

EWA POPOWSKA

Zakład Genetyki Centrum Zdrowia Dziecka

Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

MOLEKULARNE PODŁOŻE ZESPOŁU HUNTERA

WPROWADZENIE

Zespół Huntera należy do grupy dziedzicznych chorób metabolicznych zwanych mukopolisacharydozami, które wynikają z niedoboru enzymów lizosomalnych, rozkładających wielocukry zwane mukopolisacharydami lub glikozaminoglikanami. Nierozłożone lub częściowo zdegradowane glikozaminoglikany, a mianowicie siarczan dermatanu, siarczan heparanu, siarczan keratanu lub siarczan chondroityny są gromadzone w lizosomach komórek i częściowo wydalone z moczem. Obecność dużych ilości mukopolisacharydów w komórkach powoduje progresywne uszkodzenie ich funkcji.

W katabolizmie mukopolisacharydów bierze udział 10 różnych enzymów lizosomalnych o charakterze glikozydaz, sulfataz lub transferaz. W tabeli 1 zestawiono nazwy enzymów, rodzaje rozkładanych cukrów oraz nazwy poszczególnych chorób wywołanych przez niedobór odpowiednich enzymów.

Z klinicznego punktu widzenia mukopolisacharydozy charakteryzują się stopniowo narastającymi objawami powiększenia narządów wewnętrznych, rozsiazanymi zaburzeniami kostnienia (*dysostosis multiplex*) i charakterystycznymi rysami twarzy. W wielu przypadkach obserwuje się też uszkodzenie słuchu, wzroku, układu krążenia i układu kostno-stawowego. Zespół Hurlera, ciężka forma zespołu Huntera i wszystkie typy zespołu Sanfilippo przejawiają znaczne zahamowanie rozwoju umysłowego. U chorych mogą być obserwowane duże różnice w ostrości przebiegu choroby wywołanej niedoborem tego samego enzymu, a zarazem znaczne podobieństwo niektórych objawów klinicznych dla różnych typów mukopolisacharydoz. Typ mukopolisacharydozy rozpoznaje się na podstawie oceny klinicznej, testu enzymatycznego a ostatnio coraz częściej na podstawie badań genetycznych.

Zespół Huntera (mukopolisacharydoza typu II — MPS II) występuje w dwu formach:

- MPS A — ciężka postać choroby — przejawiająca się głębokim, szybko narastającym upośledzeniem umysłowym, upośledzeniem słuchu, znacznymi zmianami w układzie kostno-stawowym i układzie krążenia, powiększeniem wątroby i zgonem przed 15 rokiem życia;

— MPS II B — łagodna postać choroby — przejawiająca się prawidłowym rozwojem umysłowym, mniej nasilonymi zmianami w narządzie ruchu i układzie krążenia, dłuższym okresem przeżycia i możliwością posiadania potomstwa.

U wielu pacjentów obserwuje się pośrednie postacie choroby.

Tabela 1

Klasyfikacja mukopolisacharydoz (według NEUFELDA i MUENZERA 1989)

Typ choroby	Nazwa choroby	Nazwa uszkodzonego enzymu	Rodzaj rozkładanego cukrowca
MPS I H	Hurler	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS I S	Scheie	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS I H/S	Hurler-Scheie	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS II (Forma A)	Hunter (Forma A)	sulfataza α -L-iduronianu	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS II (Forma B)	Hunter (Forma B)	sulfataza α -L-iduronianu	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS IIIA	Sanfilippo A	N-sulfataza heparanu	siarczan heparanu
MPS IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetyloglukozaminidaza	siarczan heparanu
MPS IIIC	Sanfilippo C	acetylotransferaza acetylo-CoA: α -glukozamid	siarczan heparanu
MPS IIID	Sanfilippo D	6-sulfataza N-acetylo - glukozaminy	siarczan heparanu
MPS IVA	Morquio A	6-sulfataza galaktozy	siarczan keratanu 6-siarczan chondroityny
MPS IVB	Morquio B	β -galaktozydaza	siarczan heparanu
MPS VI	Maroteaux-Lamy	4-sulfataza-N-acetylo- galaktozaminy (arylosulfataza B)	siarczan dermatanu
MPS VII	Sly	β -glukoronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu 4-, 6-siarczany chondroityny

BIOCHEMICZNE PODŁOŻE ZESPOŁU HUNTERA

Zespół Huntera wynika z niedoboru sulfatazy α -L-iduronianu (EC 3.1.6.13). Enzym ten katalizuje odszczepienie reszty siarczanowej w pozycji 2' kwasu L-iduronowego, występującego na nieredukującym końcu siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu. Jest to pierwszy etap katabolizmu mukopolisacharydów. Na rysunku 1 przedstawiono strukturalną budowę obu wielocukrów a strzałkami oznaczono kolejne etapy ich rozkładu.

BUDOWA BIAŁKA ENZYMATYCZNEGO

Sulfataza iduronianu (IDS) występuje w różnych tkankach w bardzo niewielkich ilościach, co przez długi czas utrudniało izolację czystych preparatów enzymatycznych i zbadanie ich właściwości fizyko-chemicznych. Po kilku próbach w roku 1990 udało się wyizolować z wątroby, nerek, płuc i łożyska preparaty białkowe, które po 500000-krotnym oczyszczeniu posiadały specyficzną aktywność sulfatazy iduronianu (BIELICKI i współaut. 1990) i występowały w dwu formach A i B.

Aktywność obu form enzymu zależała w dużym stopniu od środowiska reakcji, to jest pH roztworu, siły jonowej, obecności różnych kationów i anionów, rodzaju substratu i obecności innych białek.

Sulfataza iduronianu, podobnie jak pozostałe enzymy biorące udział w katabolizmie mukopolisacharydów, jest hamowana przez produkty katalizowanej przez nią reakcji. Prawdopodobnie wszystkie te enzymy są zlokalizowane blisko siebie na błonach lizosomalnych, tworząc wspólny kompleks, działający szybko i sprawnie bez potrzeby transportu produktów pośrednich od jednego enzymu do drugiego.

