

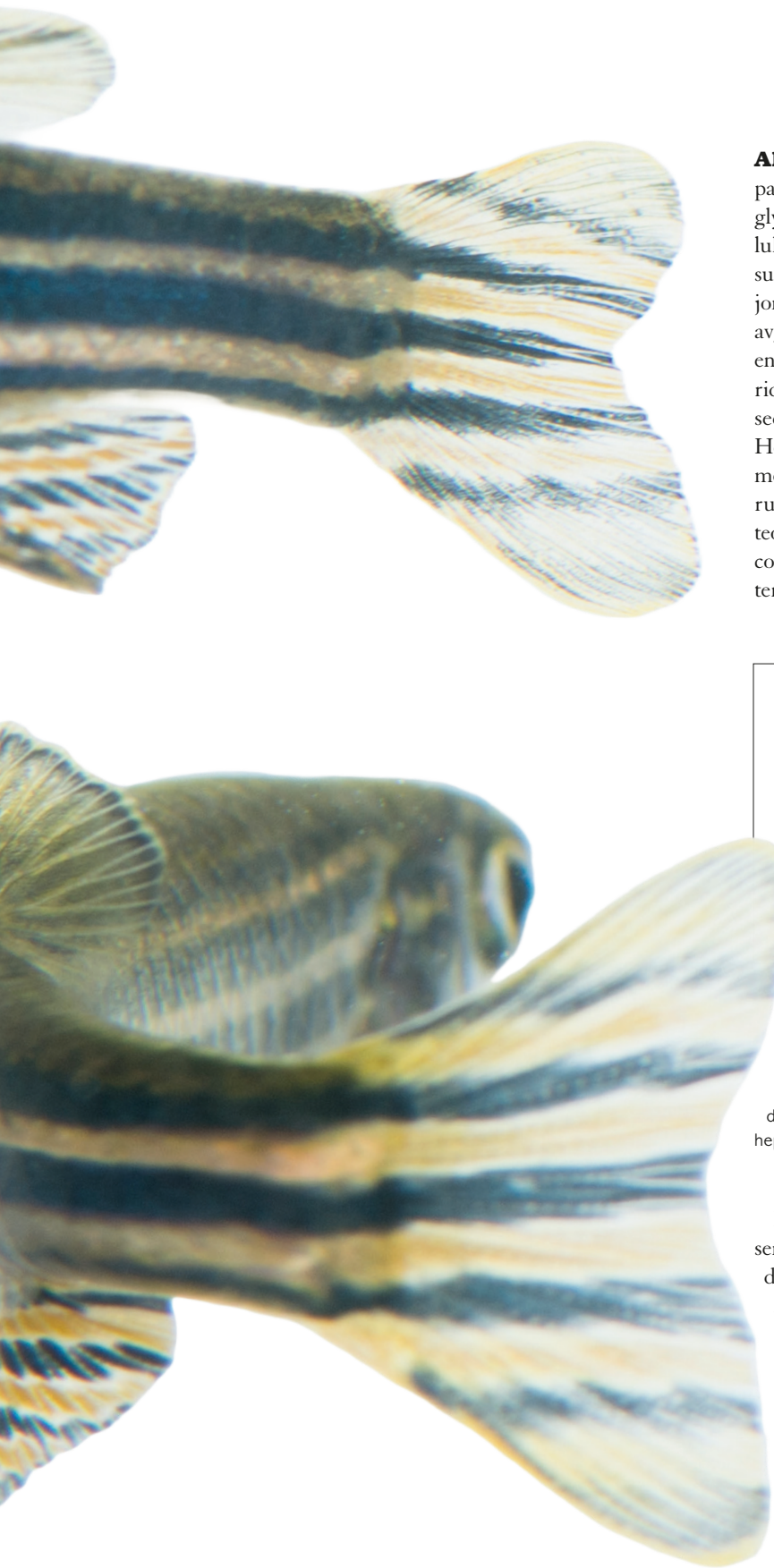


Den neurologiska sjukdomen Sanfilippo får små barn att stanna upp och backa i utvecklingen. Funktioner som språk, minne, motorik och annat slås ut från 2–6 årsåldern. Inget botemedel finns och barnen överlever sällan 20-årsdagen. Men forskning pågår, bland annat i zebrafiskmodeller. **Lena Kjellén**, Uppsala universitet, och **Anders Dagälv**, Akademiska sjukhuset, beskriver sin forskning i denna artikel.

