Assignment of the human prosaposin gene (PSAP) to 10q22.1 by fluorescence in situ hybridization. Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4;26) fusion site. *Cytogenet Cell Genet* 72:316-8.

Barneveld R.A., Keijzer W., Tegelaers F.P., Ginns E.I., Geurts van Kessel A., Brady R.O., Barranger J.A., Tager J.M., Galjaard H., Westerveld A., Reuser A.J. (1983) Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet* 64:227-31.

Barranger J.M., Novelli E.A. (2001) Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther* 1:857-67.

Barton N.W., Furbish F.S., Murray G.J., Garfield M., Brady R.O. (1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1913-6.

Berent S.L., Radin N.S. (1981) Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochim Biophys Acta* 664:572-82.

Berg-Fussman A., Grace M.E., Ioannou Y., Grabowski G.A. (1993) Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem* 268:14861-6.

Beutler E. (1992) Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* 256:794-9.

- Beutler E., West C., Gelbart T. (1992) Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene. *Genomics* 12:795-800.
- Beutler E., Nguyen N.J., Henneberger M.W., Smolec J.M., McPherson R.A., West C., Gelbart T. (1993) Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 52:85-8.
- Beutler E., Demina A., Gelbart T. (1994) Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. *Mol Med* 1:82-92.
- Boot R.G., Verhoek M., de Fost M., Hollak C.E., Maas M., Bleijlevens B., van Breemen M.J., van Meurs M., Boven L.A., Laman J.D., Moran M.T., Cox T.M., Aerts J.M. (2004) Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 103:33-9.
- Brady R.O., Pentchev P.G., Gal A.E., Hibbert S.R., Dekaban A.S. (1974) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 291:989-93.
- Brown C.R., Hong-Brown L.Q., Biwersi J., Verkman A.S., Welch W.J. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1:117-25.
- Bultron G., Kacena K., Pearson D., Boxer M., Yang R., Sathe S., Pastores G., Mistry P.K. (2010) The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 33:167-73.
- Butters T.D., Dwek R.A., Platt FM. (2005) Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. *Glycobiology* 15:43R-52R.

C

- Cantz M., Kresse H. (1974) Sandhoff disease: defective glycosaminoglycan catabolism in cultured fibroblasts and its correction by beta-N-acetylhexosaminidase. *Eur J Biochem* 47:581-90.

- Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. (2008) Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Lett* 264:1-10.
- Causeret C., Geeraert L., Van der Hoeven G., Mannaerts G.P., Van Veldhoven P.P. (2000) Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity. *Lipids* 35:1117-25.
- Compain P., Martin O.R., Boucheron C., Godin G., Yu L., Ikeda K., Asano N. (2006) Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *Chembiochem* 7:1356-9.
- Cormand B., Montfort M., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. (1997a) Genetic fine localization of the beta-glucocerebrosidase (GBA) and prosaposin (PSAP) genes: implications for Gaucher disease. *Hum Genet* 100:75-9.
- Cormand B., Grinberg D., Gort L., Chabas A., Vilageliu L. (1998) Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 11:295-305.
- Cormand B., Grinberg D., Gort L., Fiumara A., Barone R., Vilageliu L., Chabas A. (1997b) Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 70:437-43.
- Cox T., Lachmann R., Hollak C., Aerts J., van Weely S., Hrebicek M., Platt F., Butters T., Dwek R., Moyses C., Gow I., Elstein D., Zimran A. (2000) Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355:1481-5.
- Cox T.M. (2001) Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2:106-21; discussion 87-8.
- Cox T.M. (2010) Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. *Biologics* 4:299-313.
- Cox T.M., Aerts J.M., Belmatoug N., Cappellini M.D., vom Dahl S., Goldblatt J., Grabowski G.A., Hollak C.E., Hwu P., Maas M., Martins A.M., Mistry P.K., Pastores G.M., Tylki-Szymanska A., Yee J., Weinreb N. (2008) Management

of non-neuronopathic Gaucher disease with special reference to pregnancy, splenectomy, bisphosphonate therapy, use of biomarkers and bone disease monitoring. *J Inherit Metab Dis* 31:319-36.

Chabas A., Cormand B., Balcells S., Gonzalez-Duarte R., Casanova C., Colomer J., Vilageliu L., Grinberg D. (1996) Neuronopathic and non-neuronopathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain. *J Inherit Metab Dis* 19:798-800.

Chabas A., Gort L., Diaz-Font A., Montfort M., Santamaria R., Cidras M., Grinberg D., Vilageliu L. (2005) Perinatal lethal phenotype with generalized ichthyosis in a type 2 Gaucher disease patient with the [L444P;E326K]/P182L genotype: effect of the E326K change in neonatal and classic forms of the disease. *Blood Cells Mol Dis* 35:253-8.

Chang H.H., Asano N., Ishii S., Ichikawa Y., Fan J.Q. (2006) Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *FEBS J* 273:4082-92.

Charrow J., Dulisse B., Grabowski G.A., Weinreb N.J. (2007) The effect of enzyme replacement therapy on bone crisis and bone pain in patients with type 1 Gaucher disease. *Clin Genet* 71:205-11.

Check E. (2005) A crucial test. *Nat Med* 11:243-4.

Choy F.Y., Wei C., Levin D. (1996) Gaucher disease: functional expression of the normal glucocerebrosidase and Gaucher T1366G and G1604A alleles in Baculovirus-transfected *Spodoptera frugiperda* cells. *Am J Med Genet* 65:184-9.

D

Dahl N., Lagerstrom M., Erikson A., Pettersson U. (1990) Gaucher disease type III (Norrbottnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *Am J Hum Genet* 47:275-8.

- Damiano A.M., Pastores G.M., Ware J.E., Jr. (1998) The health-related quality of life of adults with Gaucher's disease receiving enzyme replacement therapy: results from a retrospective study. *Qual Life Res* 7:373-86.
- de Alba E., Weiler S., Tjandra N. (2003) Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 42:14729-40.
- De Duve C. (1963) The lysosome. *Sci Am* 208:64-72.
- De Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60:604-17.
- Diaz A., Montfort M., Cormand B., Zeng B., Pastores G.M., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. (1999) Gaucher disease: the N370S mutation in Ashkenazi Jewish and Spanish patients has a common origin and arose several thousand years ago. *Am J Hum Genet* 64:1233-8.
- Diaz A., Montfort M., Cormand B., Zeng B., Pastores G.M., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. (2000) On the age of the most prevalent Gaucher disease-causing mutation, N370S. *Am J Hum Genet* 66:2014-5.
- Diaz-Font A., Chabas A., Grinberg D., Vilageliu L. (2006) RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: A preliminary study towards a therapeutic strategy for Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. *Blood Cells Mol Dis* 37:197-203.
- Diaz-Font A., Cormand B., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. (2003) Unsuccessful chimera-plast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 31:183-6.
- Diaz-Font A., Cormand B., Santamaria R., Vilageliu L., Grinberg D., Chabas A. (2005) A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. *Hum Genet* 117:275-7.
- Diaz L., Bujons J., Casas J., Llebaria A., Delgado A. (2010) Click chemistry approach to new N-substituted aminocyclitols as potential pharmacological chaperones for Gaucher disease. *J Med Chem* 53:5248-55.

Dvir H., Harel M., McCarthy A.A., Toker L., Silman I., Futerman A.H., Sussman J.L. (2003) X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 4:704-9.

Dwek R.A., Butters T.D., Platt F.M., Zitzmann N. (2002) Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discov* 1:65-75.

E

Egido-Gabas M., Serrano P., Casas J., Llebaria A., Delgado A. (2005) New aminocyclitols as modulators of glucosylceramide metabolism. *Org Biomol Chem* 3:1195-201.

Egido-Gabas M., Canals D., Casas J., Llebaria A., Delgado A. (2007) Aminocyclitols as pharmacological chaperones for glucocerebrosidase, a defective enzyme in Gaucher disease. *ChemMedChem* 2:992-4.

Enquist I.B., Nilsson E., Mansson J.E., Ehinger M., Richter J., Karlsson S. (2009) Successful low-risk hematopoietic cell therapy in a mouse model of type 1 Gaucher disease. *Stem Cells* 27:744-52.

Enquist I.B., Nilsson E., Ooka A., Mansson J.E., Olsson K., Ehinger M., Brady R.O., Richter J., Karlsson S. (2006) Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13819-24.

Enquist I.B., Lo Bianco C., Ooka A., Nilsson E., Mansson J.E., Ehinger M., Richter J., Brady R.O., Kirik D., Karlsson S. (2007) Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17483-8.

Erikson A. (1986) Gaucher disease--Norrbottnian type (III). Neuropaediatric and neurobiological aspects of clinical patterns and treatment. *Acta Paediatr Scand Suppl* 326:1-42.

Erikson A., Forsberg H., Nilsson M., Astrom M., Mansson J.E. (2006) Ten years' experience of enzyme infusion therapy of Norrbottnian (type 3) Gaucher disease. *Acta Paediatr* 95:312-7.

Eyal N., Wilder S., Horowitz M. (1990) Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene* 96:277-83.

F

Fabrega S., Durand P., Codogno P., Bauvy C., Delomenie C., Henrissat B., Martin B.M., McKinney C., Ginns E.I., Mornon J.P., Lehn P. (2000) Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology* 10:1217-24.

Fan J.Q. (2003) A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci* 24:355-60.

Fan J.Q. (2008) A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 389:1-11.

Fan J.Q., Ishii S., Asano N., Suzuki Y. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 5:112-5.

Filocamo M., Grossi S., Stroppiano M., Tortori-Donati P., Regis S., Allegri A., Di Rocco M. (2005) Homozygosity for a non-pseudogene complex glucocerebrosidase allele as cause of an atypical neuronopathic form of Gaucher disease. *Am J Med Genet A* 134A:95-6.

Fleshner P.R., Aufses A.H., Jr., Grabowski G.A., Elias R. (1991) A 27-year experience with splenectomy for Gaucher's disease. *Am J Surg* 161:69-75.

Frustaci A., Chimenti C., Ricci R., Natale L., Russo M.A., Pieroni M., Eng C.M., Desnick R.J. (2001) Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med* 345:25-32.

Fujita N., Suzuki K., Vanier M.T., Popko B., Maeda N., Klein A., Henseler M., Sandhoff K., Nakayasu H. (1996) Targeted disruption of the mouse sphingolipid activator protein gene: a complex phenotype, including severe leukodystrophy and wide-spread storage of multiple sphingolipids. *Hum Mol Genet* 5:711-25.

Furbish F.S., Steer C.J., Krett N.L., Barranger J.A. (1981) Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim Biophys Acta* 673:425-34.

Furst W., Machleidt W., Sandhoff K. (1988) The precursor of sulfatide activator protein is processed to three different proteins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369:317-28.

Futerman A.H., Hannun Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5:777-82.

Futerman A.H., van Meer G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:554-65.

G

Gamper H.B., Jr., Cole-Strauss A., Metz R., Parekh H., Kumar R., Kmiec E.B. (2000) A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* 39:5808-16.

Gangoiti P., Camacho L., Arana L., Ouro A., Granado M.H., Brizuela L., Casas J., Fabrias G., Abad J.L., Delgado A., Gomez-Munoz A. (2010) Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res* 49:316-34.

Ginns E.I., Choudary P.V., Martin B.M., Winfield S., Stubblefield B., Mayor J., Merkle-Lehman D., Murray G.J., Bowers L.A., Barranger J.A. (1984) Isolation of cDNA clones for human beta-glucocerebrosidase using the lambda gt11 expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 123:574-80.

Glenn D., Gelbart T., Beutler E. (1994) Tight linkage of pyruvate kinase (PKLR) and glucocerebrosidase (GBA) genes. *Hum Genet* 93:635-8.

Goker-Alpan O., Hruska K.S., Orvisky E., Kishnani P.S., Stubblefield B.K., Schiffmann R., Sidransky E. (2005) Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. *J Med Genet* 42:e37.

- Goldblatt J., Sacks S., Dall D., Beighton P. (1988) Total hip arthroplasty in Gaucher's disease. Long-term prognosis. *Clin Orthop Relat Res*:94-8.
- Grabowski G.A. (1993) Gaucher disease. Enzymology, genetics, and treatment. *Adv Hum Genet* 21:377-441.
- Grabowski G.A. (1997) Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genet Test* 1:5-12.
- Grabowski G.A., White W.R., Grace M.E. (1989) Expression of functional human acid beta-glucosidase in COS-1 and *Spodoptera frugiperda* cells. *Enzyme* 41:131-42.
- Grabowski G.A., Barton N.W., Pastores G., Dambrosia J.M., Banerjee T.K., McKee M.A., Parker C., Schiffmann R., Hill S.C., Brady R.O. (1995) Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 122:33-9.
- Grace M.E., Graves P.N., Smith F.I., Grabowski G.A. (1990) Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis. Identification of residues critical to catalysis and evidence for causality of two Ashkenazi Jewish Gaucher disease type 1 mutations. *J Biol Chem* 265:6827-35.
- Grace M.E., Newman K.M., Scheinker V., Berg-Fussman A., Grabowski G.A. (1994) Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* 269:2283-91.
- Grace M.E., Ashton-Prolla P., Pastores G.M., Soni A., Desnick R.J. (1999) Non-pseudogene-derived complex acid beta-glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 gaucher disease. *J Clin Invest* 103:817-23.

H

- Hakomori S. (2000) Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj J* 17:627-47.

- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-6.
- Hannun Y.A., Obeid L.M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-50.
- Harper S.Q., Staber P.D., He X., Eliason S.L., Martins I.H., Mao Q., Yang L., Kotin R.M., Paulson H.L., Davidson B.L. (2005) RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5820-5.
- Hazkani-Covo E., Altman N., Horowitz M., Graur D. (2002) The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem-duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J Mol Evol* 54:30-4.
- Hers H.G. (1963) alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86:11-6.
- Hers H.G. (1965) Inborn Lysosomal Diseases. *Gastroenterology* 48:625-33.
- Hodanova K., Melkova Z., Horowitz M., Hrebicek M. (2003) Transient expression of wild-type and mutant glucocerebrosidases in hybrid vaccinia expression system. *Eur J Hum Genet* 11:369-74.
- Hoeller D., Dikic I. (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458:438-44.
- Hollak C.E., van Weely S., van Oers M.H., Aerts J.M. (1994) Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93:1288-92.
- Horowitz M., Wilder S., Horowitz Z., Reiner O., Gelbart T., Beutler E. (1989) The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics* 4:87-96.
- Hruska K.S., LaMarca M.E., Scott C.R., Sidransky E. (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* 29:567-83.

I

Ichikawa S., Hirabayashi Y. (1998) Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8:198-202.

Imai K., Nakamura M., Yamada M., Asano A., Yokoyama S., Tsuji S., Ginns E.I. (1993) A novel transcript from a pseudogene for human glucocerebrosidase in non-Gaucher disease cells. *Gene* 136:365-8.

K

Khanna R., Benjamin E.R., Pellegrino L., Schilling A., Rigat B.A., Soska R., Nafar H., Raney B.E., Feng J., Lun Y., Powe A.C., Palling D.J., Wustman B.A., Schiffmann R., Mahuran D.J., Lockhart D.J., Valenzano K.J. (2010) The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS J* 277:1618-38.

Kim J.W., Liou B.B., Lai M.Y., Ponce E., Grabowski G.A. (1996) Gaucher disease: identification of three new mutations in the Korean and Chinese (Taiwanese) populations. *Hum Mutat* 7:214-8.

Klugman S., Gross S.J. (2010) Ashkenazi Jewish screening in the twenty-first century. *Obstet Gynecol Clin North Am* 37:37-46.

Koprivica V., Stone D.L., Park J.K., Callahan M., Frisch A., Cohen I.J., Tayebi N., Sidransky E. (2000) Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 66:1777-86.

L

Laub O., Rutter W.J. (1983) Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system. *J Biol Chem* 258:6043-50.

Laubscher K.H., Glew R.H., Lee R.E., Okinaka R.T. (1994) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to identify mutant sequences in the beta-glucocerebrosidase gene. *Hum Mutat* 3:411-5.

- Lei K., Ninomiya H., Suzuki M., Inoue T., Sawa M., Iida M., Ida H., Eto Y., Ogawa S., Ohno K., Suzuki Y. (2007) Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:587-96.
- Lesage S., Anheim M., Condroyer C., Pollak P., Durif F., Dupuits C., Viallet F., Lohmann E., Corvol J.C., Honore A., Rivaud S., Vidailhet M., Durr A., Brice A. (2011) Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 20:202-10.
- Lieberman R.L., Wustman B.A., Huertas P., Powe A.C., Jr., Pine C.W., Khanna R., Schlossmacher M.G., Ringe D., Petsko G.A. (2007) Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nat Chem Biol* 3:101-7.
- Lieberman R.L., D'Aquino J A., Ringe D., Petsko G.A. (2009) Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. *Biochemistry* 48:4816-27.
- Lin H., Sugimoto Y., Ohsaki Y., Ninomiya H., Oka A., Taniguchi M., Ida H., Eto Y., Ogawa S., Matsuzaki Y., Sawa M., Inoue T., Higaki K., Nanba E., Ohno K., Suzuki Y. (2004) N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1689:219-28.
- Liu Y., Suzuki K., Reed J.D., Grinberg A., Westphal H., Hoffmann A., Doring T., Sandhoff K., Proia R.L. (1998) Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2503-8.
- Lukina E., Watman N., Arreguin E.A., Banikazemi M., Dragosky M., Iastrebner M., Rosenbaum H., Phillips M., Pastores G.M., Rosenthal D.I., Kaper M., Singh T., Puga A.C., Bonate P.L., Peterschmitt M.J. (2010) A phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood* 116:893-9.

M

- Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. (2005) Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77:15-22.
- Maegawa G.H., Tropak M.B., Buttner J.D., Rigat B.A., Fuller M., Pandit D., Tang L., Kornhaber G.J., Hamuro Y., Clarke J.T., Mahuran D.J. (2009) Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J Biol Chem* 284:23502-16.
- Manzano A., Mohri Z., Sperber G., Ogris M., Graham I., Dickson G., Owen J.S. (2003) Failure to generate atheroprotective apolipoprotein AI phenotypes using synthetic RNA/DNA oligonucleotides (chimeraplasts). *J Gene Med* 5:795-802.
- Marshall J., McEachern K.A., Chuang W.L., Hutto E., Siegel C.S., Shayman J.A., Grabowski G.A., Scheule R.K., Copeland D.P., Cheng S.H. (2010) Improved management of lysosomal glucosylceramide levels in a mouse model of type 1 Gaucher disease using enzyme and substrate reduction therapy. *J Inherit Metab Dis* 33:281-9.
- Martin B.M., Sidransky E., Ginns E.I. (1989) Gaucher's disease: advances and challenges. *Adv Pediatr* 36:277-306.
- Martinez-Arias R., Comas D., Mateu E., Bertranpetit J. (2001a) Glucocerebrosidase pseudogene variation and Gaucher disease: Recognizing pseudogene tracts in GBA alleles. *Hum Mutat* 17:191-8.
- Martinez-Arias R., Calafell F., Mateu E., Comas D., Andres A., Bertranpetit J. (2001b) Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Res* 11:1071-85.
- Martins A.M., Valadares E.R., Porta G., Coelho J., Semionato Filho J., Pianovski M.A., Kerstenetzky M.S., Montoril Mde F., Aranda P.C., Pires R.F., Mota R.M., Bortolheiro T.C. (2009) Recommendations on diagnosis, treatment, and monitoring for Gaucher disease. *J Pediatr* 155:S10-8.

- Marugan J.J., Zheng W., Motabar O., Southall N., Goldin E., Westbroek W., Stubblefield B.K., Sidransky E., Aungst R.A., Lea W.A., Simeonov A., Leister W., Austin C.P. (2011) Evaluation of quinazoline analogues as glucocerebrosidase inhibitors with chaperone activity. *J Med Chem* 54:1033-58.
- Masek B.J., Sims K.B., Bove C.M., Korson M.S., Short P., Norman D.K. (1999) Quality of life assessment in adults with type 1 Gaucher disease. *Qual Life Res* 8:263-8.
- Masuno M., Orii T., Sukegawa K., Taga T. (1989) Restriction fragment length polymorphism analysis in healthy Japanese individuals and Japanese families with Gaucher disease. *Acta Paediatr Jpn* 31:158-62.
- Mateu E., Perez-Lezaun A., Martinez-Arias R., Andres A., Valles M., Bertranpetit J., Calafell F. (2002) PKLR- GBA region shows almost complete linkage disequilibrium over 70 kb in a set of worldwide populations. *Hum Genet* 110:532-44.
- Matsuda J., Vanier M.T., Saito Y., Tohyama J., Suzuki K. (2001) A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse. *Hum Mol Genet* 10:1191-9.
- Matsuda J., Suzuki O., Oshima A., Yamamoto Y., Noguchi A., Takimoto K., Itoh M., Matsuzaki Y., Yasuda Y., Ogawa S., Sakata Y., Nanba E., Higaki K., Ogawa Y., Tominaga L., Ohno K., Iwasaki H., Watanabe H., Brady R.O., Suzuki Y. (2003) Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15912-7.
- McEachern K.A., Nietupski J.B., Chuang W.L., Armentano D., Johnson J., Hutto E., Grabowski G.A., Cheng S.H., Marshall J. (2006) AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease. *J Gene Med* 8:719-29.
- Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., Carey W.F. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249-54.

- Mellon P., Parker V., Gluzman Y., Maniatis T. (1981) Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 27:279-88.
- Merrill A.H., Jr. (1983) Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 754:284-91.
- Miao S., McCarter J.D., Grace M.E., Grabowski G.A., Aebersold R., Withers S.G. (1994) Identification of Glu340 as the active-site nucleophile in human glucocerebrosidase by use of electrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem* 269:10975-8.
- Michelakakis H., Spanou C., Kondyli A., Dimitriou E., Van Weely S., Hollak C.E., Van Oers M.H., Aerts J.M. (1996) Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1317:219-22.
- Michelakakis H., Moraitou M., Dimitriou E., Santamaria R., Sanchez G., Gort L., Chabas A., Grinberg D., Dassopoulou M., Fotopoulos S., Vilageliu L. (2006) Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 29:591.
- Migita M., Medin J.A., Pawliuk R., Jacobson S., Nagle J.W., Anderson S., Amiri M., Humphries R.K., Karlsson S. (1995) Selection of transduced CD34+ progenitors and enzymatic correction of cells from Gaucher patients, with bicistronic vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12075-9.
- Miller V.M., Xia H., Marrs G.L., Gouvion C.M., Lee G., Davidson B.L., Paulson H.L. (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7195-200.
- Milne J.C., Lambert P.D., Schenk S., Carney D.P., Smith J.J., Gagne D.J., Jin L., Boss O., Perni R.B., Vu C.B., Bemis J.E., Xie R., Disch J.S., Ng P.Y., Nunes J.J., Lynch A.V., Yang H., Galonek H., Israelian K., Choy W., Iffland A., Lavu S., Medvedik O., Sinclair D.A., Olefsky J.M., Jirousek M.R., Elliott P.J., Westphal C.H. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450:712-6.

Montfort M., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. (2004) Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat* 23:567-75.

Mullins C., Bonifacino J.S. (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23:333-43.

N

Nakano T., Sandhoff K., Stumper J., Christomanou H., Suzuki K. (1989) Structure of full-length cDNA coding for sulfatide activator, a Co-beta-glucosidase and two other homologous proteins: two alternate forms of the sulfatide activator. *J Biochem* 105:152-4.

Neufeld E.F. (1991) Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* 60:257-80.

O

O'Brien J.S., Miller A.L., Loverde A.W., Veath M.L. (1973) Sanfilippo disease type B: enzyme replacement and metabolic correction in cultured fibroblasts. *Science* 181:753-5.

O'Brien J.S., Kretz K.A., Dewji N., Wenger D.A., Esch F., Fluharty A.L. (1988) Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus. *Science* 241:1098-101.

Ogretmen B., Hannun Y.A. (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 4:604-16.

Ohashi T., Hong C.M., Weiler S., Tomich J.M., Aerts J.M., Tager J.M., Barranger J.A. (1991) Characterization of human glucocerebrosidase from different mutant alleles. *J Biol Chem* 266:3661-7.

Ohashi T., Eto Y. (1989) Molecular analysis of Japanese Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 12:355-8.

Ono H., Fujiwara M., Ito K., Ueda H., Mizoguchi N., Sakura N. (2001) Neurological features in Gaucher's disease during enzyme replacement therapy. *Acta Paediatr* 90:229-31.

Oulaidi F., Front-Deschamps S., Gallienne E., Lesellier E., Ikeda K., Asano N., Compain P., Martin O.R. (2011) Second-Generation Iminoxylitol-Based Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease. *ChemMedChem*.

P

Pasmanik-Chor M., Elroy-Stein O., Aerts H., Agmon V., Gatt S., Horowitz M. (1996) Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochem J* 317 (Pt 1):81-8.

Pasmanik-Chor M., Madar-Shapiro L., Stein E.O., Aerts H., Gatt S., Horowitz M. (1997) Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. *Hum Mol Genet* 6:887-95.

Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A. (2004) Sphingolipids in inflammation: roles and implications. *Curr Mol Med* 4:405-18.

Pewzner-Jung Y., Ben-Dor S., Futerman A.H. (2006) When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* 281:25001-5.

Porter M.T., Fluharty A.L., Kihara H. (1971) Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. *Science* 172:1263-5.

R

Rafi M.A., de Gala G., Zhang X.L., Wenger D.A. (1993) Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat Cell Mol Genet* 19:1-7.

- Reczek D., Schwake M., Schroder J., Hughes H., Blanz J., Jin X., Brondyk W., Van Patten S., Edmunds T., Saftig P. (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131:770-83.
- Reiner O., Wigderson M., Horowitz M. (1988) Structural analysis of the human glucocerebrosidase genes. *DNA* 7:107-16.
- Reiner O., Wilder S., Givol D., Horowitz M. (1987) Efficient in vitro and in vivo expression of human glucocerebrosidase cDNA. *DNA* 6:101-8.
- Reissner K., Tayebi N., Stubblefield B.K., Koprivica V., Blitzer M., Holleran W., Cowan T., Almashanu S., Maddalena A., Karson E.M., Sidransky E. (1998) Type 2 Gaucher disease with hydrops fetalis in an Ashkenazi Jewish family resulting from a novel recombinant allele and a rare splice junction mutation in the glucocerebrosidase locus. *Mol Genet Metab* 63:281-8.
- Rigat B., Mahuran D. (2009) Diltiazem, a L-type Ca(2+) channel blocker, also acts as a pharmacological chaperone in Gaucher patient cells. *Mol Genet Metab* 96:225-32.
- Rindgen D., Turesky R.J., Vouros P. (1995) Determination of in vitro formed DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine using capillary liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 8:1005-13.
- Ringe D., Petsko G.A. (2009) What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol* 8:80.
- Rodriguez-Mari A., Diaz-Font A., Chabas A., Pastores G.M., Grinberg D., Vilageliu L. (2001) New insights into the origin of the Gaucher disease-causing mutation N370S: extended haplotype analysis using the 5GC3.2, 5470 G/A, and ITG6.2 polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* 27:950-9.
- Rorman E.G., Grabowski G.A. (1989) Molecular cloning of a human co-beta-glucosidase cDNA: evidence that four sphingolipid hydrolase activator proteins are encoded by single genes in humans and rats. *Genomics* 5:486-92.