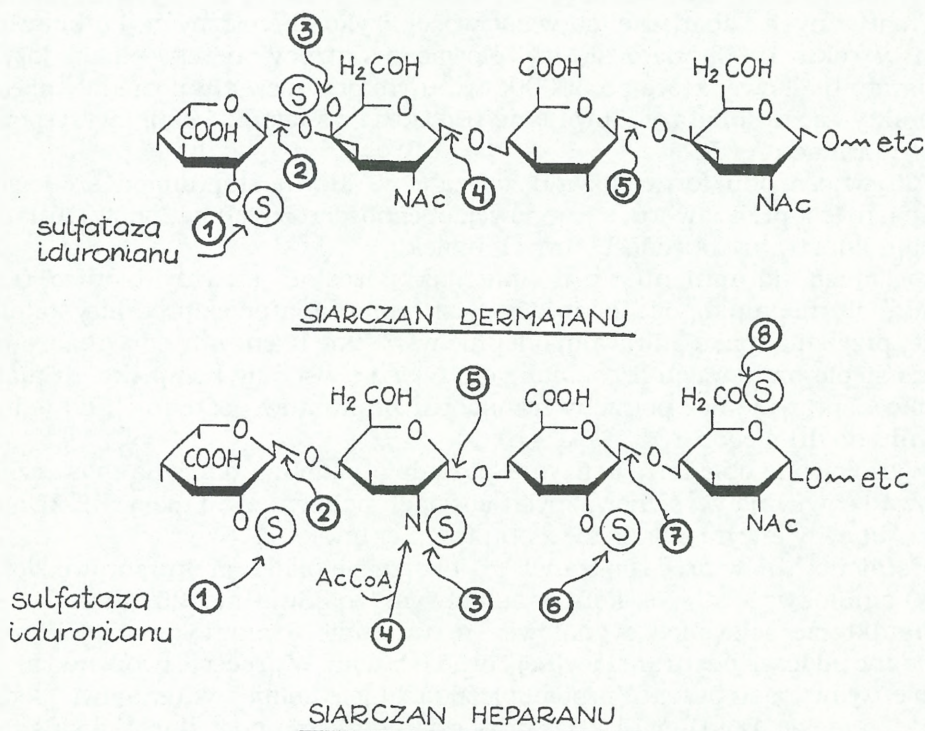
Wyizolowane obie formy enzymu posiadają podobną natywną masę cząsteczkową i zawierają w równoważnych ilościach polipeptydy o masie 42 kDa i 14 kDa. Aktywny enzym składa się z obu fragmentów.

Ustalono, że w procesie translacji* tworzy się białko prekursorowe złożone z 550 aminokwasów. Na końcu aminowym znajduje się 25 aminokwasów o charakterze sekwencji sygnałowej, a następnie 8 aminokwasów, które są wycinane podczas posttranslacyjnej obróbki białka. W procesie tworzenia aktywnego enzymu następuje też proteolityczne rozbiecie polipeptydu na dwie podjednostki o masie 42 kDa i 14 kDa, przy czym mniejsza podjednostka składa się z 95 aminokwasów, stanowiących koniec karboksylowy białka. Białko enzymatyczne posiada kilka potencjalnych miejsc N-glikozylacji, jednak nie ustalono jeszcze, które z nich są wykorzystywane.

Sulfataza iduronianu posiada sekwencję aminokwasową podobną do sekwencji innych sulfataz ludzkich, jak glukozamino-6-sulfataza i arylosulfataza A, B i C. Wysoki stopień homologii jest obserwowany szczególnie w N-końcowych fragmentach białek, zawierających grupy aminokwasów konserwatywnych, a dla

* Geny eukariotyczne składają się z eksonów, niosących informację o sekwencji aminokwasów w kodowanym białku oraz z intronów rozdzielających poszczególne eksony. Powstający podczas transkrypcji pierwotny mRNA posiada sekwencję odpowiadającą całemu genowi. W procesie składania genu (ang. mRNA splicing), zwanego też dojrzewaniem mRNA, następuje wycięcie sekwencji intronowych i wzajemne powiązanie sekwencji eksonowych. Przy końcu 5' intronu występuje specyficzna sekwencja nukleotydów stanowiących donorowe miejsce, a przy końcu 3' intronu specyficzna sekwencja nukleotydów stanowiących akceptorowe miejsce. Nukleotydy te są rozpoznawane przez splicosom, to jest kompleks enzymatyczny biorący udział w składaniu genu. Dojrzały mRNA niesie informację genetyczną w postaci trójnukleotydowych kodonów, które warunkują włączanie odpowiednich aminokwasów do syntetyzowanego w procesie translacji polipeptydu. cDNA stanowi łańcuch dezoksyrybonukleotydowy komplementarny do sekwencji rybonukleotydowej w dojrzałym mRNA.

IDS i arylosulfatazy C także w centralnych fragmentach polipeptydów. Prawdopodobnie wszystkie sulfatazy pochodzą ze spokrewnionej rodziny genów, które w funkcjonalnie ważnych rejonach białka uległy niewielkim zmianom w toku ewolucji.



Rys. 1. Degradacja siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu.

Strzałki z cyframi oznaczają kolejne etapy rozkładu obu mukopolisacharydów.