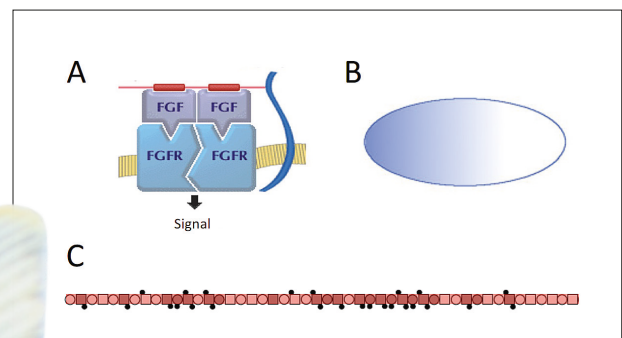
Zebrafisk- modeller

för att hitta nya sätt att behandla

Sanfilippos sjukdom



Alla (eller åtminstone nästan alla) celler har heparansulfat-proteoglykaner på sin yta. Heparansulfat-proteoglykaner finns också i basalmembraner och i annan extracellulär matrix.¹ De negativt laddade heparansulfatkedjorna är sulfaterade och sulfatgrupperna bildar unika mönster på kedjorna. Dessa ser olika ut i olika celler och vävnader. Mönstret avgör vilka proteiner (tillväxtfaktorer, cytokiner, morfogener, enzymer, matrixmolekyler etc.) som kan binda till polysackariden.² Interaktionen mellan heparansulfat och proteinet kan sedan påverka olika fysiologiska eller patologiska förlopp. Heparansulfat är viktigt för embryonalutveckling. Genetiskt modifierade möss som saknar heparansulfat, dör innan gastruleringen startar. Viktiga funktioner för heparansulfat-proteoglykaner under embryonalutvecklingen är att fungera som co-receptorer och att skapa och stabilisera morfogengradienter som styr hur celler migrerar och differentierar [Figur 1].



Figur 1. A. Heparansulfat-proteoglykaner medierar bindning av tillväxtfaktorn FGF till sin receptor som sedan medierar signalen in i cellen. **B.** Med hjälp av heparansulfat på cellytor och i matrix bildas koncentrationsgradienter av faktorer viktiga för cellers migration och differentiering. **C.** Sulfatgrupper (svarta bollar) bundna till de två alternerande monosackariderna bildar cell-specifika mönster på heparansulfat-kedjan.

TILLVERKNING OCH NEDBRYTNING AV HEPARANSULFAT

Heparansulfat tillverkas i cellens golgiapparat där utvalda seriner i proteoglykanens proteindelen är förankringspunkt för den växande polysackariden. Flera glykosyltransferaser, sulfotransferaser och andra enzymer deltar i biosyntesen där slutprodukten innehåller alternerande enheter av två monosackarider, uronsyra och N-acetylerad eller N-sulfaterad glukosamin, där båda monosackariderna också kan vara O-sulfaterade [Figur 1]. Efter biosyntes transporteras proteoglykanerna till cellytan där de antingen blir kvar förankrade i plasmamembranet eller frisätts till omgivningen. Cellyte-proteoglykaner har en snabb omsättning med en halveringstid på några timmar medan proteoglykanerna i matrix ofta omsätts i långsammare takt. När proteoglykanerna ska degraderas tas de upp i cellen och transporteras till lysosomerna där proteaser tar hand om proteindelen medan enzymet heparanas

