



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Generació d'un model cel·lular osteoblàstic i aproximacions terapèutiques per a la malaltia de Gaucher

Jenny Serra Vinardell

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



**Generació d'un model cel·lular
osteoblàstic i aproximacions
terapèutiques per a la malaltia
de Gaucher**

Jenny Serra Vinardell

**Generació d'un model cel·lular osteoblàstic
i aproximacions terapèutiques
per a la malaltia de Gaucher**

Memòria presentada per

Jenny Serra Vinardell

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de genètica

Departament de Genètica

Curs 2014/2015

Tesi dirigida pel **Dr. Daniel Grinberg Vaisman** i la **Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués**
al Departament de Genètica

de la Universitat de Barcelona

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

Jenny Serra Vinardell

2015

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Ara que ja veig el final m'aturo i penso en tota aquella gent que m'ha ajudat, en tota aquella que m'ha fet riure i en aquella que no ha deixat de confiar en mí...

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors de tesi, en Daní i la Lluïsa, gràcies per brindar-me l'oportunitat de poder formar part del vostre grup. Sobretot per la confiança, la paciència i per despertar en mí les ganes d'aprendre i de conèixer...

A l'Antonio i a la Fina, per les infinites vegades que m'heu ajudat, aconsellat i animat, us estic molt agraïda.

I què dir de tu, que no t'hagi dit, Marta? Sí no fos per tu..., sempre disposada a donar un cop de mà . Tan de bo, un dia pogués ajudar-te tant com tu ho has fet amb mí. Vals un imperi i només et falta que tu també ho creguis. Els resultats ja s'estan acostant i ja saps el que diuen, "lo bo es fa esperar". Bàrbara, ja ho saps, ets per mí un referent a seguir, tant com a científica i com a persona la teva capacitat per relativitzar les coses m'ha ensenyat, encara que no ho creguis, a veure la realitat des d'una altra perspectiva. Quan els camins ens separin trobaré a faltar les teves notetes i els teus reflets, menys els "villancicos". Isaac, gràcies per ensenyar-me tantes coses, per haver-me fet costat i motivat quan ho necessitava. Moltes gràcies Laurí i Anna per fer-me companyia les llargues hores de cultius, les hores passen més ràpid si vosaltres esteu allà. Cèlia moltes gràcies, per transmetre'm tranquil·litat, per ajudar-me a organitzar els problemes, "un rere l'altre". Noe, gràcies per haver-me donat un cop de mà sempre que t'ho he demanat, els teus consells m'han resultat molt útils. Pe cert, tenim una de "mojitos" pendent. Roser, encara que no t'ho creguis: que útils han estat per a mí els teus seminaris de qPCR!, gràcies per la teva paciència. Mònica, gràcies per la teva capacitat d'organitzar el laboratori, perquè de vegades les coses quan tu les busques apareixen soles, i mira que jo ho havia mirat.... Gràcies Bejhat, per la teva amabilitat i a tu Patri per la teva alegria!

I a les noves generacions gràcies per la vostre alegria, s'encomana! Núria, el teu glamour aclapara tot el lab , inclús quan xopa vas, ets extraordinària. Gràcies Noe.B pel teu "holi", per la teva capacitat d'aprendre i pels teus ànims. Gràcies Judit, per ensenyar-

me més coses tu a mi que jo a tu. Laura i Sílvia, que ve tenir-vos al lab i que sigueu de marxar tard, la vostra companyia s'agraeix. Neus, encara que els inicis vas pensar que era una "borde" espero que ja no ho creguis, ara et deixo dinar amb mi i abans també, gràcies per ser tal i com ets.

Agraeixo a tots els professors i els companys del departament de genètica per compartir no només ciència, sinó també sopars, barbacoes i riures. Gràcies per fer pinya.

I sense oblidar-me de tota la gent que vaig conèixer en les meves anades i vinguades al CSIC. Gràcies a tots, i en especial a la Lucía, la Francesca, la Cindy i en Pedro. Gràcies per deixar-me un espai a la "poyata".

El Grup IMIM, que recentment he tingut el plaer de conèixer. Gràcies per deixar-me entrar en el vostre lab i en especial a la Laureta, per cuidar-me les "nenes".

A les meves "Biolocas" per haver-me acompanyat en la carrera i per no haver desaparegut després.

Gràcies a tot el Sebas Team, i en especial al meu entrenador, per animar-me sempre, pel teu "a poc a poc" i per aconseguir que tot un estadi m'aplaudeixi.

I per damunt de tot, vull agrair a les persones més importants de la meva vida, els meus grans pilars, les que han fet que sigui com sóc, les que m'han recolzat en tot moment, tant en lo bo com en lo dolent, les que m'han fet treure forces d'allà on no sabia que tenia i que mai, mai i mai han deixat de confiar en mi. Gràcies papa, mama i Clàudia.

RESUM

La malaltia de Gaucher (GD) forma part d'un conjunt de malalties que es coneixen amb el nom de "malalties d'acumulació lisosòmica". La GD n'és la més prevalent i en la majoria de casos és causada per mutacions en el gen *GBA1*, que codifica l'enzim glucocerebrosidasa (GBA1) la qual hidrolitza, principalment, l'esfingolipid glucosilceramida (GlcCer) en glucosa i ceramida. En la GD aquest enzim presenta una activitat deficient i la GlcCer s'acumula en els lisosomes dels macròfags que formen les anomenades "cèl·lules Gaucher". La GD és autosòmica recessiva i compren 3 subtipus clínics, en funció de la presència i el grau de les manifestacions neurològiques: la de tipus 1 (GD1; no neuronopàtica), la de tipus 2 (GD2; neuronopàtica aguda), i la de tipus 3 (GD3; neuronopàtica subaguda). La GD1 es caracteritza per presentar problemes viscerals, hematològics i òssis. La patofisiologia de les manifestacions òssies d'aquesta és poc coneguda però tot apunta a que les cèl·lules de Gaucher, el sistema immunològic i les cèl·lules òssies hi juguen un paper important.

De totes les aproximacions terapèutiques pel tractament de la malaltia, cal destacar que la teràpia de substitució enzimàtica (ERT) és la més utilitzada, però en els últims 10 anys la teràpia amb xaperones farmacològiques ha esdevingut una opció atractiva per millorar el plegament i transport d'aquells enzims mutats que ho requereixin.

El treball que es presenta en aquesta tesi doctoral ha permès identificar algunes xaperones que presenten una bona capacitat d'augmentar l'activitat enzimàtica d'algunes glucocerebrosidasas mutades. A més, s'ha elaborat un model mesenquimal i osteoblàstic de la GD1 en el que s'està avaluant la implicació de la deficient activitat GBA1 en la diferenciació osteoblàstica i, indirectament, en l'activació de la formació dels osteoclasts.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. ELS LISOSOMES	3
1.1. Estructura i funció.....	3
1.2. Digestió lisosomal.....	3
1.3. Enzims lisosomals	4
2. LES MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....	6
2.1. Aspectes genètics i prevalença de les LSD.....	6
2.2. Fenotips clínics de les LSD	6
2.3. Classificació de les LSD.....	6
2.4. Esfingolipidosis	8
2.4.1. Metabolisme dels esfingolípidis	8
2.4.2. Propietats dels esfingolípidis	9
2.4.3. Estructura dels esfingolípidis.....	9
3. LA MALALTIA DE GAUCHER	10
3.1. Història i antecedents de la GD	10
3.2. Prevalença	10
3.3. Clínica	11
3.4. Bioquímica.....	14
3.4.1. La glucocerebrosidasa, la glucosilceramida i la glucoesfingosina	14
3.4.2. La proteïna activadora: la saposina C.....	15
3.5. Gen <i>GBA1</i>	16
3.5.1. cDNA del gen <i>GBA1</i>	17
3.5.2. Mutacions del gen <i>GBA1</i>	17
3.6. La proteïna, l'enzim GlcCerasa(o <i>GBA1</i>)	19
3.7. Correlacions genotip-fenotip.....	20
3.8. Components que intervenen en l'expressió fenotípica de la GD	21
3.8.1. Altres gens que poden estar implicats en la GD	21
3.8.2. Cèl·lules Gaucher i Sistema immunitari.....	24
3.8.3. Altres	24
3.9. Diagnòstic de la malaltia.....	24
3.9.1. Diagnòstic clínic.....	24
3.9.2. Diagnòstic morfològic	24
3.9.3. Diagnòstic enzimàtic.....	25

3.9.4.	Diagnòstic genètic.....	25
3.10.	Aproximacions terapèutiques	25
3.10.1.	Tractament de suport.....	26
3.10.2.	Tractament específic	26
3.11.	Models	39
3.11.1.	Models murins.....	39
3.11.2.	Models cel·lulars.....	40
3.12.	Manifestacions òssies en la GD.....	42
3.12.1.	Clínica de les manifestacions òssies	42
3.12.2.	Resposta de les manifestacions òssies a la teràpia	43
3.12.3.	Fisiopatologia de la malaltia òssia	44
4.	PETIT INCÍ: OSTEOIMMUNOLOGIA.....	48
	OBJECTIUS	51
	RESULTATS	55
	CAPÍTOL 1. Identificació de noves xaperones farmacològiques	59
	Article 1.....	59
	Article 2.....	85
	CAPÍTOL 2. Elaboració d'un model osteoblàstic de la malaltia de Gaucher	119
	Article 3.....	119
	DISCUSSIÓ.....	145
	1. XAPERONES FARMACOLÒGIQUES (XF) COM ESTRATÈGIA PER A TRACTAR LA MALALTIA DE GAUCHER.....	147
1.1.	Tria dels possibles candidats com a XF	148
1.1.1.	Importància dels paràmetres IC_{50} i K_i	149
1.1.2.	Lloc d'unió depenent del tipus d'inhibició.....	150
1.1.3.	Importància de la selectivitat cap a altres glicosidases i la GBA2.....	150
1.2.	Efectivitat dels compostos seleccionats sobre fibroblasts portadors de diferents genotips responsables de la malaltia de Gaucher	151
1.3.	Relació entre l'estructura cristal·lina enzimàtica i l'activitat xaperona dels inhibidors competitius vs els no competitius.....	153
1.4.	Influència de la Sap C i el pH intralisosomal en els resultats obtinguts.....	156
1.5.	La teràpia amb XP com a teràpia addicional	157
2.	MODELS	159
2.1.	Les diferents opcions pel modelatge de malalties	159
2.1.1.	Les iPSC per la malaltia de Gaucher	160
2.2.	Generació d'un model mesenquimal i osteoblàstic per a la GD.....	161

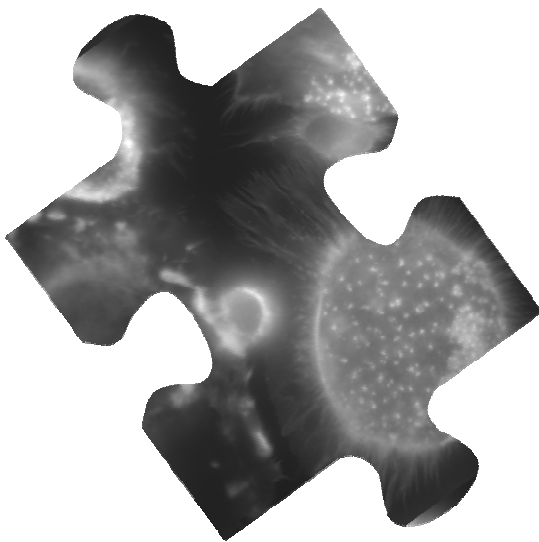
2.2.1.	Validació de les MSC	162
2.2.2.	Consideracions dels factors que poden influir en la diferenciació oseoblàstica i la metodologia emprada	163
2.2.3.	Avaluació del procés de diferenciació osteoblàstic	169
2.2.4.	Avaluació de la capacitat d'induir l'osteoclastogènesi per part de les cèl·lules del llinatge osteoblàstic de la GD	172
2.3.	Avaluació de la capacitat d'incrementar l'activitat de l'enzim GBA1 de les MSC GD	173
2.4.	La complexitat de la regulació òssia, l'heterogeneïtat clínica de la GD i l'ús de iPSC	173
2.5.	Experiments en curs i futurs.....	173
CONCLUSIONS.....		175
BIBLIOGRAFIA		179
APÈNDIX.....		211

ABREVIATURES

4-MU	: 4-metilumbeliferil- β -glucòsid
AAV	: virus adeno-associats
ABX	: ambroxol
ACE	: enzim convertidor d'angiotensina
ALPL	: fosfatasa alcalina
AMRF	: insuficiència renal-mioclonia activa
Asc	: àcid ascòrbic
BMPs	: proteïnes morfogèniques òssies
BSP	: sialoproteïna òssia
CBE	: condritol β -epòxid
CD	: <i>cluster of differentiation</i>
Col1	: col·lagen tipus 1
COX2	: ciclooxigenase-2
DeX	: dexametasone
DIX	: iminoxilitol
DMO	: densitat mineral òssia
EBs	: cossos embriònics
ECM	: matriu extracel·lular
ER	: reticle endoplasmàtic
ERT	: teràpia de substitució enzimàtica
FACS	: cistometria de flux
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
ESC	: cèl·lules mare embrionàries
GA	: aparell de Golgi
GBA1	: β -glucosidasa àcida/glucosilceramidasa (GlcCerasa)
GD	: malaltia de Gaucher/Gaucher, de tipus 1 (GD1), de tipus 2 (GD2), de tipus 3 (GD3)
GlcCer	: glucosilceramida
GlcCerasa	: β -glucosidasa àcida/glucosilceramidasa
GlcPsy	: glucoesfingosina
GSL	: glicoesfingolípid
GT	: teràpia gènica
hESC	: cèl·lules mare embrionàries humanes
HGVS	: <i>Human Genome Variation Society</i>
HSC	: cèl·lules mare hematopoètiques
HSCT	: transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques
IFG	: isofagomina
Ig	: immunoglobulina
IL	: interleuquina
InsP ₃ R	: receptor inositol trisfosfat
iPSC	: cèl·lules mare pluripotents induïdes (cèl·lules iPS)

Ki	: constant de dissociació
LIMP-2	: proteïna lisosomal integral de membrana tipus 2
LMPs	: proteïnes lisosomals integrals de membrana
LSD	: malalties d'acumulació lisosòmica
M6P	: manosa-6-fosfat
M6PR	: receptor de manosa-6-fosfat
MCP-1	: proteïna quimioattractant de monòcits
M-CSF	: factor estimulador de macròfags
MIP	: proteïna inflamatòria de macròfags
MSC	: cèl·lules mare mesenquimals
N19	: N-glicosilació
NB-DNJ	: N-butildeoxinojirimicina
NN-DNJ	: N-nonildeoxinojirimicina
NOV	: <i>N</i> -octil- β -valienamina
OC	: osteocalcina
OPG	: osteoprotegerina
OPN	: osteopontina
OSX	: osterix
PARC	: <i>pulmonary and activation regulated chemokine</i> (també coneguda com CCL18)
PBMCs	: cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PD	: malaltia de Parkinson/Parkinson
PGE2	: prostaglandina-E2
PKC	: proteïna cinasa C
PtdCho	: fosfatidilcolina
RER	: reticle endoplasmàtic rugó
RyR	: receptor de rianodina
S1P	: esfingosina 1-fosfat
Sap C	: saposina C
SNC	: sistema nerviós central
SOST	: proteïna sclerostin
SPARC	: osteonectina
TGF- β	: factor de creixement transformant β
TNF	: factor de necrosis tumoral
TRAP	: fosfatasa àcida fosfat resistent
Try	: peptidasa tripsina
XF	: xaperones farmacològiques
WT	: <i>Wild-type</i> (no malalt)
α -syn	: α -Sinucleïna
β -Gly	: β -glicerofosfat

INTRODUCCIÓ



1. ELS LISOSOMES

Els lisosomes són orgànuls subcel·lulars àcids presents en la majoria de les cèl·lules eucariotes. Van ser descrits per De Duve i els seus col·laboradors l'any 1955 (De Duve *et al.* 1955). Són els principals responsables de la degradació de diversos biomaterials i macromolècules, tals com membranes, proteïnes, polisacàrids i complexos lipídics.

1.1. Estructura i funció

Els lisosomes són molt heterogenis en mida (100-500nm), en morfologia i distribució (Mellman 1989) i conjuntament constitueixen prop d'un 5% del volum cel·lular. Contenen més de 60 tipus diferents d'hidrolases solubles, cada una de les quals és responsable de la degradació d'un substrat específic. A més a més, els lisosomes estan delimitats per una única membrana que també disposa de proteïnes (proteïnes lisosomals integrals de membrana; LMPs), de les quals n'hi ha unes 25 en mamífers i tenen diverses funcions com la de transportar partícules entre el lumen i el citosol, com per exemple la bomba de protons (Arai *et al.* 1993) encarregada de mantenir el pH àcid (al voltant de 5) de l'interior del lisosoma, per així garantir un ambient propici per l'actuació de les hidrolases, la funció de les quals requereix d'un lumen àcid.

Els lisosomes són responsables de la internalització, transport, reciclatge i degradació de material endogen i exogen (De Duve i Wattiaux 1966). Aquesta degradació lisosomal és crítica en molts processos fisiològics, incloent: el recanvi de proteïnes cel·lulars, la destrucció de proteïnes anormals, el reciclatge dels receptors de superfície, l'alliberació dels nutrients endocitats, la inactivació d'organismes patogènics, l'autofàgia, la mort cel·lular per transducció del senyal, la pigmentació de la pell i la remodelació òssia. També tenen un paper important en l'homeòstasi d'ions metàl·lics i la reparació de la membrana plasmàtica (Boustany 2013; Mullins i Bonifacino 2001; Saftig i Klumperman 2009).

1.2. Digestió lisosomal

El procés digestiu lisosomal és dinàmic ja que implica nombroses etapes de maduració lisosomal, juntament amb la digestió de proteïnes i partícules exògenes, així com també de proteïnes endògenes i orgànuls cel·lulars (Figura 1).

Les proteïnes exògenes són dirigides al lisosoma a través de l'endocitosi mediada per receptor o la pinocitosis. I les partícules exògenes hi arriben per fagocitosi; aquests tres processos es coneixen com heterofàgia. En canvi, les proteïnes endògenes i els orgànuls cel·lulars hi arriben a partir de la microautofàgia i la macrofàgia, respectivament.

El sistema lisosomal/vacuolar és un sistema digestiu heterogeni, que també inclou estructures que són majoritàriament mancades d'hidrolases, com per exemple, els endosomes primerencs que contenen el material provinent dels tres mecanismes d'heterofàgia. En l'altre extrem hi ha els cossos residuals, que són els productes finals del procés digestiu complet, tant de l'heterofàgia com l'autofàgia. Entre aquests dos extrems es troben: els lisosomes primaris que encara no han participat en cap procés proteolític; les vacuoles autofàgiques primerenques que podrien contenir orgànuls intracel·lulars; els endosomes intermedis i tardans; les vacuoles pinocítiques o fagocítiques (vacuoles heterofàgiques) i els cossos multivesiculars que són les vacuoles de transició entre les vacuoles heterofàgiques i els lisosomes amb capacitat digestiva.

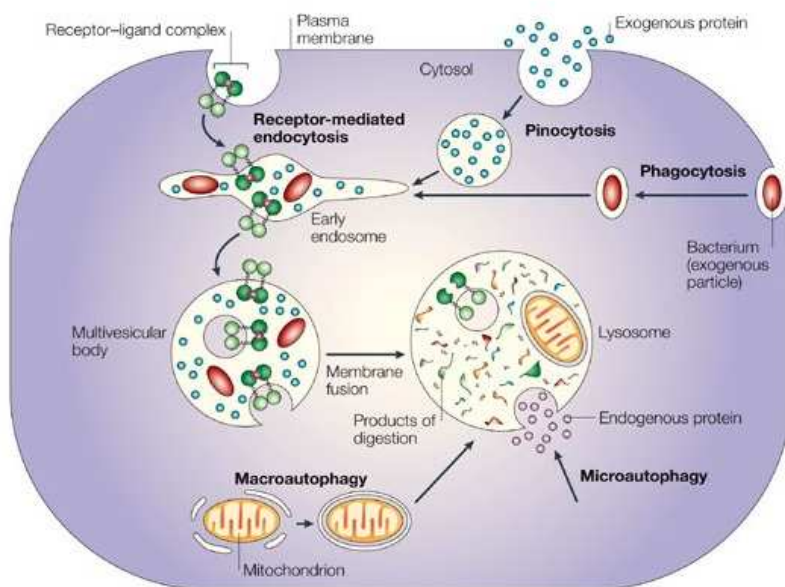


Figura 1. El procés de digestió lisosomal. Es mostra la digestió a partir del material exogen com de l'endogen i la implicació del sistema lisosomal. Figura extreta de Ciechanover 2005.

1.3. Enzims lisomals

Els enzims lisomals es sintetitzen en la seva forma nativa en el reticle endoplasmàtic rugós (RER), i gràcies al pèptid senyal (d'uns 20-25 aminoàcids a nivell N-terminal) es poden translocar al lumen del reticle endoplasmàtic (ER), a on se'ls escindeix. Després, a l'aparell de Golgi (GA) seran glicosilats. A partir d'aquest punt, la majoria de glicoproteïnes adquireixen una manosa-6-fosfat (M6P). Aquesta serà necessària per poder ser reconegudes i endocitades pel receptor de manosa-6-fosfat (M6PR) que es troba a la membrana lisosomal (Figura 2A).

Però, no tots els enzims lisosòmics arriben al lisosoma mitjançant la M6P. En el cas de la glucocerebrosidasa (GlcCerasa o GBA1), enzim deficient en la malaltia de Gaucher (GD), la proteïna lisosomal integral de membrana tipus 2 (LIMP-2) s'uneix amb aquest enzim en l'ER (Figura 2B). Així, mutacions en LIMP-2 produeixen una reducció de l'activitat glucocerebrosidasa (Blanz *et al.* 2009). Però la deficiència en

LIMP-2 no produeix la GD, sinó que produeix la síndrome d'insuficiència renal-mioclonia activa (Andermann *et al.* 1986). Els individus amb AMRF, a diferència dels pacients Gaucher, no presenten acumulació de Glucosilceramida (GlcCer) en els macròfags ni nivells elevats dels marcadors plasmàtics de la GD (com la quitotriosidasa). D'altra banda, en individus amb AMRF, l'activitat de l'enzim GBA1 en fibroblasts és casi absent i, en canvi, en cèl·lules sanguínies s'observen quantitats considerables d'activitat GBA1 residual (Gaspar *et al.* 2014).

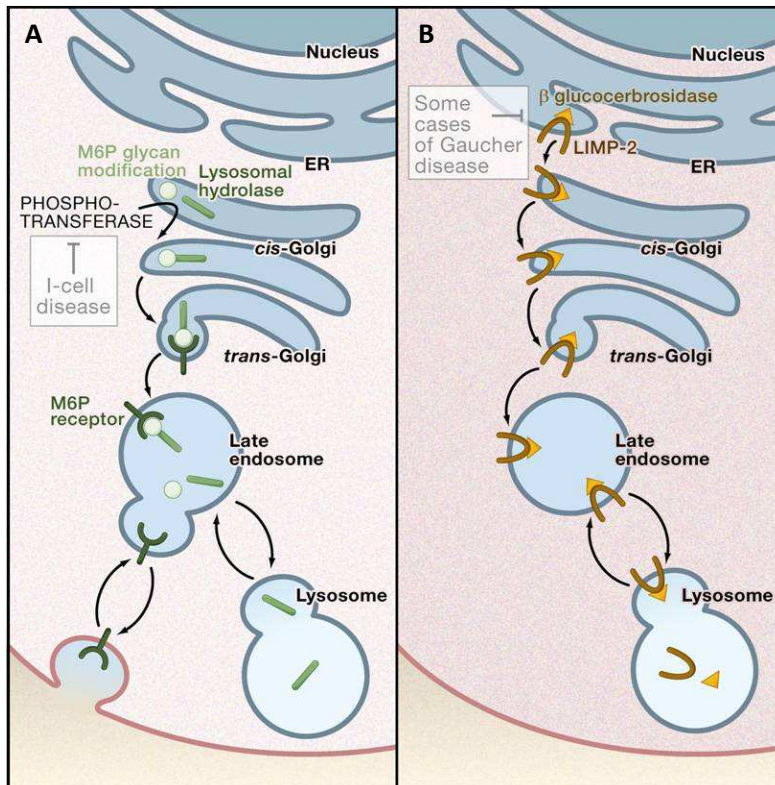


Figura 2. Diferències de l'arribada dels enzims lisosomals al lisosoma. A) mitjançant la M6P com ho fan la majoria d'hidrolases lisosomals. B) mitjançant la LIMP-2, com ho fa l'enzim GBA1. Figura extreta de Reczek *et al.* 2007.

2. LES MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD) són un grup de més de 50 trastorns metabòlics innats rars (revisat a Boustany 2013) causades per defectes en múltiples aspectes de la funció lisosomal, normalment per mutacions en gens que codifiquen enzims del catabolisme de macromolècules. Així, el substrat de l'enzim defectuós s'acumula en els lisosomes produint disfuncions de les cèl·lules que els contenen i, manifestacions clíniques progressives. Però també, hi ha altres formes de disfunció lisosomal que poden conduir a l'emmagatzematge de substrat, tals com: defectes en les proteïnes no enzimàtiques (proteïnes activadores o proteïnes integrals de la membrana lisosomal), errors en el processament post-traduccional dels enzims lisosomals, o en el tràfic/transport enzimàtic (Winchester *et al.* 2000).

2.1. Aspectes genètics i prevalença de les LSD

La majoria de les LSD són trastorns monogènics, amb herència autosòmica recessiva. Es consideren trastorns rars degut a la seva baixa prevalença, però, col·lectivament presenten una prevalença de 1 en 5.000-8.000 naixements (revisat a Ortolano *et al.* 2014).

2.2. Fenotips clínics de les LSD

L'edat d'aparició i la simptomatologia varia en cada LSD, depenent del grau de disfunció de la proteïna afectada, el tipus de macromolècula emmagatzemada, el tipus de cèl·lules on es produeix l'emmagatzematge i dels antecedents genètics del pacient (revisat a Platt *et al.* 2012). Així trobem des de símptomes lleus a greus afectant a un gran nombre de teixits. Però, malgrat l'extensa heterogeneïtat clínica alguns d'ells són comuns en la majoria de LSD, com visceromegalia, dismorfologia i afectació en el sistema nerviós central (SNC) i os.

2.3. Classificació de les LSD

Les LSD es poden classificar segons la proteïna defectiva o segons el substrat acumulat (revisat a Futerman i van Meer 2004). En la taula 1 es resumeixen les principals LSD. El grup més prevalent són les esfingolipidosis que es caracteritzen per acumular esfingolípid. Dins d'aquest grup hi trobem la malaltia de Gaucher.

Taula 1. Classificació de les principals LSD. Adaptada de Futerman i van Meer 2004b.

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 -Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidasa A i B	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (deficiència d'activador de GM2)	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2
Mucopolisacàridosis		
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)	Arisulfatasa B	Dermatà sulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Heparà sulfat, dermatà sulfat i condroití -4 i -6-sulfats
MPS IX	Hialuronidasa	Hialuronà
Oligosacàridosis 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		
Cistinosis	Cistinosisina	Cistina
Malaltia de Danon	LAMP2	Restes citoplasmàtiques i glicogen
Malaltia de Salla i malaltia infantil d'acumul d'àcid siàlic	Sialina	Àcid siàlic
Mucolipidosis (ML) IV	Mucolipina-1	Lípids i mucopolisacàrids àcids
Niemann-Pick C (NPC)	NPC 1 i 2	Colesterol i esfingolípids
Ceroide Lipofuscinosi neuronal		
NCL1	Palmitoilproteïnatioesterasa	Tioèsters lipidats
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-fosfoferasa	Oligosacàrids, mucopolisacàrids i lípids
Deficiència múltiple de sulfatases	SUMF1	Sulfàtids
Picnodisotosi	Catepsina K	Proteïnes de l'os, incloent fibres de col·lagen

2.4. Esfingolipidosis

Són les LSD més freqüents i estan causades per la disfunció d'algun dels enzims de la ruta de degradació dels esfingolípids. Els esfingolípids es degraden, normalment, dins dels lisosomes de les cèl·lules fagocitàries, especialment els macròfags del sistema reticuloendotelial, localitzats principalment en el fetge, melsa i medul·la òssia. Per tant, una degradació deficient implica l'acumulació a dins del lisosoma d'algun dels metabòlits intermedis. Així, quan la disfunció enzimàtica es produeix en la ruta de degradació dels glicoesfingolípids (GSL) en resulten les glicoesfingolipidosis, de les quals la GD n'és la més freqüent.

2.4.1. Metabolisme dels esfingolípids

La ceramida, l'esfingolípida més simple, ocupa una posició central en el metabolisme dels esfingolípids (Figura 3). La síntesi de ceramida es dona en el reticle endoplasmàtic (ER) i pot ser tant *de novo*, a partir de serina i palmitat, com a partir de la degradació d'altres esfingolípids (dels GSL o l'esfingomielina). La ceramida pot ser fosforilada per la ceramida cinasa, glicosilada per la glucosil o galactosil ceramida sintasa o, a través de la esfingomielina (SM) sintasa, es pot transformar a esfingomielina. La ceramida pot ser degradada per ceramidases i donar lloc a l'esfingosina, que pot ser reincorporada cap a ceramida o pot ser fosforilada per una cinasa, donant lloc a l'esfingosina-1-fosfat (S1P), que es podrà desfosforilar i regenerar l'esfingosina o, alternativament, la S1P liasa pot irreversiblement formar palmitaldehid i etanolamina fosfat, que es poden reduir cap a palmitat i subseqüentment reincorporar-se en el metabolisme dels esfingolípids (revisat a Hannun i Obeid 2008).

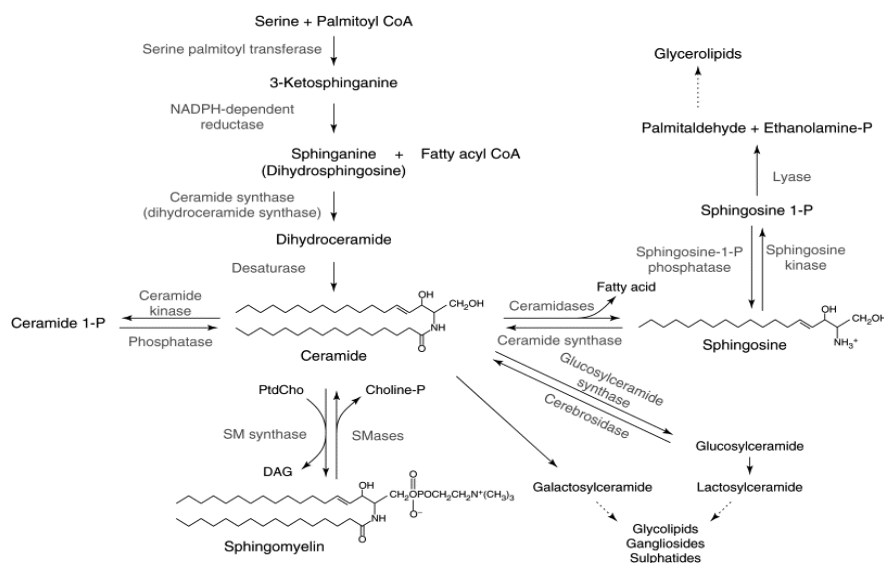


Figura 3. Metabolisme dels esfingolípids. DAG = diacilglicerol, SMases = esfingomielinas, PtdCho = fosfatidilcolina. Figura extreta de Hannun i Luberto 2000.

2.4.2. Propietats dels esfingolípidis

Els esfingolípidis són molècules amfipàtiques (amb propietats hidrofòbiques i hidrofíliques) que formen part dels elements estructurals de les membranes biològiques eucariotes (Maceyka *et al.* 2005). En particular, de les del RE (on es dona la síntesi de *novo* de la ceramida), de les de l'aparell de Golgi (on la ceramida es converteix en glicoesfingolípids) i de la membrana plasmàtica (on s'integren en el metabolisme de la ceramida amb altres vies metabòliques d'altres lípids). A part de la seva funció estructural, en les últimes dècades s'ha evidenciat la gran importància que tenen per a la supervivència i el funcionament cel·lular, ja que juguen un paper important en la regulació i el creixement cel·lular, apoptosi, senescència, adhesió, migració, inflamació, angiogènesi i el trànsit intracel·lular (Hannun i Obeid 2008).

2.4.3. Estructura dels esfingolípidis

Els esfingolípidis deriven de l'aminoalcohol esfingosina (Figura 4, en blau) que s'uneix a un àcid gras de cadena llarga (Figura 4, en vermell), mitjançant un enllaç amida, i en resulta la ceramida (l'esfingolípid més simple). Seguidament, per l'addició d'un carbohidrat (per exemple: glucosa o galactosa, Figura 4, en gris) es formen els GSL. La part lipídica d'aquests GSL actua com ancoratge a la membrana i la part del carbohidrat està a la part extracel·lular. Si en lloc d'un carbohidrat s'afegeix una fosforilcolina (Figura 4, en verd) provinent de la fosfatidilcolina (PtdCho) en resulta l'esfingomièlina.