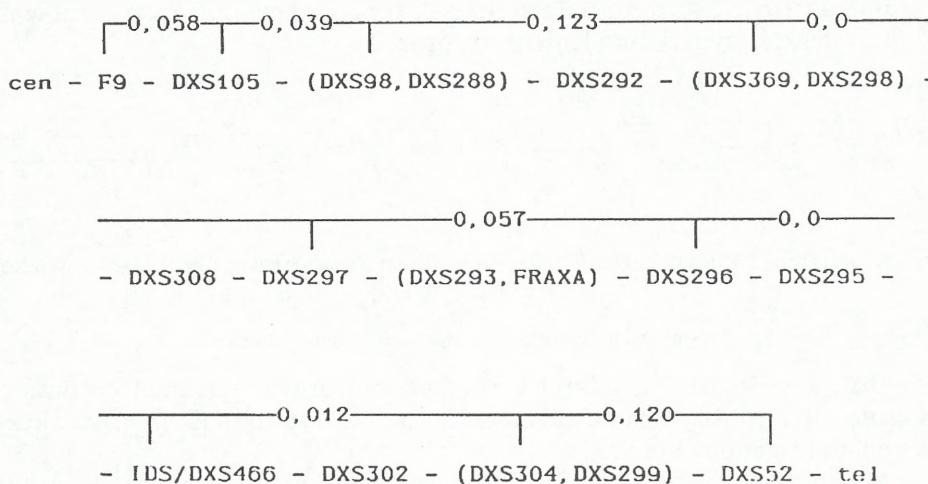
Każda sulfataza posiada też reiony unikalne, charakterystyczne tylko dla danego enzymu. Sulfataza iduronianu posiada dwa takie inserty. Nie wiadomo, jaki jest ich wpływ na działanie enzymu. Przypuszcza się, że jeden z nich może być odpowiedzialny za wiązanie IDS z błoną lizosomalną a drugi może stanowić sygnał dla wewnątrzpeptydowej proteolizy oddzielającej podjednostki 14 kDa i 42 kDa lub może decydować o specyficznym działaniu enzymu.

GENETYCZNE UWARUNKOWANIE ZESPOŁU HUNTERA

Gen kodujący sulfatazę iduronianu jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu X w rejonie q28. Prawdopodobne uszeregowanie markerów polimorficznych w rejonie lokalizacji genu *IDS* przedstawiono na rysunku 2.

W roku 1990 ustalono sekwencję całego transkryptu łącznie z rejonem promotorowym przy końcu 5' genu oraz rejonem nietranslacyjnym przy końcu

3' (WILSON i współaut. 1990). Stwierdzono, że 33 nukleotydy przed pierwszym nukleotydem wchodzącym w skład cDNA znajduje się miejsce startowe transkrypcji. Sekwencja promotorowa nie zawiera sekwencji nukleotydowej typu TATA lub CAAT, lecz posiada dwa ugrupowania złożone z nukleotydów GC (CCGCCC i GGGCGG). Ten typ potencjalnej sekwencji promotorowej jest zgodny z rolą genu *IDS*, będącego genem podstawowych przemian o niskim poziomie transkrypcji.



Rys. 2. Kolejność loci polimorficznych w rejonie Xq27-q28 (według SUTHERS i współaut. 1991).

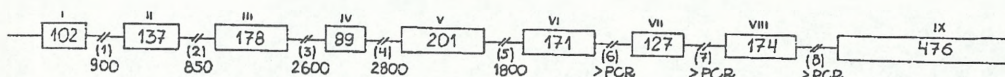
Liczby ułamkowe umieszczone między poszczególnymi loci obrazują częstość rekombinacji w tych rejonach chromosomu.

Sulfataza iduronianu, podobnie jak inne enzymy lizosomalne (np. arylosulfataza A, B i C) jest kodowana przez kilka typów mRNA różniących się długością (5,7, 5,4 i 2,1 kilo-par zasad — kpz). Wynika to z użycia różnych miejsc do poliadenylacji przy końcu 3' transkryptów. W przypadku mRNA o wielkości 2,1 kpz potencjalny sygnał poliadenylacji (AATAAA) pojawia się po 266 nukleotydach zlokalizowanych za kodonem terminalnym, niosącym informację o zakończeniu włączania aminokwasów do białka. Dla transkryptów o wielkości 5,4 i 5,7 kpz rejony nukleotydowe zlokalizowane przy końcu 3', które nie ulegają translacji, są znacznie większe i obejmują ponad 3 kpz.

W roku 1993 ukazały się równocześnie dwa doniesienia, przedstawiające sekwencję i organizację genu *IDS* (FLOMEN i współaut. 1993, WILSON i współaut. 1993). Okazało się, że gen *IDS* obejmuje rejon około 24 kpz i składa się z 9 eksonów i 8 intronów, które schematycznie przedstawiono na rysunku 3. Najmniejszy ekson (IV) jest zbudowany z 89 nukleotydów, a największy (IX) z 476 nukleotydów. Pięć pierwszych intronów (1–5) posiada wielkość od 0,85 kpz do 2,8 kpz, natomiast trzy ostatnie (6–8) są znacznie większe i obejmują łącznie 13 kpz. Nie zbadano dotychczas kolejności nukleotydów w całym genie

IDS, lecz ustalono sekwencje w poszczególnych eksonach i sekwencje graniczne ekson/intron. Poznanie fragmentów sekwencji intronowych było możliwe dzięki zsekwencjonowaniu fragmentów DNA uzyskanych po:

- amplifikacji nie znanych rejonów zawartych między znanymi fragmentami dwu sąsiadujących eksonów i
- amplifikacji nie znanych fragmentów DNA między jednym starterem reakcji PCR (polimerazowej reakcji łańcuchowej) zlokalizowanym w eksonie a drugim starterem o znanej sekwencji, specjalnie skonstruowanym i umieszczonym w przyległym intronie.



Rys. 3. Schemat budowy genu *IDS* (dane według: FLOMEN i współaut. 1993, WILSON i współaut. 1993)

Prostokątami oznaczono eksony, a cienką linią — introny.

Zgodnie z ogólnymi zasadami we wszystkich intronach miejsce donorowe wycinania intronu rozpoczyna się od sekwencji GT, natomiast miejsce akceptorowe posiada ugrupowanie AG.

Białko enzymatyczne *IDS* wykazuje duże podobieństwo budowy do sulfatazy sterydowej, szczególnie dla sekwencji kodowanych przez eksony II, III i VII, jednak ogólna organizacja genu *IDS* całkowicie odbiega od budowy genu sulfatazy sterydowej. Możliwe, że przyczyną tego jest znaczna różnica w specyficzności substratowej obu enzymów.

