

# Sfingolipit depo hastalıklarında enzim inhibitörlerinin tedavide kullanımları

İncilay Sinici

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Yardımcı Doçenti

**SUMMARY:** Sinici İ. (Department of Biochemistry, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Enzyme inhibitors in the treatment of sphingolipidoses. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2010; 53: 236-243.

Sphingolipidoses are a group of inherited metabolic diseases caused by a genetic defect in the catabolism of sphingosine-containing lipids. Glycosphingolipids accumulate in the lysosome due to a mutation in genes that encode their catabolic enzymes or activator proteins. They are fatal disorders and significant for some populations. Sphingolipidoses are relatively common and represent an important health problem in Turkey due to the 'founder effect' created by consanguineous marriages. Only a low level of residual enzyme activity is apparently needed to prevent or reverse substrate (glycosphingolipids) storage in these diseases, mostly in juvenile and adult forms. Low molecular weight pharmacological chaperones have newly appeared as enzyme enhancement therapy agents in sphingolipidoses resulting from enzyme protein misfolding or mistracking due to certain missense mutations and some small inframe deletions. Pharmacological chaperones can stabilize the conformation of a mutant protein, allowing it to pass the quality control system of the endoplasmic reticulum. To date, all successful pharmacological chaperones have also been competitive inhibitors of the enzyme proteins. They assist the proper folding of mutant proteins in the endoplasmic reticulum, increase stability, avoid aggregation, and thus increase the activity at their target sites by allowing passage of the mutant protein from the endoplasmic reticulum quality control system. These agents, are attracting considerable interest in the enhancement of quality of life and clinical improvement in the juvenile and adult forms of sphingolipidoses which have residual enzymatic activity. In this review, we describe the actions and usage area of pharmacological chaperones in sphingolipidoses, together with their advantages and disadvantages and recent developments.

*Key words:* sphingolipidoses, enzyme inhibitors, pharmacological chaperones, protein misfolding, missense mutations.

**ÖZET:** Sfingolipidozlar, sfingozin içeren lipidlerin katabolizmasında bir genetik hata sonucu oluşan bir grup kalıtsal metabolizma hastalıklarıdır. Glikosfingolipidler, katabolik enzimlerini veya aktivatör proteinlerini kodlayan genlerdeki bir mutasyon sonucu lizozomlarda birikirler. Sfingolipidozlar ölümcül hastalıklardır ve bazı toplumlarda önemlidir. Akriba evliliklerinin etkisiyle Türkiye'de göreceli olarak sık görülürler ve önemli bir sağlık problemidir. Özellikle juvenil ve erişkin tiplerde olmak üzere sadece bir miktar artık enzim aktivitesi, substrat birikimini önlemek veya geri döndürmek için yeterlidir. Yanlış anlamlı ve bazı küçük çerçeveye içi delesyon mutasyonları sonucu enzim proteininin hatalı katlanması veya hedef organeline yönlendirilememesi nedeniyle görülen sfingolipidozlarda düşük molekül ağırlıklı farmakolojik şaperonlar yeni bir enzim artırma tedavisi ajanları olarak karşımıza çıkmaktadır. Farmakolojik şaperonlar, mutant proteinin konformasyonunu stabilize ederler ve endoplazmik retikulum kalite kontrolünden geçmesini sağlarlar. Bugüne kadar tüm başarılı farmakolojik şaperonların enzim proteinlerinin kompetitif inhibitörleri oldukları görülmüştür. Endoplazmik retikulumda mutant proteinin doğru katlanmasına yardımcı olurlar, dayanıklılıklarını artırır, çökmelerini önlerler ve böylece endoplazmik retikulum kalite kontrol sisteminden geçişlerine izin vererek

fonksiyon görecekları hedef organellerde aktivitelerini artırırılar. Bu ajanlar, artık enzim aktivitesi içeren juvenil ve erişkin tip sfingolipidozlarda yaşam kalitesinin artırılması ve klinik iyileşmenin sağlanmasında önemli derecede dikkat çekmektedir. Bu derlemede, sfingolipidozlarda farmakolojik şaperonların kullanım alanları ve fonksiyonları, avantaj ve dezavantajları konusundaki son gelişmeler özetlenmiştir.