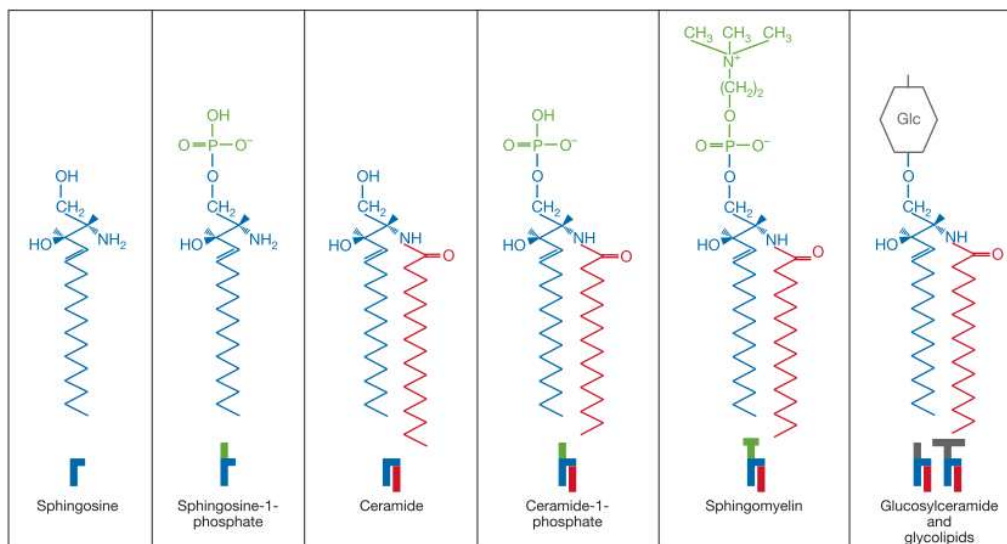


Figura 4. Estructura d'alguns esfingolípidis d'estructura senzilla, ja que es formen per la base esfingosina (en blau) amb un únic tipus d'àcid gras, en aquest cas l'àcid palmític (en vermell). A més, també, es mostra un glicoesfingolípids, la glucosilceramida (GlcCer). Però de l'addició seqüencial de residus de carbohidrats en resultaria la formació de més de 500 GSL diferents. En verd es mostra el grup fosfat (de la S1P i de la ceramida-1-fosfat) i la fosforilcolina (de l'esfingomièlina). Figura extreta de Futerman i Hannun 2004.

3. LA MALALTIA DE GAUCHER

La malaltia de Gaucher (GD, de l'anglès *Gaucher disease*) és una glicoesfingolipidosi i és la LSD amb més incidència. Es caracteritza per la disfunció de l'enzim glucocerebrosidasa o β -glucosidasa àcida (GBA1 o GlcCerasa; E.C. 3.2.1.45) (Brady *et al.* 1966) que resulta en l'acumulació progressiva del substrat glucosilceramida (GlcCer) en els lisosomes dels macròfags (formant les cèl·lules Gaucher). Els símptomes clínics principals de la malaltia són hepatosplenomegàlia, anèmia, problemes ossis i en alguns casos afectació neuronopàtica.

3.1. Història i antecedents de la GD

La GD va ser mencionada per primera vegada l'any 1882 pel metge francès Philippe Gaucher en la seva tesi doctoral. S'hi descriu un cas d'un pacient de 32 anys amb la melsa engrandida perquè estava plena d'unes "cèl·lules peculiars" amb nucli gran. No va ser fins al 1905 que Brill va emprar el terme de malaltia de Gaucher.

Després de descriure les característiques clíniques de la GD, els investigadors es van centrar en descobrir les bases bioquímiques d'aquest trastorn metabòlic. Així, entre 1916 i 1934 es va identificar que el material acumulat era un esfingolípide, i més tard es va detallar que era la GlcCer, un tipus de glicoesfingolípide. L'any 1965, Roscoe O. Brady i col·laboradors van descobrir l'enzim β -glucosidasa (GBA1), que en individus sans hidrolitza la GlcCer i que en pacients Gaucher és deficient. Aquesta descoberta va servir per confirmar el diagnòstic clínic basant-se en l'anàlisi de l'activitat residual de l'enzim GBA1. Inicialment, aquesta tècnica es va utilitzar en leucòcits perifèrics i més tard en cultius de cèl·lules del fluid amniòtic, per tal de realitzar el diagnòstic prenatal (Schneider *et al.* 1972). El 1968 es va descriure la localització lisosòmica de la GBA1 (Weinreb *et al.* 1968) i el seu activador va ser identificat el 1971 per O'Brien, però no va ser fins el 1988 que el mateix autor li va donar com a nom Saposina C (O'Brien *et al.* 1988).

A partir dels anys 90 es van començar a desenvolupar teràpies per a la GD tal com es descriuen a l'apartat 3.10.

3.2. Prevalença

Tot i que la GD està considerada una malaltia poc freqüent/minoritària/orfe degut a la seva baixa prevalença en la població mundial (1 individu de cada 60.000 habitants aproximadament) (Meikle 1999), en la població jueva asquenasa la prevalença augmenta considerablement (1 individu de cada 400-850 habitants) per efecte de l'endogàmia (Beutler *et al.* 1993). Els jueus asquenasites són els descendents de les comunitats jueves que durant l'edat mitjana es 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.

També, existeixen estudis de la prevalença de la malaltia en diferents països europeus. Per exemple, en la població holandesa de 15 milions d'habitants s'han descrit uns 200 casos (Beutler i Grabowski 2001). Altres països europeus on s'han trobat un nombre de pacients considerable són França (Germain *et al.* 1998), Alemanya (le Coutre *et al.* 1997), República Txeca (Hodanová *et al.* 1999), Espanya (Cormand *et al.* 1995, 1998) i Portugal (Amaral *et al.* 1996).

3.3. Clínica

A causa de la gran heterogeneïtat clínica, la malaltia es classifica clàssicament en 3 subtipus: tipus 1 (GD1), tipus 2 (GD2) i tipus 3 (GD3), en base a l'edat d'aparició dels símptomes i si hi ha o no afectació neuronopàtica (Beutler i Grabowski 2001). Actualment, alguns autors aposten per classificar la GD com un ampli espectre fenotípic, en que hi podem trobar categories intermèdies i on la distinció més rellevant és la presència o no d'afectació neurològica (Goker-Alpan *et al.* 2003).

A) GD Tipus 1 (GD1; forma adulta, crònica o no neuronopàtica) OMIM # 230800:

És la forma més comuna de la malaltia (aproximadament la presenten un 90% dels pacients) i es caracteritza per l'absència de símptomes neurològics (a excepció dels individus que presenten Parkinson; Caixa 1). És la que té una clínica menys severa, per tant, la supervivència és relativament prolongada. S'ha descrit com a forma adulta perquè hi ha malalts que es diagnostiquen a la vuitena dècada de vida (Berrebi *et al.* 1984), o altres són asimptomàtics i només se'ls ha detectat de forma accidental o mitjançant estudis familiars. No obstant, hi ha alguns símptomes que poden aparèixer durant la infància o fins i tot al naixement.

Les manifestacions més característiques són:

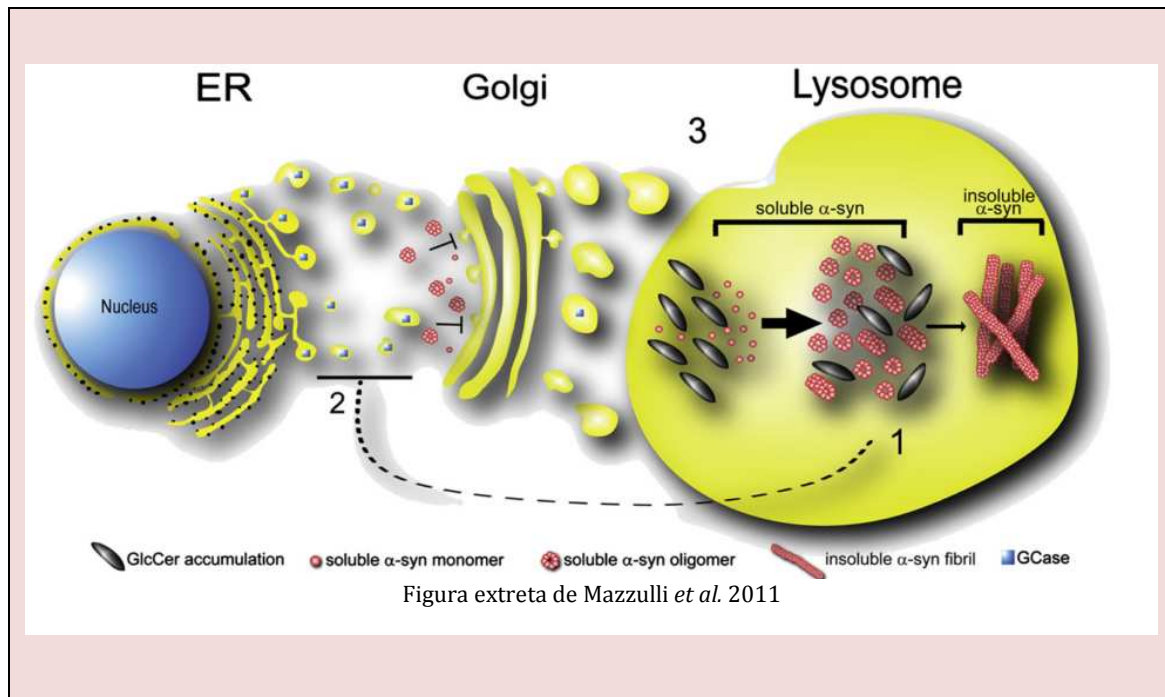
- **Viscerals:** esplenomegàlia (augment patològic de la melsa), present en el 90% dels pacients i hepatomegàlia (augment patològic del fetge), present entre un 70-80% dels pacients. Les cèl·lules Gaucher només expliquen part de l'augment visceral, ja que l'excés de GlcCer representa menys del 2% del pes addicional de l'òrgan. Això és un exemple de les conseqüències inflamatòries del defecte bioquímic i de la complexitat patològica de les malalties lisosomals (Cox 2001).
- **Hematològiques:** trombocitopènia, anèmia ferropènica, leucopènia.
- **Esquelètiques:** en un 90% dels casos (veure apartat 3.12).

- Cal mencionar que en l'actualitat s'ha trobat alguns pacients que manifesten símptomes extrapiramidals, semblants al parkinsonisme durant l'edat adulta (Caixa 1).

CAIXA 1: GD i Parkinson (PD)

Molts símptomes patològics i neurològics que mostren els pacients GD1 són característics de la malaltia de Parkinson (PD) com: la formació dels cossos de Lewy, la pèrdua de neurones dopaminèrgiques, bradicinèsia (o lentitud en el moviment), rigidesa i tremolors en repòs (Tayebi *et al.* 2001). De fet, el parkinsonisme s'ha detectant en alguns pacients Gaucher i portadors, la qual cosa ha suggerit que hi ha una associació entre els dos trastorns (Westbroek *et al.* 2011). En un treball multicèntric, que analitza pacients Gaucher de diferent origen geogràfic, els autors defensen que probablement presentar mutacions en el gen *GBA1* proporciona susceptibilitat a desenvolupar la PD, però que l'associació que es dona entre les mutacions en el gen *GBA1* i la PD no és exclusiva d'un grup ètnic ni específica del tipus de mutació en *GBA1* (Sidransky *et al.* 2009). De fet, de tots els factors que predisposen a la PD, la presència de mutacions en el *GBA1* és el més important (Mata *et al.* 2008; Mitsui *et al.* 2009; Sidransky *et al.* 2009).

Es coneix que la PD és una sinucleinopatia i, com a tal, es caracteritza per l'acumulació de α -sinucleïna (α -syn), una petita proteïna específica neuronal implicada en la funció sinàptica (Chandra *et al.* 2005), dins als cossos de Lewy del sistema nerviós central en forma de fibril·les d'amiloide. La formació d'aquestes fibril·les és un esdeveniment important en la patologia de Parkinson. D'altra banda, hi ha evidències que indiquen que l'oligòmer soluble α -syn (intermedi en la formació de les fibril·les) pot ser citotòxic (Kayed *et al.* 2003; Volles i Lansbury 2003). Estudis recents indiquen que l'acumulació de GlcCer en neurones, a causa de la deficient activitat de l'enzim GBA1 en la GD, promou la formació dels oligòmers solubles d' α -syn i la seva estabilitat. Aquests oligòmers impedeixen la proteostasi (degradació de proteïnes lisosomals) i amb el temps es converteixen en fibril·les amiloides (indicat amb el número 1 a la figura de més avall). D'altra banda, l'acumulació d'aquests oligòmers d' α -syn bloqueja el transport de l'enzim GBA1 entre l'ER-Golgi (indicat amb el número 2 a la figura de més avall). Això produeix una disminució de GBA1 al lisosoma i amplifica encara més l'acumulació de GlcCer en aquest orgànul, que continua incrementant la formació i l'estabilitat dels oligòmers tòxics solubles d' α -syn (indicat amb número 3 a la figura de més avall). Això dona com a resultat un cicle patogènic amb una augment de la inhibició del transport de l'enzim GBA1 entre l'ER-Golgi i l'estabilització dels oligòmers solubles d' α -syn. Aquest fet fa que s'acabin amplificant els símptomes tant de la PD com de la GD (Mazzulli *et al.* 2011).



B) GD Tipus 2 (GD2; forma infantil; neuronopàtica aguda) OMIM # 230900:

És la forma més severa de la malaltia, que es caracteritza per l'aparició molt prematura i la ràpida progressió de l'afectació neurològica. Aquesta forma, també coneguda com a forma infantil, és molt rara, amb una freqüència de menys d'1 naixement de cada 100.000. Les manifestacions solen aparèixer abans dels 6 mesos d'edat i els malalts solen morir als 2 primers anys de vida. L'afectació neuronal és predominant i normalment sol ser diagnosticada amb un deteriorament psicomotor greu. A més a més, els pacients presenten també manifestacions visceral, iguals que els GD1.

C) GD tipus 3 (GD3; forma juvenil; neuronopàtica subaguda) OMIM # 231000:

És una forma rara, però no tant com la GD2, amb una freqüència de menys d'1 naixement de cada 50.000 i, els pacients manifesten la clínica més tard (a la primera dècada de vida) amb una afectació neurològica menor que els pacients de tipus 2. Es caracteritza per l'inici precoç de la discapacitat visceral i, més tard, l'aparició dels símptomes del sistema nerviós central. Els malalts es solen morir a l'adolescència o més tard. La forma prototípica d'aquest tipus és la que s'ha vist en la regió de Norbotten (Suècia), amb un curs de la malaltia molt sever, amb demència i atàxia (Erikson 1986). Una clínica molt particular que s'ha trobat en pacients d'aquest tipus és l'afectació cardiovascular amb esclerosi vascular i oclusió aòrtica severa (Abrahamov *et al.* 1995, Chabás *et al.* 1995), associada a la mutació D409H.

CAIXA 2: Les cèl·lules Gaucher

Les cèl·lules Gaucher són macròfags gegants (Boven *et al.* 2004), que contenen lisosomes engrandits a causa de l'acumulació de GlcCer, el substrat no degradat. Aquestes cèl·lules produeixen danys als teixits que les contenen i tenen incrementada l'activitat de varies hidrolases àcides lisosomals, la fosfatasa àcida fosfat resistent (TRAP), l'enzim convertidor d'angiotensina (ACE) i la lisozima (Aerts i Hollak 1997). D'altra banda, una de les característiques més representatives de les cèl·lules Gaucher és la capacitat d'alliberar l'enzim quitotriosidasa, del qual se n'han detectat augments de fins a 10.000 vegades en circulació, raó per la que ha resultat ser un bon biomarcador (Hollak *et al.* 1994). A més, l'activitat en plasma de la quitotriosidasa es restaura a nivells normals després de la teràpia de substitució enzimàtica (ERT) (Aerts i Hollak 1997). Les cèl·lules Gaucher són també una font directa de nombroses citocines (també denominades citoquines), com ara la quimiocina CCL18 que és un quimioatracent pels limfòcits T/B i les cèl·lules dendrítiques. Per aquesta raó, pot jugar un paper important en la presentació d'antigen, el primer pas en la iniciació de la resposta immunitària adaptativa (Adema *et al.* 1997; Hieshima *et al.* 1997). La CCL18 també es coneix com a PARC (de l'anglès: *pulmonary and activation regulated chemokine*) i, igual que la quitotriosidasa, s'ha suggerit com a bon biomarcador de la GD, adient per avaluar l'eficàcia del tractament (Boot *et al.* 2004) i molt útil en pacients amb activitat quitotriosidasa deficient (Boot *et al.* 1998).

3.4. Bioquímica

3.4.1. La glucocerebrosidasa, la glucosilceramida i la glucoesfingosina

La glucocerebrosidasa (β -glucosidasa àcida, glucosilceramidasa; EC 3.2.1.45), abreviada com a GlcCerasa o GBA1, és una hidrolasa lisosomal que catalitza la formació de ceramida i glucosa a partir de la hidròlisi de la glucosilceramida (GlcCer). Quan l'enzim no funciona correctament, l'excés d'aquest substrat s'acumula en els lisosomes dels macròfags i forma les cèl·lules Gaucher, que afecten principalment a la melsa, fetge i medul·la òssia. D'altra banda, també poden afectar als pulmons, ganglis limfàtics i en major o menor grau, al sistema nerviós central.

De manera paral·lela, la GBA1 també hidrolitza la glucoesfingosina (GlcPsy) en glucosa i esfingosina (Figura 5). S'ha observat que en els pacients Gaucher, la GlcPsy també s'acumula en els lisosomes de les cèl·lules reticuloendotelials. Es van analitzar diversos teixits de pacients Gaucher que presentaven diferent subtipus clínic i es va observar que els nivells de la GlcPsy eren elevats independentment de l'edat, severitat i genotip. Però, se n'han detectat nivells molt alts en el cervell de pacients GD2 i GD3 (formes neuronopàtiques) i, en menor quantitat, en els GD1 (Nilsson i Svennerholm 1982). Sembla doncs que, la GlcPsy podria contribuir a

l'afectació del sistema nerviós en els pacients GD2 i GD3 (Orvisky *et al.* 2002; Schueler *et al.* 2003). A més, es va comprovar que en el cervell dels ratolins *knockouts*, els quals presentaven letalitat neonatal (Tybulewicz *et al.* 1992), hi havia grans quantitats d'aquest compost. De la mateixa manera que en pacients GD2, la GlcPsy començava a acumular-se a l'inici de la gestació (Orvisky *et al.* 2000). D'altra banda, estudis més recents han revelat que la GlcPsy també podria estar implicada en el bon funcionament dels osteoblasts (veure apartat 4) ja que, mitjançant la utilització d'un model de ratolí, s'ha suggerit que quan s'hidrolitza a esfingosina, aquesta inhibeix la proteïna cinasa C (PKC), la qual és important per la

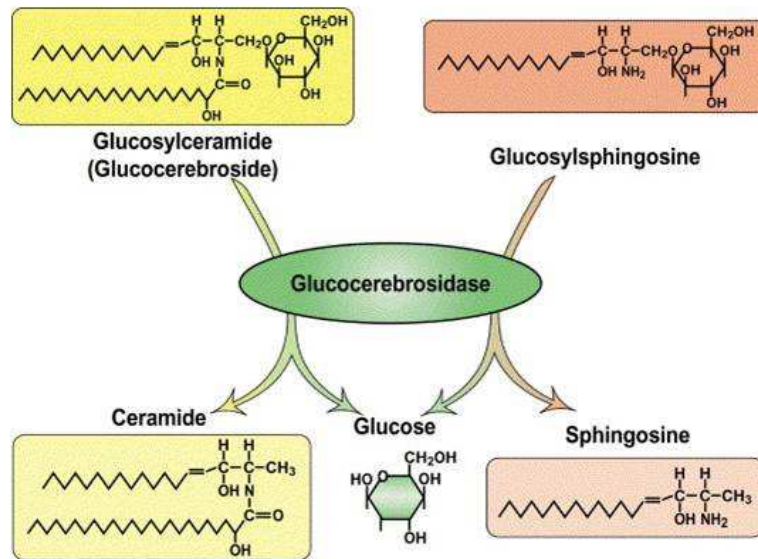


Figura 5. La glucocerebrosidasa (GlcCer) és capaç d'hidrolitzar la glucosilceramida a glucosa i ceramida, però, a més, també pot hidrolitzar un substrat alternatiu, la glucosilesfingosina, en glucosa i esfingosina (Ellen Sidransky 2004).

correcta diferenciació i proliferació dels osteoblasts (Mistry *et al.* 2010, 2014). Els mateixos autors també han argumentat que la ceramidasa àcida (enzim que està en el lisosoma) transforma part de la GlcCer a GlcPsy, la qual després, en el citosol, pot ser hidrolitzada a esfingosina per l'acció de la GBA2 (Mistry *et al.* 2014).

Altres estudis han contemplat la possibilitat de que la GlcPsy estigui implicada en la formació de les cèl·lules Gaucher. Així, igual que l'esfingosina, podria induir la formació de cèl·lules multinucleades gegants a través de la inhibició de la citocinesi (Kozutsumi *et al.* 2002).

3.4.2. La proteïna activadora: la saposina C

La saposina C (Sap C) és una proteïna de 9kDa que interacciona amb la membrana lisosomal, mitjançant els fosfolípids aniònics (unió depenent de pH) (Kolter i Sandhoff 2005). De fet, la Sap C és una de les 4 saposines que resulten de l'escissió proteolítica del precursor prosaposina de 70kDa. Les quatre saposines promouen la hidròlisi dels glicolípid per diversos enzims lisosomals (Vaccaro *et al.* 1999). Encara que és poc freqüent, la deficiència de Sap C per si sola pot produir símptomes similars a la GD (revisat a Tamargo *et al.* 2012), fet que demostra que té un paper essencial en el metabolisme de la GlcCer.

La Sap C participa en la hidròlisi de la GlcCer mitjançant l'activació de l'enzim GBA1 a través d'una associació directa amb aquest (Alattia *et al.* 2006, 2007). Aquesta activació de l'enzim GBA1 s'obté a partir de l'alteració de les propietats de la bicapa lipídica (model solubilitzant), o mitjançant l'augment del reclutament de la GBA1 a la bicapa lipídica i facilitant així, l'accés al seu substrat (model liftasa) (Figura 6). Recents estudis (Gruschus *et al.* 2015) suggereixen que la Sap C podria facilitar la transició de l'enzim GBA1 d'una forma dimèrica (inactiva) a una de monomèrica (activa). A més, respecte a l'associació entre la PD i la GD (Caixa 1), recentment s'ha determinat que l'enzim GBA1 s'uneix amb l' α -syn en el lisosoma, quedant així inhibida l'activitat GBA1 (Yap *et al.* 2011, 2013). La Sap C pot rescatar completament aquesta activitat ja que competeix amb l' α -syn pel mateix lloc d'unió a GBA1. Així, quan la Sap C funciona correctament, desplaça físicament l' α -syn que estava unida a GBA1 (Yap *et al.* 2013).

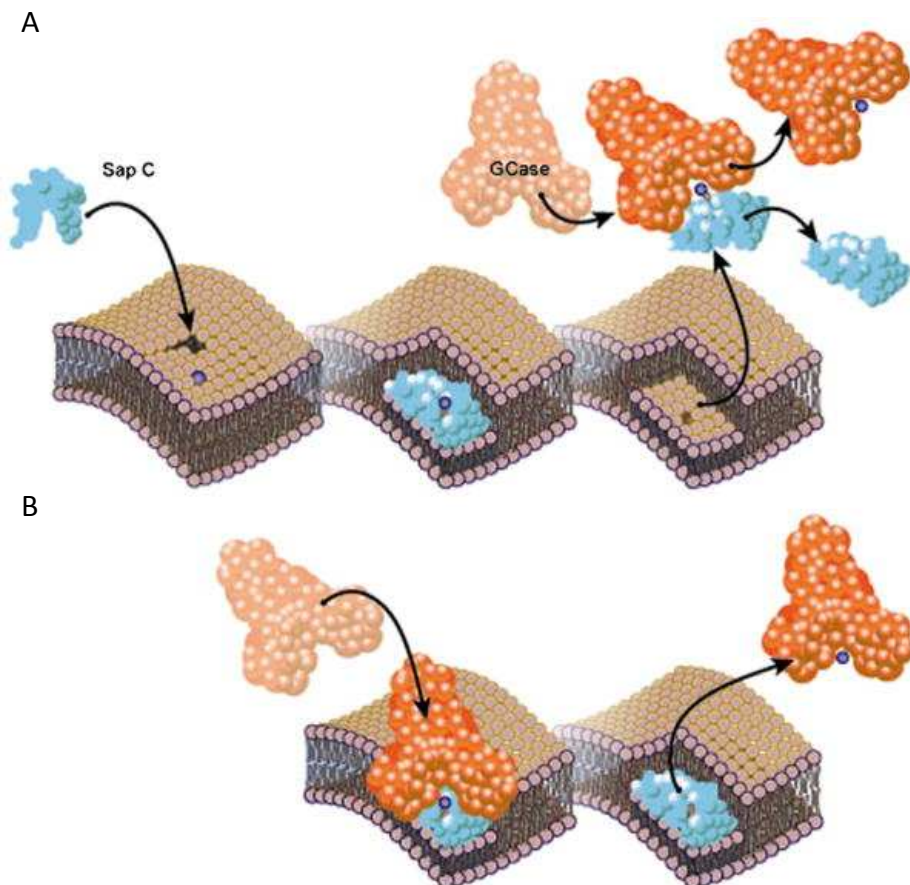


Figura 6. Mecanismes proposats entre l'enzim GBA1 (en taronja clar- enzim inactiu; en taronja intens- enzim actiu) i l'activador Sap C (en blau). La Sap C s'uneix als fosfolípids de la bicapa lipídica lisosomal i permet que el substrat GlcCer (boletes de color lila) quedi exposat per la seva hidròlisi. A) Model solubilitzant: la Sap C quan s'uneix als lípids de membrana extreu la GlcCer de la bicapa en un complex soluble i després es dissocia de la membrana per formar un complex amb la GBA1, la qual li exposarà la GlcCer perquè sigui així hidrolitzada directament. B) Model "liftasa": la Sap C s'associa de forma estable a la membrana i exposa la GlcCer per poder ser hidrolitzada per l'enzim GBA1. Figura extreta de Tamargo *et al.* 2012.

3.5. Gen *GBA1*

El gen que codifica l'enzim GBA1 o GlcCerasa és el gen *GBA1* (MIM# 606463) localitzat en el cromosoma 1 en la banda q21 (Barneveld *et al.* 1983). La regió, de 85kb, que envolta el gen *GBA1* és particularment rica en gens: 7 gens i 2 pseudogens (Dou i Joseph 1996; Winfield *et al.* 1997), alguns dels quals encara no es coneix del tot la funció que realitzen. El gen *GBA1* conté 11 exons i 10 introns que abasten aproximadament 7,6kb de seqüència. A 16kb *downstream* (respecte a l'extrem 3' del gen *GBA1*) hi ha un pseudogèn (*GBAP*) altament homòleg (Horowitz *et al.* 1989) que té una longitud de 5,7kb amb la mateixa organització d'exons i d'introns que el gen funcional. Encara que existeixin diferències en la longitud dels dos gens, les quals s'expliquen bàsicament per la presència de varies insercions *Alu* en els introns del gen *GBA1*, hi ha un 96% d'identitat nucleotídica entre els dos. D'altra banda, hi ha dues delecions en els exons 4 i 9 del pseudogèn, de 5pb i 55pb respectivament, que no estan en *GBA1*. Per tant, la delecio més gran (55pb de l'exó 9) és de gran utilitat en el diagnòstic molecular. La presència d'aquest pseudogèn tan similar en el mateix locus fa que algunes mutacions causants de la GD s'expliquin per entrecreuaments entre *GBAP* i *GBA1* (Cormand *et al.* 2000; Eyal *et al.* 1990; Latham *et al.* 1990; Zimran *et al.* 1990).

3.5.1. cDNA del gen *GBA1*

La llargada del cDNA del gen *GBA1* és d'aproximadament 2kb i conté dos codons ATG que estan en pauta de lectura, situats en els exons 1 i 2. Els dos llocs són inici de traducció, produint dos polipèptids amb pèptids senyal de diferent mida. La proteïna sorgida utilitzant el primer ATG (NP_000148), situat al final de l'exó 1, conté un pèptid senyal de 39 residus amb la meitat amino-terminal hidrofílica. En canvi, el segon ATG, situat més a 3' (a la meitat de l'exó 2), dóna lloc a un pèptid senyal hidrofòbic de 19 residus (Sorge *et al.* 1987). El primer codó ATG (el més *upstream*, exó 1) s'utilitza preferencialment, i produeix de dues a tres vegades més proteïna que el segon ATG (exó 2).

3.5.2. Mutacions del gen *GBA1*

En l'actualitat hi ha enregistrades 429 mutacions del gen *GBA1* (Figura 7) en la base de dades *Human Gene Mutation Database* (HGMD® Professional 2015.1).

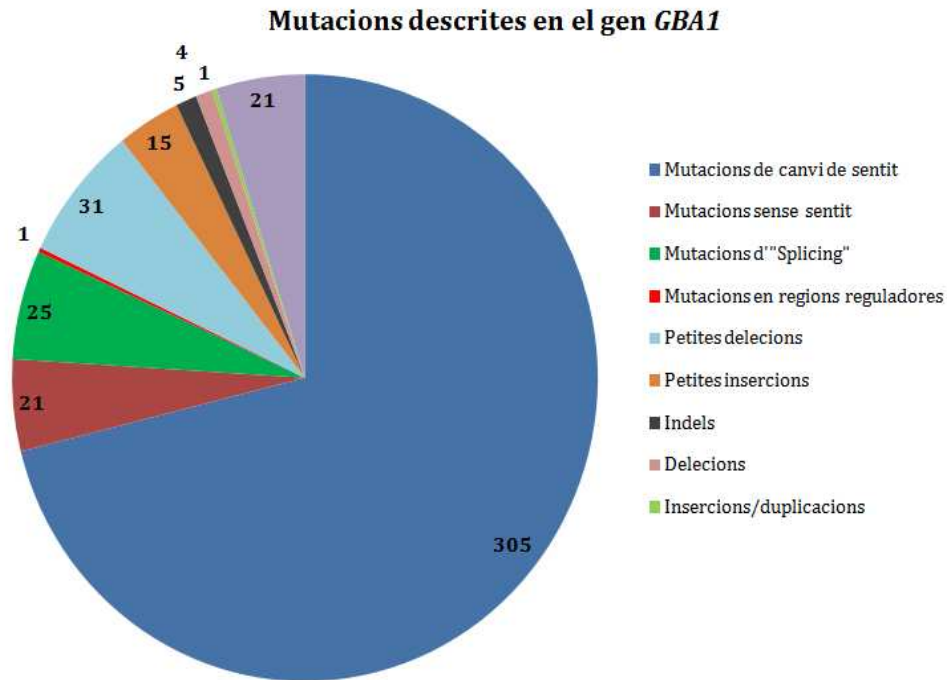


Figura 7. Les mutacions del gen *GBA1* agrupades per tipus. Les mutacions de canvi de sentit representen un 71% del total de mutacions. Individualment, cada un dels altres tipus de mutacions representa menys d'un 10% del total d'al·lels mutats.

Les dues primeres mutacions descrites van ser la c.1448T>C (L444P) i la c.1226A>G (N370S) a finals dels anys 80 (Tsuji i Suzuki 1987; Tsuji *et al.* 1988). Aquests dos al·lels són els més prevalents en la majoria de poblacions de pacients estudiades. Pel que fa a la població espanyola, també aquests dos són els que tenen major incidència (66,1% entre els dos), però també cal destacar la tercera mutació més freqüent, la c.1342G>C (D409H) (4,7%) (Cormand *et al.* 1998). Tanmateix, l'ètnia contribueix significativament a la distribució de mutacions. Així, per exemple, en els jueus asquenasites les mutacions més prevalents són: N370S (c.1226A>G), c.84dupG, R496H (c.1604G>A), L444P(c.1448T>C), IVS2+1G>A (c.115+1G>A), V394L (c.1297 G>T) (Beutler *et al.* 1995; Grabowski 1997; Koprivica *et al.* 2000; Sidransky *et al.* 2009).

Globalment, la mutació N370S que produeix la substitució Asn>Ser a l'aminoàcid 370, representa el 43,4% del total de mutacions i la L444P, que causa la substitució Leu>Pro a l'aminoàcid 444 de la proteïna, representa el 22,7%.

Els al·lels complexos es formen a partir de la recombinació entre regions homòlogues del gen i del pseudogèn. Només es troben en heterozigosi, ja que els pocs casos descrits en homozigosi han estat letals (Reissner *et al.* 1998; Sidransky *et al.* 1996; Strasberg *et al.* 1994). Els al·lels complexos més freqüents són el RecNcil i el RecTL.

CAIXA 3: Nomenclatura de les mutacions en el gen *GBA1*

Clàssicament es contava a partir de la posició del primer aminoàcid de l'enzim madur, per tant es considerava la p.Ala40 com el primer residu. Amb la nomenclatura recomanada per la *Human Genome Variation Society* (HGVS) la numeració comença a partir del primer ATG (és a dir se li ha de sumar a la nomenclatura clàssica els 39 aminoàcids del pèptid senyal). Per exemple, la mutació N370S (en la nomenclatura clàssica) correspon a la p.N409S (en la nomenclatura recomanada per la HGVS). Donat que en la literatura de la GD s'utilitza majoritàriament la nomenclatura clàssica, aquesta es la que es va utilitzar en el present treball en general (en alguns casos s'indiquen les dues nomenclatures).