fragmenterar kedjorna och exoenzymer bryter sedan steg för steg ned fragmenten [Figur 2]. Om något av enzymerna inte fungerar eller fungerar sämre kommer degradationen att avstanna eller gå långsammare. Det är det som händer hos barn med mukopolysackaridoser, sällsynta genetiska sjukdomar som orsakas av mutationer i just denna typ av enzymer.³ "Mukopolysackarid" är ett gammalt namn på de polysackarider vi nu kallar glykosaminoglykaner. Heparansulfat, heparin, kondroitinsulfat, dermatansulfat, keratansulfat och hyaluronan tillhör denna grupp. Vissa enzymer är aktiva i nedbrytningen av fler än en typ av glykosaminoglykaner, medan andra är specifika för en enda. Patienter med Sanfilippos sjukdom (MPS III) har problem med degradation av heparansulfat men inte med degradation av de andra glykosaminoglykanerna.



NÄR NEDBRYTTNINGEN INTE FUNGERAR

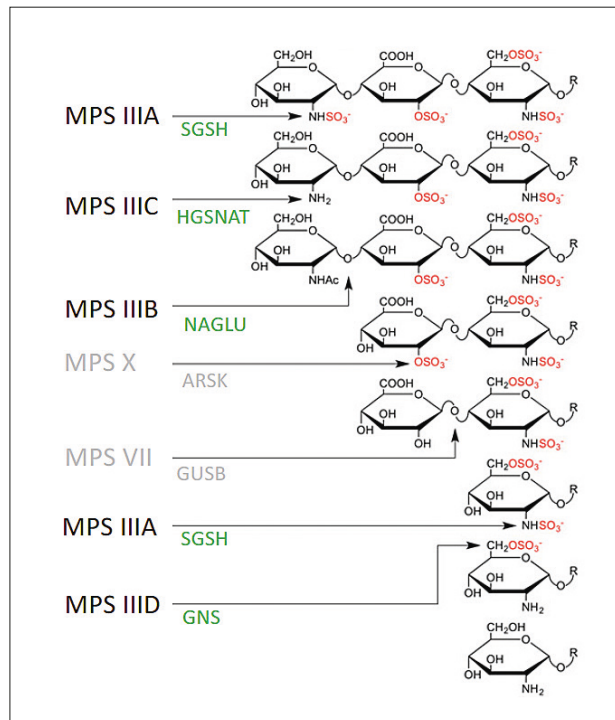
Symtomen vid de mukopolysackaridoser som enbart drabbar nedbrytningen av kondroitinsulfat, dermatansulfat, keratansulfat och hyaluronan begränsas oftast till skelett, brosk och övrig bindväv, medan mukopolysackaridoser som involverar heparansulfat (MPS I, II och III) ger svåra neurologiska skador. När enzymerna som deltar i nedbrytningen av heparansulfat inte fungerar som de ska kommer heparansulfat-kedjor att ansamlas i lysosomerna som på sikt slutar fungera. Därefter fortgår en ansamling av heparansulfat i övriga delar av neuronerna som över tid förtvinar. Barnen som har dessa genetiska defekter föds utan tecken på att de har en dödlig sjukdom. De utvecklas inledningsvis normalt, men vid 2–4 års ålder uppmärksammar föräldrarna ofta att något är avvikande. Barnen kan till exempel uppvisa en ökad aggressivitet och sömnstörningar. Med tiden kommer barnen att förlora många av de förmågor som hunnit utvecklas, till exempel tal och gång. Därefter blir barnens mentala nedsättningar svårare och de drabbas efter hand av symptom som liknar demens. De dör vanligtvis av en lunginflammation vid 15–20 års ålder. Medan MPS I och II drabbar degradation av både heparansulfat och dermatansulfat, är det bara nedbrytning av heparansulfat som drabbas hos patienter med Sanfilippos sjukdom (MPS III). Sanfilippos sjukdom har fyra undergrupper, III A–D, där mutationer i olika enzymer alla leder till att nedbrytningen av heparansulfat går långsammare eller upphör. De fyra enzymerna är SGSH (N-sulfoglukosamin sulfohydrolas; MPS IIIA), HGSNAT (heparan-a-glukosaminid N-acetyltransferas; MPS IIIC), NAGLU (N-acetyl-a-glukosaminidas; MPS IIIB) och GNS (glukosamin (N-acetyl)-6-sulfatas; MPS IIID). Eftersom symptomen till stor del är neurologiska är det extra svårt att hitta terapier som fungerar eftersom ersättningsenzymer eller andra molekyler måste kunna ta sig in i hjärnan för att ha effekt. Tre olika typer av terapier skulle kunna vara användbara: 1) enzymterapi där enzymet fuserats med någon faktor som gör att det kan passera blod-hjärnbarriären eller alternativt genom direkt administration till CNS; 2) genterapi