Rosenbloom B., Balwani M., Bronstein J.M., Kolodny E., Sathe S., Gwosdow A.R., Taylor J.S., Cole J.A., Zimran A., Weinreb N.J. (2011) The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: data from the ICGG Gaucher Registry. *Blood Cells Mol Dis* 46:95-102.

Ruiter R., van den Brande I., Stals E., Delaure S., Cornelissen M., D'Halluin K. (2003) Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty. *Plant Mol Biol* 53:675-89.

S

Sanchez-Olle G., Duque J., Egado-Gabas M., Casas J., Lluch M., Chabas A., Grinberg D., Vilageliu L. (2009) Promising results of the chaperone effect caused by imino sugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 42:159-66.

Santamaria R., Michelakakis H., Moraitou M., Dimitriou E., Dominissini S., Grossi S., Sanchez-Olle G., Chabas A., Pittis M.G., Filocamo M., Vilageliu L., Grinberg D. (2008) Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat* 29:E58-67.

Santoro A. (2002) Anemia in renal insufficiency. *Rev Clin Exp Hematol Suppl* 1:12-20.

Sawkar A.R., Cheng W.C., Beutler E., Wong C.H., Balch W.E., Kelly J.W. (2002) Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15428-33.

Sawkar A.R., Adamski-Werner S.L., Cheng W.C., Wong C.H., Beutler E., Zimmer K.P., Kelly J.W. (2005) Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol* 12:1235-44.

Sawkar A.R., Schmitz M., Zimmer K.P., Reczek D., Edmunds T., Balch W.E., Kelly J.W. (2006) Chemical chaperones and permissive temperatures alter

- localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants. *ACS Chem Biol* 1:235-51.
- Schiffmann R., Fitzgibbon E.J., Harris C., DeVile C., Davies E.H., Abel L., van Schaik I.N., Benko W., Timmons M., Ries M., Vellodi A. (2008) Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann Neurol* 64:514-22.
- Schmitz J., Poll L.W., vom Dahl S. (2007) Therapy of adult Gaucher disease. *Haematologica* 92:148-52.
- Schmitz M., Alfalah M., Aerts J.M., Naim H.Y., Zimmer K.P. (2005) Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2310-20.
- Schnabel D., Schroder M., Sandhoff K. (1991) Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett* 284:57-9.
- Sibille A., Eng C.M., Kim S.J., Pastores G., Grabowski G.A. (1993) Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type I: clinical and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 52:1094-101.
- Sidransky E. (2004) Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab* 83:6-15.
- Sidransky E., Tayebi N., Stubblefield B.K., Eliason W., Klineburgess A., Pizzolato G.P., Cox J.N., Porta J., Bottani A., DeLozier-Blanchet C.D. (1996) The clinical, molecular, and pathological characterisation of a family with two cases of lethal perinatal type 2 Gaucher disease. *J Med Genet* 33:132-6.
- Sidransky E., Bottler A., Stubblefield B., Ginns E.I. (1994) DNA mutational analysis of type 1 and type 3 Gaucher patients: how well do mutations predict phenotype? *Hum Mutat* 3:25-8.
- Sirrs S., Irving J., McCauley G., Gin K., Munt B., Pastores G., Mistry P. (2002) Failure of resting echocardiography and cardiac catheterization to identify pulmonary hypertension in two patients with type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 25:131-2.

- Sorge J., West C., Westwood B., Beutler E. (1985a) Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7289-93.
- Sorge J., Gross E., West C., Beutler E. (1990) High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J Clin Invest* 86:1137-41.
- Sorge J., Gelbart T., West C., Westwood B., Beutler E. (1985b) Heterogeneity in type I Gaucher disease demonstrated by restriction mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5442-5.
- Sorge J.A., West C., Kuhl W., Treger L., Beutler E. (1987) The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet* 41:1016-24.
- Steet R.A., Chung S., Wustman B., Powe A., Do H., Kornfeld S.A. (2006) The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13813-8.
- Stone D.L., Tayebi N., Orvisky E., Stubblefield B., Madike V., Sidransky E. (2000) Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat* 15:181-8.
- Strasberg P.M., Skomorowski M.A., Warren I.B., Hilson W.L., Callahan J.W., Clarke J.T. (1994) Homozygous presence of the crossover (fusion gene) mutation identified in a type II Gaucher disease fetus: is this analogous to the Gaucher knock-out mouse model? *Biochem Med Metab Biol* 53:16-21.
- Sun Y., Qi X., Grabowski G.A. (2003) Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *J Biol Chem* 278:31918-23.
- Sun Y., Quinn B., Witte D.P., Grabowski G.A. (2005) Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid beta-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants. *J Lipid Res* 46:2102-13.

Sun Y., Liou B., Ran H., Skelton M.R., Williams M.T., Vorhees C.V., Kitatani K., Hannun Y.A., Witte D.P., Xu Y.H., Grabowski G.A. (2010) Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: viable combined selective saposin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Hum Mol Genet* 19:1088-97.

T

Tagalakis A.D., Owen J.S., Simons J.P. (2005) Lack of RNA-DNA oligonucleotide (chimeraplast) mutagenic activity in mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 71:140-4.

Taubes G. (2002) Gene therapy. The strange case of chimeraplasty. *Science* 298:2116-20.

Tayebi N., Stubblefield B.K., Park J.K., Orvisky E., Walker J.M., LaMarca M.E., Sidransky E. (2003) Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 72:519-34.

Tayebi N., Cushner S.R., Kleijer W., Lau E.K., Damschroder-Williams P.J., Stubblefield B.K., Den Hollander J., Sidransky E. (1997) Prenatal lethality of a homozygous null mutation in the human glucocerebrosidase gene. *Am J Med Genet* 73:41-7.

Theophilus B., Latham T., Grabowski G.A., Smith F.I. (1989) Gaucher disease: molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* 45:212-25.

Thudichum J. (1884) *A treatise on the chemical constitution of the brain*, London.

Torralba M.A., Perez-Calvo J.I., Pastores G.M., Cenarro A., Giraldo P., Pocovi M. (2001) Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis* 27:489-95.

- Tropak M.B., Reid S.P., Guiral M., Withers S.G., Mahuran D. (2004) Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J Biol Chem* 279:13478-87.
- Tsuji A., Suzuki Y. (1987) Biosynthesis of two components of human acid alpha-glucosidase. *Arch Biochem Biophys* 259:234-40.
- Tsuji S., Choudary P.V., Martin B.M., Winfield S., Barranger J.A., Ginns E.I. (1986) Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. *J Biol Chem* 261:50-3.
- Tsuji S., Martin B.M., Barranger J.A., Stubblefield B.K., LaMarca M.E., Ginns E.I. (1988) Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2349-52.
- Tybulewicz V.L., Tremblay M.L., LaMarca M.E., Willemsen R., Stubblefield B.K., Winfield S., Zablocka B., Sidransky E., Martin B.M., Huang S.P., et al. (1992) Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 357:407-10. DOI: 10.1038/357407a0.
- Tylki-Szymanska A., Keddache M., Grabowski G.A. (2006) Characterization of neuronopathic Gaucher disease among ethnic Poles. *Genet Med* 8:8-15.

V

- Vaccaro A.M., Salvioli R., Tatti M., Ciaffoni F. (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res* 24:307-14.
- Vaccaro A.M., Motta M., Tatti M., Scarpa S., Masuelli L., Bhat M., Vanier M.T., Tylki-Szymanska A., Salvioli R. (2010) Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Hum Mol Genet* 19:2987-97.
- van Breemen M.J., de Fost M., Voerman J.S., Laman J.D., Boot R.G., Maas M., Hollak C.E., Aerts J.M., Rezaee F. (2007) Increased plasma macrophage

inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels in type 1 Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:788-96.

Van De Water N.S., Jolly R.D., Farrow B.R. (1979) Canine Gaucher disease--the enzymic defect. *Aust J Exp Biol Med Sci* 57:551-4.

Varki A., Kornfeld S. (2009) *Essentials of Glycobiology*. Second ed. Cold Spring Harbor, New York.

Vellodi A. (2005) Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128:413-31.

W

Wafaei J.R., Choy F.Y. (2005) Glucocerebrosidase recombinant allele: molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells Mol Dis* 35:277-85.

Wang G.N., Reinkensmeier G., Zhang S.W., Zhou J., Zhang L.R., Zhang L.H., Butters T.D., Ye X.S. (2009) Rational design and synthesis of highly potent pharmacological chaperones for treatment of N370S mutant Gaucher disease. *J Med Chem* 52:3146-9.

Wasserstein M.P., Martignetti J.A., Zeitlin R., Lumerman H., Solomon M., Grace M.E., Desnick R.J. (1999) Type 1 Gaucher disease presenting with extensive mandibular lytic lesions: identification and expression of a novel acid beta-glucosidase mutation. *Am J Med Genet* 84:334-9.

Watts R.W. (2003) A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:975-83.

Weinreb N., Barranger J., Packman S., Prakash-Cheng A., Rosenbloom B., Sims K., Angell J., Skrinar A., Pastores G.M. (2007) Imiglucerase (Cerezyme) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. *Clin Genet* 71:576-88.

Weinreb N.J., Brady R.O., Tappel A.L. (1968) The lysosomal localization of sphingolipid hydrolases. *Biochim Biophys Acta* 159:141-6.

- Weinreb N.J., Charrow J., Andersson H.C., Kaplan P., Kolodny E.H., Mistry P., Pastores G., Rosenbloom B.E., Scott C.R., Wappner R.S., Zimran A. (2002) Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med* 113:112-9.
- Weinreb N.J. (2008) A phase 2 clinical trial of the pharmacological chaperone AT2101 for the treatment of Gaucher disease., 8th European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD) Meeting, Budapest.
- Wenstrup R.J., Kacena K.A., Kaplan P., Pastores G.M., Prakash-Cheng A., Zimran A., Hangartner T.N. (2007) Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res* 22:119-26.
- Whelan J. (2005) First clinical data on RNAi. *Drug Discov Today* 10:1014-5.
- Wilkening G., Linke T., Sandhoff K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem* 273:30271-8.
- Winfield S.L., Tayebi N., Martin B.M., Ginns E.I., Sidransky E. (1997) Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease. *Genome Res* 7:1020-6.

X

- Xu Y.H., Quinn B., Witte D., Grabowski G.A. (2003) Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. *Am J Pathol* 163:2093-101.

Y

- Yu L., Ikeda K., Kato A., Adachi I., Godin G., Compain P., Martin O., Asano N. (2006) Alpha-1-C-octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg Med Chem* 14:7736-44.

Yu Z., Sawkar A.R., Kelly J.W. (2007a) Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease. *FEBS J* 274:4944-50.

Yu Z., Sawkar A.R., Whalen L.J., Wong C.H., Kelly J.W. (2007b) Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *J Med Chem* 50:94-100.

Z

Zheng W., Padia J., Urban D.J., Jadhav A., Goker-Alpan O., Simeonov A., Goldin E., Auld D., LaMarca M.E., Inglese J., Austin C.P., Sidransky E. (2007) Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13192-7.

Zimmer K.P., le Coutre P., Aerts H.M., Harzer K., Fukuda M., O'Brien J.S., Naim H.Y. (1999) Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *J Pathol* 188:407-14.

Zimran A., Gelbart T., Beutler E. (1990) Linkage of the PvuII polymorphism with the common Jewish mutation for Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 46:902-5.

Zimran A., Sorge J., Gross E., Kubitz M., West C., Beutler E. (1989) Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet* 2:349-52.

Zimran A., Elstein D., Abrahamov A. (1995a) Enzyme replacement therapy in type 1 and type 3 Gaucher's disease. *Lancet* 345:451-2.

Zimran A., Elstein D., Levy-Lahad E., Zevin S., Hadas-Halpern I., Bar-Ziv Y., Foldes J., Schwartz A.J., Abrahamov A. (1995b) Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease. *Lancet* 345:1479-80.

Zimran A., Altarescu G., Philips M., Attias D., Jmoudiak M., Deeb M., Wang N., Bhirangi K., Cohn G.M., Elstein D. (2010) Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience. *Blood* 115:4651-6.

7. ADDENDUM

En aquest apartat es descriuen part dels mètodes emprats en la tesi doctoral presentada.

a) Mutagènesi dirigida

Es disposava del cDNA salvatge i diversos cDNAs mutants, obtinguts amb anterioritat a partir de cultiu de fibroblasts d'individus sans i malalts mitjançant els kits QIAshredder™ i RNeasy MiniKit™ de Qiagen. A partir de l'RNA es va obtenir el cDNA, el qual va ser clonat al vector puc18, mitjançant les dianes *EcoRI* i *XbaI* (Montfort et al., 2004). A més a més per tal d'obtenir nous al·lels mutats (G202R, H255Q, G377S, H255Q;D409H) es va emprar la mutagènesi dirigida, mitjançant el QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), seguint les recomanacions del fabricant. Els encebadors utilitzats en la reacció van ser dissenyats amb un programa que la casa comercial ofereix (<http://labtools.stratagene.com>). Tal i com veiem en la taula A.1, el nucleòtid a canviar està en negreta.