3.6. La proteïna, l'enzim GlcCerasa (o *GBA1*)

La hidrolasa lisosomal *GBA1* necessita el pèptid senyal (de 19 o 39 aminoàcids) pel transport a través de la membrana del reticle endoplasmàtic rugós, des d'on passarà a l'aparell de Golgi i finalment al lisosoma. Durant el processament post-traduccional es produeix una escissió proteolítica, i el pèptid senyal s'allibera. La proteïna madura té 497 aminoàcids i un pes molecular de 56kDa, encara que el pes molecular de la forma glicosilada és de 65kDa.

Dvir i col·laboradors van establir l'estructura de l'enzim *GBA1*, mitjançant la cristal·lografia amb raigs X (Dvir *et al.* 2003). Això va evidenciar que el plegament de la proteïna genera 3 dominis, que s'indiquen en la Figura 8 en rosa, verd i blau.

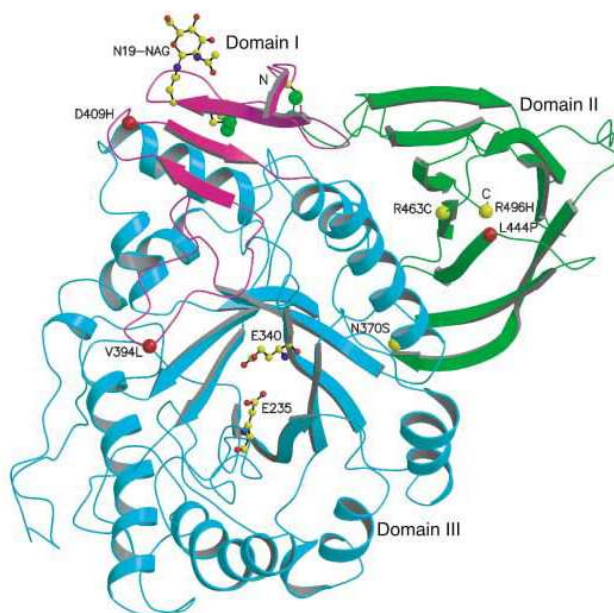


Figura 8: Estructura de raigs X de l'enzim *GBA1*. L'enzim s'estructura en tres dominis: el domini I (rosa), el domini II (verd) i el domini III (blau) que és el domini catalític on els aminoàcids E235 i E340 actuen com a catalitzador. S'indiquen les posicions d'algunes de les mutacions de la GD: en groc es marquen les mutacions lleus i en fúcsia les severes. Figura extreta de Dvir *et al.* 2003.

El domini I: s'estén del residu 1 al 27 i del 383 al 414 i es troba estructurat en 3 làmines β antiparal·leles i una perpendicular a elles on es situa el grup amino-terminal i un *loop*. Conté dos ponts disulfur i el primer lloc d'N-glicosilació (N19).

El domini II: està comprès entre els residus 30-75 i 431-497 i s'estructura en dues làmines β estretament associades que recorden a una immunoglobulina (Ig).

El domini III: va des del residu 76 al 381 i del 416 al 430. Conté el domini catalític, el qual es troba estructurat en 8 hèlixs α i 8 làmines β i tres cisteïnes lliures (Cys126, 248 i 342).

La proteïna té quatre llocs de glicosilació: N19, N59, N146 i N270 (p.Asn58, p.Asn98, p.Asn185 i p.Asn309 respectivament) (Berg-fussman *et al.* 1993) i els residus catalítics es troben a E235 i E340 (p.Glu274 i p.Glu379) (Dvir *et al.* 2003; Fabrega *et al.* 2000; Miao *et al.* 1994).

3.7. Correlacions genotip-fenotip

S'ha documentat que en pacients i inclús en germans que comparteixen el mateix genotip difereixen en les manifestacions clíniques, les complicacions i l'eficàcia en el tractament. Fins i tot s'han descrit casos en que alguns bessons idèntics presenten diferents graus de severitat de la malaltia (Lachmann *et al.* 2004). De la mateixa manera, pacients clínicament similars poden tenir genotips diferents. A més, la majoria de mutacions es troben en heterozigosi. Per tant, predir la gravetat de cada mutació no és fàcil.

Malgrat tot, s'han pogut establir algunes relacions genotip-fenotip, les quals permeten realitzar un pronòstic de la malaltia. Aquestes mutacions es poden classificar en lleus, greus o nul·les.

A) Mutacions lleus:

Són les mutacions que produeixen la GD1 i, per tant, absència d'afectació neurològica. La mutació per excel·lència és la N370S, ja que només s'ha trobat en GD1 (Beutler 1992; Grabowski 1997; Koprivica *et al.* 2000), per aquest motiu també se la coneix com "neuroprotectora" (Zimran *et al.* 2014). Això significa que la presència de la mutació N370S comporta que el pacient no desenvolupi la GD2 o la GD3 (tipus neuronopàtics). A més, quan es troba en homozigosi el pacient desenvolupa un fenotip més lleu, i l'edat d'aparició dels símptomes s'enredereix més que quan es presenta en heterozigosi composta amb una mutació severa, com per exemple la L444P (Theophilus *et al.* 1989; Zimran *et al.* 1989). Això fa que alguns homozigots per la N370S no s'arribin a diagnosticar (Beutler *et al.* 1993). També estan dins el grup de mutacions lleus la I402T o la V375L (Cormand *et al.* 1997).

B) Mutacions greus:

Són aquelles que produeixen un fenotip neuronopàtic, sempre i quan no estiguin en heterozigosis amb una mutació lleu. En aquest grup la L444P s'ha trobat en la GD2 o la GD3.

C) Mutacions nul·les:

Són aquelles que impedeixen que es formi l'enzim. La més comuna a la població mundial i molt prevalent a la població jueva asquenasa és la c.84dupG (84GG) i, en altres casos, com per exemple el de la població argentina, la més comuna és la *RecNcil* (Cormand et al. 1998). No s'han trobat mai en homozigosis ni tampoc en heterozigosi composta amb una altra mutació nul·la, fet que suggereix que són letals.

3.8. Components que intervenen en l'expressió fenotípica de la GD

Hi ha molts components que intervenen en l'expressió fenotípica de la GD. Les mutacions trobades en el gen *GBA1*, que produeixen una disfunció de l'enzim que codifica i la conseqüent acumulació de la GlcCer, són importants però no expliquen per complet el fenotip de la malaltia. A més, l'acumulació de GlcCer representa menys d'un 2% de la massa addicional dels òrgans afectats, cosa que suggereix que possiblement hi ha altres vies bioquímiques secundàries implicades i/o una resposta per part del sistema immunitari produint inflamació.

3.8.1. Altres gens que poden estar implicats en la GD

Com s'ha vist, el pseudogèn juga un paper important, ja que hi ha un nombre significatiu de pacients que presenten mutacions que s'expliquen per la recombinació dels dos gens (al·lels recombinants). Però, també s'ha de tenir en compte altres gens com el de la saposina C (proteïna activadora), els adjacents a la *GBA1*, i els implicats en altres etapes de la ruta metabòlica.

A més, cal tenir present que l'activitat β -glucosidasa és el resultat de l'activitat de tres enzims diferents: l'enzim lisosomal *GBA1*, el no-lisosmal *GBA2* (localitzat prop de la superfície de la cèl·lula o unit a la membrana de l'ER) i el citosòlic *GBA3* (Taula 2). Però el 90% de l'activitat β -glucosidasa en fibroblasts de persones sanes és deguda a l'enzim *GBA1*. Cadascun d'aquests tres enzims té la capacitat d'hidrolitzar substrats tant artificials com naturals, encara que en diferents graus (Dekker *et al.* 2011).

3.8.1.1. GBA2 i GBA3

S'ha observat que els pacients Gaucher (activitat GBA1 deficient) presenten una sobreexpressió de l'enzim GBA2. Sembla que aquest augment de l'activitat GBA2 és una mesura per tal d'intentar contrarestar l'acumulació de GlcCer produïda per la manca d'activitat de l'enzim GBA1 (Aureli *et al.* 2012). S'ha observat que el 85% de l'activitat β -glucosidasa en el cervell de ratolins WT correspon a la de l'enzim GBA2. En canvi, en leucòcits i fibroblasts l'activitat d'aquest enzim és d'un 40% i un 1%, respectivament. A més, en ratolins deficients en GBA1 l'activitat GBA2 en el cervell augmenta significativament. Per tant, sembla que la GBA2 podria tenir un paper molt important en aquest òrgan (Burke *et al.* 2013) i podria ser un factor determinant en el fet que alguns pacients Gaucher tinguin afectació neurològica i altres no. També, s'ha observat que la ceramida, resultant de la hidròlisi de la GlcCer per part de l'enzim GBA1, es degrada en el mateix lisosoma en àcid gras i esfingosina. En canvi, la ceramida, generada per la GBA2, és convertida ràpidament a esfingomielina (Sonja van Weely *et al.* 1993). Aquest procés té lloc gràcies a l'enzim esfingomielina sintasa que transfereix un grup fosforilcolina de la fosfatidilcolina (PtdCho) a la ceramida, generant una molècula de diacilglicerol (DAG) i consumint una molècula de PtdCho (Figura 3). S'ha vist que els monòcits/macròfags dels pacients Gaucher la biosíntesis *de novo* de PtdCho està augmentada (Trajkovic-Bodennec *et al.* 2004). En el 2002 ja s'havia observat en un model neuronal de la GD, que la síntesis de PtdCho estava augmentada degut a una activació directa de la fosfocolina citidiltransferasa per l'augment de la GlcCer. Aquest augment de la síntesi de PtdCho produïa defectes en el creixement neuronal (Bodennec *et al.* 2002). Recentment, els resultats publicats per Mistry i col·laboradors van demostrar que la deleció del gen *GBA2* rescatava significativament el fenotip clínic de la GD1. Van constatar que la ceramidasa àcida del lisosoma converteix part de l'excés de GlcCer en GlcPsy, que després en el citosol pot ser hidrolitzada per acció de la GBA2 cap a esfingosina. Finalment, també van demostrar que aquesta esfingosina podria contribuir en els defectes osteoblàstics observats en la GD1 (Mistry *et al.* 2014). Així, sembla ser que l'enzim GBA2 contribueix negativament a la clínica dels pacients GD1. D'altra banda, no es coneix la implicació de l'enzim GBA2 en cervell, ja que s'ha observat que mutacions severes en el gen *GBA2* poden produir atàxia autosòmica recessiva (Hammer *et al.* 2013; Martin *et al.* 2013).

Pel que fa a l'enzim GBA3 sembla que no és un modificador del fenotip de la GD (Dekker *et al.* 2011).

Taula 2. Principals característiques dels tres enzims amb activitat β -glucosidasa.

	GBA1	GBA2	GBA3
Codi	EC 3.2.1.45	EC 3.2.1.62-108	EC 3.2.1.21
Coneguda com	GBA1, GlcCerasa, β -glucosidasa àcida	Àcid biliar β -glucosidasa, glucosilceramidasa no lisosomal (NLGase), microsomal β -glucosidasa	β -glucosidasa no específica, β -glucosidasa citosòlica, proteïna de la família Klotho
Localització cel·lular	Membrana i lumen lisosomal	A prop de la superfície cel·lular (Overkleeft <i>et al.</i> 1998; van Weely <i>et al.</i> 1993) o unit a la membrana de l'ER (Yildiz <i>et al.</i> 2006)	Citosòlica
Expressió	Ubiqua però sobretot en fibroblasts i macròfags	Té expressió ubiqua (van Weely <i>et al.</i> 1993) però en ratolí sobretot a fetge, cervell, ronyó i testicles (Yildiz <i>et al.</i> 2006).	S'expressa sobretot en fetge, intestí prim, colon, melsa i ronyó (Yahata <i>et al.</i> 2000)
Funció bioquímica principal	Hidròlisi de la GlcCer en glucosa i ceramida en el lisosoma	Hidròlisi de l'àcid biliar 3-O-glucòsid en la fracció microsomal hepàtica (Matern <i>et al.</i> 1992)	Hidrolitza un ampli ventall de glicosidases
Rellevància	La seva deficiència produeix la GD	L'espermatogènesi en ratolins (van der Spoel <i>et al.</i> 2002) però no observable en humans (Amory <i>et al.</i> 2007)	Metabolisme dels xenobiòtics: garanteix la ràpida absorció d'aquest compostos en l'intestí prim (Németh <i>et al.</i> 2003)
Sensibilitat a ser inhibida per	CBE (condritol β -epòxid; inhibidor irreversible)	<ul style="list-style-type: none"> • AMP-DNJ (Overkleeft <i>et al.</i> 1998) • Tauroclorat (van Weely <i>et al.</i> 1993) • NB-DNJ 	β -D-glucosilesfingosina

3.8.2. Cèl·lules Gaucher i sistema immunitari

Hi ha evidències que les cèl·lules Gaucher (Caixa 2) no són simplement un magatzem del substrat no degradat, sinó que contribueixen activament a les diverses manifestacions clíniques de la malaltia. De fet, s'ha observat que en els teixits de pacients Gaucher, aquestes cèl·lules són macròfags activats per la via alternativa i estan envoltats per altres macròfags acabats de formar i altament inflamatoris (Boven *et al.* 2004). D'acord amb aquestes observacions, els pacients Gaucher mostren un augment dels nivells plasmàtics de diverses citocines pro-inflamatòries (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8), la citocina antiinflamatòria IL-10, les quimiocines PARC/CCL18, CCL2 i MCP-1 (proteïna quimioattractant de monòcits 1), la hidrolasa quitotriosidasa, la lisozima, l'ACE, la TRAP i algunes catepsines (Aerts i Hollak 1997; Boot *et al.* 2004; Cox 2001; Hollak *et al.* 1997; Moran *et al.* 2000). Per tant, s'ha plantejat la hipòtesi que aquesta resposta inflamatòria massiva pot exercir un paper crucial en el desenvolupament de moltes de les anormalitats clíniques en els pacients Gaucher.

3.8.3. Altres

Tal com s'ha comentat, el substrat alternatiu GlcPsy pot tenir un paper important en la malaltia. Però a més, altres aspectes a tenir en compte són les possibles alteracions que afectin al transport, les modificacions post-traduccionals o la degradació (per part d'un mal funcionament del proteosoma) de l'enzim GBA1 (Lu *et al.* 2010; Sidransky 2004). A més, com qualsevol malaltia genètica, els factors ambientals en molts casos condicionen el fenotip.

3.9. Diagnòstic de la malaltia

3.9.1. Diagnòstic clínic

L'observació de la presència de diferents símptomes, tals com esplenomegàlia, hepatomegàlia i/o icterícia, problemes hematològics i/o problemes ossis, poden evidenciar que estem davant de la malaltia de Gaucher. No obstant, alguns d'ells també poden estar presents en altres malalties com la de Niemann-Pick tipus B o les leucèmies i anèmies hemolítiques. Per aquest motiu cal fer un diagnòstic diferencial.

3.9.2. Diagnòstic morfològic

El diagnòstic morfològic s'utilitzava antigament per identificar la malaltia i consistia en la detecció específica de cèl·lules Gaucher. No obstant, s'han descrit

cèl·lules molt similars en altres malalties, que s'han anomenat cèl·lules pseudo-Gaucher (Carrington *et al.* 1992; Stewart i Jones 1999). Per aquest motiu actualment s'utilitzen altres tècniques bioquímiques i moleculars que són més específiques i menys invasives.

3.9.3. Diagnòstic enzimàtic

El diagnòstic enzimàtic es basa en la mesura de l'activitat de l'enzim GBA1 en leucòcits o fibroblasts provinents de possibles malalts. Per mesurar aquesta activitat s'utilitzen substrats sintètics de la GBA1, com el 4-metilumbeliferil- β -glucòsid (4-MU) que és hidrolitzat per l'enzim a pH 5. En individus malalts es detecta una clara disminució de l'activitat d'aquest enzim, però pel que fa al diagnòstic de portadors (heterozigots) hi ha ambigüitat, ja que hi pot haver solapament entre els valors d'activitat dels individus no portadors i els portadors. A més, mitjançant aquest diagnòstic no es pot distingir entre els tipus neuronopàtics (GD2 i GD3) i el no neuronopàtic (GD1), degut també als solapaments dels valors d'activitat entre ells (Grabowski *et al.* 1996). En general, en adults malalts l'enzim presenta entre el 10 i el 30% de l'activitat detectada en un individu control, i en nens presenta el 10% o menys (Grabowski *et al.* 1996).

3.9.4. Diagnòstic genètic

El diagnòstic genètic es basa en l'anàlisi del DNA amb l'objectiu d'identificar les mutacions en el gen *GBA1* i, a diferència de l'enzimàtic, permet distingir perfectament els individus malalts dels portadors. S'han desenvolupat diferents tècniques basades en l'amplificació del DNA (PCR) seguida de seqüenciació per a la detecció de mutacions.

3.10. Aproximacions terapèutiques

Els tractaments han d'anar dirigits a la correcció de la patologia i la funció de tots els teixits afectats per restablir la salut, o per millorar la qualitat de vida del pacient. Tot i que, en les últimes dues dècades s'han desenvolupat diferents opcions terapèutiques per a la malaltia de Gaucher, totes elles presenten limitacions i problemes importants.

Les aproximacions terapèutiques es poden dividir en dos grups: l'adreçat als símptomes (tractament de suport) o el que està dirigit a pal·liar la causa (tractament específic, Figura 9) (Futerman i van Meer 2004a).

3.10.1. Tractament de suport

El tractament de suport intenta pal·liar els símptomes provocats per la malaltia, però en cap moment tracta la causa específica que la provoca. Dins d'aquesta categoria s'hi poden incloure:

3.10.1.1. L'esplenectomia

És l'eliminació total o parcial de la melsa. Pot reduir alguns símptomes, tals com la trombocitopènia (baix número de plaquetes) i l'anèmia present en la malaltia de Gaucher (Fleshner *et al.* 1991). No obstant, pot tenir conseqüències nefastes i, per aquest motiu, actualment és una pràctica en desús.

3.10.1.2. Intervencions ortopèdiques

En els casos d'osteonecrosi o fractures patològiques es solen realitzar implantacions de pròtesis o substitucions de la part afectada (Goldblatt *et al.* 1988).

3.10.2. Tractament específic

Aquest tipus d'enfocament terapèutic està dirigit a la correcció de la pèrdua de la funció de l'enzim mutat, augmentant la quantitat de proteïna funcional, tant a nivell cel·lular com tissular (Parenti 2009) o bé intentant disminuir l'acumulació de substrat (Figura 9).

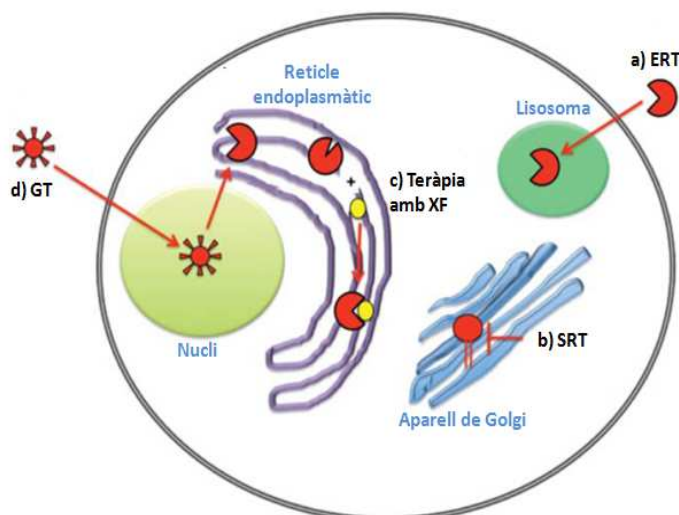


Figura 9. Alguns dels tractaments específics per la GD. a) ERT, l'enzim GBA1 recombinant està dirigit als lisosomes on hidrolitza la GlcCer acumulada. b) SRT, basada en l'inhibició de l'enzim GlcCer sintasa en l'aparell de Golgi. c) Les XF estableixen en l'ER els enzims GBA1 mutats. d) GT, introdueix en el nucli la còpia WT del gen *GBA1*. Figura modificada de Vitner *et al.* 2014.

3.10.2.1. Transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCT)

Aquest tractament va sorgir a l'any 1990 i consisteix en la introducció de precursors hematopoètics d'un donant sà a un receptor malalt (en aquest cas amb la GD), amb la conseqüent substitució dels monòcits defectius (precursors de

macròfags, que presenten lisosomes amb l'enzim GBA1 defectuós) per monòcits amb lisosomes que contenen l'enzim GBA1 funcional (Futerman i van Meer 2004a). Encara que del HSCT se n'han documentat molts pocs casos, sembla ser que produïa una progressiva, però lenta, eliminació de les cèl·lules Gaucher de l'os i del fetge (Ringdén *et al.* 1995). Alguns autors van evidenciar que amb la realització prèvia de l'esplenectomia seguida del HSCT s'obtenien millors resultats en la correcció de les manifestacions hematològiques que amb el HSCT sol (Hobbs *et al.* 1987). Alguns pacients van mostrar, també, millores importants en les manifestacions òssies, mitjançant l'ús del HSCT (Starer *et al.* 1987). D'altra banda, en pacients amb problemes neurològics (GD2 i GD3) és imprescindible que el transplantament es doni abans de que el defecte neurològic sigui irreversible, per intentar, almenys, estabilitzar la neuronopatia o corregir-la completament (Ito i Barrett 2013). Malgrat això, les millores en els casos neuronopàtics són qüestionables i, a més a més, no seria una bona opció terapèutica pels GD2, pels danys cerebrals primerencs que presenten (Machaczka 2013). Amb el desenvolupament de la teràpia de substitució enzimàtica (ERT), més segura i eficaç, el HSCT va quedar en desús.

3.10.2.2. Teràpia de substitució enzimàtica (ERT)

El rerefons de la teràpia de substitució enzimàtica és el descobriment de que la majoria de les glicoproteïnes lisosòmiques sintetitzades *de novo* són dirigides al lisosoma via receptors de manosa-6-fosfat (M6PR). Així doncs, les hidrolases lisosomals recombinants podrien ser internalitzades per les cèl·lules i els teixits, a través del M6PR i en última instància, entregades als lisosomes (Brady 2006) (Veure 1.3, Figura 2A). L'ERT va esdevenir un tractament segur i eficaç, ja que millora l'anèmia i la trombocitopènia sense necessitat de l'esplenectomia, disminueix un 30-40% la mida del fetge, un 50-60% la de la melsa (en 2-5 anys) i normalitza el patró de creixement en nens (Pastores *et al.* 2004; Weinreb *et al.* 2002). No obstant, encara que el dolor ossi i les crisis òssies es redueixen significativament després de l'ERT (Sims *et al.* 2008; Weinreb *et al.* 2002), hi ha un 39-48% dels pacients que continuen amb dolor. A més, els canvis morfològics en l'os persisteixen diversos anys després de l'ERT (Ito i Barrett 2013). Pel que fa a la densitat mineral òssia (DMO) també l'augmenta significativament, encara que és necessari que el tractament duri fins a 8 o més anys per tal d'aconseguir uns valors normals. Però aquesta reducció podria ser suficient per disminuir el risc de patir osteopènia i/o osteoporosis, així com les fractures òssies (Wenstrup *et al.* 2007).

El primer enzim GBA1 recombinant va ser desenvolupat fa més de dues dècades a partir de placenta humana per Brady i col·laboradors i es va anomenar alglucerasa (Ceredase®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) (Pentchev *et al.* 1973). El tractament de la GD1 amb l'aglucerasa va ser aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) en el 1991 i, ha estat disponible des de llavors. A l'any 1994 es va aconseguir un nou enzim recombinant GBA1, conegut com imiglucerasa (Cerezyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA), produït en cèl·lules

d'ovari d'hàmsster xinès. Igual que l'alglucerasa, després de la seva purificació es modificava perquè quedessin exposats els residus de manosa (Zimran *et al.* 1995). Més recentment, l'any 2010, es va aprovar la velaglucerasa- α (VPRIV®; *Shire Human Genetic Therapies*, Dublin, Irlanda) obtinguda en cèl·lules de fibrosarcoma humà (Gonzalez *et al.* 2013; Turkia *et al.* 2013; Zimran *et al.* 2013). A l'any 2012, es va aprovar als Estats Units la taliglucerasa- α (Elelyso®; *Protalix*, Carmiel, Israel) que prové de la pastanaga (Gregory *et al.* 2014). L'administració oral d'aquesta última està en procés d'avaluació de la fase I-II dels assajos clínics en pacients GD1. Si els informes són favorables, podria representar una gran alternativa ja que fins a l'actualitat tots els enzims recombinants comentats s'administren per via intravenosa.

En definitiva, l'ERT és altament eficient en el tractament dels GD1, però presenta mancances a l'hora de pal·liar els problemes ossis, sobretot les manifestacions irreversibles tals com l'ostenecrosi, els infarts ossis i les fractures. A més, la incapacitat de passar la barrera hematoencefàlica fa que no sigui eficient pels casos neuronopàtics (GD2 i GD3), tot i que millora les manifestacions patològiques sistèmiques dels pacients GD3.

D'altra banda, l'eficàcia d'aquest tipus de teràpia amb proteïnes recombinants sovint es veu obstaculitzada per la generació d'anticossos contra la proteïna administrada, arribant a produir reaccions d'hipersensibilitat i fins i tot xocs anafilàctics (revisat a Vitner *et al.* 2014). També s'ha observat que, en alguns casos, s'inactiva l'enzim en el flux sanguini i arriba inactiu en el lisosoma. Aquest fet es podria explicar per l'acció del pH neutre sanguini que provoca una desnaturalització enzimàtica, ja que aquests enzims estant dissenyats perquè funcionin en l'ambient àcidic lisosomal (Boyd *et al.* 2013). Per últim, cal comentar que calen transfusions intravenoses freqüents (excepte en el cas de la taliglucerasa- α) i és un tractament extremadament car. Pot arribar a suposar una despesa superior als 100.000 dòllars per pacient i any (Beutler 2006).

3.10.2.3. Teràpia de reducció de substrat (SRT)

La teràpia de reducció de substrat té com objectiu reduir la taxa de síntesi del substrat que s'acumula a la malaltia, restablint, així, l'equilibri entre la seva síntesi i la seva degradació. S'utilitza en el tractament de la GD1 des de l'any 2003 i es basa en l'ús de molècules inhibidores de la GlcCer sintasa, que és l'enzim responsable de la síntesi del substrat, GlcCer, acumulat en la malaltia de Gaucher. L'inhibidor que s'utilitza és el miglustat (*Zavesca*®; *Actelion Pharmaceuticals*, San Francisco, CA, USA), que és un iminosucre (N-butildeoxinojirimicina, NB-DNJ) (Platt *et al.* 1994) que es pot administrar oralment i s'utilitza en aquells casos en que l'ERT no és una bona opció terapèutica, com en els pacients que presenten fòbia a les agulles, al·lèrgia, hipersensibilitat o pobre accés venós (revisat a Vitner *et al.* 2014). S'ha observat que en GD1 el miglustat redueix els volums de la melsa i el fetge i augmenta la concentració d'hemoglobina i el número de plaquetes, així com, també, hi ha evidències que produeix certa millora en algunes de les

manifestacions òssies (Elstein *et al.* 2004; Kuter *et al.* 2013). Es va pensar que pel fet de ser una molècula de mida petita, podria tenir un bon potencial per tractar les formes neurològiques de la malaltia, ja que seria capaç de travessar la barrera hematoencefàlica, però els resultats de l'assaig clínic no van ser satisfactoris (Schiffmann *et al.* 2008).

El miglustat pot produir alguns efectes secundaris com diarrea i inflor abdominal, per tant, són necessaris ajustaments alimentaris. La pèrdua de pes i tremolors també són efectes no desitjats, encara que, aquest últim, disminueix generalment després d'un setmanes, però ocasionalment pot complicar-se cap a una neuropatia perifèrica (Cox 2010b).

Més tard, la companyia Genzyme va desenvolupar el tartrat d'eliglustat (Cerdelga®; *Genzyme Corporation*, Cambridge, MA, USA) que és un fort inhibidor competitiu ($IC_{50} \sim 24nM$) de la GlcCer sintasa i amb baixa inespecificitat. Es tracta d'un producte que presenta similitud química a la ceramida (Cox 2010a; McEachern *et al.* 2007). Aquest compost també presenta eficàcia clínica i amb l'avantatge respecte al miglustat, que els efectes secundaris no són tan freqüents. Tot i que en els estudis pre-clínic es va observar que en elevades concentracions podia produir irregularitats cardíaques, aquest efecte no semblava ser significatiu a les concentracions terapèutiques utilitzades. A més, com que es metabolitza predominantment pel citocrom CYP2D6, el seu ús està contraindicat per aquells pacients que se'ls administren altres medicaments que interactuen amb aquesta via metabòlica de degradació. Aquests fàrmacs inclouen la paroxetina, el ketoconazol i la rifampicina (revisat a Cox 2010b).

3.10.2.4. Teràpia amb xaperones farmacològiques (XF)

El reticle endoplasmàtic rugós té un sistema de control de qualitat per les proteïnes recent sintetitzades, que consisteix en l'ús de xaperones moleculars que faciliten la correcta conformació de la proteïna, i molècules sensores que reconeixen i marquen les proteïnes que presenten un plegament incorrecte. Subseqüentment, aquestes proteïnes es retrotransloquen al citosol i són degradades per la maquinaria de degradació associada a l'ER (proteosoma) (Ellgaard i Helenius 2003). La teràpia amb xaperones farmacològiques es basa en la suposició de que algunes mutacions enzimàtiques són responsables del mal plegament tridimensional de l'enzim, el qual queda retingut en l'ER i posteriorment és sotmès a la degradació proteosomal (Ron i Horowitz 2005), fet que impedeix el seu transport cap als lisosomes.

La interpretació més comuna de la utilitat terapèutica d'una XF és que es pot unir al centre catalític de l'enzim mal plegat a través de diferents interaccions no covalents (electrostàtiques, Van der Waals i ponts d'hidrogen), millorant el seu plegament o estabilitat (Ringe i Petsko 2009). D'aquesta manera, el complex enzim-XF arribaria al lisosoma on es dissociaria degut al medi àcid d'aquest orgànul. Així, s'aconseguiria que el lisosoma presentés nivells suficients d'enzim en

una conformació correcta perquè tinguis lloc la funció enzimàtica (Figura 10). Així doncs, la teràpia mediada per XF, també coneguda com “teràpia potenciadora” (*enhancement therapy*), ofereix una nova estratègia terapèutica per augmentar l’activitat residual de l’enzim mutat. S’ha suggerit que un 10% d’activitat enzimàtica és suficient per prevenir l’acumulació de substrat en les LSD (Schueler *et al.* 2004).

La majoria de les XF que s’han identificat són inhibidors reversibles que s’uneixen al lloc catalític de l’enzim, per tant és necessari que en el lisosoma (medi àcid) tingui lloc la dissociació del complex enzim-XF perquè el substrat natural de l’enzim pugui ser metabolitzat.

D’altra banda, les XF també poden unir-se a llocs al·lostèrics, propers o no al centre actiu de l’enzim, produint també major estabilitat a l’enzim mutat i, per tant, permeten així el correcte transport al lisosoma. No obstant, és important assenyalar que les XF han de presentar bona selectivitat i biodisponibilitat, sense interferir en els llocs d’unió essencials per a les interaccions proteïna-proteïna, com per exemple llocs d’unió a co-efectors (Boyd *et al.* 2013).

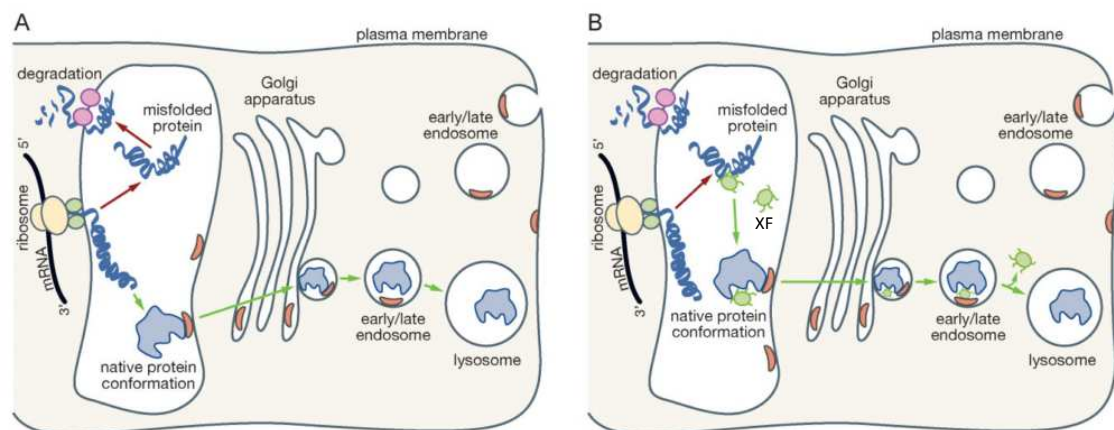


Figura 10. Efecte de les xaperones farmacològiques sobre els enzims lisosomals mal plegats. A) Mentre que el plegament dels enzims lisosomals WT és assistit per les xaperones moleculars endògenes i seguidament són transportades cap al seu destí lisosomal (fletxes verdes), els enzims mutats no poden plegar-se de manera eficient en la seva conformació nativa, i són retro-translocats al citosol i degradats pel proteosoma (fletxes vermelles). B) Les XF (en verd) afavoreixen el plegament dels enzims mutats i eviten el seu reconeixement pel sistema de control de qualitat. El complex XF-enzim mutat pot arribar al lisosoma, on tindrà lloc la dissociació del complex i l’enzim podrà realitzar la seva activitat catalítica, sempre i quan la mutació no l’hagi afectat. Figura extreta de Parenti 2009.