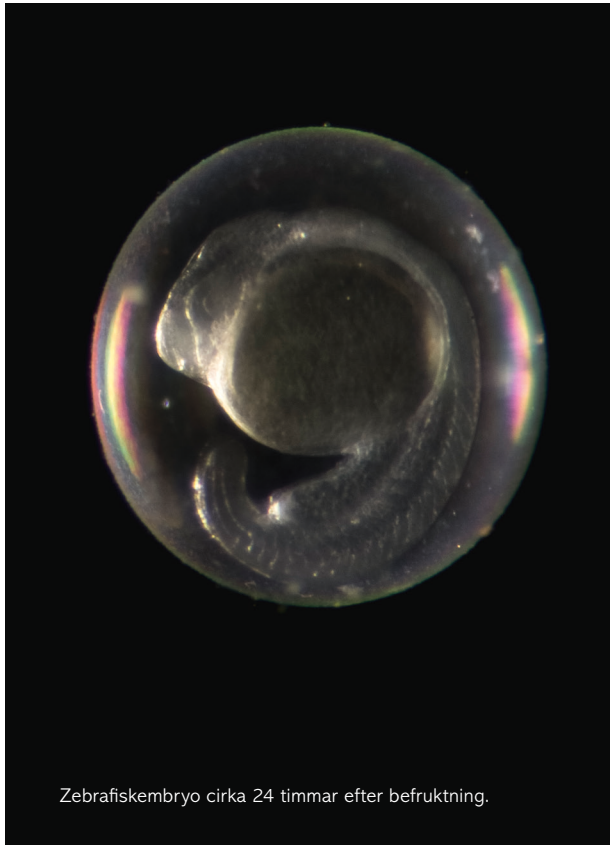
eller 3) terapi baserat på små molekyler som kan passera blod-hjärnbarriären.⁴

ZEBRAFISKMODELLER FÖR ATT STUDERA MUKOPOLYSACKARIDOSER

Zebrafisk används mer och mer som modellsystem för att studera sjukdomar och för att utveckla läkemedel. Genom CRISPR/Cas9-metodiken finns det nu möjlighet att slå ut eller förändra gener i fiskarnas arvs massa. En stor fördel med zebrafisk i jämförelse med råttor eller möss är att potentiella lågmolekylära läkemedelskandidater kan tillsättas vattnet fiskarna simmar i, istället för att injiceras. En annan fördel är den stora mängden avkomma, ofta 300–400 embryon per kull. Under evolutionen har zebrafiskar (som tillhör de så kallade äkta benfiskarna) jämfört med människan genomgått ytterligare en fördubbling av sin arvs massa. Detta gör att antalet gener är fler än i människor. Duplicerade gener kan försvinna under evolutionen men kan också bli kvar med samma eller förändrade funktioner. När det gäller generna som är aktuella vid Sanfilippos sjukdom är det bara GNS-genen som finns i två exemplar, medan de tre andra enzymerna kodas av en gen vardera. Vi bestämde oss därför för att till en början med hjälp av CRISPR/Cas9 slå ut dessa och generera zebrafiskmodeller för Sanfilippo A, B och C [Figur 2]. Dessa modeller är nu på plats och vi har kunnat visa att fiskarna, precis som barnen som drabbas, samlar på sig heparansulfat.



Figur 2. Här visas den del av heparansulfat-degradationen där de enzymer som kan ge upphov till Sanfilippos sjukdom (MPS IIIA, B, C och D) deltar. Sanfilippo-enzymerna är gröna medan andra enzymer är grå. Observera att SGSH som tar bort N-sulfatgruppen, förekommer två gånger. MPS X är en nyligen identifierad mukopolysackaridos som inte ingår i den tidigare gruppen av sju.¹²



Zebrafiskembryo cirka 24 timmar efter befruktning.