DIAGNOSTYKA ZESPOŁU HUNTERA

Identyfikacja zespołu Huntera (mukopolisacharydozy II, MPS II) opiera się na rozpoznaniu klinicznym, biochemicznym i genetycznym.

KLINICZNA DIAGNOSTYKA MPS II

Rozpoznanie kliniczne choroby jest prowadzone w oparciu o badania:

- rozwoju fizycznego (wagi, wzrostu, pomiarów antropometrycznych)
- rozwoju umysłowego (badania psychologiczne — współczynnik inteligencji)
- układu krążenia (echa serca i dużych naczyń, wydolności krążenia)
- ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego za pomocą tomografii komputerowej głowy (przewodnictwa nerwów obwodowych, słuchu, wzroku).

BIOCHEMICZNA DIAGNOSTYKA MPS II

Testy biochemiczne obejmują oznaczenie aktywności sulfatazy α -L-iduronianu oraz ocenę poziomu glikozaminoglikanów w moczu.

— Badanie aktywności enzymu IDS przeprowadza się w fibroblastach, cebulkach włosów, leukocytach, a także w osoczu i surowicy krwi. W przypadku badań prenatalnych są stosowane komórki wyizolowane z płynu owodniowego i sam płyn owodniowy — pobierane w 14–16 tygodniu ciąży, lub kosmki trofoblastu — pobierane w 9–10 tygodniu ciąży. Ze względu na mozaicyzm u heterozygotycznych płodów żeńskich, otrzymane próbki materiału biologicznego mogą wykazywać bardzo obniżony poziom enzymu, zbliżony do aktywności obserwowanej u chorych płodów męskich. Aby uniknąć błędu przy interpretacji wyników należy zawsze ustalać płeć płodu.

Badania prenatalne w kierunku MPS II mogą też być prowadzone pośrednio, poprzez analizę aktywności enzymu IDS w surowicy matki. Stwierdzono, że w okresie ciąży następuje podwyższenie poziomu tego enzymu u matki, gdy płód jest prawidłowy, natomiast brak zmiany poziomu, gdy płód jest nosicielem choroby.

— Badanie poziomu siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu w moczu jest testem diagnostycznym MPS II, umożliwiającym potwierdzenie typu mukopolisacharydozy rozpoznanej klinicznie oraz wykrycie choroby u członka rodziny.

BADANIA GENETYCZNE

Genetyczne badania diagnostyczne przeprowadza się zarówno na poziomie DNA, jak i RNA (rys. 4) i porównuje się rodzaj wykrytej mutacji w genie z mutacją obserwowaną w transkrypcie.

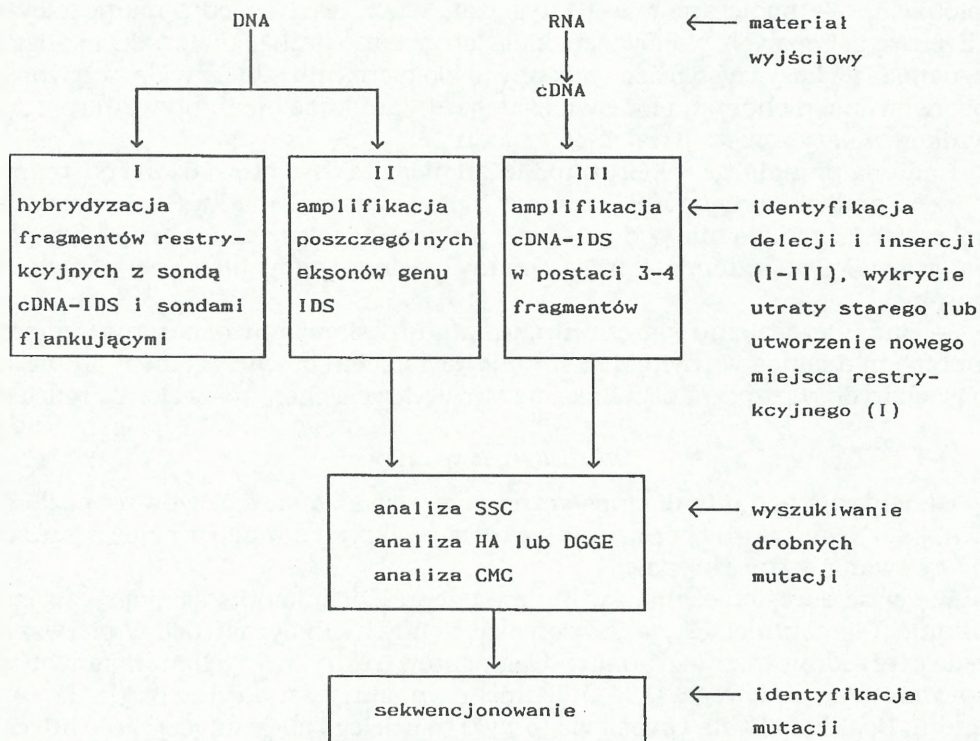
Wstępne określenie zmian w budowie genu *IDS* dokonuje się poprzez zastosowanie fragmentu cDNA, jako wzorcowej sondy hybrydyzacyjnej. W pierwszym rzędzie przeprowadza się analizę fragmentów restrykcyjnych uzyskanych po strawieniu genomowego DNA kilkoma enzymami restrykcyjnymi (*Pst*I, *Taq*I, *Hind*III, *Eco*RI czy *Stu*I). Umożliwia to wykrycie delecji obejmującej część lub cały gen *IDS* oraz wykrycie większych lub mniejszych przegrupowań w obrębie genu.

Brak wszystkich fragmentów restrykcyjnych świadczy o delecji całego genu. Zmiana ilości i wielkości fragmentów restrykcyjnych, obserwowana dla kilku enzymów, świadczy o większym przegrupowaniu niż delecja lub duplikacja fragmentu genu. Natomiast zanik jednego lub pojawienie się nowego fragmentu restrykcyjnego dla jednego tylko enzymu może być wynikiem drobnej mutacji, typu kilkunukleotydowej delecji lub insercji lub jednonukleotydowej substytucji, odpowiedzialnej za zanik istniejącego lub tworzenie nowego miejsca restrykcyjnego, specyficznego dla działania badanego enzymu.