*Anahtar kelimeler: sfingolipidozlar, enzim inhibitörleri, farmakolojik şaperonlar, protein katlanma bozukluğu, yanlış anlamlı mutasyonlar.*

### **Sfingolipit depo hastalıkları**

Glikosfingolipidozlar, sfingolipitlerin birikimi sonucu oluşan kalıtsal lizozomal depo hastalıklarıdır. Sfingolipitlerin yıkımı için gerekli enzimler veya aktivatör proteinlerde bozukluk vardır. Enzim veya aktivatör proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu, yıkılamayan sfingolipitler hedef organelleri olan lizozomlarda birikirler. İlerleyici nörodejeneratif bulguların görüldüğü klinik tablo karşımıza çıkar<sup>1</sup>.

Klinik tablo, biriken substrat miktarına bağlıdır ve bunu belirleyen aktif enzim düzeyidir<sup>2</sup>.

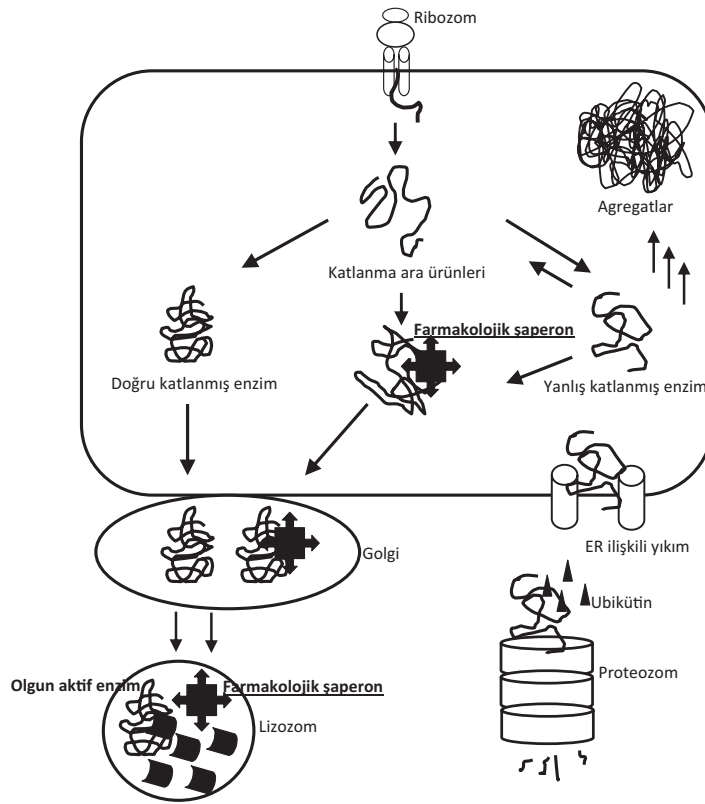
Klinik bulgularıyla akut (infantil), juvenil (geç infantil) ve erişkin (kronik) tip olarak üçe ayrılır. Akut sfingolipidozlarda enzim düzeyi yok denecek kadar azdır. Semptomların en erken ortaya çıktığı ve en ağır giden tiptir. Nörodejenerasyonun ilerlemesi ile 2-4 yaş arası ölüm görülür. Juvenil tipte bir miktar artık enzim aktivitesi vardır; 2-6 yaşlarında başlar, akut tipe göre daha hafif bulgularla gider ve 10-15 yaşlarında ölüm görülür. Erişkin tipler, artık enzim aktivite düzeyine göre farklı zamanlarda ama geç ortaya çıkar. Nörolojik bulgular çok çeşitlilik gösterir; 30-40 yaşlarına kadar yaşayabilirler. Türk toplumunda glikosfingolipidozların insidansı 100.000 canlı doğumda 4.615'dir<sup>3</sup>.

Substratların birikmesini önlemek için %10 enzim aktivitesi yeterlidir<sup>4-5</sup>. Bu "kritik eşik teorisi" ile bunu açıklamaktadır<sup>2</sup>. Buna göre fizyolojik koşullarda lizozomal enzimler Km değerlerinin çok altında substrat derişimlerinde çalışmaktadır ve %5-10 enzim aktivitesi asemptomatik bir birey olmak için yeterlidir. Bir enzimin fonksiyonel aktif olabilmesi için amino asit dizisinin ve yerel hücresel çevrenin öngördüğü şekilde, karmaşık bir katlanma yolundan geçerek özgül üç boyutlu yapısını alması gerekir. Lizozomal enzimler endoplazmik retikuluma (ER) bağlı ribozomlarda sentezlenmeye başlarlar. ER'de