VÅR FORSKNINGSIDÉ

Vi har i vår forskningsgrupp länge varit intresserade av heparansulfat och framför allt studerat hur heparansulfat-kedjorna syntetiseras och hur cellerna kan designa sulfatmönstret som ju avgör vilka proteiner heparansulfat-kedjan kan binda till. Ett biosyntesenzym som är viktigare än andra när det gäller att reglera sulfateringen av heparansulfat är NDST (glukosaminyln N-deacetylas/N-sulfotransferas). I däggdjur finns fyra NDST-gener (NDST1-4), där NDST1 och NDST2 uttrycks av nästan alla celler, medan NDST3 och NDST4 har en mer begränsad utbredning.

Zebrafisk har fem (*ndst1a*, *ndst1b*, *ndst2a*, *ndst2b*, *ndst3*).⁵ Vi har tidigare tillsammans med Johan Ledin, Beata Filipek-Górniok och Laura Waldman vid Uppsala universitet använt en "multi-hit" CRISPR/Cas9-metod för att generera mutanter där enstaka eller flera av de fem generna slagits ut (ej ännu publicerat).

Vi har också tidigare studerat NDST-enzymerna i möss och funnit att möss som saknar NDST2, förutom att de har defekta mastceller som inte kan syntetisera heparin, annars är friska och fertila.⁶ Däremot överlever inte möss som saknar NDST1.⁷ Trots att NDST2 uttrycks i nästan alla musceller tillsammans med NDST1, verkar det enzymet inte i någon större utsträckning påverka sulfateringen. Däremot leder avsaknad av enzymet till kraftigt reducerat innehåll av hepa-



Minnesmottagningen

Med tanke på hjärnhälsa

Specialister på hjärnhälsa - på dina villkor



Vi hjälper dig, eller din närstående, med en minnesutredning - digitalt hemifrån. Du får en omfattande läkarbedömning som kan identifiera eventuell tidig demenssjukdom, orsakat av exempelvis Alzheimers sjukdom.

- ✓ Utredning hemifrån
- ✓ Prata med en specialist
- ✓ Inga väntetider

Besök [Minnesmottagningen.se](https://minnesmottagningen.se)



Genom analys av arvs- massan hos patienter som lider av ärftliga neu- rologiska sjukdomar finns indika- tioner på att samma gener som är involverade i Sanfilippos sjukdom kan bidra till dessa neurologiska sjukdomar.

ransulfat.⁸ Detsamma verkar gälla i zebrafisk, där utslagning av de båda *ndst*-generna också leder till minskade heparansulfatmängder hos fiskarna (inte heller publicerat ännu). Vi gör nu korsningsförsök som syftar till att se om avsaknad av *Ndst2* i Sanfilippo-fiskarna kan reducera mängden heparansulfat hos dem utan att störa andra funktioner. Om detta fungerar blir nästa steg att identifiera en effektiv hämmare av låg molekylvikt som kan passera blod-hjärnbarriären och minska *Ndst2*-aktiviteten utan att påverka de andra *Ndst*-enzymerna.

Om vi kan identifiera en sådan hämmare som utan att störa andra viktiga funktioner får fiskarna att sluta producera för mycket heparansulfat skulle de kunna utvecklas till läkemedel som förhoppningsvis skulle kunna lindra sjukdomen också hos människa. Det är tänkbart att en *NDST2*-hämmare även skulle kunna lindra framför allt de neurologiska symtomen vid MPSI och II där ju både dermatansulfat och heparansulfat ansamlas. Vi hoppas också att våra zebrafiskmodeller oberoende av heparansulfat och *NDST2* skulle kunna utnyttjas av andra forskargrupper med andra infallsvinklar på Sanfilippos sjukdom.