W celu określenia zasięgu wykrytej delecji całego genu *IDS* przeprowadza się badania hybrydyzacyjne z zastosowaniem markerów zewnątrzgenowych, zlokalizowanych po obu stronach genu *IDS*. Po stronie telomerycznej genu wybiera się markery z locus *DXS302*, *DXS304*, *DXS299* i *DXS52*, natomiast po stronie centromerycznej markery z locus *DXS296*, *DXS293*, *DXS297* i *DXS369*.

Delecje i insercje w obrębie sekwencji kodujących genu *IDS* są wykrywane w genomowym DNA po amplifikacji poszczególnych eksonów lub w transkrypcie po przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji i amplifikacji cDNA-IDS w postaci 3–4 fragmentów. Porównanie wielkości poszczególnych eksonów lub fragmentów cDNA uzyskanych od chorych z odpowiednimi fragmentami kontrolnymi pozwa-

la na stwierdzenie kilkunastonukleotydowych lub większych delecji i insercji. Całkowity brak jednego lub kilku eksonów, względnie fragmentów cDNA świadczy o delecji części lub całego regionu kodującego IDS.



Rys. 4. Schemat badań genetycznych u chorych z mukopolisacharydozą typu II.

Wyżej opisane badania diagnostyczne pozwalają na wykrycie większych zmian w obrębie genu i dają pozytywny wynik dla około 20% chorych. Dla pozostałych pacjentów (około 80%) choroba jest wynikiem drobnych mutacji, które są wykrywane jedną z kilku opisanych ostatnio metod, jak analiza konformacyjna pojedynczych nici (SSC), analiza heterodupleksów na żelu denaturującym (HA), elektroforeza w gradiencie denaturującym (DGGE), analiza niesparowanych nukleotydów za pomocą RN-azy A lub chemicznej modyfikacji (CMC). Metody te pozwalają na stwierdzenie istnienia fragmentów DNA z kilku — lub nawet jednonukleotydową zmianą w sekwencji nukleotydów. Identyfikację mutacji osiąga się poprzez zsekwencjonowanie zmienionych fragmentów. Analiza kolejności nukleotydów w badanym fragmencie pozwala na wykrycie i dokładną lokalizację każdej zmiany w sekwencji nukleotydów.

Mutacja zidentyfikowana w genie *IDS* jest najlepszym sprawdzianem trafności rozpoznania klinicznego oraz najpewniejszym markerem choroby. Ustalona dla badanego pacjenta mutacja jest jednakowa dla wszystkich chorych członków rodziny i jest przekazywana z pokolenia na pokolenie zgodnie z prawami Mendla.

Przy przeprowadzaniu badań prenatalnych lub ustalaniu nosicielstwa uszkodzonego genu są wybierane takie metody, które specyficznie potwierdzają lub wykluczają obecność znanej dla rodziny mutacji.

Mutację można rozpoznać za pomocą enzymów restrykcyjnych, poprzez stwierdzenie zmiany wzoru restrykcyjnego lub identyfikację zmiany miejsca restrykcyjnego (utrata istniejącego lub pojawienie się nowego) lub poprzez tworzenie sztucznego miejsca restrykcyjnego. Przy identyfikacji mutacji punktowych można zastosować allelo-specyficzną hybrydyzację oligonukleotydową lub ligazową reakcję łańcuchową.

Chromosom X z uszkodzonym genem *IDS* można wykryć u członków rodziny z mukopolisacharyozą II przeprowadzając analizę sprzężeń locus choroby z markerami polimorficznymi i ustalając allele dziedziczące się łącznie z chorobą. Dla locus genu *IDS* są znane dwa dwualleliczne polimorfizmy ujawniane przez enzymy restrykcyjne *StuI* i *TaqI*. Enzym *StuI* tworzy allele polimorficzne o wielkości A1: 17,8 kpz i A2: (15,0+2,8) kpz, a enzym *TaqI* allele polimorficzne o wielkości A1: 5,1 kpz i A2: 3,8 kpz. Zestaw alleli określony dla obu markerów polimorficznych stanowi haplotyp markerowy choroby w rodzinie i może służyć do prześledzenia przekazywania zmutowanego genu *IDS* w rodzinie, natomiast nie daje informacji o naturze uszkodzenia samego genu.

MUTACJE W GENIE *IDS*

Dotychczas opisano około 200 przypadków zespołu Huntera. U 6% przebadanych pacjentów stwierdzono istnienie delecji obejmującej cały rejon genu *IDS* (według FROISSART i współaut. 1993). W niektórych przypadkach zidentyfikowano delecje obejmujące również rejony przyległe do locus genu *IDS*. WILSON i współpracownicy (1991) opisali delecję locus *IDS* i DXS296 u pacjenta wykazującego znaczne zahamowanie rozwoju umysłowego. Autorzy przypuszczają, że obserwowane ciężkie objawy choroby mogą być również wynikiem uszkodzenia przyległych do genu *IDS* regionów, a szczególnie FRAXA sprzężonego z locus DXS296. Znany jest też przypadek delecji obejmującej gen *IDS* i zmapowany dystalnie locus DXS304 (BECK i współaut. 1992). We wszystkich testowanych przypadkach stwierdzono, że locus DXS466 ulega kodelecji łącznie z locus genu *IDS*, co świadczy o ich bardzo bliskim sąsiedztwie lub nawet o lokalizacji DXS466 wewnątrz jednego z intronów genu *IDS*.

Analiza fragmentów restrykcyjnych, uzyskanych po trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi genomowego DNA, umożliwia nie tylko wykrycie delecji obejmującej cały lub część genu, lecz również wykrycie większych lub mniejszych przegrupowań w obrębie genu *IDS*. Ogółem zmiany tego typu obserwuje się u około 20% chorych. U pozostałych pacjentów (około 80%) choroba jest wynikiem drobnych mutacji, nie wykrywanych metodami hybrydyzacyjnymi z zastosowaniem sondy cDNA-IDS. Diagnostyka jest w tych przypadkach prowadzona za pomocą nowoczesnych technik genetyki molekularnej, które pozwalają na wykrycie niewielkiej zmiany w sekwencji nukleotydów typu mutacji punktowej lub kilkunukleotydowej delecji i insercji.