katlanma, glikozilasyon, proteoliz ve disülfid bağlarının oluşması meydana gelir<sup>4</sup>. ER'de katlanmakta olan enzim proteinleri, moleküler etkileşimlerden koruyan moleküler şaperonlar vardır. Bunlardan biri de glikoproteinleri özel olarak tanıyan, üç boyutlu yapısını kazandırmaya çalışan kalneksin ve kalretikulindir. Kalneksin-kalretikulün, glukozidaz I ve II ile glikoproteinlerin katlanmasını düzenler<sup>6-8</sup>. Yanlış katlanmanın gerçekleşmesi durumunda ise yıkıma götürmeye karar veren  $\alpha$ -mannozidazlar ve  $\alpha$ -mannozidaz I-benzeri protein'dir (EDEM). Man9 N-bağı oligosakkaritlerden  $\alpha$ -mannozidaz I ile mannozün koparılması proteinlerin tekrar katlanma döngüsüne girmesinde kritik basamak ve ER ilişkili yıkım (ubikütin ve proteazom) için bir sinyaldir<sup>9</sup>. ER kalite kontrol (ERQC) sistemini oluşturan bu olaylardan geçemeyen yanlış katlanmış proteinler dakikalar içinde ER ilişkili yıkım ile yıkılırlar<sup>10-13</sup>. Özgül üç boyutlu yapısını almış enzimler ise Golgi cisimciğinde fosforile edilerek fonksiyonlarını gösterecekleri lizozoma yönlendirler. Lizozomal depo hastalıklarında yanlış anlamlı ve çerçeve içi delesyon mutasyonları sonucu bazı katalitik olarak aktif mutant enzimler, yanlış katlanma nedeniyle ERQC sistemi tarafından fark edilerek lizozoma ulaşmadan ER ilişkili yıkıma giderler<sup>14-15</sup>. Moleküler şaperonlar gibi davranarak mutasyon sonucu yanlış katlanan proteinlerde doğru katlanmayı teşvik eden, ERQC sisteminin dikkatli kontrolünden mutant proteinlerin geçişini sağlayarak enzim aktivite düzeyini artıran farmakolojik şaperonlar, yeni tedavi yaklaşımı olarak gündeme gelmiştir. Enzim aktivitesinde en ufak artış hastalığın kliniğini, prognozunu iyileştirdiği ve yaşam kalitesini artırdığı için önemlidir.

### **Farmakolojik şaperonlar**

Farmakolojik şaperonlar, mutasyon sonucu yanlış katlanan proteinlerin doğru katlanmasına aracı olan moleküllerdir (Şekil 1). Substrat, substrat



Şekil 1. Şaperonların etki yolları.

analoglarının ve inhibitörlerin enzim dayanıklılığını artırdığı bilinmektedir. Böylece enzim proteinler ısıyla denatürasyondan korunur. Bazı mutasyonların dayanıklılığı azaltıcı etkisi, substrat ve inhibitör bağlanmasının dayanıklılığı artırıcı etkisi ile dengelenebilir. Farmakolojik şaperonlar da çoğunlukla enzimin dayanıklılığını artıran enzimlere özgü kompetitif inhibitörlerdir. Mutant enzim aktif merkezine özgül olarak bağlanırlar. Protein katlanma dinamiğini değiştirerek, katlanan enzim proteinini ER'deki istenmeyen moleküler etkileşimlerden koruyarak doğru katlanan mutant enzim miktarını artırır. Bu maddelerin yardımı ile ERQC sisteminden başarıyla geçen daha fazla miktardaki enzim lizozoma ulaşır<sup>15-18</sup>. Bu nedenle bu uygulamaya enzim güçlendirme tedavisi (enzyme enhancement therapy) denilmektedir<sup>19</sup>. Aktif bölgeye özgü farmakolojik şaperonlar ilk kez Fan ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır<sup>20-22</sup>. Glikosfingolipidozlarda farmakolojik şaperon olarak kullanılan maddeler Tablo I'de gösterilmiştir<sup>23-37</sup>. Bu maddelerin seçiminde, maddeler hücre kültürlerine uygulandığında, hücre kültürlerinde mutant enzimlerin ısı ve pH'ya dayanıklılığı test edilmektedir<sup>15</sup>.