3.10.2.4.1. Molècules sintètiques desenvolupades com a XF

A) Iminociclitol i compostos relacionats

Entre les molècules sintètiques que s’han descrit com a candidates a XF, els iminociclitol han estat un dels grups més representatiu (Butters 2007). Com indica el seu nom, els iminociclitol són ciclitol (cicloalcans substituïts amb, al menys, tres grups hidroxil) en els que dels grups CHOH del sistema cíclic, un s’ha

reemplaçat per un grup amino (NHR). Estructuralment, aquests compostos es poden considerar anàlegs de la GlcCer, el substrat natural de l'enzim, en els que el grup NHR ocupa el lloc de l'àtom d'oxigen endocíclic del glicoesfingolípíd natural (Benito *et al.* 2011). Els primers iminociclitols descrits a la literatura es van dissenyar com a inhibidors de la GlcCer sintasa per la SRT, com és el cas de la NB-DNJ (Figura 11) com s'ha mencionat en l'apartat 3.10.2.3.

El primer iminociclitol descrit com a XF va ser la N-nonildeoxinojirimicina (NN-DNJ) (Figura 11) en un treball de Sawkar i col·laboradors de l'any 2002. En aquest treball es descriu que la NN-DNJ a 10 μ M incrementa dues vegades l'activitat de l'enzim GBA1-N370S (en fibroblasts N370S/N370S) (Sawkar *et al.* 2002). Més tard, respecte a la mateixa mutació, Alonso i col·laboradors van apuntar que la NB-DNJ també augmentava dues vegades l'activitat de l'enzim (GBA1-N370S expressada en cèl·lules COS-7 estables) (Alfonso *et al.* 2005). A partir del descobriment de les N-alquil-DNJ com a XF, han estat nombrosos els treballs en els que es descriuen diversos anàlegs d'aquestes estructures. Per exemple, Sawkar i col·laboradors van descriure derivats N-alquilats de la DNJ amb un grup terminal adamantil (A, Figura 11), que van resultar actius com a XF en els enzims amb la mutació N370S i la G202R (analitzats amb fibroblasts amb genotips N370S/N70S i G202R/G202R, respectivament). En el mateix treball, també s'indicava que el N-octil-2,5-dideoxi-2,5-imino-D-glucitol (B, Figura 11) també era un bon candidat com a XF per a aquest últim enzim (Sawkar *et al.* 2005). S'han descrit, posteriorment, diversos anàlegs d'aquest sistema substituint l'àtom de nitrogen amb altres grups hidrofòbics, com ara els derivats d'adamantil (C i D, Figura 11). Els augments d'activitat observats oscil·len entre 2,5 i 7,5 vegades en els enzims amb la mutació N370S i la G202R respectivament (analitzats en fibroblasts amb genotips N370S/N370S i G202R/G202R, respectivament) (Yu *et al.* 2007).

L'any 2006, es van dissenyar diferents α -1-C-alquil-DNJ, per incorporació de diferents cadenes alquíliques en la posició C-1 α de la DNJ. Entre els compostos sintetitzats, la α -1C-octil-DNJ (E, Figura 11) augmentava al voltant de dues vegades l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S (analitzat en fibroblasts amb genotip N370S/N370S) (Yu *et al.* 2006).

Per últim, les calistegines (Chang *et al.* 2006) que són un grup de compostos relacionats amb estructura bicíclica i, en concret, la calistegina B2 (Figura 11) va exhibir una activitat xaperona significativa, ja que a 10 μ M augmentava 2,3 vegades l'activitat de l'enzim GBA1-L444P (analitzat en fibroblasts amb genotip L444P/L444P).

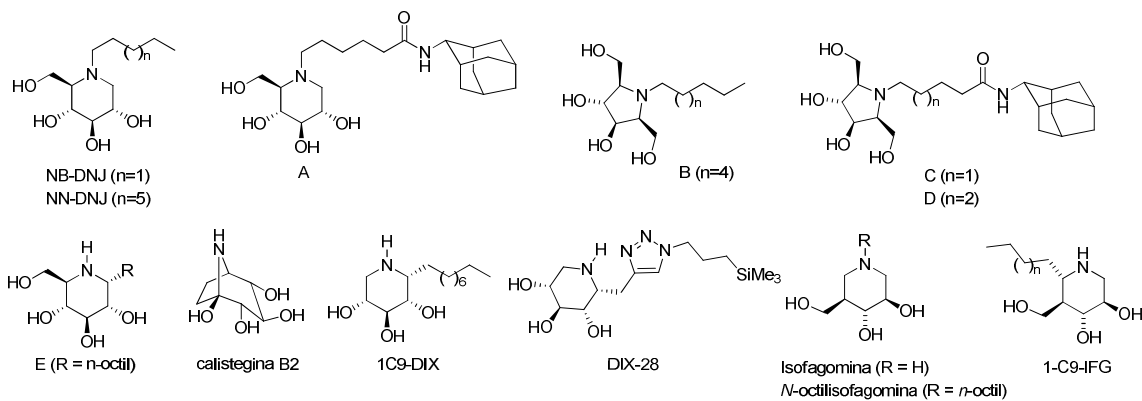


Figura 11. Iminociclitols, iminoxilitols i derivats de la isofagomina.

B) Iminoxilitols

A l'any 2006 sorgeixen els iminoxilitols, una família d'iminosucres derivats del 1,5-dideoxi-1,5-imino-D-xilitol (DIX) i els derivats α -1-alquil d'aquest. En concret, α -1C-nonil-DIX (1C9-DIX, Figura 11) és capaç, a 10nM, d'augmentar 1,8 vegades l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S (en fibroblasts N370S/N370S) (Compain *et al.* 2006; Yu *et al.* 2006). Encara que l'activitat xaperona és inferior a l'obtinguda amb la NN-DNJ sobre el mateix enzim, aquest compost és més selectiu i requereix una concentració més petita (10nM) per observar els mateixos efectes que amb la NN-DNJ. Alguns derivats del DIX s'han utilitzat en aquesta tesi.

C) Isofagomina i derivats

Un compost relacionat amb els iminociclitols és la isofagomina (IFG) (Figura 11), un anàleg estructural del producte natural fagomina, que es troba al gra de fajol. El 2006 es va descriure aquest compost com un potent inhibidor de l'enzim GBA1, capaç d'augmentar (a una concentració de 30 μ M) al voltant de tres vegades l'activitat enzimàtica de l'enzim N370S (analitzat en fibroblasts amb genotip N370S/N370S) i millorar el seu transport cap al lisosoma (Chang *et al.* 2006; Steet *et al.* 2006). Resultats més recents mostren com la IFG a més de produir un increment d'aproximadament 3,5 vegades (a 6-20 μ M) en l'activitat de l'enzim amb la mutació L444P en limfoblasts i 1,3 vegades en fibroblasts (a 20 μ M), és també capaç de reduir els nivells de GlcCer tant en a limfoblasts com en a fibroblasts portadors del genotip L444P/L444P. D'altra banda, perquè aquesta reducció sigui apreciable cal que els nivells de GlcCer siguin mesurats després de que les cèl·lules, tractades amb la IFG, hagin estat 3 dies incubades amb medi sense la XF, per així eliminar l'accés d'IFG que hagi pogut quedar unida a l'enzim (Khanna *et al.* 2010). A més, en un model de ratolí *knock-in* per la mutació L444P, al qual se li va administrar oralment el tartrat d'IFG, es va observar que l'activitat enzimàtica GBA1 augmentava significativament en els teixits afectats (2 vegades en cervell, 4 en fetge i melsa i 5 en pulmons) (Khanna *et al.* 2010). Per aquest motiu, aquest compost va ser comercialitzat per l'empresa *Amicus Therapeutics* amb el nom

d'AT-2101, sota la marca registrada de Plicera®. Va superar la fase II dels assajos clínics, però els resultats preliminars posteriors van evidenciar que hi havia escassa milloria en els pacients tractats, i no es va prosseguir a la següent fase. Entre les possibles causes de la baixa eficàcia observada pel compost en humans, es va considerar l'elevada hidrofilitat com una de les més importants. En aquest sentit, alguns grups estan treballant en el desenvolupament de derivats menys polars, com ara la 1-C9-IFG (Figura 11) (revisat a Benito *et al.* 2011). És interessant destacar que, encara que és menys efectiu que la IFG, la concentració necessària del compost 1-C9-IFG per aconseguir la màxima efectivitat (3nM) és quatre ordres de magnitud inferior que amb la IFG (sobre fibroblasts amb genotip N370S/N370S). Finalment, cal indicar que, ja a l'any 2002, es va descriure la *N*-octil-isofagomina (Figura 11) com a candidata a XF per a l'enzim amb la mutació G202R en fibroblasts G202R/G202R (Sawkar *et al.* 2005).

D) Aminociclitols

Els aminociclitols són ciclitols que contenen un grup amino lliure o substituït. Un dels primers aminociclitols descrits com a un inhibidor selectiu de l'enzim GBA1 va ser la *N*-octil- β -valienamina (NOV, Figura 12). A una concentració de 30 μ M, aquest compost va produir un increment de 6 vegades l'activitat de l'enzim F213I (analitzat en fibroblasts amb genotip F213I/F213I) (Lin *et al.* 2004).

Més tard es van identificar una sèrie d'inhibidors selectius de l'enzim GBA1 a partir d'una llibreria de *N*-aquil aminociclitols (compostos A-D, Figura 12) (Egido-Gabas *et al.* 2005). Alguns d'ells van incrementar al voltant de 1,5 vegades (a 20 μ M) l'activitat GBA1 dels enzims produïts pel genotip L444P/G202R (Sánchez-Ollé *et al.* 2009). Es van sintetitzar, també, una sèrie d'aminociclitols substituïts a la cadena *N*-alquil amb diversos sistemes alifàtics i cicloalifàtics (compostos LD, Figura 12) que s'han utilitzat en aquesta tesi.

Simultàniament, es van descriure com a XF de la GBA1, altres aminociclitols relacionats. Aquest és el cas del derivat d'adamantil (E, Figura 12), que incrementa un 64% (a 1mM) i un 150% (a 100mM) l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S o la L444P, respectivament (Trapero *et al.* 2013). D'altra banda, el derivat dialquilat (F, Figura 12) va donar lloc a increments d'un 90% (a 1nM) i un 40% (a 0,01nM) sobre l'enzim GBA1-N370S i el GBA1-L444P, respectivament (Trapero *et al.* 2012). Finalment, el sistema de 1,2-diaminociclitol també ha resultat interessant com a XF. Un exemple és el diaminociclitol (G, Figura 12), que va produir (a 100nM) un augment de l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S de l'ordre del 60% i d'un 30% (a 1nM) sobre l'enzim amb la L444P (Trapero i Llebaria 2011). Els compostos utilitzats en aquests treballs es van incubar durant 3 dies en limfoblasts homozigots per a cada mutació.

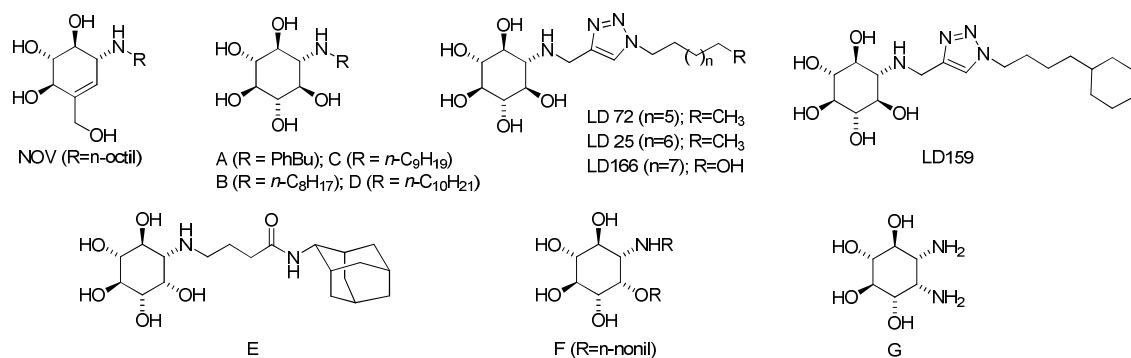


Figura 12. Aminociclitolos.

E) Sistemes bicíclics fusionats

A partir de la modificació molecular de la DNJ, i amb l'objectiu d'augmentar la selectivitat sobre les glicosidases, s'han descrit diversos sistemes bicíclics fusionats (García i Cañada 2000). En el cas de l'enzim amb la mutació N370S, els derivats 1-3 (Figura 13) van produir-li un modest increment, en comparació amb la NN-DNJ. En canvi els resultats obtinguts amb els enzims codificats per el gen amb les mutacions F213I o G202R (associades a fenotips neuropàtics) van ser més prometedors, amb augments d'activitat de l'ordre de 2,5 vegades (Luan *et al.* 2009). Altres anàlegs relacionats són els sistemes bicíclics de tipus isourea (4, X=O) i guanidina (5, X=NH) (Figura 13), que van mostrar increments d'activitat entre 1,8 i 2 vegades (a concentració 100nM) en limfoblasts homozigots per les mutacions N370S o L444P (Trapero *et al.* 2011). Més recentment, s'han descrit altres sistemes bicíclics relacionats, com els compostos 6-8 (Figura 13), que van demostrar un bon potencial com a XF per l'enzim GBA1-L444P (al·lel L444P expressat en cèl·lules COS-7), on van incrementar la seva activitat més de 3,5 vegades a concentracions entre 2 i 5µM (Alfonso *et al.* 2013). Aquests nous anàlegs solen presentar una alta afinitat pel lloc actiu de l'enzim GBA1 i molts són altament selectius envers altres glicosidases, malgrat que es coneixen excepcions.

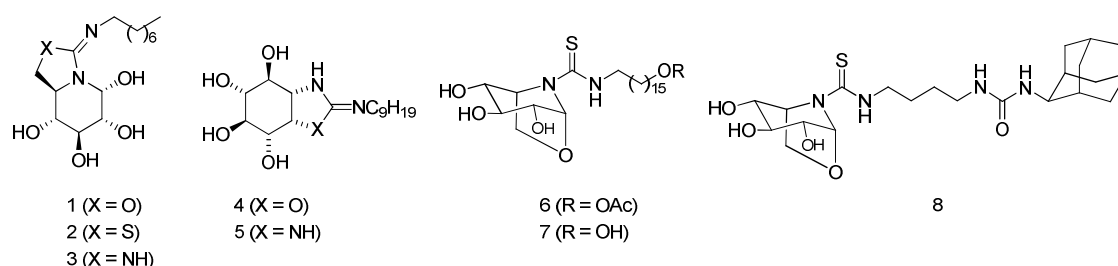


Figura 13. Sistemes bicíclics fusionats.

F) Inhibidors al·lostèrics

Una línia d'investigació recent en el camp de les XF, és la identificació de nous compostos capaços d'estabilitzar l'enzim per unió a un centre al·lostèric. De

manera similar als compostos que actuen directament sobre el centre actiu, cal que s'alliberi una forta energia d'afinitat xaperona-enzim per tal d'augmentar l'estabilitat de l'enzim mutat. No obstant, l'avantatge d'aquest tipus d'inhibidors, respecte als que actuen sobre el centre actiu, és que poden romandre units a l'enzim durant el procés catalític sense el risc d'inhibir (Parenti *et al.* 2015). A la Figura 14 s'indiquen alguns dels compostos més representatius descrits a la literatura. Per exemple, els compostos NCGC00182331-03 (Marugan *et al.* 2011), ML 156 (Marugan *et al.* 2012) i NCGC00188758-01 (Marugan *et al.* 2012; Patnaik *et al.* 2012) mostren una capacitat de transport de l'enzim amb la mutació N370S cap al lisosoma similar a la mostrada per la IFG. Per últim, s'han patentat darrerament una sèrie de derivats de l'àcid salicílic (estructura general A, Figura 14). Segons les dades de la patent, el compost més potent de la sèrie, a una concentració de 100nM, és capaç d'incrementar els nivells d'activitat de l'enzim GBA1-N370S de fibroblasts homozigots per aquesta mutació a nivells comparables als de l'enzim WT (Marugan *et al.* 2013).

G) Noves XF obtingudes per “reposicionament” de fàrmacs coneguts

El desenvolupament d'un nou fàrmac requereix una enorme inversió de temps, diners i esforços al llarg del procés. Fins i tot en el millor dels casos, el temps requerit per a la seva comercialització no és inferior a 15 anys. Amb l'objectiu de reduir aquests terminis i abaratir costos, l'estratègia de “reposicionament” de fàrmacs (*drug repositioning*) representa una aproximació interessant. El fonament d'aquesta estratègia consisteix en l'exploració de noves aplicacions terapèutiques per a fàrmacs ja coneguts i ben consolidats per el tractament d'altres malalties. L'avantatge inqüestionable del “reposicionament” és que els fàrmacs ja han estat assajats en humans, les seves propietats farmacològiques i toxicològiques són conegudes i han superat tots els controls requerits per a la seva comercialització. En conseqüència, qualsevol nou ús terapèutic del fàrmac requerirà de menys etapes de desenvolupament, amb les avantatges que se'n deriven d'aquest fet (Ashburn i Thor 2004). Amb aquesta estratègia, s'ha demostrat que alguns fàrmacs coneguts presenten propietats interessants com a potencials XF pel tractament de la GD. A partir d'un cribatge exhaustiu de més de 1.000 fàrmacs aprovats, es va identificar l'ambroxol (ABX, Figura 14), un mucolític aprovat per a nadons. En fibroblasts de pacients es va estudiar l'efecte de l'ABX, el qual va incrementar significativament l'activitat GBA1 de l'enzim amb la mutació N370S i amb la F213I (Maegawa *et al.* 2009), ja que millorava el plegament dels respectius enzims i no quedaven retinguts en l'ER (Bendikov-Bar *et al.* 2013). Altrament, es va observar que reduïa els nivells de GlcCer en limfoblasts (N370S/N370S), que tenia baixa toxicitat i que incrementava l'activitat GBA1 en la melsa, el cor i el cerebel d'un ratolí WT (Zhuo Luan *et al.* 2013). Es va dur a terme el primer estudi pilot amb l'ABX en 12 pacients de la GD, 3 dels quals van presentar una disminució d'un 20% en el volum de la melsa i d'un 50% en l'activitat quitotriosidasa (Goker-Alpan

2013; Zimran *et al.* 2013). Recentment, l'ABX també s'ha proposat com a possible tractament del Parkinson vinculat a la GD (McNeill *et al.* 2014).

Un altre fàrmac que sembla haver mostrat resultats prometedors és el Diltiazem (Figura 14), un bloquejador dels canals de calci (veure apartat 3.10.2.6.1) que s'empra com antihipertensiu. Aquest fàrmac és capaç d'actuar com a XF a pH neutre (el de l'ER). No obstant, el seu mecanisme d'actuació no és del tot clar (Rigat i Mahuran 2009), ja que els resultats observats en fibroblasts de ratolí no es reproduïen *in vivo* (Sun *et al.* 2009).

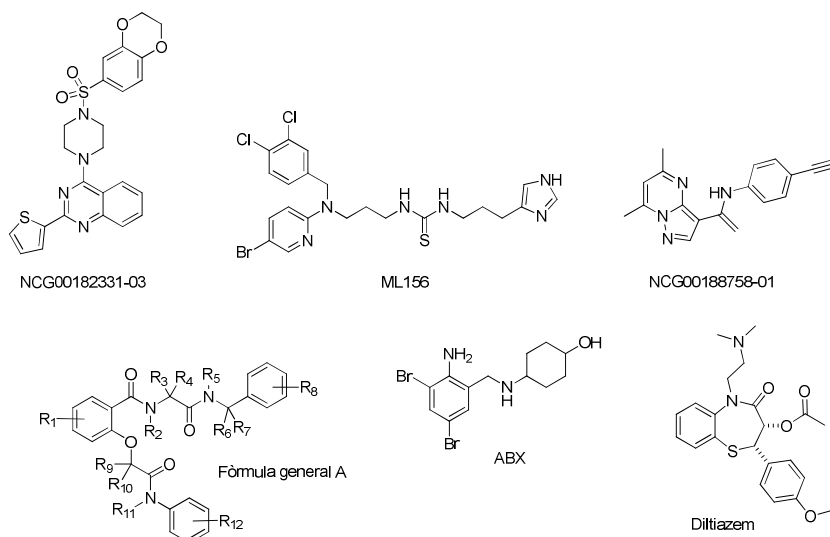


Figura 14. Inhibidors al·lostèrics i XF resultants del reposicionament de fàrmacs coneguts.

CAIXA 4. Xaperona química vs xaperona farmacològica

Els termes xaperona química i farmacològica s'han utilitzat a la bibliografia de forma indistinta, però s'han establert unes diferències entre ells (Bernier *et al.* 2004; Kolter i Wendeler 2003). Les xaperones químiques són compostos de baix pes molecular, com per exemple el glicerol i l'*N*-òxid de trimetilamina, que s'uneixen i faciliten el correcte plegament de qualsevol proteïna mutada i, normalment, no tenen un lloc d'unió específic. Degut això, són necessàries unes concentracions molt elevades d'aquests compostos per aconseguir l'efecte. En canvi, les xaperones farmacològiques són generalment inhibidors competitiu de l'enzim deficient que, a concentracions sub-inhibitòries, s'uneixen de forma específica amb aquest, facilitant el seu correcte plegament i el seu transport cap al lisosoma.

3.10.2.5. Teràpia gènica (GT)

La teràpia gènica es focalitza en recuperar l'activitat enzimàtica de forma permanent, mitjançant la introducció de la copia WT del gen defectuós, a partir de l'ús d'un vector, generalment viral. Les LSD són unes candidates ideals per a la GT pel fet de ser malalties monogèniques. A més, no és necessari que es transdueixin totes les cèl·lules amb el gen WT, sinó que amb una subpoblació és suficient per produir l'efecte. Les cèl·lules transduïdes seran capaces de produir i secretar enzims funcionals a l'espai extracel·lular, i subseqüentment els enzims lisosomals podran arribar a les cèl·lules veïnes mitjançant el M6PR. Aquest fenomen s'anomena correcció creuada (*cross-correction*) (Barton i Neufeld 1971).

L'èxit de la GT depèn de nombroses consideracions com ara el tipus de vector, la dosi i la via d'introducció del vector viral utilitzat i, també, l'edat del pacient quan rep el tractament. Actualment, els virus adeno-associats (AAV) i els lentivirus són els preferits. L'expressió sistèmica del gen introduït s'aconsegueix normalment quan la GT està dirigida al fetge, el qual actua com a font endògena de les proteïnes circulants. D'altra banda, la bioseguretat del vector viral, la immunogenicitat i el pas dels enzims funcionals a través de la barrera hematoencefàlica segueixen essent les principals preocupacions. Per tal d'afrontar alguna d'aquestes limitacions, s'està contemplant la possibilitat de practicar règims d'immunosupressió i injeccions intracraneals.

Pel que fa a la GD, la GT podria representar una opció terapèutica futura en aquells pacients refractaris a l'ERT i els que no tenen donadors compatibles de medul·la òssia. En un model de ratolí GD1 s'ha observat, que amb menys d'un 10% de cèl·lules progenitores hematopoètiques sanes és suficient per revertir la patologia en la medul·la òssia i la melsa (Enquist *et al.* 2009). Recentment s'ha demostrat que mitjançant la infusió de cèl·lules mare hematopoètiques autòlogues corregides *ex vivo* mitjançant vectors lentivirals, és possible reduir la simptomatologia en un ratolí GD1 (Dahl *et al.* 2015). Així doncs, aquest enfocament podria arribar a ser aplicable als pacients GD1, però és poc probable que pugui millorar les manifestacions neurològiques dels GD2 i GD3.

3.10.2.6. Noves possibles dianes terapèutiques

Recentment han sorgit noves estratègies terapèutiques basades en la comprensió dels mecanismes de la malaltia, i en particular de les vies bioquímiques descendents (*downstream*) que es veuen afectades a causa de l'acumulació del substrat en la GD.

3.10.2.6.1. Homeostasi de Ca²⁺

El Ca²⁺ és un segon missatger universal i la regulació de la seva homeòstasi és imprescindible pel correcte funcionament de moltes vies metabòliques i funcions cel·lulars. L'ER és el principal orgànul emmagatzemador de Ca²⁺ i, per tant, la sortida i l'entrada de Ca²⁺ en aquest orgànul estan regulats. La sortida es regula

mitjançant dos tipus de canals, el receptor inositol trifosfat (InsP₃R) i el receptor de rianodina (RyR) i l'entrada mitjançant l'ATPasa (bomba de Ca²⁺ SERCA) (Figura 15). S'ha demostrat que l'increment de la sortida de Ca²⁺ en l'ER en la GD és responsable de la mort cel·lular neuronal després de l'exposició d'agents neurotòxics, i en particular al neurotransmissor excitador, glutamat (Korkotian *et al.* 1999; Pelled *et al.* 2000). A més hi ha una correlació significativa entre els nivells de GlcCer acumulats i l'alliberació de Ca²⁺ (Pelled *et al.* 2005). Sembla ser que l'homeòstasi de Ca²⁺ en l'ER és clau pel correcte funcionament d'aquest. Els nivells adequats de Ca²⁺ en l'ER propicien el correcte plegament mitjançant les xaperones moleculars i, la degradació d'aquells enzims que no hagin aconseguit millorar-lo. Els nivells de Ca²⁺ en l'ER es poden augmentar mitjançant l'ús de bloquejadors dels RyRs que n'evitarien la sortida, o bé promovent-ne l'entrada en l'ER per la sobreexpressió de la bomba de Ca²⁺ (Ong *et al.* 2010). A més a més, s'ha demostrat que amb l'ús d'aquests bloquejadors, juntament amb modeladors de la proteostasi es millora el plegament, transport i activitat de l'enzim inestable GBA1-L444P (Wang *et al.* 2011).

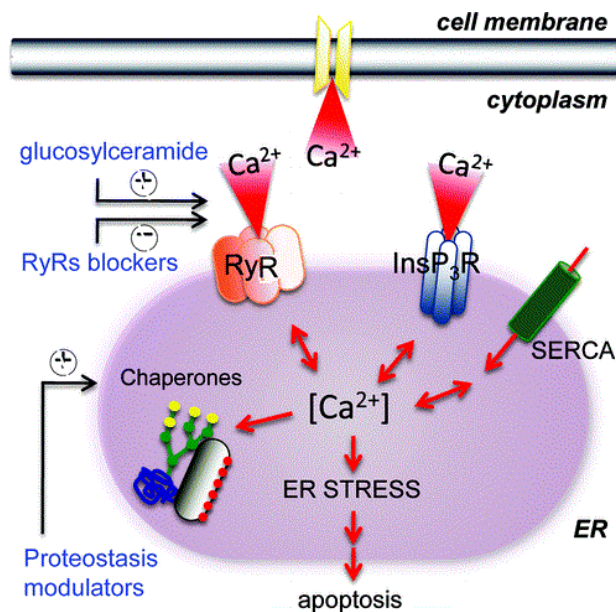


Figura 15. L'acumulació de GlcCer potencia la sortida de Ca²⁺ de l'ER a través del RyR en les neurones dels pacients Gaucher que acaba produint l'apoptosi neuronal. Paral·lelament, el Ca²⁺ té un paper molt important en l'activació d'algunes xaperones moleculars de l'ER, com la Bip/Grp78, calnexina i la calreticulina. Així doncs, fluctuacions en els nivells de Ca²⁺ en l'ER influeixen en l'activitat d'algunes d'aquestes xaperones i impossibilita el correcte plegament dels enzims GBA1 inestables. Figura extreta de Wang *et al.* 2011.

Alguns autors també van comprovar que inhibint els canals de Ca²⁺ de tipus L de la membrana plasmàtica, mitjançant el Diltiazem o el Verapamil (els dos són drogues per la hipertensió i aprovades per la FDA) s'aconseguia una restauració parcial de l'activitat GBA1 en fibroblasts de pacients homozigots per la mutació N370S o la L444P. Sembla que, en concret, el Diltiazem (Figura 14) produeix un augment de la regulació d'un subconjunt de xaperones moleculars, que inclou la Bip i la Hsp40 (Mu *et al.* 2008).

3.10.2.6.2. L'enzim GBA2

Ja s'ha comentat, en l'apartat 3.8.1.1, que en nombrosos treballs s'ha observat que hi ha una correlació entre la GD i l'augment d'activitat de l'enzim GBA2, però no es coneix del tot el paper d'aquest enzim en la simptomatologia de la malaltia. Recentment, Mistry i col·laboradors han posat de manifest que la deleció del gen *GBA2* millora significativament les manifestacions clíniques de la GD1. Van suggerir que l'esfingosina obtinguda a partir de la hidròlisi de la GlcPsy per part de l'enzim GBA2 és parcialment responsable de la patologia en la GD1 (Mistry *et al.* 2014). Així basant-nos en aquestes dades, es podria suposar que els nivells patològics d'esfingosina podrien reduir-se inhibint l'enzim GBA2 amb inhibidors com l'AMP-DNJ o el NB-DNJ i, es podria considerar com a possible teràpia per la GD1. Però en el cervell, la cosa és diferent, ja que mutacions en el gen *GBA2* produeix malalties neurològiques (Hammer *et al.* 2013; Martin *et al.* 2013). Per tant, és poc probable que l'enzim GBA2 en si esdevingui un bona diana terapèutica.

3.11. Models

3.11.1. Models murins

Els models murins de la GD han ajudat a entendre els mecanismes moleculars vinculats a l'acumulació de GlcCer, que acaben produint la disfunció cel·lular i la patologia. S'han utilitzat diferents estratègies per a generar aquests models, que s'expliquen a continuació.

3.11.1.1. Models induïble químic

El primer intent per generar un model de ratolí de la GD va ser mitjançant la utilització d'un inhibidor de l'enzim GBA1, el condritol β -epòxid (CBE) (Kanfer *et al.* 1975). Es van administrar diàriament injeccions intraperitoneals de CBE durant 3 setmanes, i es van aconseguir ratolins amb més d'un 90% d'inhibició de l'activitat GBA1 i amb acumulació de la GlcCer a la melsa, fetge i cervell. A més, els efectes eren revertits quan s'interrompia el tractament (Stephens *et al.* 1978).

3.11.1.2. Models Genètics

A) GBA1 *knockout* complet (GBA1^{-/-})

El primer model de la GD *knockout* complet es va generar l'any 1992 (Tybulewicz *et al.* 1992). Es van obtenir ratolins que presentaven menys del 4% d'activitat GBA1, respecta a la dels ratolins WT. Tenien un fenotip semblant als GD2 humans (Sidransky *et al.* 1992) i presentaven letalitat neonatal, degut a un defecte en la permeabilitat de la pell, que més tard es va també observar en pacients GD2 humans (Holleran *et al.* 1994). Aquests ratolins es van utilitzar per analitzar alguns aspectes de la neuropatologia (Willemsen *et al.* 1995).

B) Models basat en mutacions puntuals

La generació de models murins amb algunes de les mutacions conegudes del gen *GBA1* (Liu *et al.* 1998; Mizukami *et al.* 2002; Xu *et al.* 2003) va permetre estudiar més a fons la GD, ja que l'afectació que presentaven aquests ratolins majoritàriament era menor, en excepció dels ratolins amb la mutació puntual N370S, els quals morien a les 24 hores després del naixement, també per problemes cutanis (Xu *et al.* 2003).

C) Models condicionals

Els models condicionals van representar un gran avanç en la generació de models de ratolins amb la GD, ja que recapitulaven els símptomes clínics de la malaltia d'una manera molt més rigorosa que els models anteriors. Es van generar mitjançant el sistema Cre-loxP i d'aquesta manera es podien mantenir els nivells d'activitat *GBA1* normals durant el desenvolupament, per tal d'evitar desordres en la formació de la barrera de la pell. Es van generar models GD1 (Enquist *et al.* 2006; Mistry *et al.* 2010; Sinclair *et al.* 2007) i també models neuronopàtics (Enquist *et al.* 2007; Xu *et al.* 2008).

3.11.2. Models cel·lulars

3.11.2.1. Químics induïbles (amb el CBE)

La manera més simple de generar models cel·lulars de la GD és mitjançant el tractament de les cèl·lules amb el CBE. Hi ha autors que han utilitzat aquest inhibidor per tractar macròfags per tal d'imitar les cèl·lules Gaucher (Hein *et al.* 2007; Kacher *et al.* 2007; Trajkovic-Bodennec *et al.* 2004), o cèl·lules neuronals per estudiar la neuronopatologia en la GD2 i GD3 (Pelled *et al.* 2000; Prence *et al.* 1996) o precursors de cèl·lules òssies per estudiar la patofisiologia òssia en la GD (Lamghari *et al.* 2005; Lecourt *et al.* 2012; Mucci *et al.* 2012, 2013).