W 34% przypadków mukopolisacharydozy II stwierdzono istnienie mutacji punktowych typu podstawienia nukleotydowego (substytucji), powodujących powstanie kodonów o zmienionej informacji i w konsekwencji włączenie nieprawidłowego aminokwasu lub powstanie kodonu terminalnego i w konsekwencji przerwanie włączania aminokwasów do tworzonego białka (BUNGE i współaut. 1993, FLOMEN i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994). Zidentyfikowano też znaczną ilość (około 23%) delecji lub insercji jednego, kilku lub kilkunastu nukleotydów (BUNGE i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994). W niektórych przypadkach insercja była wynikiem duplikacji fragmentu eksonu.

Dużą grupę (około 23%) stanowią mutacje punktowe w rejonie występowania sekwencji specyficznych dla donorowego lub akceptorowego miejsca składania genu. Mutacje tego typu prowadzą do nierozpoznania miejsca wycinania i usunięcia całego eksonu łącznie z intronem lub wykorzystania nietypowego miejsca wycinania i usunięcia fragmentu eksonu lub wstawienia różnej długości fragmentu intronowego do eksonu (BUNGE i współaut. 1993, FLOMEN i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994).

Pośród mutacji punktowych często jest obserwowane podstawienie T w miejsce C w dwunukleotydowych mostkach CpG, co jest zgodne z wysoką mutagennością tych ugrupowań, wynikającą z deaminacji metylowanej cytydyny. Jedną z najczęściej występujących mutacji tego typu jest substytucja C → T w kodonie 374 (ogółem 6 przypadków), która wprowadza nowe miejsce donorowe składania genu i powoduje delecję 60 końcowych nukleotydów w eksonie VIII. Zmiana nukleotydu powoduje powstanie nowego miejsca restrykcyjnego dla enzymu HphI w genie *IDS*. Inne substytucje C → T mają charakter mutacji wprowadzającej zmienioną informację w kodonie lub wprowadzającej kodon terminalny.

Zidentyfikowane mutacje są zlokalizowane wzdłuż całego genu, przy czym 2/3 znajduje się w eksonach III, V i IX.

Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na wielką różnorodność mutacji w genie *IDS*. Identyczne zmiany wykryto tylko w kilku rodzinach i poza opisaną powyżej substytucją w kodonie 374 dotyczą mutacji w kodonach 172 i 443, wprowadzających w obu przypadkach kodon terminalny do transkryptu. Znane są też przypadki występowania mutacji w tych samych trójnukleotydowych kodonach, na przykład: 86, 135 i 468, jednak różnią się one bądź pozycją nukleotydu, który uległ zmianie, bądź rodzajem samego podstawienia nukleotydowego.

PATOGENEZA ZESPOŁU HUNTERA

Zespół Huntera manifestuje się przy całkowitym braku lub znacznie zredukowanym poziomie aktywności sulfatazy α -L-iduronianu. Całkowity brak białka enzymatycznego lub tworzenie białka o zmienionej strukturze i trwałości może być wynikiem delecji całego lub części genu *IDS* lub może być wynikiem takiej zmiany w obrębie genu, która powoduje tworzenie zmienionego i/ lub niestabilnego transkryptu.

Choroba dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X. Objawy choroby są obserwowane u osobników męskich, posiadających uszkodzony gen *IDS* na obecnym u nich jednym chromosomie X. Kobiety posiadające dwa chromosomy X, zazwyczaj nie rozwijają objawów choroby, a są jedynie nosicielkami uszkodzonego genu. Do chwili obecnej zidentyfikowano kilka przypadków stanowiących odstępstwo od tej reguły. MOSSMAN i współpracownicy (1983) opisali przypadek dziewczynki z klinicznymi objawami MPS II i niedoborem *IDS*, u której stwierdzono istnienie wymiennej translokacji zrównoważonej 46,XX,t(X;5), powodującej rozerwanie chromosomu X w locus genu *IDS*. Ujawniono też przypadki MPS II u dziewcząt nie wykazujących zmian cytogenetycznych (CLARKE i współaut. 1991). Szczegółowe badania stwierdziły istnienie u tych dziewcząt selektywnej (non random) inaktywacji jednego z chromosomów X. Przypuszczać należy, że inaktywacji uległ prawidłowy chromosom, natomiast aktywny pozostał chromosom niosący uszkodzony gen *IDS*.

Oceniono, na podstawie dotychczas zdiagnozowanych przypadków, że mukopolisacharydoza II występuje z częstością $7,5 \times 10^{-6}$ żywo narodzonych chłopców. U Żydów askenazyjskich i marokańskich obserwuje się dwukrotnie większą częstość choroby (14,8 przypadków na 1 milion), co może być wynikiem prenatalnej selekcji faworyzującej chromosom X z uszkodzonym genem *IDS* (ZŁOTOGORA i współaut. 1991).

ZALEŻNOŚĆ FENOTYP — GENOTYP

W celu określenia zależności między fenotypem a genotypem objawy kliniczne MPS II są klasyfikowane w trzech grupach, obejmujących formę A i B oraz uwzględniających postać pośrednią choroby.

Grupa I — choroba o łagodnym przebiegu — obejmuje pacjentów z normalnym współczynnikiem inteligencji i typowymi, lecz niezbyt ciężkimi zmianami somatycznymi.

Grupa II — choroba o umiarkowanym przebiegu — obejmuje pacjentów z typowymi zmianami somatycznymi i obniżonym stopniem rozwoju umysłowego, który wraz z wiekiem wykazuje tendencje uwsteczniające.