Normal şartlarda birçok protein için inaktif katlanma ara ürününün, doğal katlanmış şekle gelmesi için sadece küçük bir ısı farklılığına ihtiyaç vardır<sup>38</sup>. Yanlış anlamlı ve bazı çerçeve içi delesyon mutasyonları çok az oynama ile bu ısı farkını azaltır, olması gereken katlanma gerçekleşemez<sup>39</sup>. Aynı zamanda mutasyon sonucu yanlış katlanmış veya tam katlanamamış enzimler, ısı ve pH denatürasyonuna duyarlıdır. Farmakolojik şaperonlar enzimin ısıya dayanıklılığını artırır, enzimin doğru katlanması için onu çevresel etkileşimlerden koruyarak uygun ortamı sağlar ve ERQC sisteminden geçen doğru katlanmış enzim, aktivite gösterdiği hedef organel olan lizozomlara ulaşır. Şaperonlar translasyon sonrası protein düzeylerinin ayarlanmasında hücrede kontrol mekanizması olarak da işlem görürler<sup>15-18</sup>.

Farmakolojik şaperon/enzim kompleksi lizozoma ulaşınca yüksek derişimdeki substrat ile kompetitif inhibitör olan farmakolojik şaperonlar yer değiştirir<sup>40</sup>. Glikosfingolipidozlarda lizozomlarda substrat birikimi vardır. Lizozomlarda, birikmiş yüksek derişimdeki substratlar enzim aktif

**Tablo I.** Glikosfingolipidozlarda kullanılan farmakolojik şaperonlar.

Hastalıklar	Farmakolojik şaperon	Kaynaklar
Fabry hastalığı	1-deoksigalaktonojirimisin (DGJ) N-butil-deoksigalaktonojirimisin (NB-DGJ) Altro- deoksinojirimisin (Altro-DNJ) Galaktostatin bisulfit (GBS) $\alpha$ -galakto-homonojirimisin $\beta$ -allo-homonojirimisin $\beta$ -1-C-bütül-deoksigalaktonojirimisin	21-27
Gaucher hastalığı	N-nonil- deoksinojirimycin (NN-DNJ) N-butil-deoksinojirimisin (NB-DNJ) Aminosiklitol-4 1,5-dideoksi -1,5-iminosiklitol (DIX) $\alpha$ -1-C-nonil-DIX İzofagomin tartrat (AT2101) Diltiazem N-oktil-izofagomin N-oktil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glusitol N-oktil- $\beta$ -valienamin (NOV) $\alpha$ -1-C-oktil-1-DNJ İzofagomin (IFG) Kalistegines A <sub>3</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , C <sub>1</sub>	19,28-32
GM1 gangliyozidoz	N-oktil-4-epi- $\beta$ -valienamin (NOEV)	17,33-34
GM2 gangliyozidoz (Tay-Sachs hastalığı ve Sandhoff hastalığı)	N-asetil glukozamin tiyazolin (NGT) 6-asetamido-6-deoksikastanospermin (ACAS) Bisnaftilimid nitro-indan-1-one Pirolo[3,4-d]pidazin-1-one Primetamin (PYR) Tiyoguanin	15,35-37

merkezinde, yarışmalı olarak kolaylıkla farmakolojik şaperonların yerini alırlar. Farmakolojik şaperonlarından kolaylıkla kurtulan mutant enzimler lizozomlarda aktivitelerini gösterir ve biriken substratları parçalarlar. Yapılan çalışmalarda mutant enzimlerin asidik pH'da normal şekilleri gibi dayanıklı olduğunu göstermiştir<sup>15</sup>. Böylece daha çok miktarda lizozoma ulaşan mutant enzim, normal enzim gibi asidik pH'lı lizozomda aktivitesini rahatlıkla gösterir.

Kullanılan enzime özgü kompetitif inhibitör olan farmakolojik şaperonlar düşük derişimlerde şaperon gibi davranırlar, yüksek derişimlerde inhibitör özelliği gösterirler<sup>15,40</sup>. Düşük derişimde şaperon özelliğini sağlayabilmesi hücre içinde inhibitör olarak davrandıkları derişimin altında bir derişimde bulunacak şekilde verilebilmelerini sağlar. Bu durum, glikosfingolipidozlarda diğer tedavi seçeneklerine göre bir avantajdır.