3.11.2.2. Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC)

Les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) van ser generades per primera vegada pel grup de Yamanaka (Takahashi *et al.* 2007) a partir de cèl·lules humanes adultes. Les iPSC, igual que les cèl·lules mare embrionàries humanes (hESCs), podien diferenciar-se a qualsevol tipus cel·lular per poder ser estudiat (Figura 16). L'avantatge de les iPSC respecte les hESCs és que minimitzen considerablement els aspectes ètics vinculats a l'ús d'aquestes últimes i, per tant, han esdevingut una eina molt potent a l'hora de modelitzar un gran número de malalties. Yamanaka va ser guardonat amb el premi Nobel de Medicina l'any 2012, per aquest descobriment.

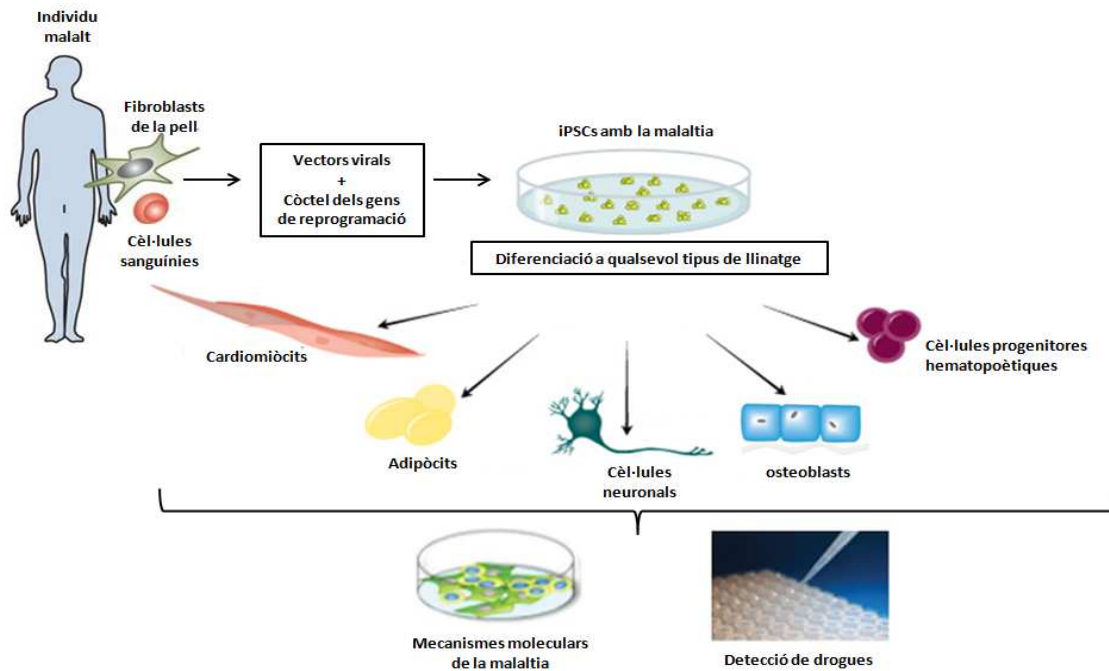


Figura 16. Generació de les iPSCs d'un pacient amb la malaltia a estudiar a partir de cèl·lules somàtiques (per exemple de fibroblasts de la pell o cèl·lules de la sang) mitjançant un determinat mètode de reprogramació. Posteriorment es poden diferenciar *in vitro* a qualsevol tipus de llinatge cel·lular.

Inicialment, la inducció de l'estat de pluripotència s'aconseguia a partir de fibroblasts als quals se'ls transduïa retrovirus portadors de 4 factors de reprogramació: OCT4, SOX2, KLF4 i c-MYC (també conegut com a OSKM o còctel de Yamanaka) (Takahashi i Yamanaka 2006; Takahashi *et al.* 2007). Més tard, es van desenvolupar nous sistemes de reprogramació, tals com l'ús d'altres còctels (OCT4, SOX2, NANOG i LIN28), d'altres vectors (com els lentivirus o virus no-integretius) i també es van utilitzar diferents tipus de cèl·lules somàtiques (Revisat a González *et al.* 2011). Quan sorgeixen les colònies d'iPSC, cada una provinent d'una cèl·lula reprogramada, se n'escull alguna i s'han de validar de manera independent (revisat a Tiscornia *et al.* 2011).

3.11.2.2.1. L'ús d'iPSC en el modelatge de LSD

Per a les LSD, actualment ja s'han desenvolupat a partir d'iPSC diferents models cel·lulars humans (Park *et al.* 2008; Huang *et al.* 2012), tals com: el síndrome de Hurler (Tolar *et al.* 2011), la malaltia de Pompe (Higuchi *et al.* 2014; Huang *et al.* 2011), el síndrome de Sanfilippo B (Lemonnier *et al.* 2011) i Niemann-Pick tipus C (Trilck *et al.* 2013). Cal destacar que la malaltia de Gaucher, degut a la seva major incidència, és la LSD més modelitzada per aquest tipus d'estratègia. Actualment, diversos grups han generat macròfags (Panicker *et al.* 2012, 2014; Tiscornia *et al.* 2013) i cèl·lules neuronals (Mazzulli *et al.* 2011; Schöndorf *et al.* 2014; Sun *et al.* 2015; Tiscornia *et al.* 2013) a partir de cèl·lules iPS de pacients Gaucher.

3.12. Manifestacions òssies en la GD

3.12.1. Clínica de les manifestacions òssies

Està descrit que un 90% dels pacients Gaucher presenten afectació òssia. Aquest tipus de simptomatologia afecta sobretot als GD1, però també als GD3. Els pacients GD2 no mostren manifestacions òssies clínicament rellevants, degut a que moren abans dels 2-3 anys d'edat com a conseqüència del ràpid deteriorament neurològic que presenten. Les principals manifestacions òssies que pateixen els pacients Gaucher inclouen:

- **Deformatat de flascó d'Erlenmeyer:** és una anomalia que normalment s'evidencia en la part distal del fèmur, però en algunes ocasions també es pot observar en les regions metafisàries d'altres ossos tubulars, en particular, a la tibia proximal (Figura 17A). Aquesta anomalia resulta de l'alteració del remodelat ossi (Caixa 5) de dins la metàfisi i l'aprimament cortical anormal a causa de la infiltració de les cèl·lules Gaucher en la medul·la òssia (Faden *et al.* 2009). No es correlaciona amb la severitat de la malaltia òssia.
- **Osteopènia i osteoporosi:** és la reducció de la densitat mineral òssia (DMO) que incrementa el risc de fractures.
- **Lesions osteolítiques:** són perforacions òssies que es produeixen a causa de la destrucció òssia (Figura 17C). Es podria explicar per l'activació dels osteoclasts i l'alliberació de catepsina K per part d'aquests (Moran *et al.* 2000). La catepsina K és una col·lagenasa que s'expressa de forma específica en els osteoclasts i és essencial per la degradació de la matriu de col·lagen.
- **Infart ossi, crisis òssies i osteomielitis:** els infarts ossis (Figura 17B) es poden produir per l'alteració de la vascularització com la trombosis, la infiltració de les cèl·lules Gaucher en la medul·la òssia i els possibles processos inflamatoris addicionals. Poden ser asimptomàtics o produir episodis de dolor agut acompanyat de febre, increment del número de leucòcits i de la taxa de sedimentació eritrocitària, donant lloc a les crisis òssies que, esporàdicament, poden desencadenar una osteomielitis asèptica.
- **Osteonecrosi:** es creu que és una conseqüència secundària a la isquèmia a causa de l'infart ossi crònic.

- **Osteosclerosi:** pot ocórrer a causa d'un remodelat incorrecte després de l'infart ossi, amb engrossiment de l'os, augment de la seva densitat i possible disminució de l'espai medul·lar. Sol anar acompanyada de dolor.

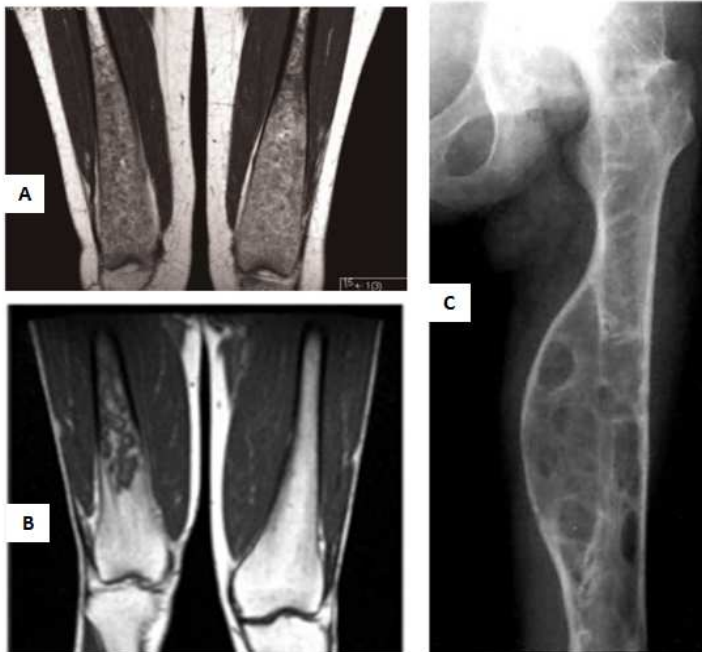


Figura 17: Algunes de les manifestacions òssies. A) Deformitat de flasó d'Erlenmeyer. B) El fèmur esquerra (dreta en la figura) presenta una aparença normal, mentre que en el dret (esquerra en la figura) s'observa un infart ossi. C) Aprimament cortical i diverses lesions osteolítiques. Figura adaptada de Mikosch i Hughes 2010.

3.12.2. Resposta de les manifestacions òssies a la teràpia

Ja s'ha comentat que la teràpia de reemplaçament enzimàtic (ERT) ha demostrat ser molt eficaç en la reversió de la citopènia i la reducció dels volums dels òrgans. No obstant, les manifestacions òssies responen més lentament. La reducció de la càrrega de les cèl·lules Gaucher en la medul·la òssia tarda aproximadament 1 any (Hollak *et al.* 2001), mentre que la millora en la densitat òssia i les lesions focals és més lenta i menys consistent (Ciana *et al.* 2005; Schiffmann *et al.* 2002). A més, els pacients que no han estat tractats durant un llarg període de temps i, especialment, aquells que ja presentaven diversos problemes ossis abans d'iniciar la teràpia, poden no respondre a aquesta (De Fost *et al.* 2008).

Els bisfosfonats inhibeixen la resorció òssia osteoclàstica, per tant s'ha suggerit que podrien ser utilitzats com a teràpia adjuvant (juntament amb l'ERT) pel tractament de les complicacions òssies (Ostlere *et al.* 1991; Samuel *et al.* 1994; Wenstrup *et al.* 2004). No obstant, s'han descrit que poden produir efectes contradictoris (positius i negatius) en la densitat mineral òssia (DMO) i en les lesions focals. A més a més, els efectes sobre la resistència òssia i el risc de fractura són desconeguts (Cox *et al.* 2008; van Dussen *et al.* 2011).

Així doncs, la millora de la simptomatologia òssia, malgrat el tractament enzimàtic i/o els bisfosfonats, és un dels reptes principals de la patologia de la GD, donat que és un dels aspectes més debilitants de la malaltia. Els pacients Gaucher

freqüentment han de fer front a episodis aguts o crònics de dolor ossi d'intensitat variable. Per tant, els problemes ossis en la GD i les seves complicacions tals com les crisis òssies, l'osteonecrosi, la destrucció d'articulacions o les fractures, suposen una gran càrrega pels pacients i, per tant, comprometen la seva qualitat de vida (Giraldo 2005)

3.12.3. Fisiopatologia de la malaltia òssia

Els mecanismes responsables de l'afectació òssia no es coneixen totalment. Moltes de les manifestacions òssies comentades es poden explicar per un desequilibri del remodelat ossi (Caixa 5). Els marcadors del metabolisme ossi són de gran ajuda per avaluar l'activitat osteoblàstica i osteoclàstica (veure apartat 4), però la inconsistència en la seva expressió entre estudis fa que els mecanismes moleculars que hi tenen lloc siguin encara poc coneguts (Drugan *et al.* 2002; van Dussen *et al.* 2011; Giuffrida *et al.* 2012). A més, les causes d'aquest desequilibri es coneixen de forma parcial. D'altra banda, es creu que hi ha una acció conjunta de les cèl·lules Gaucher, el sistema immunitari i les cèl·lules òssies, tant osteoblasts com osteoclasts.

La infiltració de les cèl·lules Gaucher en la medul·la òssia sembla ser el primer pas del procés patològic. Aquest procés causa l'obstrucció mecànica i altera la vascularització i la pressió normals de la medul·la òssia, fet que pot portar a la trombosi o l'infart localitzat (Mikosch i Hughes 2010).

De forma paral·lela, sembla ser que les cèl·lules Gaucher poden induir canvis en l'expressió de citocines, que activarien als macròfags i altres cèl·lules immunitàries, que a través d'altres citocines podrien acabar produint alteracions en el remodelat ossi (Stowens *et al.* 1985). Els estudis sobre l'estat pro-inflamatori en pacients Gaucher s'han centrat principalment en analitzar els nivells d'algunes citocines en el sèrum, com per exemple: IL(interleuquina)-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, sIL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , TGF- β , M-CSF, MIP-1, i CCL18 (Allen *et al.* 1996; Barak *et al.* 1999; Boot *et al.* 2004; van Breemen *et al.* 2007; Hollak *et al.* 1997; Michelakakis *et al.* 1996; Yoshino *et al.* 2007). Però hi ha una gran variació en els nivells d'aquestes entre pacients, per tant es fa difícil predir la implicació de cada citocina en la patologia òssia. A continuació es recullen alguns dels canvis més ben fomentats en la possible implicació d'algunes citocines i de les cèl·lules del sistema immunitari en la simptomatologia òssia de la GD.

- La IL-10 podria inhibir l'activitat osteoblàstica, mentre que la IL-1 β , IL-6 i el M-CSF podrien augmentar la resorció òssia a causa de l'activació i la formació dels osteoclasts. De fet, l'osteoporosi en la GD es podria explicar per canvis en aquestes citocines (Allen *et al.* 1996).
- Les proteïnes inflamatòries de macròfags, MIP-1a i MIP-1b, les quals augmenten la resorció osteoclàstica en el mieloma múltiple, també es

troben elevades en pacients Gaucher amb problemes ossis (van Breemen *et al.* 2007). Per tant, es suggereix la seva implicació en la funció osteoclàstica.

- S'han observat alteracions en el nombre total de limfòcits T (sobretot els CD8⁺) en malalts Gaucher que presenten alteracions òssies. A més a més, també s'ha evidenciat una correlació significativa inversament proporcional entre el número de limfòcits T CD8⁺ i l'increment de l'activitat TRAP (marcador d'activitat osteoclàstica)(Lacerda *et al.* 1999).
- Més recentment, Mucci i col·laboradors, mitjançant un model murí, van observar que les cèl·lules T i la citocina TNF- α juguen un paper important en l'osteoclastogènesi en la GD (Mucci *et al.* 2012).

CAIXA 5: El remodelat ossi

És un procés regulat contínuament per l'equilibri entre la resorció per part dels osteoclasts i la formació d'os per part dels osteoblasts, per tal de mantenir l'estructura i la mineralització òssia normals i respondre a les demandes d'ions de l'organisme i les seves necessitats mecàniques. El cicle de remodelat ossi s'inicia amb una fase de resorció de la matriu per part dels osteoclasts, els quals posteriorment es desprenen de la superfície de l'os i els osteoblasts madurs sintetitzen i dipositen una nova matriu, que omplir la llacuna de resorció prèviament formada.

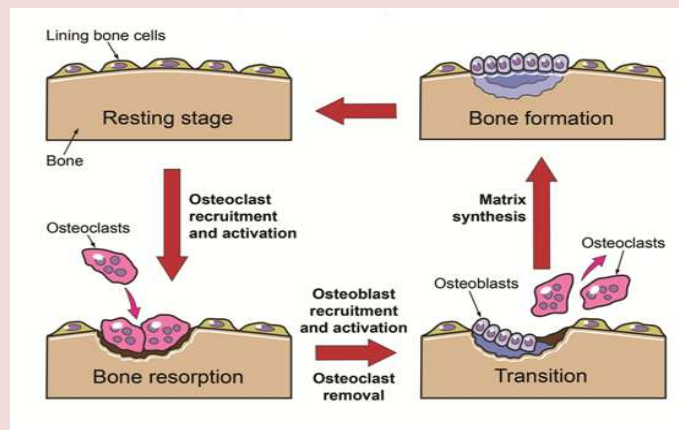


Figura extreta de: <http://pixshark.com/bone-remodeling.htm>

Com ja s'ha esmentat, les cèl·lules Gaucher i les citocines poden trencar l'equilibri que hi ha en el remodelat ossi. No obstant, recentment, s'han postulat diverses teories per explicar el trencament de l'homeòstasi en l'os en la GD, com a conseqüència d'una disfunció intrínseca dels osteoclasts, osteoblasts i/o les cèl·lules mare mesenquimals (MSC). A continuació s'exposen alguns models experimentals que han servit per avaluar aquesta possible disfunció intrínseca de les cèl·lules òssies i dels seus precursors en la GD:

Campeu i col·laboradors van ser els primers en demostrar que les MSC d'un pacient GD1 adult amb genotip N370S/L444P, tot i presentar un fenotip i una capacitat de diferenciar-se normals, tenien un secretoma inflamatori alterat, amb uns nivells incrementats de ciclooxigenase-2 (COX2), IL-8, prostaglandina-E2 (PGE2) i CCL2, comparat amb els nivells que presentaven les MSC provinents de donants sans. Per tant, es va demostrar que la deficiència enzimàtica de l'enzim GBA1 produeix defectes intrínsec en les MSC, alterant els nivells d'expressió d'algunes citocines, que acaben contribuint en les manifestacions esquelètiques i immunitàries presents en la GD, d'una manera diferent i additiva de com ho fan les cèl·lules Gaucher (Campeau *et al.* 2009).

Recentment, Mistry i col·laboradors van generar un model de ratolí *knockout* condicionat de la GD, en el que delectaven el gen *GBA1* en les cèl·lules del llinatge hematopoètic i mesenquimal. Aquest ratolí presentava les principals característiques clíniques dels GD1 (Mistry *et al.* 2010). Cal destacar que també mostrava manifestacions òssies, les qual no s'havien observat en cap dels models murins anteriorment generats. Aquestes incloïen infart medul·lar amb osteonecrosis i osteopènia generalitzada. A més, van observar un deteriorament significatiu en la capacitat proliferativa dels osteoblasts mentre que la diferenciació i l'activació osteoclàstica no semblaven estar alterades. Es va evidenciar que el deteriorament de la proliferació dels osteoblasts era depenent d'una disminució de l'activitat de la proteïna cinasa C (PKC), a causa de l'acumulació de la GlcPsy i, en menor mesura, de la GlcCer. De fet, estudis recents anomenen l'esfingosina com el principal candidat per explicar l'afectació dels osteoblasts en el model de ratolí (Mistry *et al.* 2014). Per tant, aquestes dades suggereixen que les complicacions òssies en la GD serien el resultat de la disfunció osteoblàstica, sense la implicació dels osteoclasts (Mistry *et al.* 2010, 2014).

Diversos autors van apostar per l'elaboració de models químics de la GD, mitjançant la utilització del CBE, a fi d'inhibir l'enzim GBA1 dels progenitors osteoblàstics (MSC) o osteoclàstics (monòcits) i poder avaluar els efectes d'aquesta inhibició:

Lecourt i col·laboradors van mostrar que el tractament de MSC o monòcits amb CBE no afectava a la diferenciació d'aquestes cèl·lules a osteoblasts ni a osteoclasts, respectivament. Per tant, van suggerir que els problemes ossis observats en la GD no eren una conseqüència intrínseca de la diferenciació anormal dels progenitors osteoblàstics ni dels osteoclàstics. D'altra banda, quan van cultivar monòcits amb presència del medi condicionat per les MSC tractades amb CBE, van observar un augment de la funció osteoclàstica. Això va suggerir, que la deficiència induïda *in vitro* de l'activitat GBA1 produeix una activació osteoclàstica a causa d'una estimulació extrínseca. Les citocines, secretades per les MSC tractades amb CBE, podrien ser les causants d'aquesta estimulació (Lecourt *et al.* 2012).

Utilitzant un enfocament similar, Mucci i col·laboradors van tractar precursors osteoclastics (cèl·lules THP-1; línia cel·lular que deriva de la sang d'un pacient amb leucèmia monocítica aguda) amb un medi condicionat per cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs), que havien estat tractades amb CBE. Van observar que es generaven nivells augmentats de diferenciació osteoclàstica (osteoclastogènesi) quan els comparaven amb la condició control. També van demostrar que la citocina TNF- α i les cèl·lules T jugaven un important paper en aquest procés d'osteoclastogènesi (Mucci *et al.* 2012). Un any més tard, els mateixos autors van apuntar la importància del TNF- α , quan van utilitzar precursors osteoclàstics provinents d'un ratolí deficient en el receptor TNF- α , ja que s'observava una disminució en la diferenciació cap a osteoclasts madurs. A més a més, també van evidenciar una reducció significativa del bon funcionament dels osteoblasts (disminució de l'activitat fosfatasa alcalina, la producció de col·lagen i la mineralització), quan tractaven la línia MC3T3 (línia cel·lular de ratolí precursora d'osteoblasts) amb CBE (Mucci *et al.* 2013). Amb aquests resultats van confirmar l'afectació tant en l'activitat osteoclàstica com l'osteoblàstica en la GD, que conduïa a la pèrdua d'os i on la participació de les cèl·lules i les molècules del sistema immunitari hi tenien un paper important.

Reed i col·laboradors van aïllar PBMC de pacients Gaucher i, van demostrar que quan els monòcits d'aquests estaven exposats per mediadors osteoclastogènics (M-CSF i el RANKL) es diferenciaven abans i en major nombre, en comparació amb els monòcits provinents de PBMC de persones sanes (controls). A més, els osteoclasts Gaucher també eren significativament més actius i més grans que els osteoclasts control. També van mostrar que els monòcits amb major potencial osteoclastogènic provenien de pacients que tenien major afectació òssia (Reed *et al.* 2013).

4. PETIT INCÍS: OSTEOIMMUNOLOGIA

Existeixen moltes interaccions entre l'os i les cèl·lules dels sistema immunitari (Nakashima i Takayanagi 2009):

L'os i les cèl·lules immunitàries comparteixen els mateixos progenitors els quals resideixen en la medul·la òssia i estan sota l'efecte de les mateixes molècules, incloent les citocines. Aquestes molècules poden tenir una gran influència en el procés d'hematopoesi, la resposta immunitària local i el desenvolupament de les cèl·lules òssies.

Les **cèl·lules T** activades són les protagonistes principals de les cèl·lules del sistema immunitari, que influeixen en el desenvolupament i l'activitat cel·lular de l'os. Després de l'activació específica d'antigen, les cèl·lules T produeixen una sèrie de citocines pro-inflamatòries que poden activar de forma directa o indirecta les cèl·lules implicades en el remodelat ossi, produint un desequilibri entre la resorció i la formació d'os.

Els **osteoblasts** són els responsables de la formació d'os i s'originen a partir de la medul·la òssia, on resideixen les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) multipotents. Aquestes cèl·lules poden influir en les immunitàries, i són unes reguladores de la diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC) cap a immunitàries o altres tipus cel·lulars, com per exemple els osteoclasts (Yin i Li 2006). Els osteoblasts poden esdevenir cèl·lules de revestiment si romanen a la superfície de l'os, o **osteòcits** si queden atrapats dins la matriu òssia i són responsables del seu manteniment. D'altra banda, una part dels osteoblasts acaben entrant en apoptosi (Figura 19).

Els **osteoclasts** són cèl·lules grans, polinuclears i són els encarregats de la resorció òssia (Figura 18). Provenen dels mateixos progenitors que els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (llinatge monocític). RANKL i el factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF) són essencials per la diferenciació osteoclàstica i la supervivència d'aquests (Boyle *et al.* 2003).

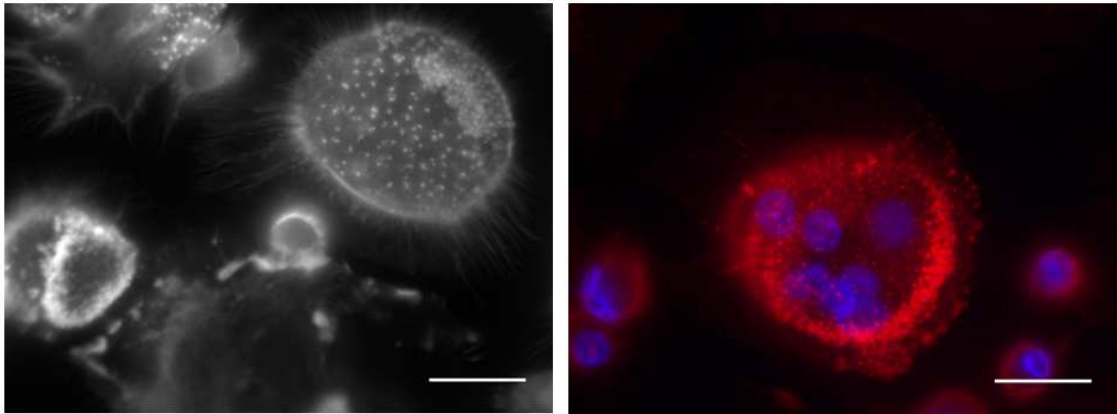


Figura 18. Osteoclasts d'una persona sana. A la imatge de l'esquerra es visualitzen les prolongacions dels osteoclasts que els hi serviran per ancorar-se a la matriu òssia perquè tingui lloc la resorció. A la dreta, s'aprecia que és una cèl·lula multinucleada (amb blau) amb un citoesquelet d'actina (amb vermell) que s'ha reordenat formant un anell. La barra d'escala equival a 25µm.

Sistema OPG/RANK/RANKL:

- **RANKL** és una proteïna que pertany a la superfamília del TNF i està codificada pel gen *TNFSF11*. Es pot trobar ancorada a membrana o bé de forma soluble (Kanamaru *et al.* 2004). Encara que les dos formes de la proteïna tenen activitat osteoclastogènica, la forma transmembrana és més eficient (Nakashima *et al.* 2000). RANKL s'expressa en la superfície o és alliberada per part dels osteoblasts en els diferents estadis de diferenciació. Sembla que els osteocits són els que n'expressen/n'alliberen en més quantitat (Nakashima *et al.* 2011), però també ho fan: les cèl·lules estromals d'origen indefinit, les cèl·lules B i T, els fibroblasts sinovials (estan en la membrana sinovial articular), els condrocits hipertròfics i inclús els mateixos osteoclasts. Per tant totes les cèl·lules anteriors poden controlar la resorció òssia mitjançant RANKL.
- El receptor de RANKL és **RANK** que està codificat pel gen *TNFRSF11A*. Després de l'estimulació de RANK per RANKL sota senyals co-estimuladores, tals com el M-CSF, comença el procés de diferenciació i maduració dels osteoclasts (Boyle *et al.* 2003).
- A banda d'això, hi ha una tercera proteïna soluble que juga un paper important en el sistema RANK/RANKL, l'osteoprotegerina (**OPG**), que és codificada pel gen *TNFRSF11B*. L'OPG modula la unió RANK/RANKL, mitjançant la connexió amb RANKL i impedit que aquest interaccioni amb RANK, i per tant l'osteoclastogènesi (Simonet *et al.* 1997). L'OPG és expressada per els osteoblasts i altres cèl·lules mesenquimals.

L'osteoclastogènesi és regulada positivament o negativament per factors com la vitamina D3, la prostaglandina E2 o la hormona paratiroide. Les citocines IL-1 β , IL-

6, IL-11, IL-17 i TNF- α també n'augmenten l'expressió de les dos formes de RANKL i en canvi disminueixen la d'OPG (Nakashima *et al.* 2000).

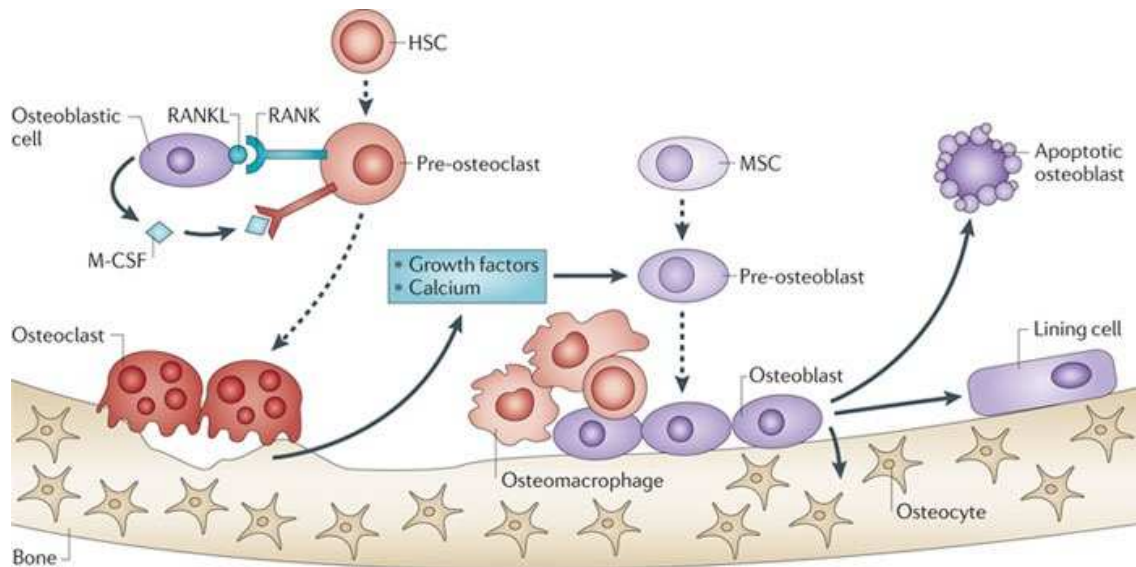
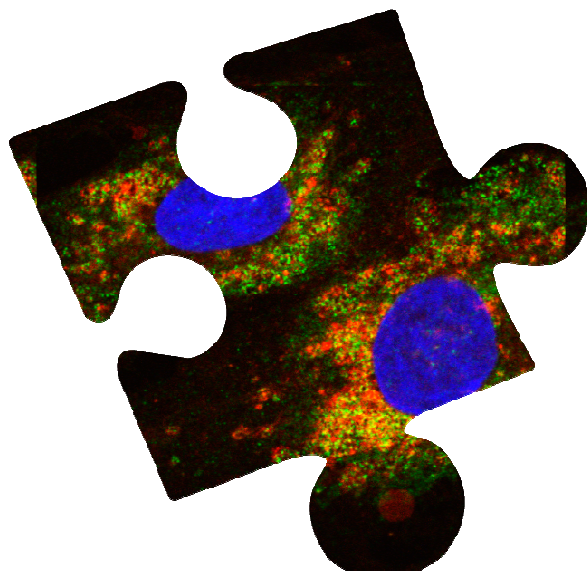


Figura 19. Interacció entre els osteoblasts i els osteoclasts durant el remodelat ossi. Les HSC són les precursoras dels osteoclasts, que són els responsables de la resorció òssia i alliberen factors de creixement i calci, que d'alguna manera activaran l'osteoblastogènesi a partir de les MSC. Els osteoblasts reemplaçaran els buits amb nou os, començant amb la producció de col·lagen de tipus 1 i la seva posterior mineralització, formant la matriu òssia calcificada. Les cèl·lules del llinatge osteoblàstic (des de les MSC als osteòcits) poden activar l'osteoclastogènesi mitjançant RANKL (tant la forma transmembrana com la soluble). Figura extreta de Weilbaecher *et al.* 2011.



OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els objectius principals d'aquesta tesi van ser, per una banda, la identificació de noves xaperones farmacològiques (XF) com a estratègia terapèutica per a la malaltia de Gaucher i, per l'altra, entendre els mecanismes moleculars que tenen lloc en la patofisiologia òssia d'aquesta malaltia.

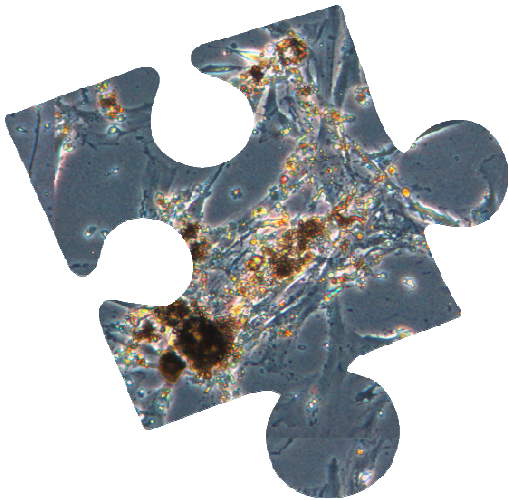
Els objectius concrets plantejats van ser:

Identificació de noves xaperones farmacològiques (XF)

- Analitzar l'efecte XF de 9 compostos de la família dels aminociclitols (compostos LD) i 6 compostos de la família dels iminoxilitols (compostos DIX). Tots ells sintetitzats pel grup "Rubam" (CSIC-UB) amb el qual col·laborem.
- Comprovar la selectivitat d'aquests compostos envers altres glicosidases i l'enzim GBA2.
- Avaluar, pels compostos més efectius, la capacitat de millorar el transport de l'enzim mutat al compartiment lisosomal.
- Avaluar, per alguns d'ells, la capacitat de disminuir el substrat GlcCer acumulat.