Grupa III — choroba o ciężkim przebiegu — obejmuje pacjentów z ostro zaznaczonymi zmianami somatycznymi i głębokim niedorozwojem umysłowym, objawiającym się między innymi całkowitym brakiem mowy lub znajomością jedynie kilku słów.

Dotychczas przeprowadzone badania genetyczne wykazują wielką różnorodność mutacji w genie *IDS*. Identyczne zmiany w budowie genu wykryto tylko w nielicznych rodzinach dla kilku rodzajów mutacji.

Funkcja poszczególnych fragmentów kodowanego białka enzymatycznego nie jest jeszcze wyjaśniona. Wysoka homologia pewnych obszarów białka *IDS* z budową innych sulfataz lizosomalnych świadczy o funkcjonalnej i strukturalnej ważności tych rejonów, obejmujących ugrupowania tak zwanych aminokwasów konserwatywnych. Stwierdzono, że mutacje dotyczące obszarów konserwatywnych wywołują chorobę o ciężkim lub umiarkowanym przebiegu (BUNGE i współaut. 1993, POPOWSKA i współaut. 1994). Dzieje się to nawet w przypadku

mutacji punktowych, powodujących zmianę jednego prawidłowego aminokwasu na aminokwas o odmiennej strukturze i odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych. Podobnie dość ciężki przebieg choroby obserwuje się u pacjentów z mutacjami zlokalizowanymi w unikalnych rejonach genu o budowie specyficznej tylko dla sulfatazy iduronianu.

U niektórych pacjentów obserwowano mutacje punktowe, powodujące zmianę kodonów informacyjnych w kodony terminalne, co prowadziło do przerywania włączania aminokwasów do tworzonego białka. Powstanie tego typu zmiany w kodonie 172 warunkowało ciężkie objawy choroby, natomiast w kodonie 443 i 475 umiarkowane objawy choroby. W pierwszym przypadku mutacja wystąpiła w początkowym fragmencie transkryptu, co w konsekwencji przejawiało się całkowitym brakiem aktywnego białka enzymatycznego. W dwu pozostałych przypadkach kodony terminalne powstały w końcowym fragmencie transkryptu, już poza rejonem wysokiej homologii obserwowanej dla różnych sulfataz, co prawdopodobnie powodowało, że tworzone cząsteczki białkowe charakteryzowały się znaczną stabilnością i mniej zredukowaną aktywnością enzymatyczną.

Znaczną zmienność fenotypową manifestują też mutacje zmieniające specyficzność miejsca donorowego lub miejsca akceptorowego składania genu. Ekspresja tych mutacji zależy od ich lokalizacji w genie i wpływu na budowę i strukturę tworzonego białka enzymatycznego. Jedną z takich zmian jest mutacja w eksonie VIII (kodon 374), która wprowadza nowe miejsce donorowe składania genu, nie naruszając przy tym sekwencji nukleotydowej w uprzednio istniejącym miejscu. Nowe miejsce donorowe wykazuje większe powinowactwo do splicosu — kompleksu enzymatycznego zajmującego się wycinaniem intronów i wzajemnym łączeniem eksonów. Stwierdzono, że głównie jest używane nowe miejsce donorowe a w dużo mniejszym stopniu stare miejsce donorowe składania genu co powoduje, że obok zmienionego transkryptu tworzą się też pewne ilości normalnego transkryptu. W konsekwencji powstaje pewna ilość prawidłowego białka a choroba ma przebieg łagodny. U pacjentów z tą mutacją obserwuje się zmniejszoną ruchliwość stawów, zaburzenia słuchu, obniżony wzrost i charakterystyczne rysy twarzy, jednak rozwój umysłowy pozostaje w normie, co pozwala im na podjęcie nauki w normalnej szkole.

Duża heterogenność zmian genetycznych utrudnia opracowanie prostej zależności między obserwowanym fenotypem a genotypem. Ogólnie można stwierdzić, że wszelkie mutacje prowadzące do delecji całego lub fragmentu genu, drobne mutacje typu delecji czy insercji zmieniające ramkę odczytu, mutacje punktowe w rejonach konserwatywnych lub w rejonach unikalnych oraz mutacje punktowe wprowadzające kodon terminalny, szczególnie w początkowym rejonie transkryptu, będą odpowiedzialne za brak lub tworzenie zmienionego, niestabilnego białka całkowicie lub w znacznym stopniu pozbawionego aktywności enzymatycznej i w konsekwencji będą się ujawniały w formie choroby o ciężkim lub umiarkowanym przebiegu. Natomiast mutacje zlokalizowane w mniej ważnych funkcyjnie rejonach białka, nie wywołujące dużych zmian w sekwencji i budowie przestrzennej białka, będą odpowiedzialne za wystąpienie choroby o łagodnym przebiegu.

Badania korelacji między fenotypem a genotypem w spokrewnionych rodzinach skłaniają do twierdzenia, że kondycja fizyczna i umysłowa chorego

z mukopolisacharydozą II zależy głównie od podłoża genetycznego choroby, lecz w pewnym stopniu mają też na nią wpływ uwarunkowania środowiska.

Mukopolisacharydoza II, jako choroba uwarunkowana genetycznie, jest nieuleczalna za pomocą dotychczas stosowanych zabiegów klinicznych i farmakologicznych. Obecnie możliwa jest niewielka poprawa komfortu życia chorego poprzez stosowanie odpowiedniej rehabilitacji ruchowej, treningu umysłowego i doraźnej terapii farmakologicznej.

W latach 70-tych zasygnalizowano osiągnięcie pewnej poprawy ruchliwości stawów u chorych w wyniku przetoczenia dużej ilości plazmy lub leukocytów. Lepsze rezultaty normalizacji wydalania glikozaminoglikanów, zmniejszenia przerostu narządów wewnętrznych i zwiększenia ruchliwości stawów uzyskano po przeprowadzeniu transplantacji szpiku. Niestety, w obu przypadkach osiągnięto jedynie przejściową poprawę stanu zdrowia.