Farmakolojik şaperonlarla tedavide, hangi mutasyonların tedavi için uygun olduğunun tespit edilmesi önem taşımaktadır<sup>28</sup>. Aktif

bölge mutasyonları enzimin katalitik bölgesini etkilediği için enzim aktivitesini tamamen yok eder. Enzim inaktiftir. Bazı mutasyonlarda da enzim konformasyonu ileri derecede etkilendiği için fonksiyon göstermesi imkansızdır. Farmakolojik şaperonlar bu tür mutasyonlarda etkili olmamaktadır. Farmakolojik şaperonların esas etkili olduğu taşıma veya katlanmayı etkileyen mutasyonlardır<sup>15,41,42</sup>. Enzimin aktif bölgesi çok etkilenmemiştir ve bir miktar artık enzim aktivitesi bulunur. Çoğu yanlış anlamlı ve çerçeve içi delesyon mutasyonları enzim konformasyonunda tolere edilebilir bozukluğa neden olur ve bir miktar artık enzim aktivitesi vardır<sup>15</sup>. Juvenil ve erişkin klinik tipler bu tür mutasyon taşımaktadır ve klinik bulgular daha geç ortaya çıkmaktadır. Artık enzim aktivite varlığı, mutasyonun protein üzerindeki etkisinin infantil tiplerdeki kadar çok şiddetli olmadığını gösterir. Bu nedenle artık enzim aktivite varlığı farmakolojik şaperonlarla tedavi edilebilirliğin kaba bir göstergesidir. İdeal olan mutasyonların tespit edilip, protein üzerine etkilerinin açığa çıkarılması ve

farmakolojik şaperonlarla tedavi edilebilirliğin değerlendirilmesidir. Bunun bir yolu da in vitro mutagenез yönteminin uygulanması ve mutasyonun proteindeki etkisinin tespit edilmesidir<sup>43-47</sup>. Akut GM1 gangliyozidoz tanısı alan bir Türk hastada (G190D homozigot) deri fibroblast kültüründe farklı derişimlerde NOEV uygulandığında enzim aktivitesinin 2 ile 4 kat arttığı tespit edilmiştir<sup>48</sup>. Bu durum, sadece juvenil ve erişkin tiplerde değil akut klinik tiplerde de farmakolojik şaperon tedavisinin uygulanabileceğini göstermiştir. Önemli olan mutasyonların proteinde hangi düzeyde ve hangi şiddette etki yarattığının bilinmesidir. Farmakolojik şaperonlar mutasyona özgü tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır.

#### **Farmakolojik şaperon tedavisinin avantajları**

Farmakolojik şaperonlar küçük molekül ağırlıklı, hidrofobik maddelerdir. Dokular arası geçişleri kolaydır ve hücre içi organellere ulaşabilirler. Dokular arası geçişlerinin kolay olması özellikle santral sinir sistemi tutulumunun olduğu glikosfingolipidozlarda diğer tedavi seçeneklerine göre büyük avantaj sağlamaktadır. Nörolojik bulguların önde olduğu bu hastalıklarda kan-beyin engelini geçerek etki gösterebilmektedir. Enzimin kompetitif inhibitörü oldukları için enzime özgül olarak bağlanırlar. Kompetitif özellikleri, geri dönüşümlü bağlanabilmeleri nedeniyle lizozomda kolayca mutant enzimden ayrılırlar ve substratın bağlanmasına izin verirler. Düşük derişimlerde şaperon etkilerini gösterdiklerinden, küçük miktarda kullanımları yeterli olmaktadır. Substrat azaltma tedavisine göre, çok küçük miktarlarının yeterli olması bir avantajdır. Düşük derişimlerde kullanıldıkları için inhibitör etkileri olmamakta ve yan etkileri beklenmemektedir. IC<sub>50</sub> değeri 10 µl altında

olan moleküller tedavi ajanı olarak tercih edilir. Diğer tedavi seçeneklerinden farklı olarak oral yolla kullanılabilir. Bu tedavi yaklaşımı diğer tedavilerle (rekombinant enzim yerine koyma tedavisi gibi) beraber kullanıldığında sinerjik etkilidir<sup>49</sup>. Ucuz ve ekonomik bir tedavi şeklidir. Gen tedavisinden farklı olarak farmakolojik şaperonları geliştirmede halen bulunan ilaç altyapısı kullanılabilir. Eldeki ilaç altyapısı kullanımı, ilaç olarak kullanılmadan önce yapılması gerekli basamak çalışmalarının bir kısmının gerçekleştirilmiş olması nedeniyle bu basamakların atlanmasını sağlayarak ekonomik bir katkı getirir. Farklı farmakolojik şaperonların tespit edilmesinde ilaç kütüphanelerinde taramalar yapılmaktadır (Tablo II)<sup>15,30,36</sup>.