Estudi dels mecanismes moleculars en la patofisiologia òssia en la GD

- Generar un model mesenquimal (MSC) i osteoblàstic de la GD mitjançant l'ús de cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC) amb genotips diferents del gen *GBA1* i d'un genotip WT.
- Avaluar la possible existència d'una disfunció intrínseca del llinatge osteoblàstic en la GD, comparant la capacitat de diferenciació osteoblàstica de les MSC GD amb la de les MSC WT.
- Avaluar la capacitat de les cèl·lules de llinatge osteoblàstic de la GD d'incrementar o potenciar l'osteoclastogènesi.



RESULTATS

INFORME DELS DIRECTORS DE TESI SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DEL DOCTORAND A LES PUBLICACIONS PRESENTADES

Títol de la tesi: “GENERACIÓ D’UN MODEL CEL·LULAR OSTEUBLÀSTIC I APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES PER A LA MALALTIA DE GAUCHER”

Autora: Jenny Serra Vinardell

Directors: Daniel Grinberg Vaisman i Lluïsa Vilageliu Arqués

CAPÍTOL 1.

Identificació de noves xaperones farmacològiques

Article 1

Títol: Efecte xaperona selectiu de derivats d’aminociclitols sobre l’enzim amb la mutació G202R i altres glucocerebrosidases mutades que causen la malaltia de Gaucher.

Autors: Jenny Serra Vinardell, Lucía Díaz, Hugo Guitiérrez de Terán, Gessamí Sánchez Ollé, Jordi Bujons, Helen Michelakakis, Irene Mavridou, Johannes M F G Aerts, Antonio Delgado, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Josefina Casas.

Publicació: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 54: 245-254, 2014.

Índex de qualitat: SCI2013/2014 = 4,24. Quartil 2 de les categories BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY i CELL BIOLOGY.

Aportació de l’autora a l’article: Assajos de l’efectivitat dels compostos sobre diferents enzims GBA1 mutats, assaig de la selectivitat dels compostos, immunofluorescència i imatges de microscòpia confocal. Anàlisi estadístic i interpretació dels resultats. Participació en el redactat del primer esborrany del manuscrit i de l’edició final.

Article 2

Títol: Potenciadors de la glucocerebrosidasa per genotips seleccionats de la malaltia de Gaucher que s’han sintetitzat per modificació dels imino-D-xilitols (DIXs) amb substitució del C-1- α .

Autors: Jenny Serra Vinardell, Lucía Díaz, Josefina Casas, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Helen Michelakakis, Irene Mavridou, Johannes M F G Aerts, Camille Decroocq, Philippe Compain, Antonio Delgado.

Publicació: *ChemMedChem*. 9: 1744–1754, 2014.

Índex de qualitat: SCI2013/2014 = 3,046. Quartil 2 de les categories MEDICINAL CHEMISTRY i PHARMACOLOGY & PHARMACY.

Aportació de l'autora a l'article: Estudis bioquímics, assajos de citotoxicitat, assajos de l'efectivitat dels compostos sobre diferents enzims GBA1 mutats, assaig de la selectivitat dels compostos, immunofluorescència i imatges de microscòpia confocal, anàlisi estadístic i interpretació dels resultats. Participació en el redactat del primer esborrany del manuscrit i de l'edició final.

CAPÍTOL 2.

Elaboració d'un model osteoblàstic de la malaltia de Gaucher

Article 3

Títol: Elaboració d'un model osteoblàstic de la malaltia de Gaucher mitjançant l'ús d'iPSC.

Autors: Jenny Serra Vinardell *et al.*

Publicació: Manuscrit en preparació

Aportació de l'autora a l'article: La totalitat del treball experimental i l'esborrany de l'article presentat en aquest manuscrit ha estat realitzat per la doctoranda.

Barcelona, 3 de Juny de 2015

Signatura dels directors

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

CAPÍTOL 1

Identificació de noves xaperones farmacològiques

Article 1

Efecte xaperona selectiu de derivats d'aminociclitols sobre l'enzim amb la mutació G202R i altres glucocerebrosidases mutades que causen la malaltia de Gaucher.

RESUM

La malaltia de Gaucher (GD) és un trastorn lisosomal autosòmic recessiu caracteritzat per l'acumulació de glucosilceramida, com a resultat d'una deficiència de l'enzim glucocerebrosidasa. Diversos inhibidors competitiu d'aquest enzim són capaços d'actuar com a xaperones farmacològiques, rescatant eficientment aquelles formes que presenten un mal plegament. En aquesta línia, aquest treball presenta diversos aminociclitols amb la capacitat d'augmentar l'activitat residual de la glucocerebrosidasa en fibroblasts de pacients Gaucher amb diferents genotips. Alguns dels compostos van ser lleugerament actius sobre alguns enzims procedents de fibroblasts portadors de mutacions del gen *GBA1*, com la mutació N370S que és la més prevalent. Tots els compostos van ser capaços d'augmentar l'activitat enzimàtica dels fibroblasts Gaucher portadors de la mutació G202R. A més, la utilització d'una esfingosina marcada amb un N₃ (ω N₃Sph) ens va permetre observar una reducció de l'acumulació de glucosilceramida, després del tractament amb alguns aminociclitols. Els experiments d'immunolocalització en els fibroblasts amb genotip G202R/G202R van evidenciar un lleuger increment de la co-localització de l'enzim en el compartiment lisosomal, després d'haver estat tractats amb alguns aminociclitols. Aquest fet indica certa milloria en el transport lisosomal de l'enzim G202R.

REFERÈNCIA

Jenny Serra Vinardell*, Lucía Díaz*, Hugo Guitiérrez de Terán, Gessamí Sánchez Ollé, Jordi Bujons, Helen Michelakakis, Irene Mavridou, Johannes M F G Aerts, Antonio Delgado, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Josefina Casas. Selective chaperone effect of aminocyclitol derivatives on G202R and other mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 54: 245-254, 2014

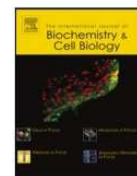
* Autors que han contribuït equivalentment a l'article.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel



Selective chaperone effect of aminocyclitol derivatives on G202R and other mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease



Jenny Serra-Vinardell^{a,1}, Lucía Díaz^{b,c,1}, Hugo Gutiérrez-de-Terán^d,
Gessamí Sánchez-Ollé^a, Jordi Bujons^e, Helen Michelakakis^f, Irene Mavridou^f,
Johannes M.F.G. Aerts^g, Antonio Delgado^{b,c}, Daniel Grinberg^a,
Lluïsa Vilageliu^{a,2}, Josefina Casas^{b,*,2}

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

^b Research Unit on BioActive Molecules (RUBAM), Departament de Química Biomèdica, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

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

^d Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Biomedical Center, Box 596, SE-751 24, Uppsala, Sweden

^e Departament de Química Biològica i Modelització Molecular, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^f Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of Child Health, Athens 11527, Greece

^g Department of Medicinal Biochemistry, Academic Medical Center, Meibergdreef 15, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2014

Received in revised form 4 July 2014

Accepted 22 July 2014

Available online 30 July 2014

Keywords:

Glucosylceramide

Fibroblast

G202R mutation

Gaucher disease

Pharmacological chaperone

ABSTRACT

Gaucher disease is an autosomal recessive lysosomal disorder characterized by the accumulation of glucosylceramide as a result of a deficiency of the enzyme glucocerebrosidase. Several competitive glucocerebrosidase 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 glucocerebrosidase activity in patient fibroblasts with different genotypes. Some of the compounds were slightly active on fibroblasts bearing some mutations, including the highly prevalent N370S mutation. All compounds were highly active as enzyme activity enhancers on fibroblasts from Gaucher disease patients containing the G202R mutation. Moreover, using the novel tagged sphingolipid ω -azidosphingosine, a reduction in the tagged glucosylceramide accumulation was also observed for selected aminocyclitols. Attempts to explain the activity impairment observed in glucocerebrosidase bearing the G202R mutation by comparative molecular dynamic studies on wild type and the G202R mutated proteins (free and isofagomine-bound, in both cases) were unsuccessful. Under the simulation conditions used, no clear effect of the G202R mutation neither over the global structure of the protein nor on the loops that constitute the glucocerebrosidase active site was observed. Since the G202R residue is located on the protein surface, altered protein-membrane or protein-protein interactions could account for the observed differences. In conclusion, we have tested novel compounds that have shown some chaperone effect on particular glucocerebrosidase mutant enzymes, supporting the enhancement therapy as an alternative approach for Gaucher disease.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; CBE, conduritol β -epoxide; Cer, ceramide; D-MEM, Dulbecco Eagle's minimal essential medium; ERT, enzyme replacement therapy; GBA1, lysosomal glucocerebrosidase; GBA2, non-lysosomal glucocerebrosidase; GlcCer, glucosylceramide; GD, Gaucher disease; GlcCerS, glucosylceramide synthase; IFG, isofagomine; LCS, lactosyl ceramide synthase; MD, molecular dynamics; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NBDNJ, *N*-butyldeoxyjirimycin; NNDNJ, *N*-(*n*-nonyl)deoxyjirimycin; RMSF, root mean square fluctuation; Sap C, saposin C; SM, sphingomyelin; WT, wild type; ω N₃Sp, ω -azidosphingosine.

* Corresponding author. Tel.: +34 934006115; fax: +34 932045904.

E-mail address: finn.casas@iqac.csic.es (J. Casas).

¹ Both authors contributed equally to the work.

² Co-last authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biociel.2014.07.017>

1357-2725/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lysosomal storage diseases are a group of disorders mainly caused by the loss of function of lysosomal enzymes, which leads to the intra-lysosomal 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 the deficiency of glucocerebrosidase (GBA1, E.C. 3.2.1.45), which produces the progressive accumulation of glucosylceramide (GlcCer). 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, as well as neurological features in types II and III (Beutler and Gelbart, 1997; Grabowski, 2008).

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 hematological symptoms of type I patients (Grabowski, 2008). However, since the recombinant enzyme does not cross the blood–brain barrier (BBB), its efficacy in neurological involvement is, if any, limited (Schiffmann et al., 1997). 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 (GlcCerS), the enzyme involved in the rate-limiting first step in the glycosphingolipid biosynthetic pathway, by the oral administration of *N*-butyldeoxynojirimycin (NBDNJ, miglustat, Zavesca®, Fig. 1) (Cox et al., 2000). This reduction therapy is used for type I patients for whom ERT is not a therapeutic option. The small size of NBDNJ makes it of potential use for neurological forms of the disease.

On the other hand, to date other alternative strategies, such as gene therapy, have had very limited success in the treatment of GD. However, new experimental approaches either for conventional gene therapy or based on the partial inhibition of the GlcCerS gene using siRNAs, have been evaluated in cellular and animal models (Enquist et al., 2006; McEachern et al., 2006) (Díaz-Font et al., 2006) with promising results.

In the last few years, a new line of research based on the use of pharmacological chaperones has emerged (Fan, 2003). This approach is based on the assumption that some mutations cause or result in enzyme misfolding and its premature degradation in the endoplasmic reticulum (ER), thereby preventing enzyme transport to the lysosome. In this scenario, a pharmacological chaperone would be able to partially stabilize the mutant protein, thereby allowing its transport to the final destination (Benito et al., 2011; Boyd et al., 2013; Parenti, 2009). A number of iminosugars (Goddard-Borger et al., 2012) and aminocyclitols (Suzuki, 2013) have shown an *in vitro* chaperone-like profile towards GBA1. The first molecule reported to act as pharmacological chaperone *in vivo* for GD was the iminosugar *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin (NNDNJ, Fig. 1) (Sawkar et al., 2002). 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 GBA1 activity (Sawkar et al., 2002). Furthermore, several mutant GBA1 enzymes were shown to increase their activity following the addition of the related iminocyclitol NBDNJ to COS cells transfected with the corresponding mutant cDNAs (Alfonso et al., 2005; Sanchez-Olle et al., 2009). Other iminosugars were also active on the N370S mutant enzyme (Chang et al., 2006; Steet et al., 2006) as well as on several other mutant glucocerebrosidases (Sawkar et al., 2005; Yu et al., 2007). In addition, some non-sugar GBA1 inhibitors (Bendikov-Bar et al., 2013; Marugan et al., 2012) and isofagomine (IFG, Fig. 1) (Lieberman et al., 2007) also showed a chaperone effect on the N370S enzyme in GD patient cells. Unfortunately, although clinical trials using IFG tartrate (AT2101) were initially conducted and

showed promising results (Weinreb, 2008), its advancement to phase III has been discontinued.

The knowledge of structural aspects of GBA1 in its native state (Dvir et al., 2003) with different degrees of glycosylation (Brumshtein et al., 2010; Brumshtein et al., 2006; Shaaltiel et al., 2007) under different pH conditions (Lieberman et al., 2009), complexed with different inhibitors (Brumshtein et al., 2009; Brumshtein et al., 2007; Lieberman et al., 2007; Premkumar et al., 2005) and bearing the common N370S mutation (Wei et al., 2011), has opened new avenues in this line of research. Along this line, in a previous work, we undertook a computational study addressed at the prediction of structure-activity relationships for the binding of aminocyclitols generated by our group to GBA1 (Díaz et al., 2011).

As a continuation of our work on the development of new pharmacological chaperones for GD, we here report on the effect of a selection of our recently synthesized aminocyclitols LD, (Díaz et al., 2010; Díaz et al., 2011) on the residual GBA1 activity in fibroblasts from patients with diverse genotypes, compared with those of NNDNJ and IFG.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

NNDNJ was purchased from Tocris Bioscience (UK) and IFG (D-tartrate) was purchased from Toronto Research Chemicals, Toronto (Canada). CBE (conduiritol β -epoxide) was obtained from a synthetic route described elsewhere (Jaramillo et al., 1994). LD aminocyclitols (Fig. 1) were obtained as previously described (Díaz et al., 2010; Díaz et al., 2011). ω -Azidosphingosine (ω N₃Sph) was synthesized following reported protocols (Garrido, 2012; Garrido et al., 2012). All compounds were dissolved in DMSO and control experiments were performed with DMSO (<1%).

2.2. Fibroblast culture assay

Skin fibroblasts were obtained from non-neurological (type I) and neurological (types II and III) GD patients with distinct genotypes, which were diagnosed, in most of the cases (genotypes: N370S/N370S, L444P/L444P, [D409H;H255Q]/[D409H;H255Q], G202R/G202R) at the Institute of Child Health, Athens. In two cases (N370S/L444P and G202R/[L444P;E326K]), diagnosis was performed at the Institut de Bioquímica Clínica, Barcelona. Fibroblasts from healthy individuals were used as controls. The study had the approval of the Ethics committees of both institutions. Fibroblast cultures were established following routine procedures in Dulbecco Eagle's minimal essential medium (D-MEM) with 10% FBS.

For the assay of GBA1 in intact cells, 10,000 cells were plated into 24-well plates during 6 days in D-MEM, 10% FBS at 37 °C under 5% CO₂ either with or without NNDNJ, IFG or LD aminocyclitols (see Fig. 1) at several concentrations. Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with the corresponding compound dissolved in DMSO. Cells were washed and the enzyme assay performed as follows: substrate (100 μ l, 5 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) 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 released 4-methylumbelliferone was measured with a Spectramax M5 plate reader (Molecular Devices), at λ_{ex} : 340 nm; λ_{em} : 460 nm. For each experiment untreated (no compound added) and treated cells were plated in quadruplicate. The non-specific GBA1 activity was evaluated by addition of CBE (2 h 0.5 mM) to control wells and was shown to account for about 1% of the activity in control fibroblasts.

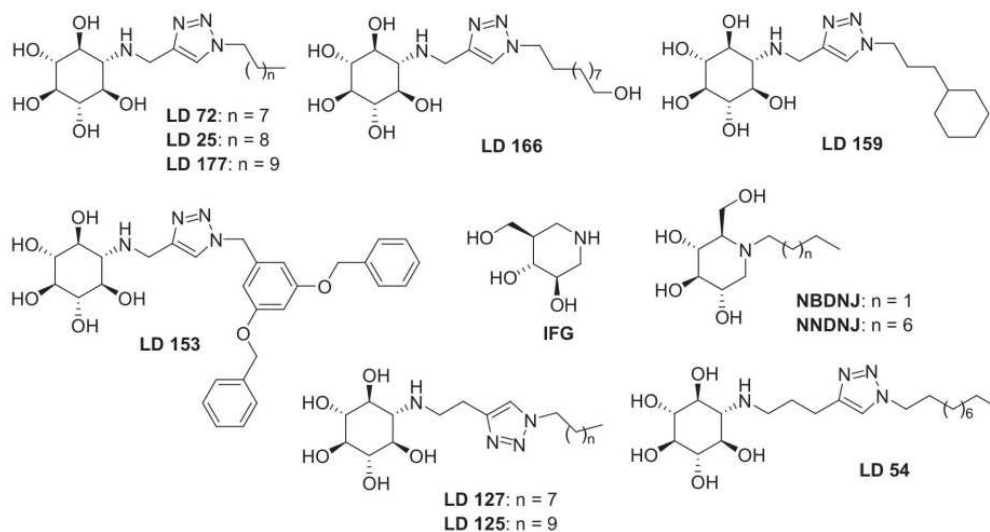


Fig. 1. Aminocyclitols and iminosugars selected for this study. GBA1 inhibition (expressed as *K_i*) is shown (see also Table S1).

2.3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the selected compounds and cell viability over a period of 6 days was tested by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 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 3 h 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.

2.4. Sphingolipid analysis by UPLC/MS

Fibroblasts from GD patients with G202R/G202R genotype (100,000 cells) were plated into 6-well assay plates during 6 days in D-MEM, 10% FBS at 37 °C under 5% CO₂ either with or without IFG, LD25, LD125 or LD153 at 0.1 or 1 μ M. Fibroblasts from healthy individual were used as a reference. Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with the corresponding compound dissolved in DMSO. Then, cells were washed in PBS, collected by brief trypsinization, counted and transferred to glass vials. Sphingolipid extracts were prepared and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry using a Waters Acquity UPLC system connected to a Waters LCT Premier orthogonal accelerated time of flight mass spectrometer (Waters, Millford, MA), operating in positive electrospray ionization mode in the conditions reported previously (Canals et al., 2009).

Alternatively, fibroblasts cultured for 6 days with the compounds or vehicle were washed with medium and cultured in fresh medium for 1 day in the presence of ω N₃Sph at 5 μ M final concentration. Then, cell extracts were prepared as indicated above. Identification of tagged sphingolipids was based on accurate mass measurement (< 5 ppm error) and LC relative retention time compared to ω N₃Cer–C16 standard. Quantification was carried out with the extracted ion chromatogram of each compound, using 50 mDa windows.

2.5. Non-lysosomal glucocerebrosidase assay (GBA2)

The effect of three LD products, as well as NNDJ and IFG, on GBA2 activity were determined in mouse testis homogenates, according to Walden et al. (Walden et al., 2007) with minor modifications.

2.6. Immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging

For immunofluorescence, 5000 cells per well were seeded overnight on 10 mm glass coverslips (Marienfeld) in 24-well plates. The WT cells and Cells bearing the genotype G202R/G202R were then incubated for 6 days in fresh medium (DMEM, 10% FBS) at 37 °C under 5% CO₂ in the absence or presence of compounds: LD25 (1 μ M), LD72 (5 μ M), LD125 (1 μ M), and LD159 (5 μ M). Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with the compounds. The WT cells and untreated GD cells were incubated with 0.1% DMSO. On day 6 of treatment, the cells were incubated for 1 h with 75 nm LysoTracker Red DND-99 (L7528; Invitrogen) at 37 °C. Then, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at room temperature. The cover slips were then washed 4 times for 5 min each with 0.3 M PBS, and the cells were permeabilized with 0.1% Tween in PBS. The cells were then incubated with primary antibody (mouse monoclonal anti-GBA 8E4, diluted 1:100) (Aerts et al., 1986) in a solution of PBS with 10% NDS (normal donkey serum, Millipore) and 0.1% Tween at 48 °C overnight. The coverslips were then washed three times with 0.3 M PBS and incubated for 1 h with secondary antibody anti-mouse (Cy2-conjugated AffinPure donkey anti-mouse IgG (H+L), diluted 1:100, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) followed by DAPI staining (1:10000 dilution in a solution of PBS with 10% NDS and 0.1% Tween for 10 min; Invitrogen). Staining was viewed with a Leica TCS-SP2, and the images were analyzed using Fiji-ImageJ software. Colocalization between lysosome and GBA1 was quantified using Manders' algorithm by the tool named JACoP

2.7. 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. The SPSS statistical programme was used for the statistical analysis. P values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

2.8. MD simulations

The structures of free and IFG-bound GBA1 WT (Lieberman et al., 2007) (PDB codes 2NT0 and 2NSX, respectively) were used as starting point to model the corresponding structures of the G202R mutant. In all cases, the acidic pH of 4.5 used for crystallization was considered to assign protonation states. All protein preparation steps, including manual mutation of position 202, were performed with the Maestro software (Schrödinger, 2011b) and the Protein Preparation Wizard of the Schrödinger Suite 2011 package. (Schrödinger, 2011c) Minimization of the mutated protein was carried out with MacroModel, (Schrödinger, 2011a) using the OPLS2005 force field, an enhanced version of the OPLSAA force field (Jorgensen et al., 1996) developed by Schrödinger to provide a larger coverage of organic functionality, (Kaminski et al., 2001) under implicit water solvation conditions (Still et al., 1990). All atom molecular dynamics (MD) under explicit solvent were performed with the NAMD package (v. 2.7) (Phillips et al., 2005) using the OPLSAA forcefield (Jorgensen et al., 1996) and the TIP3P water model (Jorgensen et al., 1983). The parameters for the IFG ligand were obtained from a minimization with MacroModel (Schrödinger, 2011a) and translated into the NAMD syntax with *ad hoc* scripts. Preparation of the systems and all MD analysis were conducted with the VMD package (Humphrey et al., 1996) and associated plugins. Each system was solvated in a cubic box that extended at least 12 Å away from any solute atom and neutralized with 0.01 M concentration of NaCl. This allowed the use of periodic boundary conditions in combination with the particle-mesh Ewald algorithm to account for the long-range electrostatic interactions beyond a cutoff of 10 Å. A smoothing switching function was defined at 8 Å to smooth the boundary effects of this cutoff for all non bonded interactions. An equilibration procedure was designed which consisted of: (i) Energy minimization of the system (1,000 steps); (ii) MD (25 ps long) in the NVT ensemble, where the temperature was gradually increased from 150 to 300 K; (iii) MD (25 ps long) in the NPT ensemble, using the Langevin piston method with a damping coefficient of 0.1 ps^{-1} for the conservation of the pressure at 1 atm target value and the temperature at the target value of 350 K. The production phase followed for 10 ns with the same parameters as described for the last equilibration stage, except for the time step, which was increased from the initial value of 1 fs to 2 fs, in combination with the SHAKE algorithm used to constraint bond lengths. Each simulation was repeated 5 times to calculate averaged values, following the protocol reported by Offman et al. (Offman et al., 2010).

3. Results

3.1. Biochemical profile of selected compounds on GBA1 and GBA2

The nine LD aminocyclitol compounds and the selected iminosugars shown in Fig. 1 were previously biochemically characterized as GBA1 inhibitors (Díaz et al., 2010; Díaz et al., 2011). As summarized in Table S1 (Supplementary data), these compounds were efficient inhibitors of imiglucerase (IC_{50} values at pH 5.2 and 7.0 and K_i values at pH 5.2), as well as the GBA1 activity of WT fibroblasts. Moreover, the selected compounds showed interesting properties as potential pharmacological chaperones, based on their low toxicity and high enzyme stabilization ratio (SR). These data were used to select the concentration range for each compound. Data for some aminocyclitols as GBA2 inhibitors are also included

in Table S1. The IC_{50} values were two or more orders of magnitude higher than those for GBA1, indicating a negligible effect on GBA2 in the present experiments.

3.2. Residual GBA1 activity enhancement

The effect of the LD aminocyclitols, and the reference compounds NNDNJ and IFG, was measured on fibroblasts from GD patients with 7 different genotypes (N370S/N370S; L444P/L444P; N370S/L444P; [D409H;H255Q]/L444P; [D409H;H255Q]/[D409H;H255Q]; G202R/[L444P;E326K] and G202R/G202R) and from a healthy individual (WT, wild type). Residual enzyme activities after treatment with some representative LD compounds (LD25, LD125, LD127, LD153, LD159 and LD166) are shown in Fig. 2. The effects of all compounds at all concentrations tested are shown in Fig. S1 and Table S2 (Supplementary data).

As depicted in Fig. 2a, NNDNJ, and specially IFG, have a substantial chaperone activity on fibroblasts bearing the G202R mutation, i.e. G202R/[L444P;E326K] (genotype F in Fig. 2) and G202R/G202R (genotype G). The GBA1 activity enhancement in fibroblasts with this last genotype was observed with IFG at concentrations as low as $0.1 \mu\text{M}$ (55% increase, Fig. S1 and Table S2). None of the LD compounds were active on fibroblasts containing the [D409H;H255Q]/L444P genotype (genotype D). Among the LD compounds with a linear alkyl chain, LD25 (Fig. 2b), LD72 and LD 177 (Fig. S1 and Table S1) showed a low chaperone activity with fibroblasts carrying homo- or heterozygote N370 or L444P mutations and a higher effect when the G202R mutation was present. Actually, the presence of the L444P mutation decreases the activity enhancement caused on the other genotype bearing the G202R mutation (e.g. normalized activity of fibroblasts with G202R/L444P mutations incubated with $1 \mu\text{M}$ LD25 was 125.7 ± 14.8 , whereas the same compound elicited an enhancer activity of 173.2 ± 22.4 in fibroblasts with G202R/G202R mutations). It is worth mentioning that LD72 and LD177 showed an enhancement pattern on the different tested genotypes similar to that of LD25, but with lower effect (Fig. S1 and Table S2).

Although the presence of a terminal OH group in LD166 (Fig. 1) decreased its inhibitory activity around 20 times and around 3 times its SR in comparison with LD25 (Table S1), its chaperone effect on the tested genotypes (Fig. 2b) was similar to that of LD25. Equivalent results were obtained with LD159 (Fig. 2b), a compound with a cyclic alkyl substituent (Fig. 1), while the presence of an aromatic substituent, as in LD153, decreased the overall chaperone effect (Fig. 2b).

All the above compounds contain one-carbon linker between the aminocyclitol and the triazole rings, and were the best GBA1 inhibitors tested in this work (Table S1). Although Compounds with a two- (LD125 and LD127) and a three-carbon linker (LD54) were worse inhibitors than those with one-carbon linker, their chaperone activity on fibroblasts from GD patients with different mutations were also tested. Among them, compound LD54 (Fig. 1) was not effective in increasing GBA1 activity in all tested fibroblasts (Fig. S1 and Table S2), except for those with the G202/G202R genotype, where a minor but significant ($p < 0.01$) increase of GBA1 activity was observed.

On the other hand, compound LD127 was slight but significantly active only at high concentrations ($10\text{--}20 \mu\text{M}$) on WT fibroblasts or those containing the N370S mutation (Fig. S1 and Table S2). In addition, LD127 was slightly active at low concentrations ($1\text{--}5 \mu\text{M}$) in fibroblasts with the G202R mutation (Fig. 2b). Finally, compound LD125 at high concentrations ($5\text{--}20 \mu\text{M}$) inhibited the GBA1 activity in all tested fibroblasts (Fig. S1 and Table S2), while at $1 \mu\text{M}$ produced enhancement of the residual GBA1 activity of fibroblasts containing the G202R mutation (Fig. 2b).

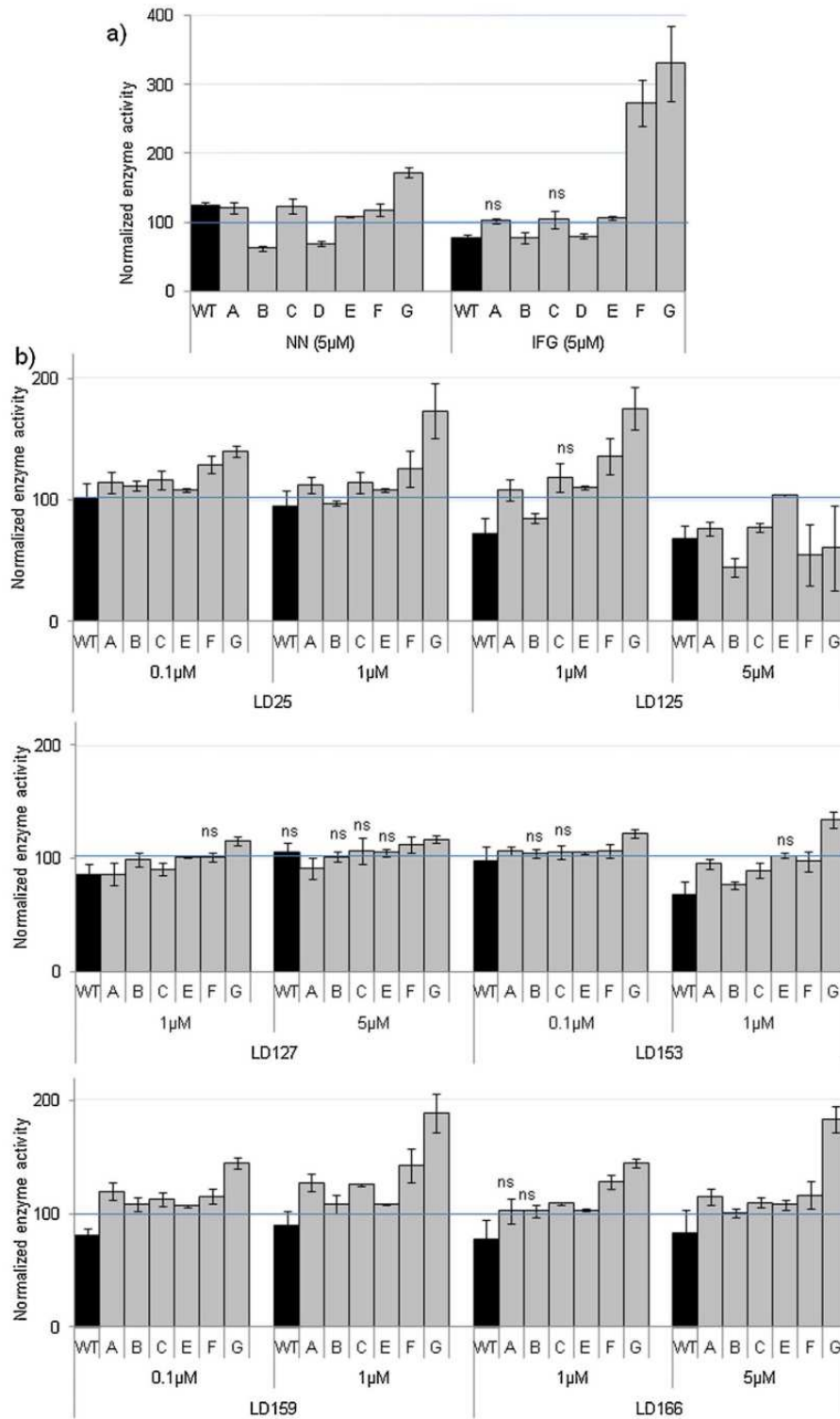


Fig. 2. Normalized GBA1 activity of human fibroblast cell lines after treatment with NN, IFG (a) and selected LD compounds (b) at the indicated concentrations, for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated cells and untreated (0.1% DMSO) cells. Cell lines used: **WT**, wild type; **A**, N370S/N370S; **B**, L444P/L444P; **C**, N370S/L444P; **D**, [D409H;H255Q]/L444P; **E**, [D409H;H255Q]/[D409H;H255Q]; **F**, G202R/[L444P;E326K]; **G**, G202R/G202R. Values are the Median ± confidence interval of 3–6 separate experiments performed by triplicates. Values higher than 100 were considered statistically significant ($p \leq 0.05$), except when indicated by ns (no statistically significant). See also supplementary data. Neither compound was active against mutation D.