KOPPLING TILL ANDRA NEUROLOGISKA TILLSTÅND

Genom analys av arvsmassan hos patienter som lider av ärftliga neurologiska sjukdomar finns indikationer på att samma gener som är involverade i Sanfilippos sjukdom kan bidra till dessa neurologiska sjukdomar. Detta är visat för *NAGLU* som kan kopplas till Parkinsons sjukdom,⁹ och till vissa typer av nedärvd sensorisk neuropati.¹⁰ För en form av retinopati har man istället sett en koppling till *HGSNAT*.¹¹ Hur brist på enzymer som bryter ned heparansulfat kan bidra till dessa sjukdomar och varför olika enzymer leder till olika sjukdomar är inte känt. Zebrafiskmodellerna som vi utvecklat kan förhoppningsvis utnyttjas för att studera dessa samband.



**LENA
KJELLÉN**
Professor,
Uppsala
universitet
[lena.kjellen@
imbim.uu.se](mailto:lena.kjellen@imbim.uu.se)



**ANDERS
DAGÄLV**
ST-läkare,
Akademiska
sjukhuset
[anders.dagalv@
imbim.uu.se](mailto:anders.dagalv@imbim.uu.se)

Referenser

- Merry CLR, Lindahl U, Couchman J, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Mohnen D, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 17.
- Kjellén L, Lindahl U. Specificity of glycosaminoglycan-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2018; 50:101-108.
- Zhou J, Lin J, Leung WT, Wang L. A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. *Intractable Rare Dis Res* 2020; 9(1):1-9.
- Gaffke L, Pierzynowska K, Piotrowska E, W grzyn G. How close are we to therapies for Sanfilippo disease? *Metab Brain Dis* 2018; 33(1):1-10.
- Filipek-Górniok B, Habicher J, Ledin J, Kjellén L. Heparan Sulfate Biosynthesis in Zebrafish. *J Histochem Cytochem* 2021; 69(1):49-60.
- Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellén L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 1999; 400(6746):773-776.
- Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppevelt T, Ellin F, Eriksson I, Olofsson AM, Kjellen L, Forsberg E. Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J Biol Chem* 2000; 275(34):25926-25930.
- Deligny A, Dierker T, Dagälv A, Lundquist A, Eriksson I, Nairn AV, Moremen KW, Merry CLR, Kjellén L. *NDST2* (N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2) Enzyme Regulates Heparan Sulfate Chain Length. *J Biol Chem* 2016; 291(36):18600-18607.
- Winder-Rhodes SE, Garcia-Reitböck P, Ban M, Evans JR, Jacques TS, Kempainen A, Foltynie T, Williams-Gray CH, Chinnery PF, Hudson G, Burn DJ, Allcock LM, Sawcer SJ, Barker RA, Spillantini MG. Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome. *Mov Disord* 2012; 27(2):312-315.
- Tétreault M, Gonzalez M, Dicaire MJ, Allard P, Gehring K, Leblanc D, Leclerc N, Schondorf R, Mathieu J, Zuchner S, Brais B. Adult-onset painful axonal polyneuropathy caused by a dominant *NAGLU* mutation. *Brain* 2015; 138(Pt 6):1477-1483.
- Schiff ER, Daich Varela M, Robson AG, Pierpoint K, Ba-Abbad R, Nutan S, Zein WM, Ullah E, Hury LA, Tuupainen S, Mahroo OA, Michaelides M, Burke D, Harvey K, Arno G, Hufnagel RB, Webster AR. A genetic and clinical study of individuals with nonsyndromic retinopathy consequent upon sequence variants in *HGSNAT*, the gene associated with Sanfilippo C mucopolysaccharidosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2020; 184(3):631-643.
- Verheyen S, Blatterer J, Speicher MR, Bhavani GS, Boons GJ, Ilse MB, Andrae D, Sproß J, Vaz FM, Kircher SG, Posch-Pertl L, Baumgartner D, Lübke T, Shah H, Al Kaissi A, Girisha KM, Plecko B. Novel subtype of mucopolysaccharidosis caused by arylsulfatase K (*ARSK*) deficiency. *J Med Genet* 2022; 59(10):957-964.