Taula A.1. Encebadors utilitzats en la mutagènesi dirigida

Nom	Seqüència
G202R FW	5'-CAAGGGACAGCCCAGAGACATCTACCACC-3'
G202R RV	5'-GGTGGTAGATGTCTCTGGGCTGTCCCTTGA-3'
H255Q FW	5'-GCTTCACCCCTGAACAGCAGCGAGACTTCAT-3'
H255Q RV	5'-GTCTCGCTGCTGTTTCAGGGGTGAAGC-3'
G377S FW	5'-GTACCATGTGGTCAGCTGGACCGACTGG-3'
G377S RV	5'-CCAGTCGGTCCAGCTGACCACATGGTAC-3'

Els encebadors utilitzats, així com el temps de la reacció en cadena de la polimerasa utilitzats, es van escollir seguint les recomanacions del fabricant indicades en el manual d'ús.

Els passos emprats per a dur a terme la mutagènesi es resumeixen en la figura A.1, modificada a partir del protocol a seguir dins del manual d'instruccions del QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit d'Stratagene.

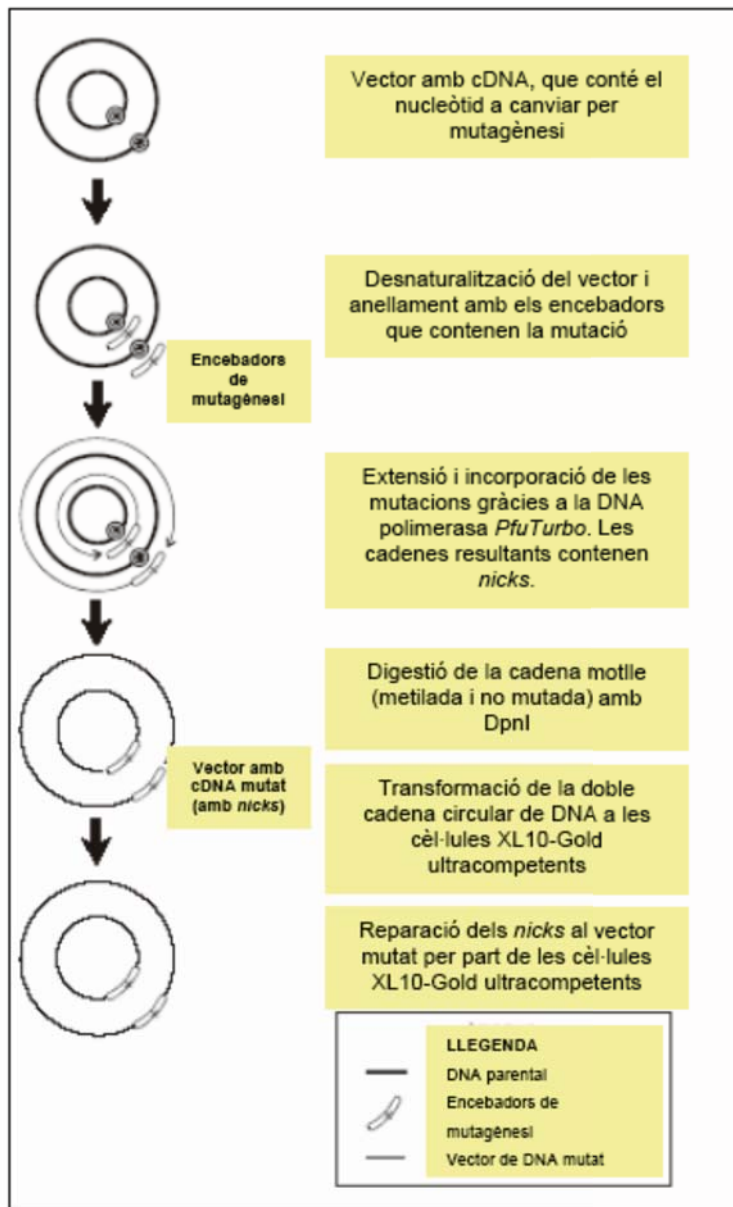


Figura A.1. Esquema de la reacció de la mutagènesi sobre el cDNA salvatge en puc18.

Per tal de confirmar els canvis introduïts, es va utilitzar el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) per a realitzar la seqüenciació dels fragments. Els components que formaven part de la barreja de reacció es detallen a continuació:

- 1µl de DNA (uns 100 ng)
- 2µl encebador a 1,6 pmols/µl
- 2µl barreja de seqüència Big Dye 3.1
- 2µl tampó 5x
- 4µl aigua destil·lada

Els encebadors emprats per tal de dur a terme la seqüenciació van ser escollits de manera que tot el cDNA quedés seqüenciat (les dues cadenes). La relació d'encebadors es detalla a la taula 4.

Taula A.2. Encebadors emprats per a seqüenciar

Encebadors	Seqüència (5'>3')
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAGTG
1b FW	GGAATTCGCCGGAATTACTTGCAGGGC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	AGCATTTAGGTGACACTATAG
11 RV	GCTCTAGACTCTTTAGTCACAGACAGCG
M13 RV	GGAAACAGCTATGACCATG

El protocol de l'amplificació del DNA per a obtenir la seqüència està indicat en la taula A.3:

Taula A.3. Protocol PCR.

TEMPS	TEMPERATURA	OBSERVACIONS
3 minuts	96°C	Desnaturalització
10 segons	96°C	Desnaturalització*
5 segons	50°C	Anellament*
4 minuts	60°C	Elongació*
infinit	4°C	Fi reacció

* 25 CICLES

Els termocicladors emprats per a dur a terme la mencionada reacció van ser Gene AMP PCR System 2700 i 2720 (Applied Biosystems).

b) Clonatge dels cDNAs a pcDNA3.

Les dianes de restricció (*EcoRI* i *XbaI*) situades al lloc de clonatge múltiple del vector puc18 van ser emprades per a subclonar els cDNAs en el vector d'expressió per a mamífers pcDNA3. La reacció enzimàtica realitzada per tal de dur a terme l'escisió del cDNA mutat va ser la següent (volum final 20 µl):

- 0,5 µl enzim *EcoRI*
- 0,5 µl enzim *XbaI*
- 2 µl tampó 10x
- 5 µl DNA

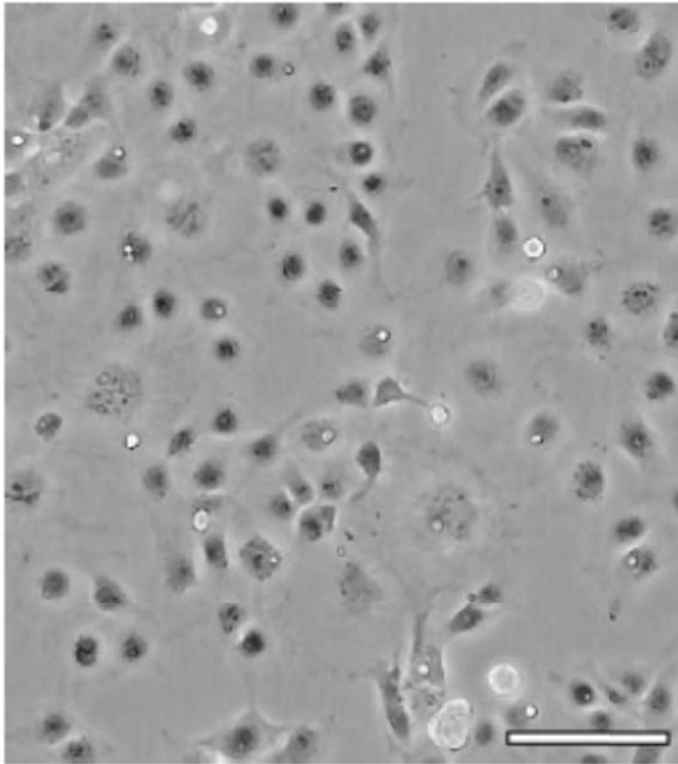
12 µl aigua

Un cop obtinguts els vectors d'expressió amb el cDNA corresponent, es va obtenir grans quantitats del mateixos gràcies al HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) i a cultius líquids de cèl·lules DH5α prèviament transformades amb el nostre insert d'interès, clonat en el vector pcDNA3.

c) Transfecció a cèl·lules COS-7.

Les cèl·lules COS-7 deriven de la línia CV-1 (ronyó de mico verd) per transformació amb un mutant de l'SV-40, que codifica per l'antigen T salvatge. A diferència de les cèl·lules COS-1, les COS-7 no contenen una còpia completa integrada de la regió early del genoma de SV40.

En la figura A.2 podem veure l'aspecte que tenen les mencionades cèl·lules.



Barra 100 µm

Figura A.2 Aspecte de les cèl·lules COS-7 al microscopi òptic, quan no s'utilitza cap tipus de tinció. Tot i així s'intueix el nucli de la cèl·lula i la forma arrodonida de les cèl·lules. Extret de www.jmbioscience.com/COS-7.html.

El medi de cultiu de les cèl·lules COS-7 està compost per D-MEM, 10% sèrum boví i 1% penicil·lina/estreptomicina. Quan es troben al 90% de confluència es procedeix a la transfecció.

Per tal de transfectar les cèl·lules COS-7 s'ha utilitzat Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), seguint les recomanacions del fabricant (medi de cultiu sense antibiòtic). Per a obtenir transfeccions estables, les cèl·lules van ser tractades amb Geneticin® (Invitrogen) 48h després de la transfecció, durant un mínim de 15 dies. Aquest antibiòtic permet la selecció de les cèl·lules transfectades, ja que són resistents a la neomicina gràcies al vector d'expressió en mamífers pcDNA3.

d) Immunofluorescència per a la detecció d'òrgans i l'enzim GBA.

Per a poder caracteritzar el camí que segueixen les proteïnes mutades, des de la seva síntesi al reticle endoplasmàtic fins que arriben al lisosoma, s'ha posat a punt la tècnica d'immunofluorescència per a la detecció dels òrgans: reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i lisosoma, així com per a la proteïna del nostre interès, la GBA.

Es van clonar el cDNA salvatge i els que contenen les mutacions N188S, G202R, H255Q, E326K, N370S, G377S, I402T, D409H, L444P, N188S;E326K i H255Q;D409H en el vector pEGFP-N2, un vector resistent a la kanamicina amb una mida de 4,7 kb.

Per tal de realitzar la clonació es fa una PCR partint de les minipreps o midipreps del cDNA clonat en el pcDNA3. Els encebadors que es van utilitzar tenen inclosa una diana de restricció per tal de permetre el clonatge en el nou vector (pEGFP-N2). El producte de la reacció té 1,6 kb.

Mix (Vf = 25 µl, però es poden preparar 50µl per tal de tenir volum suficient)

22,5 µl Taq AccuPrime Pfx Super Mix

0,25 µl primer Forward (EcoRI FW)

0,25 µl primer Revers (XmaI RV)

Condicions:

95°C 5 minuts

95°C 15 segons

65°C 30 segons

68°C 2 minuts

4°C ∞

} 35 cicles

Es va testar la PCR en gel d'agarosa a l'1,5% aproximadament. El marcador emprat va ser λ Eco/Hind. Apareixen moltes bandes per sobre d'1,6 kb (tamany de la nostra PCR), que corresponen a les diferents conformacions del vector utilitzat com a motlle, per tant cal retallar banda.

Es va preparar un gel a l'1% d'agarosa i es va utilitzar el marcador $\lambda Eco/Hind$. Un cop retallada la banda de 1,6 kb, es va purificar amb el kit Illustra (GE Healthcare) i resuspendre amb aigua (50 μ l). Posteriorment es va digerir la banda, mitjançant l'enzim de restricció *XmaI* (s'anomena *Cfr9I* en la casa Fermentas) i l'*EcoRI*, seguint les instruccions del fabricant.

Mix (Vf = 20 μ l)

- 2 μ l buffer *Cfr9I*
- 1 μ l enzim *EcoRI*
- 0,5 μ l enzim *Cfr9I*
- 5 μ l banda purificada
- 11,5 μ l aigua

Les reacció es va dur a terme durant tota la nit (*over night*, ON) a 37°C.

Mitjançant el Kit Illustra, procedim a la purificació de la banda i a la resuspensió en buffer TE, ja que millora l'eficiència de lligació (segons el kit). Més tard es testa la purificació en gel d'agarosa a l'1,5% aproximadament amb el marcador $\lambda Eco/Hind$.

Un cop testada i quantificada la banda purificada, procedim a la lligació amb el vector pEGFP-N2

Mix (Vf = 10 μ l)

- Lligasa Promega 0,2 μ l
- Buffer 10x 1 μ l
- Vector 1 μ l
- Insert 7,8 μ l

Condicions

- ON a 16°C

Tot el producte de lligació es transforma en 90 μ l de DH5 α (30 minuts en gel, 1 minut i 30 segons a 42°C, 2 minuts en gel, s'afegeix LB precalentat a 42°C, 45 minuts a 37°C) que es deixa créixer ON a 37°C. Les colònies es van picar i es van fer créixer en un tub amb medi LB (3ml), als quals afegirem 9 μ l de kanamicina, durant 16 h a 37°C en agitació .

A partir de les colònies que van créixer, es va fer una miniprep, que va ser testada en gel d'agarosa a l'1,5% aproximadament amb el marcador $\lambda Eco/Hind$. La mida observada va ser 6,3kb (4,7 kb vector + 1,6 kb cDNA),

Les minipreps que tenien el tamany correcte es van digerir per veure si l'insert tenia el tamany desitjat.

Mix (Vf = 20 µl)

- 2 µl buffer *Cfr9I*
- 1 µl enzim *EcoRI*
- 0,5 µl enzim *Cfr9I*
- 5 µl miniprep
- 11,5 µl aigua

Condicions

ON a 37°C

Es va testar la miniprep digerida en gel d'agarosa a l'1,5% aproximadament. Si les bandes eren les correctes es va procedir a la seqüenciació de la miniprep.