#### **Farmakolojik şaperon tedavisinin dezavantajları**

Farmakolojik şaperonlar, mutasyona özgü tedavi şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Verimli bir tedavi ajanı olarak kullanılabilmesi için artık enzim aktivitesine ihtiyaç vardır ve mutasyonların etki mekanizmalarının belirlenmesi gereklidir. Esas sorunlardan biri de az enzim aktivitesi taşıyan hayvan modellerinin olmamasıdır. “Knockout” hayvan modellerinde hiç enzim aktivitesi yoktur, bu yüzden yükseltilecek enzim aktivitesi mevcut olmadığından farmakolojik şaperon tedavilerinin ilaç olarak kullanılmadan önceki klinik faz çalışmalarında zorlanılmaktadır. İdeal olan mutant enzimi eksprese eden transgenik hayvan modellerinde çalışılmasıdır (Tablo II).

#### **Farmakolojik şaperon tedavisinde son gelişmeler**

Daha etkili farmakolojik şaperon türevleri bulmak için yapıcı birbirine benzeyen iminoşekerler taranmakta, termodinamik özelliklerine, enzim ile nasıl etkileşime girdiklerine ve şaperon

**Tablo II.** Farmakolojik şaperon tedavisinin avantaj ve dezavantajları.

Avantajları	Dezavantajları
Küçük molekül ağırlığı	Mutasyona özgü tedavi
Hidrofobik, dokular arası ve zardan geçişleri kolay, kan-beyin engelini geçebilme	Mutant enzimi eksprese eden transgenik hayvan modelleri pahalı
Özgüllük	
Kompetitif inhibitor, geri dönüşümlü bağlanabilme	
Düşük derişimde kullanılabilme, toksisite düşük	
Oral yolla kullanım	
Ucuz, ekonomik	

etkilerine bakılmaktadır<sup>15,30,50</sup>. Daha etkili, çözünürlüğü artırılmış, yan etkileri olmayacak, yapıca benzeyen türevler sentezlenmeye çalışılmaktadır. Amaç ideal etkinlikte, ilaç özelliği taşıyan moleküller elde etmektir. Şu ana kadar kullanılan moleküller inhibitör etki gösterdikleri derişimlerin altında bir derişimde kullanılabilir. Yine de bazı farmakolojik şaperonlar glikosfingolipidlerin ilk glikozilasyon basamağını da inhibe ederler<sup>51</sup>. Bu nedenle enzimi inhibe etmeden özgül ve etkin bağlanma yapan farmakolojik şaperon türevlerinin tespit edilmesi istenmektedir. Bunların enzimlerle nasıl etkileşime girdikleri ve termodinamik özelliklerin belirlenmesi önem taşımaktadır<sup>27</sup>. Enzimlerin yapısını bilmek gerekmektedir. Enzimlerin kristal yapıları ve etki mekanizmaları aydınlatılmaya devam etmektedir<sup>52,53</sup>. ERQC sistemi, protein katlanması, genetik ve çevresel etkiler, mutasyonların tanımlanması ve etki mekanizmaların açığa çıkarılması önem taşımaktadır. İnsanlarda klinik çalışmalara başlanmadan önce olası yan veya toksik etkiler dikkatle değerlendirilmelidir. Olası yan ve toksik etkileri gözardı edebilmek için ilaç adayı olabilecek bileşikler mevcut ilaç altyapısını barındıran ilaç kütüphanelerinden taranmaktadır. GM2 gangliozidoz için, Maybridge Kütüphanesi'nden 50.000 ilaç benzeri (Lipinsky kurallarına göre) bileşik ve NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) Kütüphanesi'nden FDA'nın (Food and Drug Administration) onayladığı 1040 bileşik taranmıştır<sup>15</sup>. Tarama yapabilmek için 4-metilumbelliferon (MU) bazlı substratları ve 4-metilumbelliferil-GlcNAc (MUG)'u kullanan "real-time" Hex enzim deneyi geliştirilmiştir<sup>15,36</sup>. Aday farmakolojik şaperonların mutasyonlu lenfoblast ve fibroblast kültürlerinde şaperonlama potansiyelleri değerlendirilmektedir. NINDS kütüphane taramasının amacı insanlarda test edilmiş ilaçların türevlerinin bulunması ve daha cazip farmakokinetik profile sahip olmalarıdır. Bu şekilde iki inhibitör bileşik, primetamin (PYR) ve tiyoguanin tespit edilmiştir<sup>37</sup>. Örnek olarak, PYR erişkin tip Tay-Sachs hastalığının tedavisinde ideal şaperon özelliklerine sahiptir; nötral pH'da (ER) substratına en yüksek düzeyde bağlanır, lizozom gibi asidik pH'da substratına en az etkili inhibitör olarak davranır. PPR, tiyoguanine göre "bioavailability" si yüksek, plazma da yarı ömrü 100 saatten yukarı, kan-beyin engeline geçebilir<sup>54</sup>. İnsanlarda test edilen