Prawdziwe uleczenie choroby wydaje się bardzo trudne do osiągnięcia, gdyż wiąże się z naprawą uszkodzonego genu we wszystkich komórkach organizmu. Osiągnięcie tego celu jest możliwe jedynie poprzez odpowiednią wymianę materiału genetycznego w zarodku podczas pierwszych podziałów zygoty. Działania tego typu są na razie w stadium pierwszych prób wykonywanych na komórkach zwierzęcych. Zastosowanie ich w terapii człowieka wiąże się z pokonaniem trudności technicznych gwarantujących odpowiednie włączenie prawidłowego genu w specyficzny dla niego locus na chromosomie. Ewentualne wprowadzenie terapii u ludzi wiąże się też z koniecznością ustalenia przepisów prawnych zezwalających na tego typu manipulacje genetyczne.

MOLECULAR BASIS OF THE HUNTER SYNDROME

Summary

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of inheritable disorders caused by a deficiency of lysosomal enzymes needed for stepwise degradation of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans). To this group of diseases belongs the Hunter syndrome (mucopolisaccharidosis type II, MPS II) caused by absence or reduction of iduronate sulfatase (IDS). This leads to accumulation of the incompletely degraded dermatan and heparan sulfates. Symptoms of the disease include short stature, coarse facial features, skeletal deformities and, sometimes, progressive deafness, mental retardation and greatly shortened life span.

IDS is encoded by a gene located on X chromosome. The *IDS* gene contains 9 exons and 8 introns.

Many different type of mutations were observed in patients with MPS II. In about 20% of the cases deletions of the whole gene or other major structural alterations were found. The majority of the patients carries small aberrations of the *IDS* gene, 23% having deletions of one, two or three base pairs, and 57% various point mutations like missense, nonsense or mutations affecting the splice site.

Identification of mutations is based on DNA or RNA analysis. The most useful molecular techniques seem to be restriction fragments analysis, exon and cDNA fragment amplification, single strand conformational polymorphism and heteroduplex analysis, dot-blot hybridization and sequencing. Knowledge of the primary genetic defect allows carrier detection and prenatal diagnosis as well as some insight into the relationship between genotype and phenotype.

LITERATURA

- BECK M., STEGLICH C., ZABEL B., DAHL N., SCHWINGER E., HOPWOOD J. J., GAL A., 1992. *Deletion of the Hunter gene and both DXS466 and DXS304 in a patient with mucopolysaccharidosis*. Am. J. Med. Genet., 44, 100-103.
- BIELICKI J., FREEMAN C., CLEMENTS P. R., HOPWOOD J. J., 1990. *Human liver iduronate-2-sulphatase. Purification, characterization and catalytic properties*. Biochem. J., 271, 75-86.
- BUNGE S., STEGLICH C., BECK M., ROSENKRANZ W., SCHWINGER E., HOPWOOD J. J., GAL A., 1992. *Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Hum. Mol. Genet., 1, 335-339.
- BUNGE S., STEGLICH C., ZUTHER C., BECK M., MORRIS C. P., SCHWINGER E., SCHINZEL A., HOPWOOD J. J., GAL A., 1993. *Iduronate-2-sulfatase gene mutations in 16 patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Hum. Mol. Genet., 2, 1871-1875.
- CLARKE J. T. R., GREER W. L., STRASBERG P. M., PEARCE R. D., SKOMOROWSKI M. A., RAY P. N., 1991. *Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl*. Am. J. Hum. Genet., 49, 289-297.
- FLOMEN R. H., GREEN E. P., GREEN P. M., BENTLEY D. R., GIANNELLI F., 1993. *Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate (IDS) gene*. Hum. Mol. Genet., 2, 5-10.
- FLOMEN R. H., GREEN P. M., BENTLEY D. R., GIANNELLI F., GREEN E., 1992. *Detection of point mutations and a gross deletion in six Hunter syndrome patients*. Genomics, 13, 543-550.
- FROISSART R., BLOND J.-L., MAIRE I., GUIBAUD P., HOPWOOD J. J., MATHIEU M., BOZON D., 1993. *Hunter syndrome: Gene deletions and rearrangements*. Human Mut., 2, 138-140.
- MOSSMAN J., BLUNT S., STEPHENS R., JONES E. E., PEMBREY M., 1983. *Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal disrupting the Hunter gene*. Arch. Dis. Child, 58, 911-915.
- NEUFELD E. F., MUENZER J., 1989. *The mucopolysaccharidoses*. [W:] *The metabolic basis of inherited disease* (red.) SCRIVER C. R., BEANDET A. L., SLY W. S., VALLE D., MCGRAW-HILL, New York 1565-1587.
- POPOWSKA E., RATHMAN M., TYLKI-SZYMAŃSKA A., BUNGE S., STEGLICH C., SCHWINGER E., GAL A., 1994. *Mutations of the iduronate-2-sulfatase gene in 12 Polish patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Human Mut. (w druku).
- SUTHERS G. K., OBERL I., NANCARROW J., MULLEY J. C., HYLAND V. J., WILSON P. J., MCCURE J., MORRIS C. P., HOPWOOD J. J., MANDEL J. L., SUTHERLAND G. R., 1991. *Genetic mapping of new RFLPs at Xq27-q28*. Genomics, 9, 37-43.
- WILSON P. J., MEANEY C. A., HOPWOOD J. J., MORRIS C. P., 1993. *Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene*. Genomics, 17, 773-775.
- WILSON P. J., MORRIS C. P., ANSON D. S., OCCHIODORO T., BIELICKI J., CLEMENTS P. R., HOPWOOD J. J., 1990. *Hunter syndrome: Isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8531-8535.
- WILSON P. J., SUTHERS G. K., CALLEN D. F., BAKER E., NELSON P. V., COOPER A., WRAITH J. E., SUTHERLAND G. R., MORRIS C. P., HOPWOOD J. J., 1991. *Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome*. Hum. Genet., 86, 505-508.
- ZLOTOGORA J., SCHAAP T., ZEIGLER M., BACH G., 1991. *Hunter syndrome in Jews in Israel: further evidence for prenatal selection favoring the Hunter allele*. Hum. Genet., 86, 531-533.