Primers utilitzats:

- N2 FW (situat a l'extrem 5', dins del vector pEGPF-N2).
- DOWN FW (en mig de l'exó 4).
- UP RV (en mig de l'exó 6).
- 7b FW (en mig de l'exó 7).
- 7a RV (en mig de l'exó 7 després del 7b FW).
- N2 RV (situat a l'extrem 3', dins del vector pEGPF-N2).

Mix:

- 2 µl buffer 5x
- 0,5 µl primer (3,2 µM)
- 5,5 µl aigua
- 1 µl Big Dye3.1
- 1 µl mostra

Condicions:

96°C 1 minut

96°C 10 segons

55°C 5 segons

60°C 4 minuts

4°C ∞



25 cicles

Desgraciadament, un cop realitzada la clonació dels diferents al·lels es va publicar que aquesta tècnica no era útil per a poder col·localitzar la nostra proteïna al lisosoma, ja que quedava retinguda al reticle endoplasmàtic (Lei et al., 2007).

Existeixen pocs anticossos comercials per a la proteïna GBA que serveixin per a

immunofluorescència. Gentilment, el Dr. JM Aerts (Departament de Medicina Interna, Divisió d'Endocrinologia i Metabolisme, Centre Mèdic Acadèmic, Amsterdam) ens ha facilitat l'anticòs de ratolí 8E4, prèviament descrit per Ginns (Ginns et al., 1983). Per a detectar-lo s'ha utilitzat l'anticòs contra ratolí Alexa Fluor[®] 488 Dye (Invitrogen[™], California, Estats Units) a dilució 1:400. S'ha utilitzat el microscopi confocal amb detecció espectral Leica TCS SP II (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemanya) per a fer les fotografies de les imatges confoncals. Els anticossos de conill emprats per a detectar els orgànuls van ser Calnexina (1:100) per al reticle endoplasmàtic (Abcam[®], Cambridge, Regne Unit), GM130 (1:200) per a l'aparell de Golgi (Abcam[®], Cambridge, Regne Unit) i LAMP-1 (1:50) per al lisosoma (Abcam[®], Cambridge, Regne Unit). Per a detectar-los s'ha utiliat l'anticòs contra conill Alexa Fluor[®] 594 Dye Invitrogen[™], California, Estats Units) a dilució 1:400.

Per a detectar el nucli s'ha utilitzat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a dilució 1:200 (Sigma-Aldrich[®], St Louis, Missouri, Estats Units).

El protocol de fixació utilitzat tant en posar a punt l'anticòs contra la GBA com en els de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i lisosoma és el següent:

1. Introduir un vidre de 12 mm de diàmetre en una placa de 12 pous (Nunc, Regne Unit).
2. Afegir 10.000 fibroblasts en un dels pous.
3. A les 24h rentar el medi amb PBS durant 2-3 minuts tres vegades.
4. Fixar les cèl·lules amb 200 µL de formaldehid al 3.7% en PBS i incubar-ho durant 10 minuts a temperatura ambient.
5. Rentar amb PBS, 3 vegades durant 5 minuts.
6. Permeabilitzar amb Triton X-100 al 0.5% en PBS durant 10 minuts.
7. Rentar amb PBS, 3 vegades durant 5 minuts.
8. Bloquejar les cèl·lules amb 200 µL de BSA al 3% en PBS durant 40 minuts a temperatura ambient, en una cambra humida.
9. Treure el vidre del pou amb molt de compte per a poder incubar amb l'anticòs primari en la cambra humida. Aquesta es pot construir amb una placa de petri i paper secant humitejat amb aigua. Es posa un tros de Parafilm[®] M (Labolan, España) sobre el paper secant.
10. Incubar amb l'anticòs primari, diluït en BSA al 0.5% en PBS durant 1 hora a

temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C, en una cambra humida. La gota de 30-50 µL d'anticòs diluït es diposita sobre Parafilm[®] i el vidre, amb la cara de les cèl·lules, sobre aquest.

11. Rentar amb PBS, 3 vegades durant 5 minuts.
12. Posar de nou el vidre en el pou.
13. Incubar amb l'anticòs secundari (1:400) i el DAPI (1:200) diluïts en BSA al 0.5% en PBS durant 45 minuts a temperatura ambient, en una cambra humida a la foscor.
14. Rentar amb PBS, 3 vegades durant 5 minuts.
15. Rentar amb aigua destil·lada per eliminar les sals i evitar que en afegir el medi per a muntar apareguin cristalls de sal.
16. Afegir 10-20 µL de Mowiol[®] 4-88 en un porta de vidre i desar el vidre amb les cèl·lules fixades amb molta cura que no apareguin bombolles d'aire.

El primer pas que era posar a punt la tècnica en fibroblasts portadors de l'al·lel salvatge ha donat els següents resultats (figura A.3):

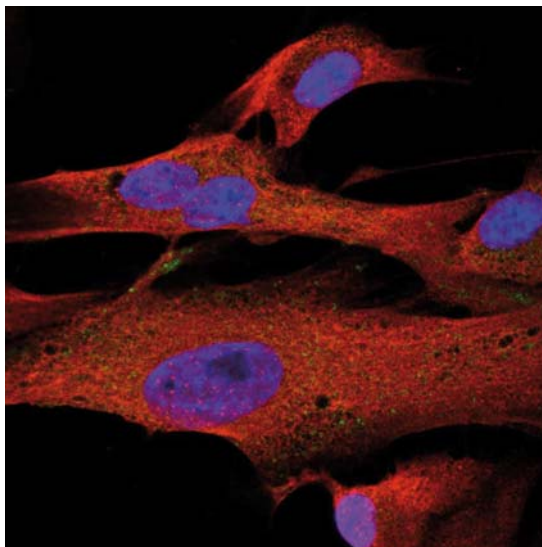


Figura A.3. En aquesta imatge podem veure el reticle endoplasmàtic (vermell), la GBA (verd) i el nucli (blau) a 60x.

Tot i utilitzar una baixa dilució de l'anticòs de reticle, no va ser possible visualitzar millor la nostra proteïna. En la figura A.4 es mostra la imatge.

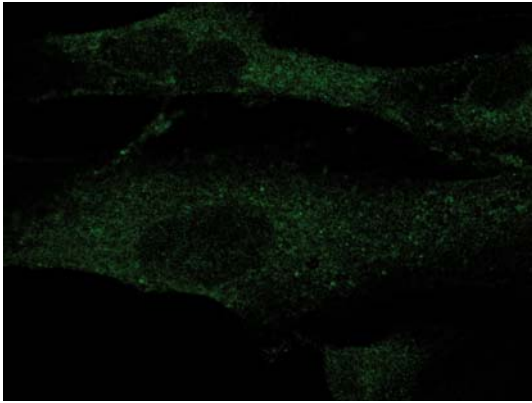


Figura A.4. Imatge de la GBA amb l'anticòs proveït pel Dr. Aerts a 60x

Paral·lelament es va testar l'anticòs contra l'aparell de Golgi per tal de comprovar que la proteïna amb l'al·lel salvatge, a diferència de la portadora de la mutació G202R, no quedava acumulada i podia passar al lisosoma (figura A.5).

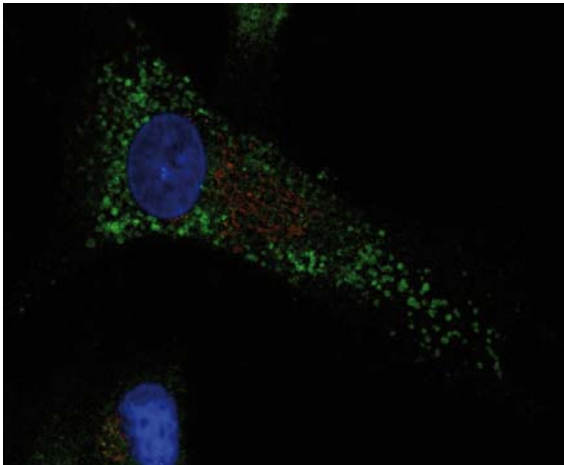


Figura A.5. En aquesta imatge podem veure l'aparell de Golgi (vermell), la GBA (verd) i el nucli (blau) a 60x.

En la figura A.6, on hi ha marcat el lisosoma (vermell) i la GBA (verd), podem veure que hi ha col·localització, però que la nostra proteïna també es troba fora del lisosoma. Això va ser detectat en el nostre grup, no tan sols amb la GBA, sinó també amb altres proteïnes lisosomals objecte del nostre estudi.

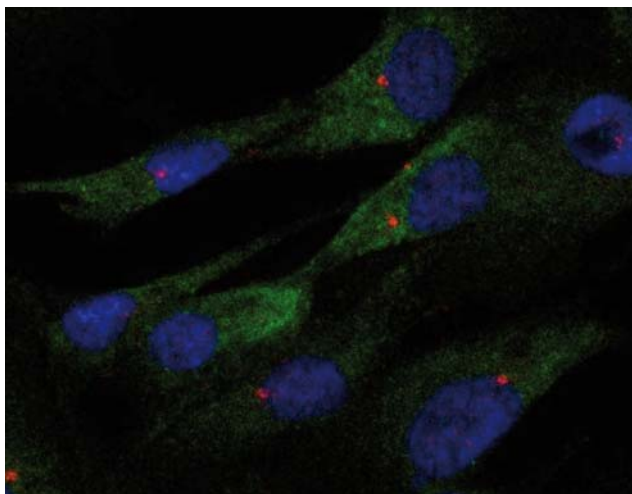


Figura A.6. En aquesta imatge podem veure el lisosoma (vermell), la GBA (verd) i el nucli (blau) a 40x.

7.2 Article Macías-Vidal i col·laboradors 2010

Aquesta tesi està enmarcada dins del grup de malalties d'acúmul lisosòmic. Part de la feina realitzada durant aquests anys es referia a una altra malaltia, la malaltia de Niemann-Pick tipus C, i queda reflectida en el següent treball. La meua feina va ser determinar el segon al·lel mutat en diferents pacients per seqüenciació.

Short Report

Molecular analysis of 30 Niemann–Pick type C patients from Spain

Macías-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ, the Spanish NPC Working Group. Molecular analysis of 30 Niemann–Pick type C patients from Spain. Clin Genet 2010. © John Wiley & Sons A/S, 2010

Mutations in the *NPC1* or *NPC2* gene are responsible for Niemann–Pick type C (NPC) disease (OMIM #257220), an autosomal recessive neurodegenerative lysosomal storage disorder caused by an incorrect regulation of intracellular lipid trafficking. A molecular analysis carried out in 30 unrelated patients identified 43 distinct mutations in the *NPC1* gene, 12 of which had not been previously described. The novel *NPC1* alleles were four amino acid substitutions (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P and p.G1209E), a nonsense mutation (p.E1089X), a 1-bp insertion (p.L1117PfsX4), an in-frame deletion (p.N916del), four intronic changes (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) that affect the splicing mechanism, and the first deletion including the whole gene described in NPC disease. In all the splice site mutations, the formation of abnormal spliced transcripts was confirmed by cDNA analysis, and mRNA degradation by the nonsense-mediated mRNA decay process was also assessed. As it has been previously reported in this disease, genotype–phenotype correlations are limited due to the large number of private mutations. We describe for the first time one homozygous patient for p.I1061T mutation, who presented the severe infantile clinical onset, and another patient with the variant biochemical phenotype, whose clinical presentation was the neonatal form of the disease.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

**J Macías-Vidal^{a,b},
L Rodríguez-Pascau^{b,c,d},
G Sánchez-Ollé^{b,c,d}, M Lluch^{a,b},
L Vilageliu^{b,c,d}, D Grinberg^{b,c,d}
and MJ Coll^{a,b} and the Spanish
NPC Working Group***

^aInstitut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, ^bCIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain, ^cDepartament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, and ^dInstitut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

*The Spanish NPC Working Group includes all physicians who referred patients' samples for the study: A. Alonso (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), M. Arellano (Hospital Mútua de Terrassa, Barcelona), O. Blanco de la Barca (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo), M. R. Cazorla (Hospital de Fuenlabrada, Madrid), J. Dalmau (Hospital Universitari La Fe, Valencia), R. Domingo (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia), M. T. García-Silva and E. Martín (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid), M. Gil-Campos (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba), P. Jara (Hospital Universitario La Paz, Madrid), D. Lefeber (Radboud University Medical Centre Nijmegen, Nederland), J. A. Martínez-Matos and L. Romero (Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona), I. Ortiz (Hospital General de Elda, Alicante), G. Ozaita (Complejo Hospitalario de Ourense), M. S. Pérez Poyato and M. Pineda (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona), J. Prieto (Hospital Universitario de Salamanca), S. Roldán (Hospital Virgen de las Nieves, Granada), L. Ruiz del Portal (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla) and A. Verdú Pérez (Hospital Virgen de la Salud, Toledo).

Key words: large deletion – lysosomal storage disorder – Niemann – Pick type C disease – *NPC1* gene – splice site mutations

Corresponding author: Dr Maria Josep Coll, Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, C/Mejía Lequerica s/n, Ed. Helios III Planta baixa, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 932279341;
fax: +34 932275668;
e-mail: mjcoll@clinic.ub.es

Received 12 April 2010, revised and accepted for publication 2 July 2010

Niemann–Pick type C (NPC) disease (OMIM #257220) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>) is an autosomal recessive lipid storage disorder. At the cellular level, the disease produces a late-endosomal/lysosomal accumulation of endocytosed unesterified cholesterol that leads to the accumulation of a complex pattern of lipids in non-neural tissues and in the brain (1). The clinical manifestations are characterized by the presence of hepatosplenomegaly and severe progressive neurological dysfunction with varying age at onset and later course (2).