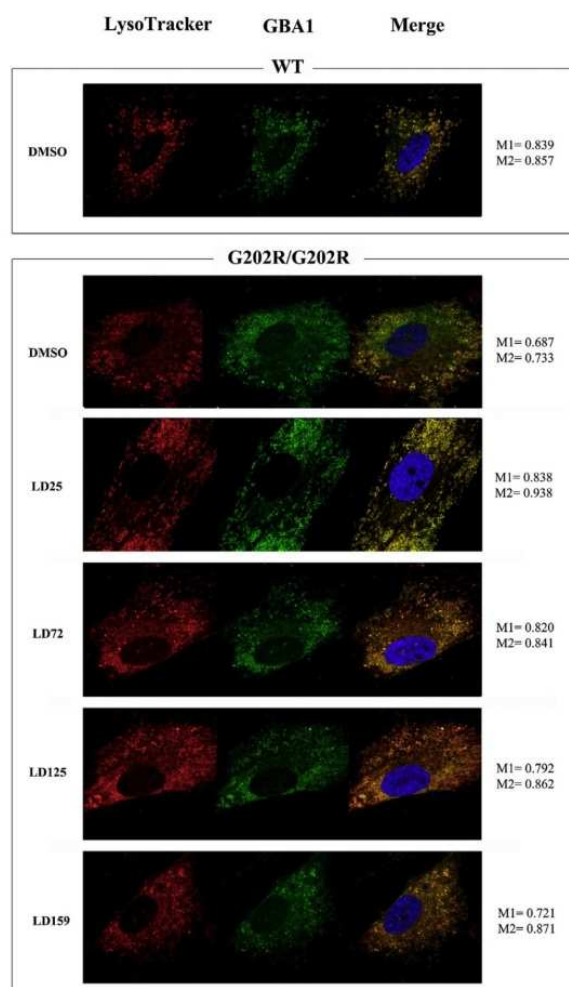


Fig. 3. Confocal laser microscope images of immunofluorescence staining for lysosomes (red) and GBA1 (green) in cultured fibroblasts derived from a healthy individual (WT) and a GD patient with the G202R/G202R genotype untreated (DMSO) and after treatment with LD25, LD72, LD125 and LD159 at the indicated concentrations. Nuclei were stained with DAPI (blue). Immunofluorescent labeling of GBA1 was performed with the 8E4 monoclonal antibody, and LysoTracker was used to detect lysosomes. The concentrations of the compounds are: 1 μ M of LD25, 5 μ M of LD72, 1 μ M of LD125, 5 μ M of LD159. M1 and M2 = Manders' coefficient.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging were used to determine whether some selected compounds (LD25, LD72, LD125, and LD159) increased the trafficking of the G202R mutated enzyme to the lysosome (Fig. 3). Fibroblasts from a Gaucher patient homozygous for the G202R mutation were incubated for 6 days with or without the compounds at different concentrations. In treated cells the GBA colocalization of the mutated enzyme with a lysosomal marker (LysoTracker[®]) was increased with all tested compounds. Colocalization was quantified with the Manders' coefficient, which is a measure of the fraction of one structure in contact with the other (Manders et al., 1993). The Manders' coefficient M1 indicates the fraction of the lysosome that colocalizes with GBA1, whereas the Manders' coefficient M2 indicates the fraction of GBA1 that colocalizes with the lysosome. In both cases, we observed a slight increase of both coefficients by the addition of the selected LD compounds. In fact, the degree of colocalization following treatment was similar to that observed in WT

fibroblasts, as shown by the M1 index (WT: 0.833, mutant: 0.687, treated cells: 0.721–0.838). The best result was obtained with LD25 at 1 μ M.

3.3. Selectivity against other lysosomal glycosidases

The effect of the LD aminocyclitols and the reference compounds NNDNJ and IFG on lysosomal glycosidases was measured in fibroblasts incubated with or without the LD and reference compounds for 6 days (Table S3). LD compounds were inactive against the two human α -glycosidases tested, namely α -glucosidase and α -galactosidase, although an unspecific 10–20% inhibition was observed for LD153. On the other hand, human β -galactosidase was slightly enhanced (1.2 fold) by compounds LD125, LD127 and LD166 at 10 μ M concentration. Finally, activity of human β -hexosaminidase was somewhat affected (10% inhibition) by several of the tested compounds. Despite these minor effects on lysosomal glycosidases, it can be concluded that these compounds exhibited a remarkable selectivity towards GBA1.

3.4. Lipidomics

Taking into account the above results on residual GBA1 activity enhancement, genotype G202R/G202R and several representative compounds (LD25, LD125, LD153 and IFG) were selected for lipidomic studies. Fibroblasts from GD patients bearing this genotype, showed higher GlcCer levels (around 2.5 times) than WT cells, as revealed by UPLC-TOF analysis (see Fig. 4A). These results were consistent with the lower GBA1 activity associated with the disease. However, the expected reduction in GlcCer levels after 6 days treatment with the selected compounds at 1 or 0.1 μ M was not observed and, at a concentration of 1 μ M, an increase in GlcCer levels was found (Fig. 4A).

In order to have a closer insight on the temporal variation of the GlcCer levels in the presence of the potential chaperones, the standard analytical method was modified to include incubation with ω N₃Sph after the sixth day of treatment with LD compounds, as detailed in Materials and Methods. This compound behaves as a labeled sphingolipid that can be taken up and metabolized by WT and GD cells as the natural one.

As expected, ω N₃Sph was metabolized into the corresponding tagged Cer (ω N₃Cer), SM (ω N₃SM) and GlcCer (ω N₃GlcCer). Treatment with the inhibitors used in this study did not affect ω N₃Cer and ω N₃SM levels (not shown). The uses of this labeled sphingolipid revealed higher GlcCer levels in GD fibroblasts bearing the G202R/G202R mutation in comparison with WT (Fig. 4B). Very importantly, these levels were significantly reduced in the presence of 0.1 μ M LD25, LD125, LD153, and IFG (Fig. 4B), thus confirming the chaperone activity of the tested compounds on this genotype. Similar results were obtained in a single experiment performed by triplicate with GD fibroblasts bearing the G202R/[L444P;E326K] genotype (results not shown).

3.5. Computational studies on GBA1 G202R mutant

A computational study to unravel the structural origin of the chaperone effect elicited by the tested compounds was undertaken. According to the experimental data, the G202R mutation was the most sensible to these effects, in particular those from IFG, therefore this mutation was chosen as target for this study.

Residue G202 of GBA1 is located in the solvent exposed surface, in a relatively polar environment formed by residues R257, D258, R262, D298, E300 and K303, and it is in close proximity (<4 Å) to residue R262 (Fig. 5A and B). Replacement by Arg (G202R) causes a strong electrostatic repulsion between the two cationic residues, R202 and R262, that results on a side chain movement of residue

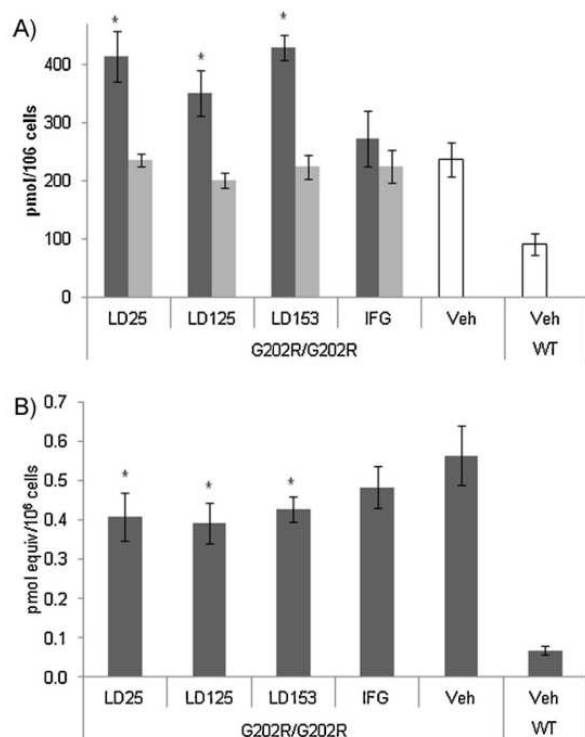


Fig. 4. (A) GlcCer levels after 6 days treatment of selected compounds on fibroblasts from GD patients bearing the G202R/G202R mutation. Black bars: 1 μ M, grey bars: 0.1 μ M and empty bars: Veh, 0.1% DMSO. Values are the Mean \pm SD of three separate experiments performed by triplicates. (B) Relative amounts of ω N3GlcCer after 6 days treatment with selected compounds at 0.1 μ M on fibroblasts from GD patients bearing the G202R/G202R mutation, followed by 24 h incubation with ω N3Sph. Values are the Mean \pm SD of two separate experiments performed by triplicates. * Values statistically different from values of fibroblast with G202R/G202R mutation treated with vehicle ($p \leq 0.05$).

R262 towards E300 (Fig. 5C and D). However, the energetically minimized structure of GBA1 G202R did not show a significant change on the conformation of any other residues or on the protein backbone.

To further assess if the effect of the mutation could have a distal effect in the stability of other regions of the protein, in particular the active center, and to gain knowledge about the potential reasons for the activity impairment of the GBA1 G202R mutation, a molecular dynamics approach, similar to that recently reported by Offman et al. (Offman et al., 2010) was envisaged. For that purpose, the crystal structures of GBA1 WT at pH 4.5 (PDB 2NT0) and the isofagomine-bound protein at the same pH (PDB 2NSX), as well as the corresponding G202R-mutant modeled structures, were taken as starting point to carry out 10 ns MD simulations in explicit solvent at high temperature, i.e. 350 K. It was expected that at this temperature the systems would be more sensitive to differences in stability, allowing for shorter simulations times. Five replicates of each simulation were carried to increase the sampling. In all cases, the systems remained mostly stable after about 2 ns (Fig. S2) with most of the variation along the simulation of the wild-type and mutant proteins concentrated on several flexible loops (see Fig. S3), for example loop 341–350 (L1). This loop together with loops 393–396 (L2), 312–319 (L3) and 233–252 (L4) constitute the vestibule to the active site cavity of GBA1 (Fig. S4) (Diaz et al., 2010). Root mean square fluctuation (RMSF) values averaged over the residues

of these four loops did not show significant differences between GBA1 WT and GBA1 G202R (Figs. S5 and S6). The presence of the ligand IFG seemed to stabilize some regions of the proteins, like that of loop L1, although the differences between GBA1 WT and GBA1 G202R were again not significant. Interestingly, no major variation was observed around residues 202 and 262 of the mutated protein relative to wild-type (Fig. S3). Moreover, differences between the global RMSF values averaged over the full sequence of the proteins were not significant either (Fig. S7). An extension of the simulation time up to a total of 20 ns showed similar trends (data not shown) and we concluded that no significant difference on the effect of the mutation or the chaperone effect of the inhibitor could be captured by this approach, therefore no additional efforts were carried out along this line.

4. Discussion

The severity and the lack of an efficient therapy for some of the known GD mutations have 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 (Dvir et al., 2003; Sawkar et al., 2005). This is in agreement with the observed enhancement of residual activity observed for NNDNJ (Sawkar et al., 2002) and several reported aminocyclitols (Compain et al., 2006; Oulaidi et al., 2011; Sawkar et al., 2005; Wang et al., 2009) on mutation N370S. However, this assumption is controversial, since the related iminocyclitol derivatives IFG (Khanna et al., 2010) and α -1-C-octyl-1-deoxynojirimycin, (Yu et al., 2006) are also able to increase GBA1 activity in L444P Gaucher cells.

We have reported on a series of new aminocyclitols and their ability to increase thermal stabilization of recombinant GBA1 (imiglucerase, Cerezyme[®]) in *in vitro* assays (Diaz et al., 2010; Díaz et al., 2011). The recovery of enzyme activity after thermal denaturation, referred as “stabilization ratio” (SR), is a widely accepted parameter to uncover potential pharmacological chaperones (Sawkar et al., 2002). A selection of our best aminocyclitols as thermal stabilizers, together with reference pharmacological chaperones NNDNJ and IFG were selected for this study. This trend was paralleled by their ability to act as competitive inhibitors of the target enzyme, as it is commonly accepted for this type of compounds (Futerman et al., 2004; Ringe and Petsko, 2009). Some of these compounds exhibited moderately higher imiglucerase inhibition at neutral pH than at acid pH, an indication of their ability to bind to the enzyme at the neutral pH of the endoplasmic reticulum (ER), although they partly dissociate at the low lysosomal pH.

All LD compounds were highly active as chaperones in fibroblasts from GD patients containing the G202R mutation (G202R/[L444P;E326K] and G202R/G202R) achieving almost 2 times increase of the normalized GBA1 activity. Moreover, NNDNJ and IFG were also very effective as chaperones in fibroblasts with G202R mutation. In particular IFG causes around a 3-fold increase of the activity on the mutated enzyme. This is consistent with several previous positive results for this mutation with IFG and other different compounds. (Boyd et al., 2013) It has been reported that G202R mutation is a severe mutation associated with the neurodegenerative phenotype that affects the trafficking of the enzyme and precludes it being transported to the lysosome (Schmitz et al., 2005; Zimmer et al., 1999). Additionally, immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging showed an increase of the lysosomal localization of the G202R mutation after treatment with the

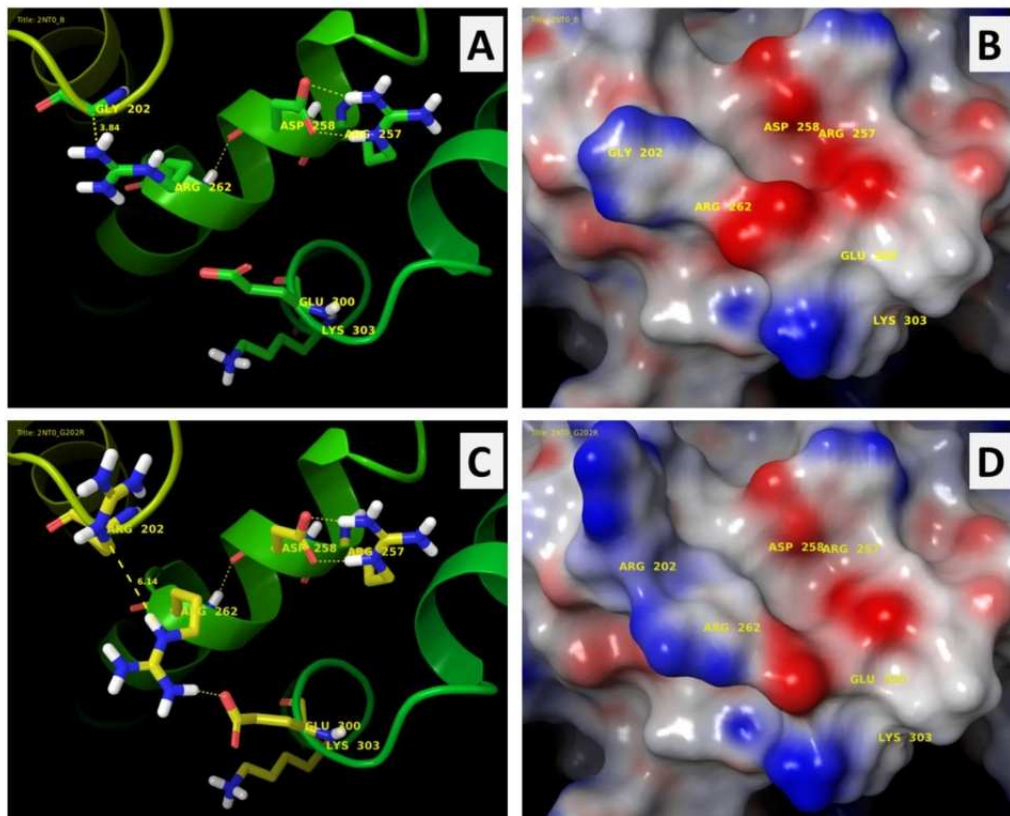


Fig. 5. A and B: Crystal structure of GBA1 at pH 4.5 (PDB 2NT0) showing the environment of residue G202. C and D: Modeled structure of mutant G202R showing the same region.

tested compounds. These results are in agreement with the idea that the G202R mutation does not disrupt the catalytic site (Sawkar et al., 2005). Thus, the tested compounds could induce the correct folding and trafficking of the enzyme into the lysosome.

The N370S is a highly prevalent mutation, mainly among Ashkenazi Jews, and it is related to the non-neuronopathic GD type I population. Most of the pharmacological chaperones reported for GD have been analysed on the N370S mutated enzyme (Boyd et al., 2013; Suzuki, 2013). However, none of the products causes a substantial activity increase on that mutated enzyme. In this study, some of our LD compounds, such as LD25, LD72, LD127, LD159 or LD177, were slightly active as chaperones (about 110–130% increase of normalized GBA1 activity) in fibroblasts with the N370S mutation (N370S/N370S and N370S/L444P).

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 disease. (Grabowski, 1997) Unfortunately, the effect of the LD products on the GBA activity of fibroblasts with L444P was very low in homozygote (L444P/L444P) cells or null in heterozygote cells (L444P/[D409H;H255Q]). In the case of the [D409H;H255Q]/[D409H;H255Q] genotype, the response to the products was also low, no more than a 110%.

It has been reported that the activity enhancement obtained with IFG did not correlate with a decrease on the GlcCer

levels (Maegawa et al., 2009). In order to check if the chaperone effect shown by LD compounds was also observed on the levels of accumulated substrate, the GlcCer amount were analysed on G20R/G202R fibroblasts cultured with selected aminocyclitols. However, the expected GlcCer pool reduction was not observed (Fig. 4A). Different hypothesis were considered to explain this controversial results.

One of them could be that the concurrent inhibition of GBA2 accounted for these results. Selected compounds were tested in mouse testicle homogenates in the presence of the GBA1 inhibitor CBE. As shown in Table S1, LD compounds required a high concentration to elicit a significant, albeit low, inhibition of GBA2, thus ruling out this hypothesis for LD compounds. This is not the case for IFG, which elicited a GBA2 inhibition higher than 50% at the lowest concentration used (see Table S1). Moreover, the GBA2 activity in G20R/G202R fibroblasts was not modified after 6 days incubation with 1 μ M of LD compounds (results not shown). Note that the inhibition effect of IFG on GBA2 (Table S1) is consistent with reported data (Sun et al., 2012).

Alternatively, the possibility that the non-reduction of GlcCer levels was due to lactosylceramide synthase (LCS) inhibition by LD products was also taken into account. This possibility was considered after the finding that LD125 is a moderate LCS inhibitor, albeit at higher concentration (10 μ M) (unpublished results). However, the lactosyl ceramide levels, measured by UPLC-TOF, were practically unaltered at the concentrations used in the assay (results not shown). Moreover, LD compounds had no remarkable effect on the

enzymatic activity of other lysosomal glycosidases (α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase and β -hexosaminidase) after 6 days incubation, which allows to eliminate an unspecific effect on lysosomes.

After ruling out these two hypotheses, we thought that discrepancies between both results may arise due to the fact that residual GBA1 activity enhancement is a “single point measure” of the enzyme activity after 6 days treatment and lipidome analysis, instead, is a measure of the pool of GlcCer generated after the same period. The use of a novel tagged sphingolipid precursor (ω N₃Sph) allowed the analysis of the real GlcCer accumulation after the sixth day of treatment with LD compounds. The experiment showed that GlcCer levels in GD fibroblasts bearing the G202R mutation were significantly reduced in the presence of the tested compounds (Fig. 4B), thus confirming their chaperone activity.

Attempts to explain the activity impairment observed in GBA1 bearing the G202R mutation based on comparative molecular dynamics (MD) carried out on the structures of the GBA1 WT protein and the G202R mutated (free and IFG-bound, in both cases) was unsuccessful. Differences among the global RMSF values of the four protein systems were not significant. In addition, a closer look at the RMSF averaged over the four loops that are concentrated around the GBA1 active center also showed non significant differences between WT and the G202R mutant, either free or in the presence of IFG (Figs. S5–S7). It can be thus concluded that, under the conditions of our simulations, we have not been able to find a clear effect of the G202R mutation neither over the global structure of the protein nor on the loops that constitute the GBA1 active site. This was also the case for the corresponding IFG-bound proteins (WT and G202R). Although the reasons for these disappointing results may be diverse (for example, a too short MD timescale to observe changes over the distant active site or the lack of a crystal structure for this particular mutation), the clearest effect found for the G202R mutation is the alteration of the electrostatic environment close to the mutated residue. Since this residue is located on the protein surface, altered protein-membrane or protein-protein interactions, albeit different from those involved in saposine-C (SapC) recognition, (Atrian et al., 2008) could account for the observed differences between WT and G202R mutant.

Recently, as a result of massive screening programs, several non-substrate related compounds have emerged as promising potential pharmacological chaperones for GD (Huang et al., 2007; Maegawa et al., 2009; Marugan et al., 2011; Rigat and Mahuran, 2009; Zheng et al., 2007). However, most of them were assayed only on the common N370S mutation or were shown to be inefficient on other mutations. Under this scenario, the results reported herein represent an interesting contribution for the development of chaperone-based therapeutic strategies for this disease. Further studies along this line are underway and will be reported in due course. Moreover, the use of ω N₃Sph as tagged sphingolipid has proved efficient for the selective detection of metabolites by UPLC-TOF analysis.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish MICINN (projects CTQ2008-01426/BQU, SAF2011-2244 and SAF2011-25431) and “Generalitat de Catalunya” (Grants 2009SGR-1072 and 2009SGR-971). L.D. is grateful to CSIC for a JAE-Predoc fellowship. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of ISCIII. The authors thank the Institut de Bioquímica Clínica for the collaboration. The authors also thank Mrs. Eva Dalmou for experimental contributions. Finally, the authors acknowledge the “Consorci de Serveis Universitaris de Catalunya” (CSUC) for allowing the use of its software and hardware resources.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjocel.2014.07.017>.

References

- Aerts JM, Donker-Koopman WE, Murray GJ, Barranger JA, Tager JM, Schram AW. A procedure for the rapid purification in high yield of human glucocerebrosidase using immunoaffinity chromatography with monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 1986;154:655–63.
- Alfonso P, Pampin S, Estrada J, Rodriguez-Rey JC, Giraldo P, Sancho J, et al. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2005;35:268–76.
- Atrian S, Lopez-Vinas E, Gomez-Puertas P, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase-saposin C and glucocerebrosidase-substrate interactions - relevance for Gaucher disease. *Proteins* 2008;70:882–91.
- Bendikov-Bar I, Maor G, Filocamo M, Horowitz M. Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2013;50:141–5.
- Benito JM, Garcia Fernandez JM, Ortiz Mellet C. Pharmacological chaperone therapy for Gaucher disease: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2011;21:885–903.
- Beutler E, Gelbart T. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells and Molecular Diseases* 1997;23:2–7.
- Boyd RE, Lee G, Rybczynski P, Benjamin ER, Khanna R, Wustman BA, et al. Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013;56:2705–25.
- Brumshtein B, Aguilar-Moncayo M, Garcia-Moreno MI, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Silman I, et al. 6-Amino-6-deoxy-5,6-di-N-(N'-octyliminomethylidene)nojirimycin: synthesis, biological evaluation, and crystal structure in complex with acid beta-glucosidase. *Chembiochem* 2009;10:1480–5.
- Brumshtein B, Greenblatt HM, Butters TD, Shaaltiel Y, Aviezer D, Silman I, et al. Crystal structures of complexes of N-butyl- and N-nonyl-deoxynojirimycin bound to acid beta-glucosidase: insights into the mechanism of chemical chaperone action in Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:29052–8.
- Brumshtein B, Salinas P, Peterson B, Chan V, Silman I, Sussman JL, et al. Characterization of gene-activated human acid-(beta)-glucosidase: crystal structure, glycan composition and internalization into macrophages. *Glycobiology* 2010;20:24–32.
- Brumshtein B, Wormald MR, Silman I, Futerman AH, Sussman JL. Structural comparison of differently glycosylated forms of acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography* 2006;62:1458–65.
- Canals D, Mormeneo D, Fabrias G, Llebaria A, Casas J, Delgado A. Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:235–41.
- Compain P, Martin OR, Boucheron C, Godin G, Yu L, Ikeda K, et al. Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *Chembiochem* 2006;7:1356–9.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 2000;355:1481–5.
- 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 Journal* 2006;273:4082–92.
- 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 and Molecular Diseases* 2006;37:197–203.
- 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. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010;53:5248–55.
- Diaz L, Bujons J, Delgado A, Gutierrez-de-Teran H, Aqvist J. Computational prediction of structure-activity relationships for the binding of aminocyclitols to beta-glucocerebrosidase. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2011;51:601–11.
- Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Tokar L, Silman I, Futerman AH, et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Reports* 2003;4:704–9.
- Enquist IB, Nilsson E, Ooka A, Mansson JE, Olsson K, Ehinger M, et al. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2006;103:13819–24.
- Fan J-Q. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003;24:355–60.
- Futerman AH, Sussman JL, Horowitz M, Silman I, Zimran A. New directions in the treatment of Gaucher disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004;25:147–51.

- Garrido M. New Sphingolipid Probes for Metabolism and Trafficking Studies: Doctoral Thesis. University of Barcelona; 2012.
- Garrido M, Abad JL, Alonso A, Goñi Félix M, Delgado A, Montes LR. In situ synthesis of fluorescent membrane lipids (ceramides) using click chemistry. *Journal of Chemical Biology* 2012;5:119–23.
- Goddard-Borger ED, Tropak MB, Yonekawa S, Tysoe C, Mahuran DJ, Withers SG. Rapid assembly of a library of lipophilic iminosugars via the thiol–ene reaction yields promising pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012;55:2737–45.
- Grabowski GA. Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genetic Testing* 1997;1:5–12.
- Grabowski GA. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 2008;13:197–211.
- Huang W, Zheng W, Urban DJ, Inglesse J, Sidransky E, Austin CP, et al. 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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:5783–9.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996;14:33–8.
- Jaramillo C, Chiara JL, Martín-Lomas M. An effective strategy for the synthesis of 6-O-(2-amino-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl)-D-*chiro*- and -D-*myo*-inositol 1-phosphate related to putative insulin mimetics. *Journal of Organic Chemistry* 1994;59:3135–41.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics* 1983;79:926–35.
- Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118:11225–36.
- Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B* 2001;105:6474–87.
- Khanna R, Benjamin ER, Pellegrino L, Schilling A, Rigat BA, Soska R, et al. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS Journal* 2010;277:1618–38.
- Lieberman RL, D'Aquino JA, Ringe D, Petsko GA. Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. *Biochemistry* 2009;48:4816–27.
- Lieberman RL, Wustman BA, Huertas P, Powe AC Jr, Pine CW, Khanna R, et al. Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nature Chemical Biology* 2007;3:101–7.
- Maegawa GH, Tropak MB, Buttner JD, Rigat BA, Fuller M, Pandit D, et al. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme-enhancement agent for Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:23502–16.
- Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 1993;169:373–82.
- Marugan JJ, Huang W, Motabar O, Zheng W, Xiao J, Patnaik S, et al. Non-iminosugar glucocerebrosidase small molecule chaperones. *MedChemComm* 2012;3:56–60.
- Marugan JJ, Zheng W, Motabar O, Southall N, Goldin E, Westbroek W, et al. Evaluation of quinazoline analogues as glucocerebrosidase inhibitors with chaperone activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011.
- McEachern KA, Nietupski JB, Chuang WL, Armentano D, Johnson J, Hutto E, et al. AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease. *The Journal of Gene Medicine* 2006;8:719–29.
- Offman MN, Krol M, Silman I, Sussman JL, Futerman AH. Molecular basis of reduced glucosylceramidase activity in the most common Gaucher disease mutant, N370S. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:42105–14.
- Oulaidi F, Front-Deschamps S, Gallienne E, Lesellier E, Ikeda K, Asano N, et al. Second-generation iminoxylitol-based pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease. *ChemMedChem* 2011;6:353–61.
- Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Molecular Medicine* 2009;1:268–79.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 2005;26:1781–802.
- Premkumar L, Sawkar AR, Boldin-Adamsky S, Tokar L, Silman I, Kelly JW, et al. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase covalently bound to condurititol-B-epoxide. Implications for Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:2381 5–9.
- Rigat B, Mahuran D. Diltiazem, a L-type Ca²⁺ channel blocker, also acts as a pharmacological chaperone in Gaucher patient cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 2009;96:225–32.
- Ringe D, Petsko GA. What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *Journal of Biology* 2009;8:80.
- Sanchez-Olle G, Duque J, Egido-Gabas M, Casas J, Lluch M, Chabas A, et al. Promising results of the chaperone effect caused by iminosugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Blood Cells and Molecular Diseases* 2009;42:159–66.
- Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, et al. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chemistry & Biology* 2005;12:1235–44.
- Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2002;99:15428–33.
- Schiffmann R, Heyes MP, Aerts JM, Dambrosia JM, Patterson MC, DeGraba T, et al. Prospective study of neurological responses to treatment with macrophage-targeted glucocerebrosidase in patients with type 3 Gaucher's disease. *Annals of Neurology* 1997;42:613–21.
- Schmitz M, Alfalah M, Aerts JM, Naim HY, Zimmer KP. Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005;37:2310–20.
- Schrödinger. MacroModel, version 9.9. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2011a.
- Schrödinger. Maestro, version 9.2. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2011b.
- Schrödinger. Suite 2011. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2011c.
- Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal* 2007;5:579–90.
- Steet RA, Chung S, Wustman B, Powe A, Do H, Kornfeld SA. The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2006;103:13813–8.
- Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *Journal of the American Chemical Society* 1990;112:6127–9.
- Sun Y, Liou B, Xu YH, Quinn B, Zhang W, Hamler R, Setchell KD, Grabowski GA. Ex vivo and in vivo effects of isofagomine on acid β -glucosidase variants and substrate levels in Gaucher disease. *Journal Biological Chememistry* 2012;287:4275–87.
- Suzuki Y. Chaperone therapy update: Fabry disease, G(M1)-gangliosidosis and Gaucher disease. *Brain and Development* 2013.
- Walden CM, Sandhoff R, Chuang CC, Yildiz Y, Butters TD, Dwek RA, et al. Accumulation of glucosylceramide in murine testis, caused by inhibition of beta-glucosidase 2: implications for spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:32655–64.
- Wang GN, Reinkensmeier G, Zhang SW, Zhou J, Zhang LR, Zhang LH, et al. Rational design and synthesis of highly potent pharmacological chaperones for treatment of N370S mutant Gaucher disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009;52:3146–9.
- Wei RR, Hughes H, Boucher S, Bird JJ, Guziewicz N, Van Patten SM, et al. X-ray and biochemical analysis of N370S mutant human acid beta-glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:299–308.
- Weinreb NJ. A phase 2 clinical trial of the pharmacological chaperone AT-2101 for the treatment of Gaucher disease. 8th European Working Group on Gaucher Disease (EWGCD) Meeting. Budapest 2008.
- Yu L, Ikeda K, Kato A, Adachi I, Godin G, Compain P, et al. alpha-1-C-Octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006;14:7736–44.
- Yu Z, Sawkar AR, Whalen IJ, Wong CH, Kelly JW. Isofagomine-. 2,5-Anhydro-2,5-imino-d-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007;50:94–100.
- Zheng W, Padia J, Urban DJ, Jadhav A, Goker-Alpan O, Simeonov A, et al. Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2007;104:13192–7.
- Zimmer KP, le Coutre P, Aerts HM, Harzer K, Fukuda M, O'Brien JS, et al. Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *Journal of Pathology* 1999;188:407–14.

Supplementary content for

Selective chaperone effect of aminocyclitol derivatives on G202R and other mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease.

Jenny Serra-Vinardell,^{a‡} Lucía Díaz,^{b,c‡} Hugo Gutiérrez de Terán,^d Gessamí Sánchez-Ollé,^a Jordi Bujons,^e Helen Michelakakis,^f Irene Mavridou,^f Johannes M.F.G. Aerts,^g Antonio Delgado,^{b,c} Daniel Grinberg,^a Lluïsa Vilageliu^{a#*} and Josefina Casas^{b#*}

[‡] Both authors contributed equally to the work.

[#] Co-last authors

^{*} Corresponding authors

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

(b) Research Unit on BioActive Molecules (RUBAM), Departament de Química Biomèdica, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

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

(d) Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Biomedical Center, Box 596, SE-751 24, Uppsala, Sweden

(e) Departament de Química Biològica i Modelització Molecular, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain.