ilaçların iskelet yapısına bakarak benzer inhibitör listesi çıkarılabilir ve yeni tanımlanan aktiviteleri optimize edilebilir.

Klinik kullanım değerlendirme süreçleri, sırasıyla DGJ, IFG, EX-101 için Fabry, Gaucher ve GM2 gangliozidoz hastalıklarında yapılmaktadır. Fabry hastalığında sıçan ve maymunlarda DGJ için klinik öncesi güvenlik çalışmaları yapıldıktan sonra gönüllü sağlıklı bireylerde güvenlik ve farmokinetik klinik faz I çalışmaları yapılmıştır<sup>55</sup>. Yanlış anlamalı mutasyona sahip 26 Fabry hastasında klinik faz II çalışmaları 2007 yılında tamamlanmıştır<sup>55</sup>. Gaucher hastalığı için IFG tartrat (AT2101) ile faz II klinik çalışmaları halen devam etmektedir<sup>55,56</sup>.

#### KAYNAKLAR

1. Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 2057-2079.
2. Leinekugel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K. Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum Genet* 1992; 88: 513-523.
3. Özkara HA, Topçu M. Sphingolipidoses in Turkey. *Brain Dev* 2004; 26: 363-366.
4. Gravel RA, Kaback MM, Proia RL, Sandhoff K, Suzuki K, Suzuki K. The GM2 gangliosidosis. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly W, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 3827-3877.
5. Schueler UH, Kolter T, Kaneshi CR, Zirzow GC, Sandhoff K, Brady RO. Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J Inher Metab Dis* 2004; 27: 649-658.
6. Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 619-624.
7. Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 2003; 299: 1397-1400.
8. Wu Y, Swulius MT, Moremen KW, Sifers RN. Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8229-8234.
9. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 1019-1049.
10. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 2003; 299: 1394-1397.
11. Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, et al. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003; 18: 343-354.

12. Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000; 404: 770-774.
13. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 294-297.
14. Hurtley SM, Helenius A. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 1989; 5: 277-307.
15. Tropak MB, Mahuran D. Lending a helping hand, screening chemical libraries for compounds that enhance beta-hexosaminidase A activity in GM2 gangliosidosis cells. *FEBS J* 2007; 274: 4951-4961.
16. Yu Z, Sawkar AR, Kelly JW. Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease. *FEBS J* 2007; 274: 4944-4950.
17. Suzuki Y. Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 351-353.
18. Conn PM, Knollman PE, Brothers SP, Janovick JA. Protein folding as posttranslational regulation: evolution of a mechanism for controlled plasma membrane expression of a G protein-coupled receptor. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3035-3041.
19. Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-galactosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15428-15433.
20. Fan JQ. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 355-360.
21. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 1999; 5: 112-115.
22. Asano N, Ishii S, Kizu H, et al. In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4179-4186.
23. Yam GH, Zuber C, Roth J. A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J* 2005; 19: 12-18.
24. Yam GH, Bosshard N, Zuber C, Steinmann B, Roth J. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1076-C1082.
25. Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, Fan JQ. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 2007; 406: 285-295.
26. Ishii S, Yoshioka H, Mannen K, Kulkarni AB, Fan JQ. Transgenic mouse expressing human mutant alpha-galactosidase A in an endogenous enzyme deficient background: a biochemical animal model for studying active-site specific chaperone therapy for Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1690: 250-257.
27. Sugawara K, Tajima Y, Kawashima I, et al. Molecular interaction of imino sugars with human alpha-galactosidase: Insight into the mechanism of complex formation and pharmacological chaperone action in Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2009; 96: 233-238.
28. Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, et al. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol* 2005; 12: 1235-1244.
29. Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, et al. N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-galactosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689: 219-228.
30. Chang HH, Asano N, Ishii S, Ichikawa Y, Fan JQ. Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *FEBS J* 2006; 273: 4082-4092.
31. Compain P, Martin OR, Boucheron C, et al. Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *Chembiochem* 2006; 7: 1356-1359.
32. Suzuki Y. Beta-galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 471-476.
33. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, et al. Fibroblast screening for chaperone therapy in beta-galactosidosis. *Brain Dev* 2006; 28: 482-486.
34. Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, et al. Chemical chaperone therapy for brain pathology in G(M1)-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15912-15917.
35. Tropak MB, Reid SP, Guiral M, Withers SG, Mahuran D. Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J Biol Chem* 2004; 279: 13478-13487.
36. Tropak MB, Blanchard JE, Withers SG, Brown ED, Mahuran D. High-throughput screening for human lysosomal beta-N-Acetyl hexosaminidase inhibitors acting as pharmacological chaperones. *Chem Biol* 2007; 14: 153-164.
37. Maegawa GH, Tropak M, Buttner J, et al. Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 9150-9161.
38. Dill KA, Shortle D. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 795-825.
39. Edgington SM. Rites of passage: moving biotech proteins through the ER. *Biotechnology (NY)* 1992; 10: 1413-1420.
40. Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 385-410.
41. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 5121-5188.
42. Kuznetsov G, Nigam SK. Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* 1998; 339: 1688-1695.

43. Sinici I, Tropak MB, Mahuran DJ, Ozkara HA. Assessing the severity of the small inframe deletion mutation in the alpha-subunit of beta-hexosaminidase A found in the Turkish population by reproducing it in the more stable beta-subunit. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 747-756.
44. Ozkara HA, Sandhoff K. Characterization of two Turkish beta-hexosaminidase mutations causing Tay-Sachs disease. *Brain Dev* 2003; 25: 191-194.
45. Brown CA, Neote K, Leung A, Gravel RA, Mahuran DJ. Introduction of the alpha subunit mutation associated with the B1 variant of Tay-Sachs disease into the beta subunit produces a beta-hexosaminidase B without catalytic activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 21705-21710.
46. Brown CA, Mahuran DJ. Active arginine residues in beta-hexosaminidase. Identification through studies of the B1 variant of Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 1991; 266: 15855-15862.
47. Brown CA, Mahuran DJ. Beta-hexosaminidase isozymes from cells cotransfected with alpha and beta cDNA constructs: analysis of the alpha-subunit missense mutation associated with the adult form of Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 497-508.
48. Aydın H, Kalkanoglu Sivri H, Sinici İ, et al. In vitro efficacy of N-octyl-4-epi-valienamine (NOEV) in patient with infantile GM1 gangliosidosis. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(Suppl): 443.
49. Porto C, Cardone M, Fontana F, et al. The pharmacological chaperone N-butyldeoxynojirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts. *Mol Ther* 2009; 17: 964-971.
50. Fan JQ, Ishii S. Cell-based screening of active-site specific chaperone for the treatment of Fabry disease. *Methods Enzymol* 2003; 363: 412-420.
51. Platt FM, Neises GR, Karlsson GB, Dwek RA, Butters TD. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *J Biol Chem* 1994; 269: 27108-27114.
52. Mark BL, Mahuran DJ, Cherney MM, Zhao D, Knapp S, James MN. Crystal structure of human beta-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J Mol Biol* 2003; 327: 1093-1109.
53. Maier T, Strater N, Schuette CG, Klingenstein R, Sandhoff K, Saenger W. The X-ray crystal structure of human beta-hexosaminidase B provides new insights into Sandhoff disease. *J Mol Biol* 2003; 328: 669-681.
54. Weiss LM, Harris C, Berger M, Tanowitz HB, Wittner M. Pyrimethamine concentrations in serum and cerebrospinal fluid during treatment of acute Toxoplasma encephalitis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1988; 157: 580-583.
55. <http://www.amicustherapeutics.com>.
56. NJ. 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.