Genetic and allelic heterogeneity was established for this disease by the identification of two different genes, *NPC1* (MIM 607623) and *NPC2* (MIM 601015) (3–5). Over 294 and 19 different disease-causing mutations have been reported worldwide in *NPC1* and *NPC2* gene, respectively (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

A number of studies point towards a key role for the NPC1 and NPC2 proteins in modulating vesicular trafficking of cholesterol and glycolipids (6–8), although whether they work in concert, interacting at the functional and potentially at the structural levels, is unclear. It is worth mentioning that direct protein–protein interactions for NPC2 with NPC1 have not been reported so far (9).

In a previous survey by our group, we reported the mutational analysis of the *NPC1* gene in a cohort of 40 Spanish patients and we suggested a unique origin for p.C177Y and p.G993EfsX4 mutations in contrast to p.I1061T mutation that showed different origins. Here, we present the molecular analysis in 30 unrelated NPC patients, which allowed the identification of 12 novel mutations in the *NPC1* gene including a large deletion and several splice site mutations that have been characterized at RNA level.

Materials and methods

Patients

Samples were obtained from 31 patients belonging to 30 unrelated families. Most of them were

of Spanish origin, except for seven patients from other ethnic backgrounds: Moroccan, Costa Rican, Ecuadorian and Dutch. Nine patients (NPC02, 03, 07, 13, 21, 29, 36, 38 and 40) had been previously described by our group (10), but one of the mutant alleles in each of them had remained unidentified. Diagnosis of NPC disease was determined by cytochemical demonstration of pathologically enriched cholesterol via filipin staining in cultured skin fibroblasts as described by Vanier et al. (11). Classification of patients with respect to their clinical characteristics was as previously proposed (12).

Mutation screening: analysis of cDNA and genomic DNA

To identify mutations in *NPC1* gene, sequence analysis of its cDNA was performed. The changes identified were confirmed by sequencing the corresponding genomic DNA region. When only one mutation was found in the cDNA sequence, all exons and intron boundaries were sequenced.

To detect possible mutations whose mRNAs are candidate to suffer nonsense-mediated mRNA decay (NMD) process (13), cells were treated with cycloheximide (CHX) (Sigma, St. Louis, MO) according to the protocol previously described (14). RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed using standard methods. *NPC1* cDNA was amplified in 10 overlapping PCR fragments using either specific primers previously described (15) or self-designed primers, which are available upon request. To analyse the occurrence of exon 11 skipping in CHX-treated or untreated fibroblasts from the NPC29 patient and from a healthy individual, cDNA was amplified using the forward primer specific for the skipped transcript (overlapping exons 10 and 12) 5'TTGGGAGGCTATGATGGTTTA3' and the reverse primer in exon 14 5'GGTTTCCCC TTGAAGACGTT3'. The real-time PCR method used to quantify the mRNA levels in this patient was previously described (14). To determine the intronic change that causes exonization of 374

Molecular analysis of 30 NPC patients

bp in the NPC59 patient, primers based on the sequence of intron 1 were used (primer sequences available upon request). PCR products were screened for mutations by DNA sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. The sequencing reactions were run on an ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Genomic DNA was extracted from cultured skin fibroblasts by standard methods. *NPC1* and *NPC2* exons and their intron boundaries were amplified using primers and PCR conditions previously described (10, 16). PCR products were purified and sequenced as described in the preceding paragraphs. Novel mutations were analysed in 50 healthy controls.

Characterization of the mutations of patient NPC57

To confirm the presence of p.T1066N mutation in exon 21 of the *NPC1* gene in samples from the NPC57 patient and from their parents, gDNA was amplified.

To analyse the deletion, quantitative real-time PCR experiments were performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). All PCR reactions, with a final volume of 10 µl, were run in triplicate and contained 50 ng of DNA. Exons 1, 21 and 25 of the *NPC1* gene and exon 5 of the *PMM2* gene, which was used as endogenous control, were run in separate wells. The reagents were SYTO®9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon) and Ampli Taq® Gold DNA Polymerase with Gene Amp® 10× PCR Gold buffer and MgCl₂ solution (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers used to amplify the *PMM2* fragment were forward 5'AGGCTGTTTATCTATGTTGCC3' and reverse 5'CACCAGGCCATATCTTATTT3'. PCR conditions were 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The runs were monitored via the STEPONE Software v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Levels of gDNA were relatively quantified by evaluating C_t values according to the comparative C_t ($\Delta\Delta C_t$) method (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A total of 13 polymorphisms located in the *NPC1* gene were analysed by PCR amplification and sequencing. In particular, three of the polymorphisms were in the 5'UTR region, four were in intron 1, and the remaining six were in exons 4, 6, 12, 17, 18 and 25 (last exon of the gene),

respectively. Parents' samples were also analysed for these polymorphisms.

Mutation nomenclature

All mutations were described according to the recommended nomenclature (17) (the updates found at the web page: <http://www.HGVS.org/mutnomen/>). Gene nucleotide numbering was according to the GenBank sequence NM_000271.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), with +1 as A of the start codon. The ATG codon represents +1 for the amino acid numbering according to NPC1 protein sequence NP_000262.1.

Results

Clinical and biochemical phenotype

The clinical and biochemical phenotype distribution of the unrelated NPC patients is summarized in Table 1. Clinical phenotypes were classified according to the age at onset of neurological symptoms, except for the neonatal fatal systemic form. The group of 30 patients included 3 (10%) neonatal, 10 (33.3%) severe infantile (onset at age <2 years), 6 (20%) late infantile (onset at age 3–5 years), 6 (20%) juvenile (onset at age 5–16 years) and 2 (6.6%) adult (onset at age >16 years) clinical forms. In three patients, the clinical phenotype could not be established due to the lack of data relating to disease progression.

Regarding the biochemical phenotype, 21 (70%) of the patients presented the classical phenotype (a massive unesterified cholesterol accumulation) and 8 (26.6%) of them showed the variant phenotype (a moderate unesterified cholesterol accumulation). No biochemical classification was possible in one patient because the filipin staining could not be performed.

Mutation analysis

Table 1 shows the *NPC1* genotypes of the patients included in this study. Molecular analysis of *NPC1* gene allowed the identification of 43 different mutations, 12 of which had not been described before. The novel mutations were four amino acid substitutions [p.F995L (c.2983T>C), p.F1079S (c.3236T>C), p.L1106P (c.3317T>C) and p.G1209E (c.3626G>A)], a nonsense mutation [p.E1089X (c.3265G>T)], a 1-bp insertion [p.L1117PfsX4 (c.3349dupC)], an in-frame deletion [p.N916del (c.2746_2748delAAT)], four intronic changes that affect the splicing mechanism (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A

Table 1. Clinical, biochemical and mutational features of 30 Niemann–Pick C disease patients

Patient	Origin	Clinical phenotype ^a	Biochemical phenotype ^b	Nucleotide change (allele 1)	Amino acid change ^c (allele 1)	Nucleotide change (allele 2)	Amino acid change ^c (allele 2)	Ref.
NPC13 ^d	Spanish	Neonatal	Classical	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	N
NPC55	Spanish	Neonatal	Classical	c.3591+5G>A	p.[S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	c.3591+5G>A	p.[S1160_S1197del, V1177_S1197del, S1197_V1198ins15]	N
NPC61	Spanish	Neonatal	Variant	c.[2932C>T; 3467A>G]	p.[R978C; N1156S]	c.3019C>G	p.P1007A	18, 4, 19
NPC02 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.3245+1dupG	p.[S1082RfsX15, S1082_Q1090delinsF]	c.3265G>T	p.E1089X	10, N
NPC07 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.894dupT	p.V299CfsX9	c.2612A>G	p.Y871C	10, 20
NPC40 ^d	Spanish	Severe infantile	Classical	c.1935T>A	p.C645X	c.3236T>C	p.F1079S	10, N
NPC47	Ecuadorian	Severe infantile	Classical	c.530G>A	p.C177Y	c.530G>A	p.C177Y	18
NPC51	Spanish	Severe infantile	Classical	c.1436G>A	p.C479Y	c.3160G>A	p.A1054T	10, 21
NPC53	Spanish	Severe infantile	Classical	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.2830G>A	p.D944N	22, 21
NPC57	Spanish	Severe infantile	Classical	c.3197C>A	p.T1066N	Deletion of the whole <i>NPC1</i> gene	-	10, N
NPC62	Moroccan	Severe infantile	Classical	c.3182T>C	p.I1061T	c.3182T>C	p.I1061T	23
NPC63	Spanish	Severe infantile	Classical	c.3324A>C	p.Q775P	c.2830G>A	p.D944N	21
NPC64	Moroccan	Severe infantile	Classical	c.3317T>C	p.L1106P	c.3317T>C	p.L1106P	N
NPC03 ^d	Spanish	Late infantile	Classical	c.530G>A	p.C177Y	c.2604+5G>A	p.I839_D868del	18, N
NPC21 ^d	Spanish	Late infantile	Classical	c.882-28A>T	p.K295RfsX6	c.1274C>A	p.S425X	N, 10
NPC36 ^{d,e}	Spanish	Late infantile	Classical	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.2883_2897del	p.I962_F966del	24, 10
NPC38 ^d	Spanish	Late infantile	Variant	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.3754G>C	p.V1198GfsX4 ^f	24, 10
NPC45	Costa Rican	Late infantile	Classical	c.2201G>T	p.S734I	c.2201G>T	p.S734I	25
NPC54	Spanish	Late infantile	Variant	c.352_353delAG	p.Q119VfsX8	c.2974G>T	p.G992W	22, 19
NPC29 ^d	Spanish	Juvenile	Variant	c.1436G>A	p.C479Y	?	?	10
NPC46	Spanish	Juvenile	Classical	c.1990G>A	p.V664M	c.3104C>T	p.A1035V	25, 18
NPC49	Spanish	Juvenile	Classical	c.2922G>A	p.A750_G765del	c.3425T>C	p.M1142T	18, 21
NPC52	Spanish	Juvenile	Variant	c.2932C>T	p.R978C	c.2983T>C	p.F995L	18, N
NPC58	Spanish	Juvenile	Classical	c.2746_2748delAAT	p.N916del	c.3451G>A	p.A1151T	N, 26
NPC60	Spanish	Juvenile	Variant	c.1554-1009G>A	p.A519QfsX1	c.3182T>C	p.I1061T	24, 23
NPC50	Spanish	Adult	Variant	c.2974G>C	p.G992R	c.2983T>C	p.F995L	21, N
NPC56/NPC56 ^g	Spanish	Adult	Classical	c.3349dupC	p.L1117PfsX4	c.3672C>G	p.F1224L	N, 10
NPC48	Dutch	Unknown	Unknown	c.2861C>T	p.S954L	c.3626G>A	p.G1209E	19, N
NPC59	Moroccan	Unknown	Variant	c.58-3280C>G	p.V20CfsX6	c.2819C>T	p.S940L	N, 19
NPC65	Moroccan	Unknown	Classical	c.3557G>A	p.R1186H	c.3557G>A	p.R1186H	4

? , not found; N, novel mutation identified in this report; NMD, nonsense-mediated mRNA decay.

^aClassification of clinical phenotypes by age at onset of neurological symptoms (12), except for the neonatal fatal systemic form that includes those patients who died from liver failure in the first months of life. We included in the unknown form those patients who were diagnosed at the neonatal period on the systemic signs but not presented any neurological symptom yet.

^bDefined by the degree of severity of alterations of intracellular cholesterol processing.

^cNote that in some cases, the putative protein might not be synthesized due degradation of the mRNA by NMD.

^dPatients previously reported (10), but they had only identified one mutated allele.

^eNote that this patient was mentioned as NPC111 in the article in which the c.1554-1009G>A mutation was first described (24).

^fNote that this mutation was previously described as p.G1252R (10).

^gPatient 56 and 56' are affected siblings.

Molecular analysis of 30 NPC patients

and c.3591+5G>A), and a large deletion that includes the whole *NPC1* gene.

We also found a novel mutant allele carrying two *in cis* mutations, p.[R978C;N1156S], as shown by analysis on the NPC61 parents' DNA (not shown).

Our analysis of *NPC1* gene allowed completion of 29 genotypes. In one patient (NPC29), after sequencing both cDNA and genomic DNA, one allele still remains unknown (see subsequent sections).

Splicing mutations

The electrophoretic profile of RT-PCR products obtained from total RNA isolated from several patients' fibroblasts, which bear novel splice site mutations (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) or previously described changes (c.1554-1009G>A, c.2292G>A and c.3754G>C), showed multiple bands (Fig. 1). Therefore, these mutations are worth to be described in more detail.

The presence of the intronic mutation c.58-3280C>G promotes a pseudoexon insertion that corresponds to 374 bp of intron 1, which was detected by direct sequencing (c.57_58ins374) (Fig. 1a). This change presumably creates a novel acceptor region and activates a cryptic donor splice site (splicing score 0.92), whereas the naturally used adjacent splice sites of the surrounding exons remain functional, resulting in the generation of an aberrant transcript. The inserted intronic sequence led to a premature termination codon (PTC), but the extra band was present in both CHX-treated and untreated samples, suggesting no degradation by the NMD mechanism (not shown).

The c.882-28A>T intronic change, which involves the conserved adenosine residue of the lariat branch point in intron 6, causes an abnormally spliced cDNA with the complete skipping of exon 7 (c.882_954del73) (Fig. 1b). The loss of exon 7 disrupts the reading frame leading to a PTC, which activates mRNA degradation by the NMD process (not shown).

The c.2604+5G>A splice mutation, which is located in a conserved position of the donor splice site of intron 17, promotes skipping of exon 17 (c.2515_2604del90) (Fig. 1c).

The analysis of c.3591+5G>A products reveals three abnormally spliced cDNAs: one with an insertion of the first 45 bp of intron 23 (c.3591_3592ins45), another with a deletion of the last 63 bp of exon 23 (c.3529_3591del63) and a third one with the skipping of exon 23 (c.3478_3591del114) (Fig. 1d).

Among the previously described mutations, the deep intronic change c.1554-1009G>A (24) is located in intron 9 and creates a cryptic donor splice site resulting in the incorporation of 194 bp of the intron 9 (c.1553_1554ins194) as a pseudoexon (Fig. 1e).

The c.2292G>A mutation leads to the creation of an acceptor splice site in exon 15, generating a transcript with an in-frame deletion of the first 48 bp of exon 15 (c.2246_2293del48) (Fig. 1f).

The c.3754G>C mutation affects the last nucleotide of exon 24, which plays a key role in governing the splicing efficiency, and generates skipping of exon 24 (c.3592_3754del163) (Fig. 1g). In a previous report (10), the effect on NPC1 protein of this change was indicated as p.G1252R; nevertheless, skipping of exon 24 disrupts the reading frame, and the predicted translation product of this mRNA, which is not degraded by the NMD process (not shown), is a truncated protein.

Different transcripts found in the sample from patient NPC02

In a previous study (10), one of the mutant alleles, c.3245+1dupG, of this patient was found. Here, we report the identification of a mutation in the second allele, p.E1089X. Thus, the two disease-causing mutations of the patient were now identified. However, the analysis of the cDNA from the patient showed the appearance of four different transcripts (Fig. 2) as a result of the combination of the presence/absence of the dupG and of an alternative pattern of splicing that skipped the first 25 nucleotides of exon 22 (from position c.3246 to c.3270). In wild-type individuals, this alternative splicing was also observed but at very low levels and was only detectable upon CHX treatment (not shown). In the patient, one abundant transcript was that bearing the extra G and in which the alternative acceptor site within exon 22 had been used (Fig. 2, transcript D). This is consistent with the fact that this transcript would not be affected by NMD because the frameshift caused by the addition of the G nucleotide would be corrected by the elimination of the 25 nucleotides of exon 22 due to the alternative splicing. The analysis of the genomic and cDNA samples from the parents confirmed this hypothesis. The father carries the duplication of the G and the mother the nonsense p.E1089X mutation. At the cDNA level, the p.E1089X mutation was not observed, suggesting degradation by NMD.

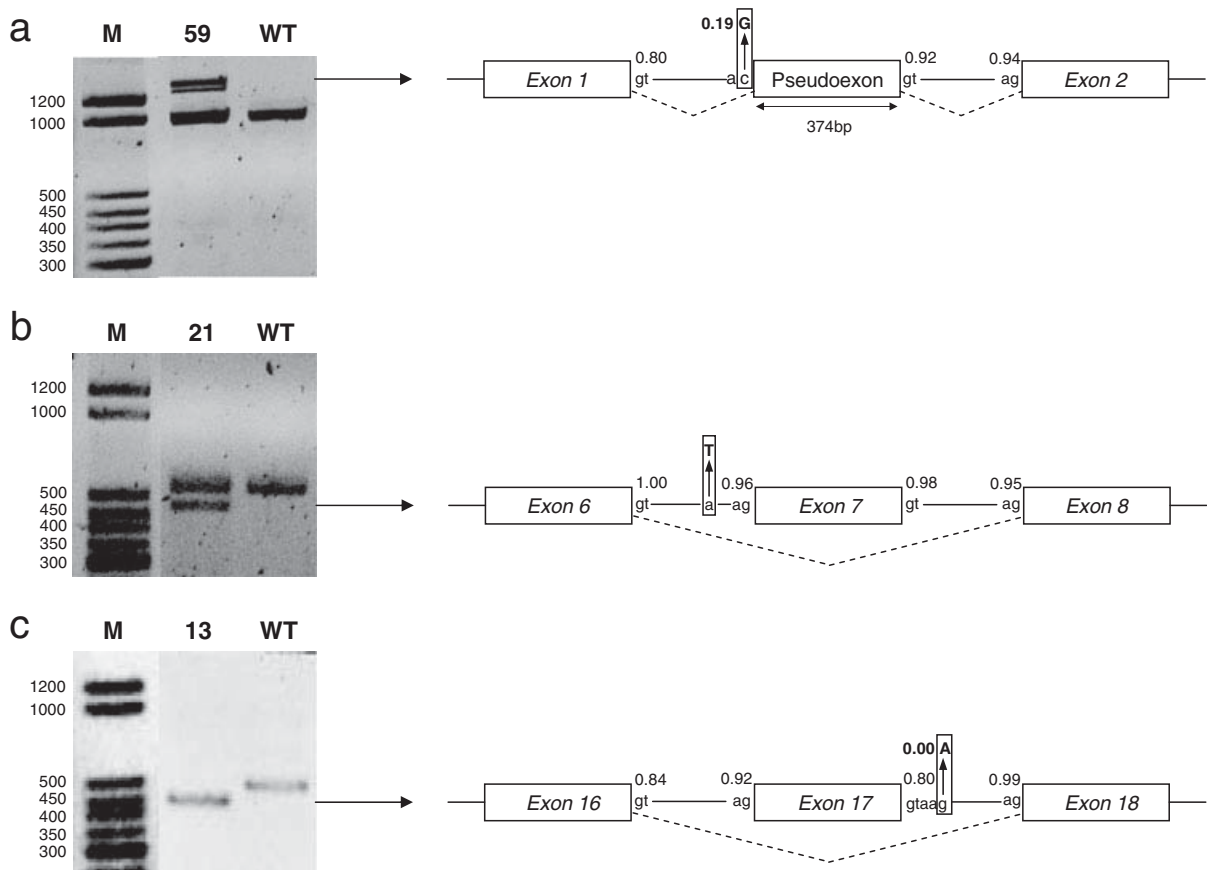


Fig. 1. Abnormal *NPC1* mRNAs in cases with splice site mutations. Agarose gel electrophoresis of reverse transcription-polymerase chain reaction products and schematic depictions of samples of *NPC1* cDNA isolated from the patients' fibroblasts treated with cycloheximide. The splice scores (calculated with BDGP software) are shown above the corresponding 5' and 3' splice sites. The mutant scores are in bold letters. Mutations are indicated by arrows. M, molecular weight of 50-bp DNA marker (expressed in bp); WT, wild-type individual. **(a)** Patient 59 with c.58-3280C>G mutation. The intermediate band corresponds to heteroduplex. **(b)** Patient 21 with c.882-28A>T mutation. **(c)** Patient 13 with c.2604+5G>A mutation in homozygosity. **(d)** Patient 55 with c.3591+5G>A mutation in homozygosity. **(e)** Patients 36, 38 and 60 with c.1554-1009G>A mutation. **(f)** Patient 49 with c.2292G>A mutation. **(g)** Patient 38 with c.3754G>C mutation. The upper band corresponds to heteroduplex.

Large deletion allele carried by patient NPC57

The first analysis of samples from patient NPC57 revealed homozygosity for mutation p.T1066N. However, while the father was heterozygous for this change, the mother did not carry the mutation. The analysis of 13 polymorphisms within the *NPC1* gene (three in the 5'UTR region: rs1620047, rs1788774 and rs1652354; four in intron 1: rs1788781, rs1788783, rs1788826 and rs7226548; and six in the coding region: p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N and p.R1266Q) in the patient and parents suggested a deletion of the maternal allele, because the polymorphisms covered all the gene from the 5'UTR to the last exon. Quantitative PCR analyses revealed that the patient and the mother have half of the amount of *NPC1* gDNA. The relative quantification (RQ) of the *NPC1* DNA was normalized to *PMM2* DNA levels (endogenous

control) using the comparative C_t ($\Delta\Delta C_t$) method. The control sample (wild-type individual) was set as the reference value (RQ = 1). Sample from the father showed RQ around 1, whereas the patient and the mother showed RQ around 0.50 for the exon 21 and also the first and the last exons of the *NPC1* gene. To determine the limits of the NPC57 deletion, additional polymorphisms located in other chromosome 18 flanking genes will be analysed.

Unidentified allele

Regarding NPC29 patient, apart from the identification of p.C479Y mutation in one allele, an extra band corresponding to the skipping of exon 11 (lost of 103 bp) was detected. However, no mutation that could explain this alternative splicing was found after cDNA and gDNA

Molecular analysis of 30 NPC patients

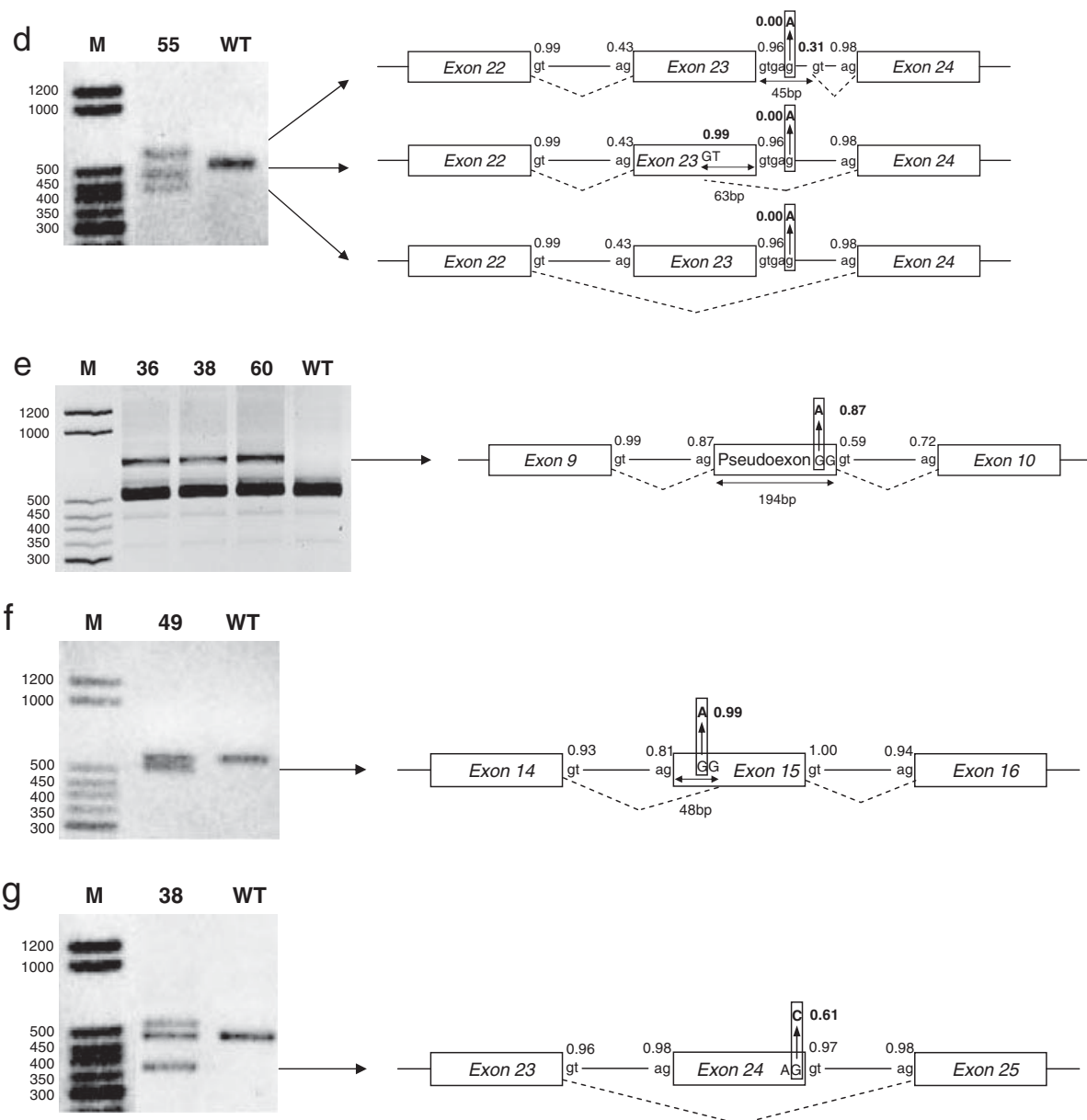


Fig. 1. Continued

sequencing. To analyse whether this transcript was naturally produced, we performed the same PCR amplification in cDNA from wild-type fibroblasts. The extra band was also detected in the wild-type sample, although the intensity was lower than in that of the patient (Fig. 3a). CHX treatment showed that this transcript was partly subjected to NMD. To further confirm these results, an additional PCR using a forward primer specifically designed for the amplification of the transcript lacking exon 11 was carried out. As shown in Fig. 3b, in all cases, a band of the expected size (416 bp) was obtained, suggesting that this alternative product is not related with the disease in

the patient. The analysis of polymorphic markers in the coding region of the *NPC1* gene and the normal mRNA levels observed by real-time PCR (RQ around 1) in this patient did not suggest the presence of a whole *NPC1* deletion or a mutation targeted by the NMD process. *NPC2* gene was also analysed in this patient but no change was detected.

Discussion

Mutation profile

As previously reported (27), molecular results in NPC patient series of this study show a broad

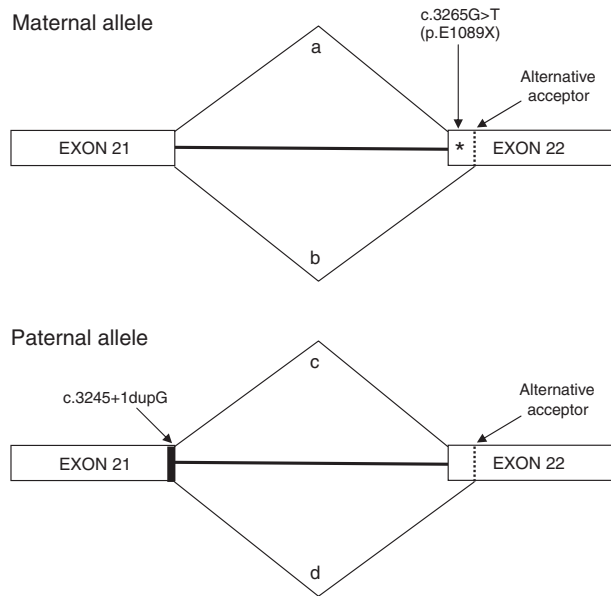


Fig. 2. *NPC1* transcripts observed in samples from patient NPC02. The maternal allele generates one transcript (a), which uses normal splice sites but contains the nonsense mutation c.3265G>T (p.E1089X) in exon 22, and another transcript (b) that uses an alternative acceptor site within exon 22 and skips the first 25 nucleotides of exon 22. The paternal allele bears an extra G nucleotide at the end of exon 21 and generates two transcripts depending on the usage of the normal (c) or alternative (d) acceptor site.

spectrum of disease-causing mutations in the *NPC1* gene.

The mutation profile of the studied cohort mainly shows mutant alleles containing missense alterations; however, it is worth mentioning the relevance of splicing defects. The true prevalence of this type of mutation is probably underestimated because deep intronic sequences are not conventionally sequenced, and in mRNA analysis, the aberrant transcripts (usually with a frameshift and a PTC) are usually prone to degradation by NMD (28).

Mutation p.I1061T is the most common *NPC1* mutation in patients of Western European descent (23). In our cohort of 55 Spanish NPC patients, including those of this study together with the ones reported in our preceding survey (10), this mutation accounts for 8% of the mutant alleles. The frequency of p.I1061T mutation is lower than that reported by other authors (23, 25, 29); however, it is similar to that described in the Portuguese and Italian populations (18, 30). Mutation p.P1007A was the second most frequent allele, with a frequency of 4.5%, in agreement with previous studies (20). The intronic change c.1554-1009G>A, first described by our group in the Spanish patient NPC36 (24), which causes a splicing error,

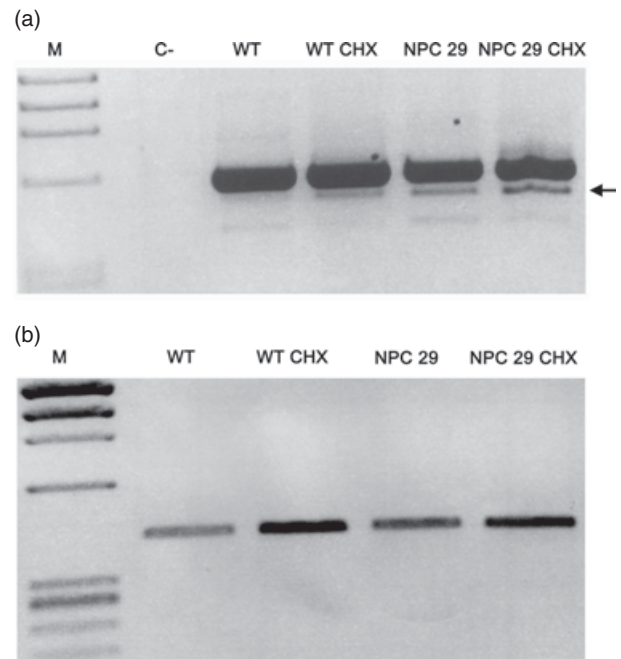


Fig. 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of fragments of the *NPC1* cDNA in samples from a wild-type (WT) individual and patient 29 (NPC29), in the absence or presence of cycloheximide (CHX). M, molecular weight marker; C-, negative control (PCR without DNA). (a) Amplification of fragment 5 of the *NPC1* cDNA, including exons 9–13. The arrow indicates the band corresponding to the skipping of exon 11. (b) Amplification of the skipped transcript using a specific forward primer overlapping exons 10 and 12.

appeared to be relatively common in our country, because three patients (NPC36, NPC38 and NPC60) were compound heterozygous for this mutation (2.7%). There is a great allelic heterogeneity, because few mutations are present in more than one patient.

Referring to the novel mutations, the missense changes (p.F995L, p.F1079S, p.L1106P and p.G1209E) are probably pathogenic mutations due to the fact that they were not observed in 100 healthy control alleles; after sequencing all *NPC1* gene, no other mutations were found, and the affected amino acid residues are conserved throughout species. Moreover, functional effect prediction programs such as POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) or PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) confirmed the possible pathogenesis of these novel changes (not shown). Although to verify these predictions, it should be necessary to perform expression studies on these alleles.

Among the other novel changes, there is the mutation p.N916del that causes an in-frame deletion. Although the effect of this deletion was not

confirmed by expression studies, the previous programs suggest that residue 916 is relevant for the NPC1 protein.

Mutations p.E1089X and p.L1117PfsX4 are undoubtedly disease-causing mutations, as they create a PTC that triggers mRNA degradation by the NMD mechanism (not shown).

The analysis of the novel splicing mutations (c.58-3280C>G, c.882-28A>T, c.2604+5G>A and c.3591+5G>A) using splicing prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) indicates that they disrupt natural splice sites. The effect of each mutation on the splicing score is shown in Fig. 1. In all cases, the formation of abnormal spliced transcripts has been confirmed by cDNA analysis. Nevertheless, to provide evidence that the observed intronic changes are disease causing, it should be necessary to evaluate them using minigene transfection assays. In the case of the novel deep intronic change, c.58-3280C>G, the fact that after CHX treatment no difference was observed in the cDNA from the patient NPC59 may be due to the escape of the NMD process. Termination codons are recognized by the NMD apparatus as premature if they are located more than 50–55 nucleotides upstream of the 3'-most exon–exon junction, but a number of apparent exceptions have been previously reported. The mechanisms involved in these individual cases of NMD resistance include the proximity of nonsense mutations to the natural initiation codon, translation re-initiation downstream of the nonsense codon and the presence of a sequence *cis*-acting element that confers immunity to the 50–55 nucleotide boundary rule (31). The same as the c.1554-1009G>A mutation (24), this intronic point mutation resulting in pseudoexon insertion can be effectively targeted with antisense therapy. In the case of c.882-28A>T mutation, the appearance of skipping of exon 7 coincides with what it was described for the c.882-28A>G mutation (32), because both of them affect the same nucleotide. Regarding the previously described c.2292G>A mutation, the observed effect in cDNA PCR product is the same as the one reported by other authors (18, 25).

We also describe a large deletion in one NPC patient, including the whole *NPC1* gene. To our knowledge, this is the first large deletion described in a NPC patient.

One allele remained unidentified, in the case of patient NPC29, in spite of the comprehensive analysis at the genomic and cDNA levels. The facts that a mutation on one *NPC1* allele was identified and that no mutation in *NPC2* was found strongly suggest that the missing mutation is in the *NPC1*

gene. An aberrant splicing including the skipping of exon 11 was observed; however, it also occurred in wild-type individuals, indicating that it is not related to the disease. No other aberrant splicing was detected, which rules out the presence of a deep intronic mutation. The mutation (in exon 9) and polymorphisms in exons 4 and 12 were found in heterozygosity, both at the genomic and at the cDNA levels. These data rule out a complete deletion of the gene or a mutation in a regulatory region that prevents the transcription of the gene from one allele. Moreover, no differences at the RNA level were detected by real-time PCR. A complex rearrangement, a small deletion, or another alteration could exist, but it is difficult to understand how it was detected neither by the genomic nor by the cDNA analyses performed.

Genotype–phenotype correlation

As we previously reported, this NPC series shows a great prevalence of the severe infantile form (around 30%), whereas this clinical presentation represents 20% of cases in a European survey (27).

Genotype–phenotype correlations are limited, due to the large number of private mutations and because most of the patients' samples were found to be heteroallelic. Among these correlations, we would like to introduce several considerations relating to some mutations. The p.I1061T mutation has been suggested to correlate with juvenile clinical presentation (23). Conversely, we describe for the first time one homozygous patient for p.I1061T mutation (NPC62), who presented the severe infantile clinical onset. This last fact is in disagreement with the previous conclusion that one p.I1061T allele is sufficient to exclude the most severe infantile neurological form (20). In this patient, the *NPC1* gene was entirely sequenced and it shared the haplotype [–, –, –, –, –, –] with respect to the six polymorphic markers p.Y129Y, p.H215R, p.M642I, p.I858V, p.N931N and p.R1266Q as we previously reported for all chromosomes bearing the p.I1061T mutation (10). This patient presented neonatal cholestasis but absence of neurological signs until second year of life. At that time, he presented with retarded psychomotor development, followed rapidly by the appearance of other symptoms as ataxia, dystonia and cataplexy. The parents are consanguineous and a brother died at 1 year by hepatopathy of unknown origin.

According to published data, the presence of p.P1007A mutation led to a juvenile or adult clinical onset (10, 18, 21). Patient NPC61, heterozygous compound for this mutation and biochemical variant, presented the neonatal systemic clinical presentation of the disease. This patient presented hepatosplenomegaly and cholestasis at birth. He died from liver failure at 6 months of life before onset of neurological disease.

In conclusion, we have established the mutation profile in a large number of NPC patients, which contributes to a greater knowledge of this uncommon disorder. Moreover, we want to emphasize the need to analyse the cDNA in presence of CHX in those patients with one unidentified allele after performing the mutation screening in the genomic DNA. It is essential to detect splicing defects, which have relevance (20% of the mutated alleles in this cohort) as disease-causing mutations.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundación Niemann–Pick de España, by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, SAF2006-12276) y Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, SAF2009-11289) and by the Generalitat de Catalunya (SGR2005-00848 and 2009SGR-971). The authors are grateful to them and also to all patients and their families. J. M.-V. is recipient of Juan Girón fellowship from the Spanish Foundation and L. R.-P. was a recipient of a FI fellowship from the Generalitat de Catalunya. We also thank A. Valle and L. Ozaez for their technical assistance. The CIBER of Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K et al. Niemann–Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2001: 3611–3633.
- Vanier MT, Suzuki K. Niemann–Pick diseases. In: Moser HW, ed. Neurodystrophies and neurolipidoses: handbook of clinical neurology, Vol. 66. Amsterdam: Elsevier Science, 1996: 133–162.
- Vanier MT, Duthel S, Rodriguez-Lafrasse C et al. Genetic heterogeneity in Niemann–Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 118–125.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG et al. Niemann–Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 277: 228–231.
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann–Pick C disease. *Science* 2000; 290: 2298–2301.
- Zhang M, Sun M, Dwyer NK et al. Differential trafficking of the Niemann–Pick C1 and 2 proteins highlights distinct roles in late endocytic lipid trafficking. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 92: 63–73.
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A et al. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15287–15292.
- Subramanian K, Balch WE. NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15223–15224.
- Storch J, Xu Z. Niemann–Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 671–678.
- Fernández-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann–Pick type C patients: genotype–phenotype correlations. *Clin Genet* 2005; 68: 245–254.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R et al. Type C Niemann–Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 328–337.
- Iturriaga C, Pineda M, Fernández-Valero EM et al. Niemann–Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale. *J Neurol Sci* 2006; 249: 1–6.
- Maquat LE. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1995; 1: 453–465.
- Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M et al. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann–Pick type C patients from Spain. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 60–64.
- Tarugi P, Ballarini G, Bembi B et al. Niemann–Pick type C disease: mutations of NPC1 gene and evidence of abnormal expression of some mutant alleles in fibroblasts. *J Lipid Res* 2002; 43: 1908–1919.
- Millat G, Chikh K, Naureckiene S et al. Niemann–Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1013–1021.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15: 7–12.
- Ribeiro I, Marcão A, Amaral O et al. Niemann–Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet* 2001; 109: 24–32.
- Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS et al. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1252–1260.
- Millat G, Baño N, Molinero S et al. Niemann–Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 220–232.
- Millat G, Marçais C, Tomasetto C et al. Niemann–Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1373–1385.
- Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann–Pick disease type C. *Hum Genet* 1999; 105: 10–16.
- Millat G, Marçais C, Rafi MA et al. Niemann–Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1321–1329.
- Rodríguez-Pascau L, Coll MJ, Vilageliu L et al. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the *NPC1* gene causing Niemann–Pick type C disease. *Hum Mutat* 2009; 30: E993–E1001.
- Park WD, O’Brien JF, Lundquist PA et al. Identification of 58 novel mutations in Niemann–Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat* 2003; 22: 313–325.

Molecular analysis of 30 NPC patients

26. Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ et al. The national Niemann–Pick type C1 disease database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J Lipid Res* 2010; 51: 406–415.
27. Vanier MT, Millat G. Niemann–Pick disease type C. *Clin Genet* 2003; 64: 269–281.
28. Vega AI, Pérez-Cerdá C, Desviat LR et al. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type IA. *Hum Mutat* 2009; 30: 795–803.
29. Imrie J, Dasgupta S, Besley GTN et al. The natural history of Niemann–Pick disease type C in the UK. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 51–59.
30. Fancello T, Dardis A, Rosano C et al. Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann–Pick C Italian Patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics* 2009; 10: 229–239.
31. Inacio A, Silva AL, Pinto J et al. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem* 2004; 279: 32170–32180.
32. Di Leo E, Panico F, Tarugi P et al. A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann–Pick type C disease. *Hum Mutat* 2004; 24: 440.