(f) Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of Child Health, Athens11527, Greece

(g) Department of Medicinal Biochemistry, Academic Medical Center. Meibergdreef 15, 1105 AZ, Amsterdam (The Netherlands)

Content:

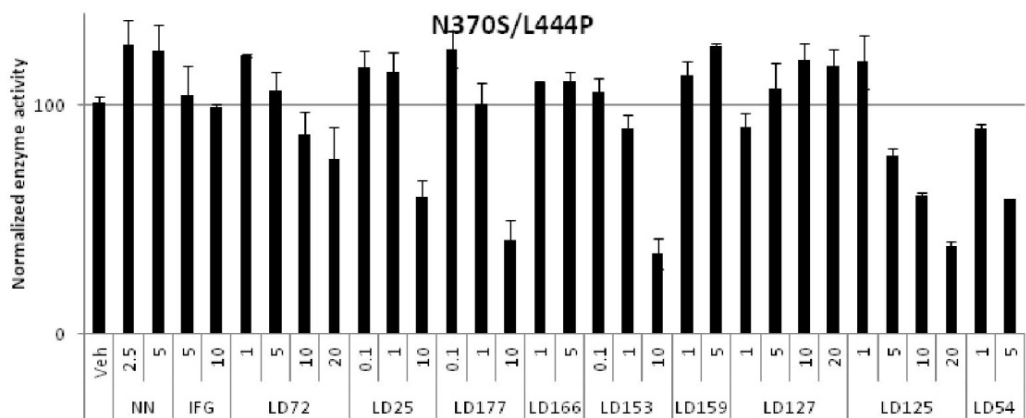
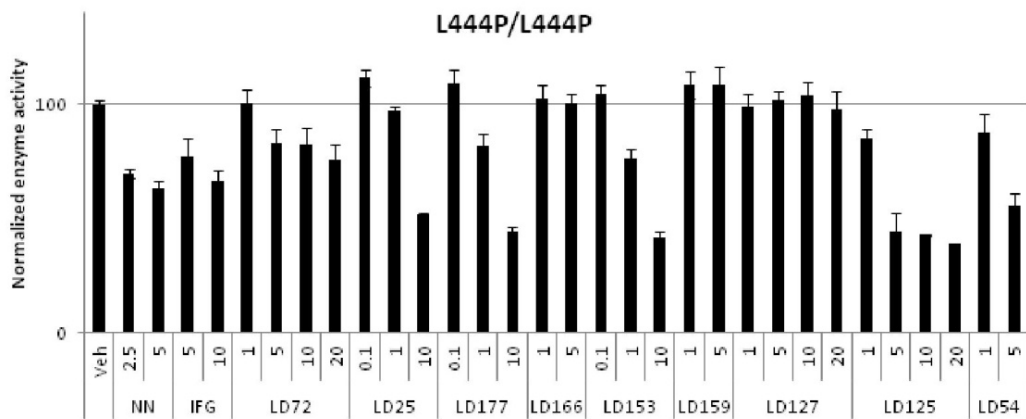
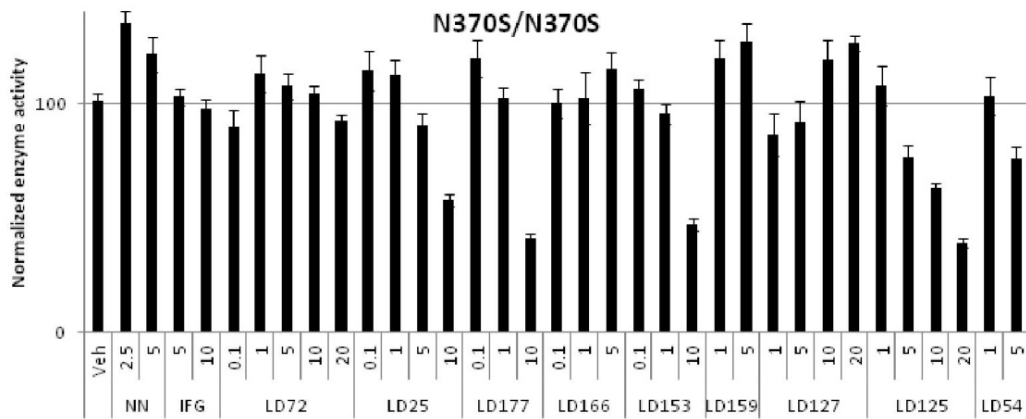
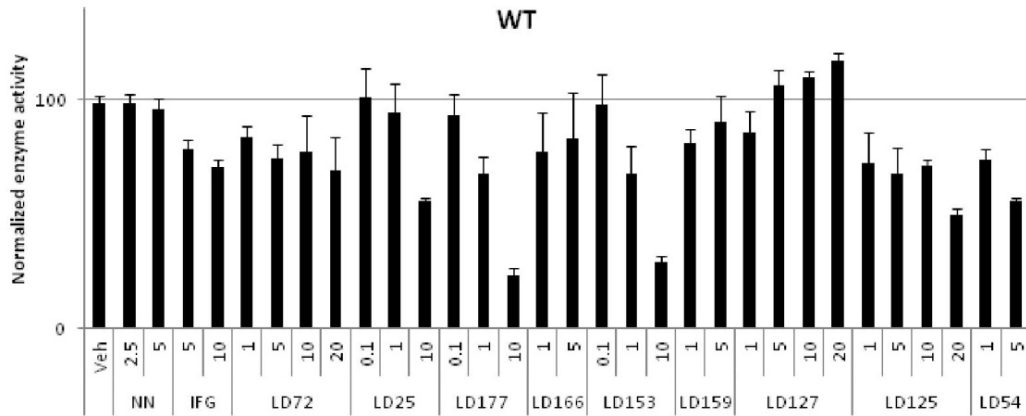
Materials and methods	Page 2
Figure S1	Pages 3-5
Figure S2	Page 6
Figure S3	Page 7
Figure S4	Page 8
Figure S5	Page 9
Figure S6	Page 10
Figure S7	Page 11
Table S1	Page 12
Table S2	Page 13
Table S3	Page 14

Materials and methods

Lysosomal glycosidases assays

Fibroblasts were incubated with or without LD and reference compounds for 6 days, as described above. Then, the cells were trypsinization and the pellets were lysed in H₂O by sonication for 2 min with 10 sec on/off intervals.

The supernatant of the cell lysates were screened for α -galactosidase (20 μ L) in 500 mM acetate buffer (pH 4.5, 20 μ L), β -galactosidase (10 μ L) in 500 mM citrate buffer (pH 4.4, 10 μ L), β -hexosaminidase (10 μ L) in 500 mM citrate buffer (pH 4.4, 10 μ L) and α -glucosidase (25 μ L) in 100 mM acetate buffer (pH 4.0, 25 μ L). Compounds were pre-incubated for 15 min at 37 °C and the respectively substrate were added: 4-MU- α -D-galactopyranoside (10 mM in H₂O, 50 μ L), 4-MU- β -D-galactopyranoside (1 mM in H₂O, 200 μ L), 4-MU-N-acetyl- β -D-glucosaminide (3 mM in H₂O, 50 μ L), 4-MU- α -D-glucopyranoside (1 mM in 100 mM acetate buffer, pH 4.0, 50 μ L). Assays for α -galactosidase and β -galactosidase were carried out for 60 min at 37°C while incubations for β -hexosaminidase and α -glucosidase activity lasted 15 min at 37°C. Finally, the enzymatic reactions of α -galactosidase, β -galactosidase and β -hexosaminidase were stopped by addition of 500 mM carbonate buffer (pH 10.6, 3mL), whereas 100 mM glycine/NaOH buffer (pH 10.6, 150 μ L,) was added in the case of α -glucosidase. Then, the released fluorescence of the corresponding 4-MU-conjugated substrate was measured.



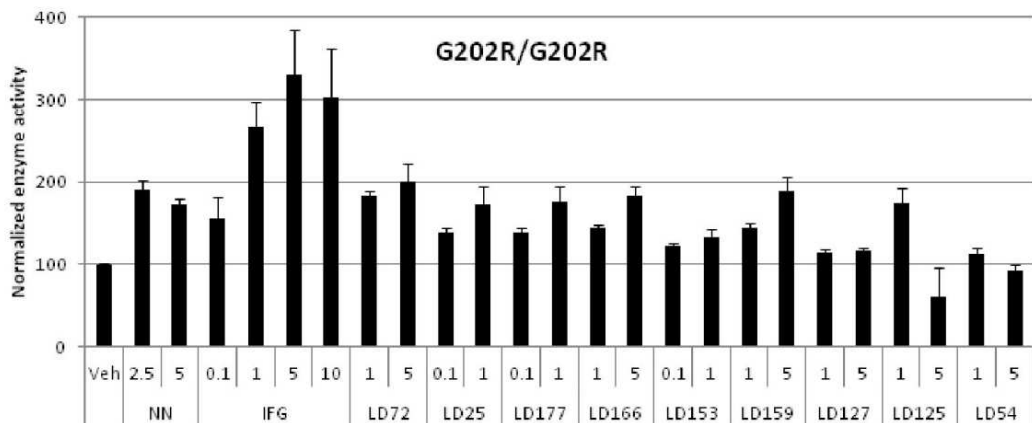
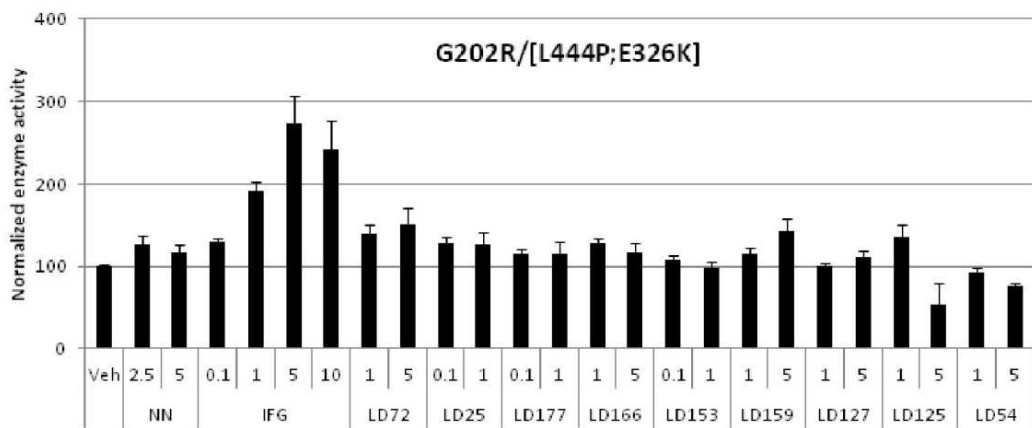
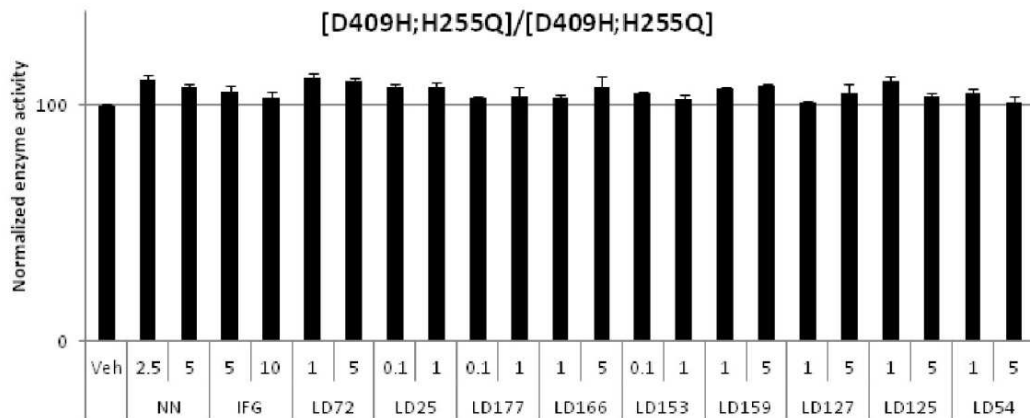
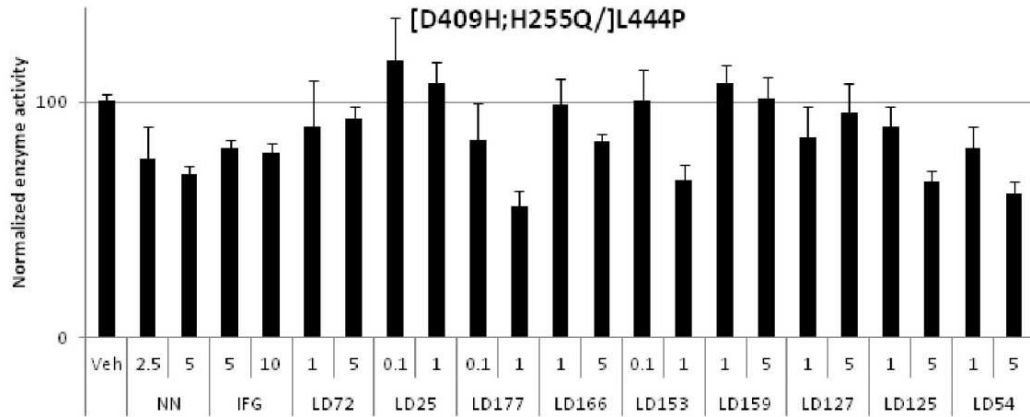


Figure S1. Normalized GBA1 activity of fibroblasts from GD patients after the treatment with NNDNJ, IFG and LD compounds, at the indicated concentrations (μM), for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated cells and untreated (0.1% DMSO) cells. Values are the Median \pm confidence interval of 3-6 separate experiments performed by triplicates. See Table S2 for statistics.

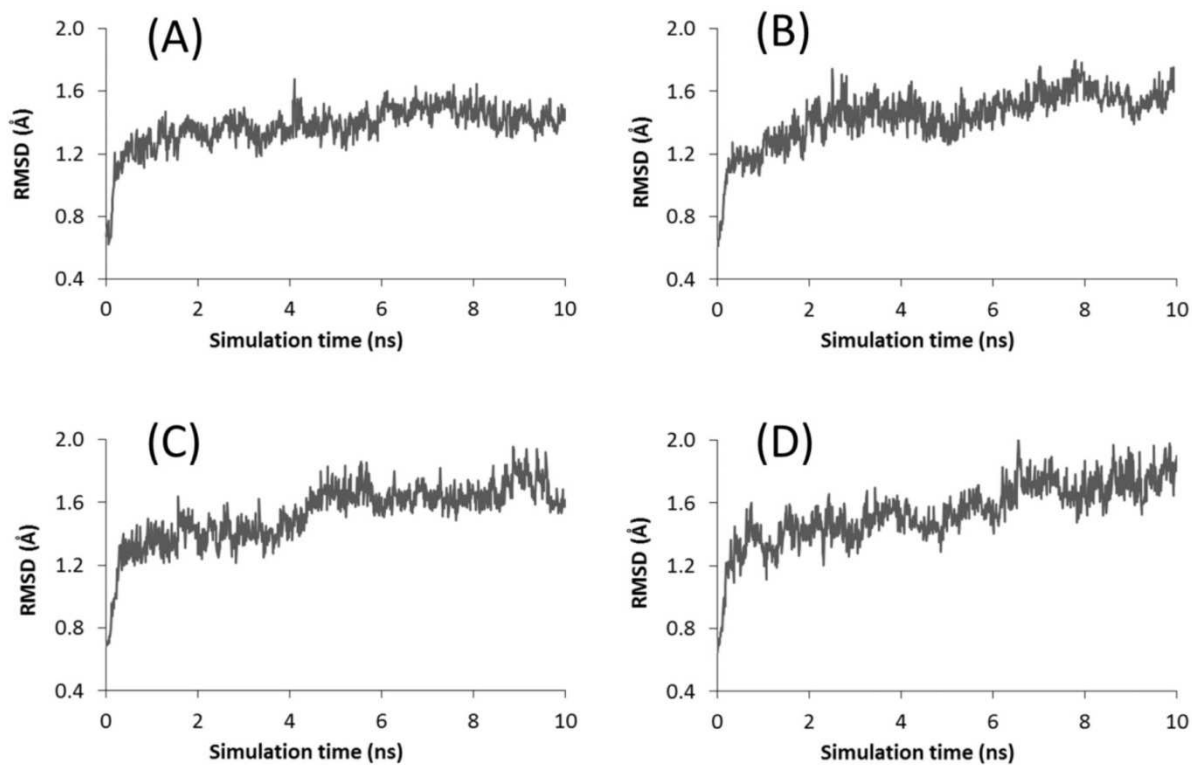


Figure S2. RMSD vs time of representative 10 ns simulations carried out for GBA1 WT (A), G202R (B), WT IFG-bound (C), and G202R IFG-bound (D).

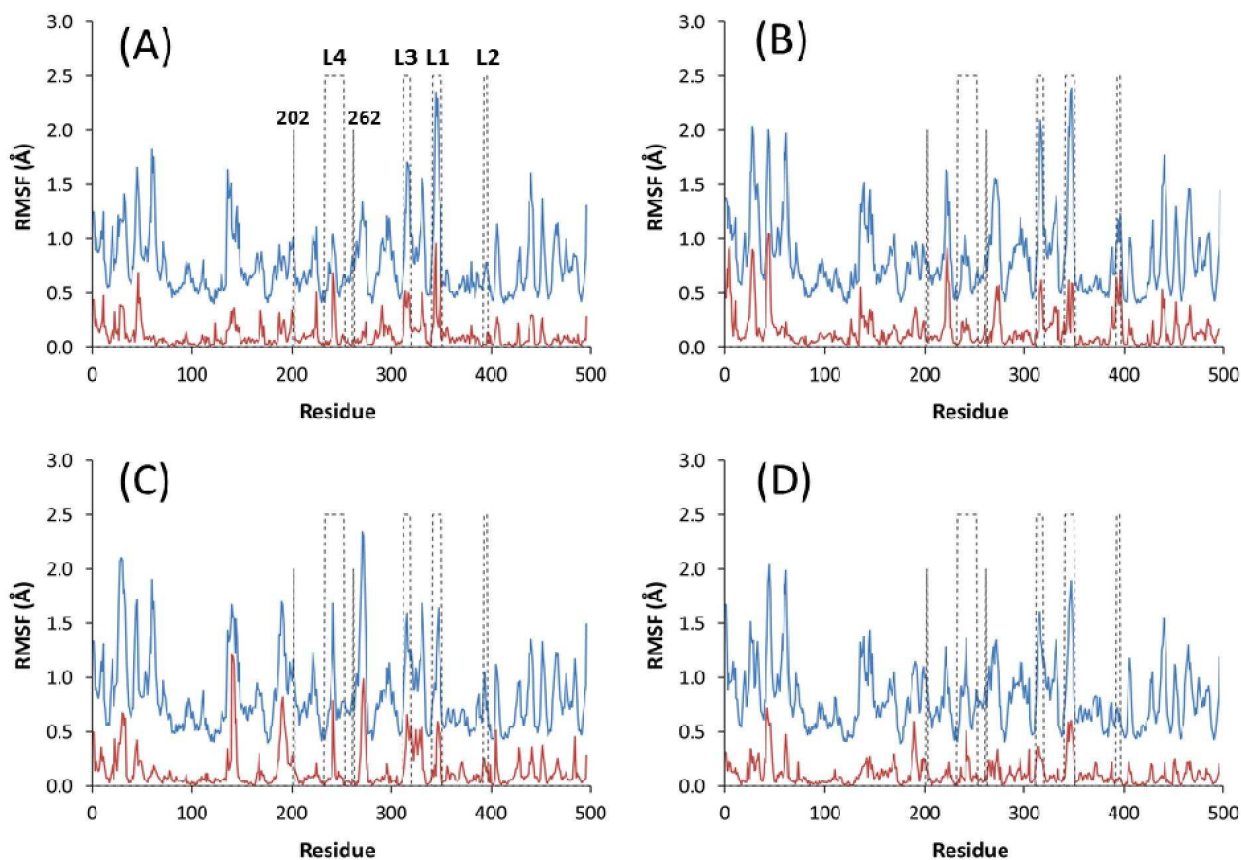


Figure S3. RMSF per residue averaged over 5 simulations (blue line) and standard deviation (red line) for simulations carried out for GBA1 WT (A), G202R (B), WT IFG-bound (C), and G202R IFG-bound (D). Regions corresponding to active center loops L1-L4 are enclosed on a grey dotted line. Position of residues 202 and 262 are also marked.

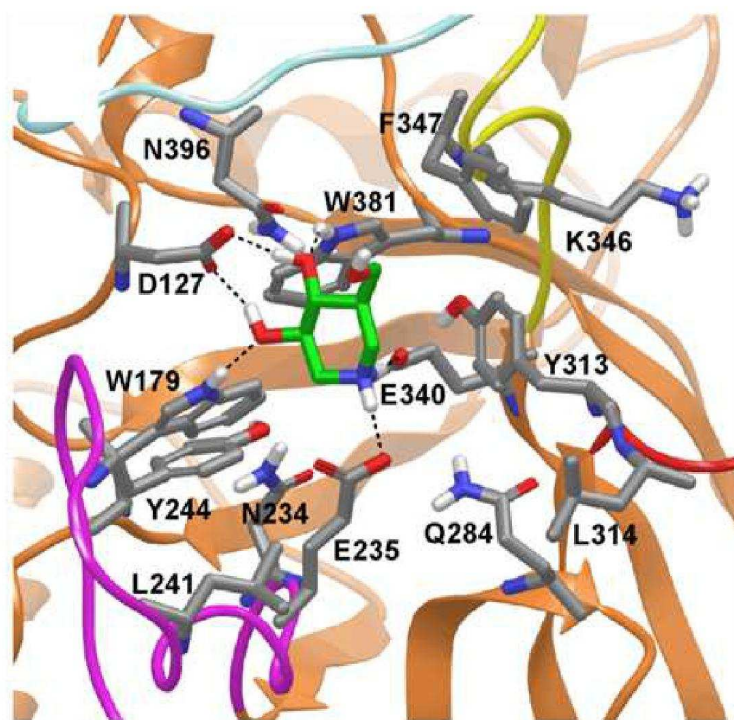


Figure S4. IFG-bound GBA1 structure (PDB 2NSX) showing the main residues of the active center and the four loops that form the vestibule to the active site: L1 (yellow), L2 (cyan), L3 (red) and L4 (purple).

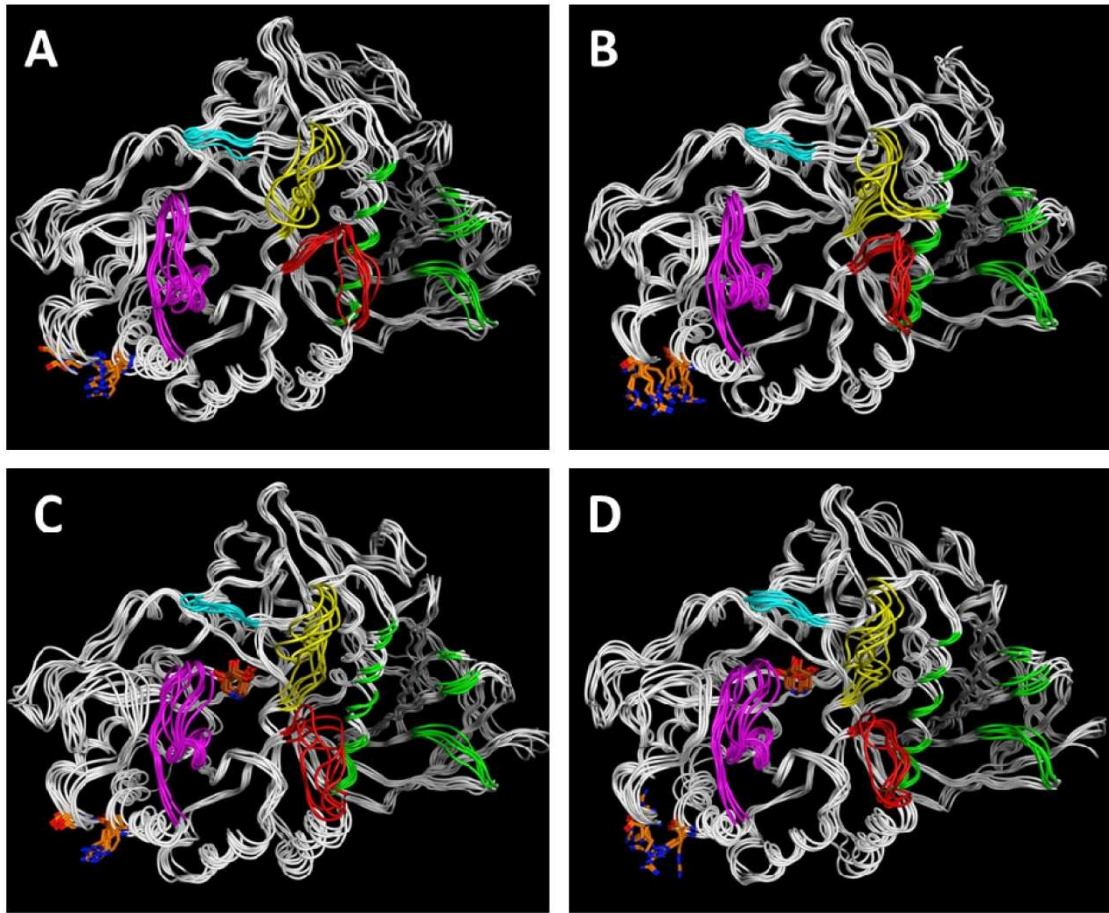


Figure S5. Six snapshots from simulations of GBA1 WT (A), G202R (B), WT IFG-bound (C), and G202R IFG-bound (D). Loops L1 (yellow), L2 (cyan), L3 (red) and L4 (purple), as well as the region (green) postulated as part of the saposin interface (Atrian et al. Proteins 2007, 882-891) are marked. IFG (brown) and residues 202 and 262 (both orange) are also shown.

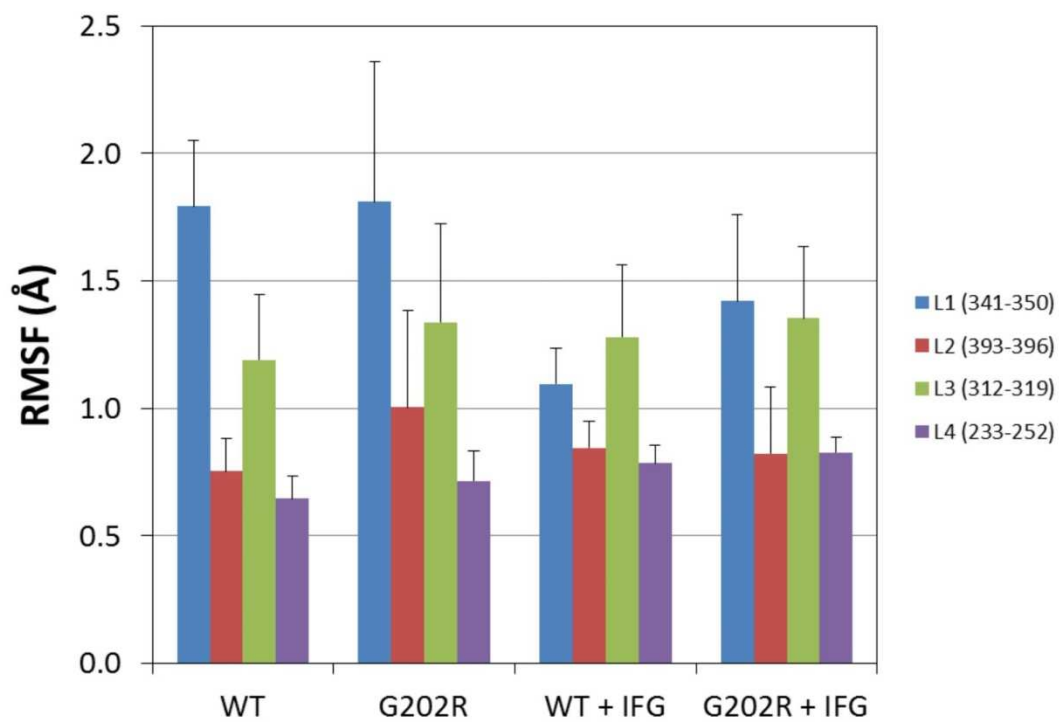


Figure S6. RMSF values averaged over loops L1-L4 and over 5 simulations for the four systems considered.

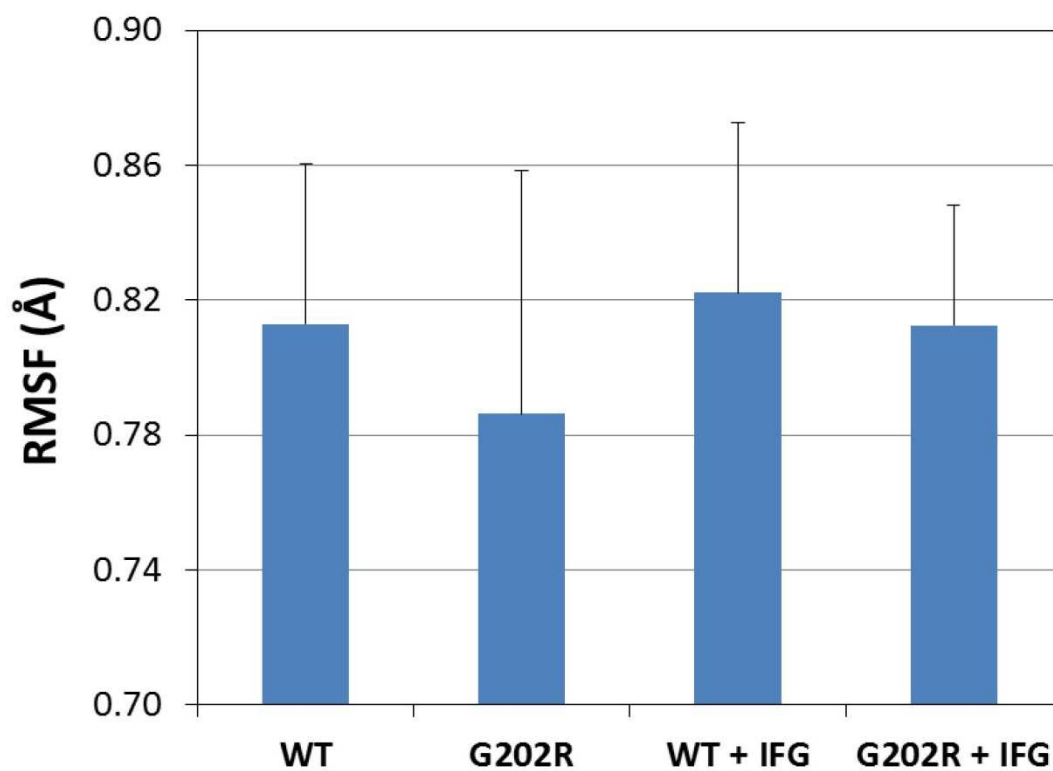


Figure S7. Global RMSF values (calculated over the full sequence) averaged over 5 simulations for the four systems considered.

Table S1. Biochemical data for aminocyclitols LD and iminocyclitols NNDNJ and IFG

Compd	GBA1 IC ₅₀ (μM)		GBA1			GBA2	CC50 (μM) (e,g)
	pH 5.2 (a)	pH 7.4 (a)	K _i (μM)	SR (a,c)	% inh. (a,d)	IC ₅₀ (μM) (e,f)	
LD25	0.10	0.09	0.09(a,b)	21.0	90	11	109
LD54	3.5	1.2	7.6 (a,b)	1.4	20	nd	170
LD72	0.20	0.20	0.33(a,b)	13.0	50	nd	143
LD125	25.4	4.9	20.2(a,b)	11.6	50	(15%)*	80
LD127	44.7	11.0	(nd)	7.6	<5	nd	125
LD153	0.05	0.06	0.05(a,b)	31.2	93	35	132
LD 159	1.5	0.30	0.29(a,b)	7.5	30	nd	>300
LD166	1.8	1.3	0.89(a,b)	6.9	28	nd	>300
LD177	0.12	0.10	0.05(a,b)	30.5	97	nd	138
NNDNJ	2.1	1.8	0.30 (e)	9.2	(nd)	(78%)**	
IFG	0.03	0.008	0.03 (h)			(61%)**	

(a) Diaz, L. *et al. J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5248-5255; Diaz, L. *et al. J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2069-2079.

(b) Competitive inhibitors (determined at pH=5.2)

(c) Stabilization ratio. Defined as the ratio of relative enzymatic activities (inhibitor vs control) at a given inhibitor concentration and incubation time. Tabulated values for 100 μM inhibitor and 60 min incubation time.

(d) % inhibition of GBA1 after incubation for 24h at 50μM inhibitor and 5mM substrate with WT fibroblasts;

(e) This paper

(f) Tested in mouse testicle homogenates.

(g) CC: cytotoxic concentration determined by MTT assay after 6 days incubation with WT fibroblasts

(h) Sun, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4275-4287.

(nd) not determined

* Inhibition at 50 μM

** Inhibition at the lowest tested concentration (0.005 μM).

Table S2. Normalized GBA1 activity of fibroblasts from GD patients after the treatment with NN, IFG and LD compounds for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated and untreated (0.1% DMSO) cells. Values are the Median \pm CI of 3-6 separate experiments performed by triplicates. Values equal or lower than 100 were not remarked, whereas values statistically different were marked in yellow, red or blue depending if $p < 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

CONTROL	WT		N370S/N370S		L444P/L444P		N370S/L444P		ID409H; H255Q/ L444P		ID409H; H255Q/ [L444P; E325K]		G202R/ G202R/G202R	
NNDNJ	CONTROL	98.58 \pm 3.41	101.31 \pm 3.16	99.73 \pm 2.10	100.76 \pm 2.96	100.58 \pm 3.01	100.58 \pm 2.05	100.08 \pm 1.74						
	2.5 μ M	98.16 \pm 4.31	134.91 \pm 5.10	69.58 \pm 2.20	126.30 \pm 10.90	75.93 \pm 13.69	111.00 \pm 1.72	125.57 \pm 11.41	191.85 \pm 10.57					
	5 μ M	96.01 \pm 4.61	121.50 \pm 7.71	62.73 \pm 3.46	123.78 \pm 11.34	69.44 \pm 3.30	107.97 \pm 0.99	117.83 \pm 9.31	172.63 \pm 7.11					
IFG	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	78.11 \pm 4.33	102.71 \pm 3.67	77.21 \pm 7.99	104.04 \pm 13.17	80.26 \pm 3.75	106.00 \pm 2.50	129.90 \pm 3.59	155.52 \pm 25.81					
	5 μ M	70.56 \pm 3.00	97.60 \pm 3.74	66.11 \pm 4.62	98.80 \pm 1.32	78.42 \pm 3.97	103.38 \pm 2.60	192.34 \pm 9.71	267.24 \pm 29.40					
LD25	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	101.19 \pm 12.40	114.42 \pm 8.59	111.51 \pm 3.76	116.14 \pm 7.63	117.84 \pm 18.43	108.00 \pm 1.19	128.86 \pm 6.99	139.76 \pm 4.95					
	5 μ M	94.56 \pm 12.68	112.09 \pm 6.85	96.81 \pm 2.11	114.22 \pm 8.63	107.69 \pm 9.40	108.00 \pm 1.78	125.71 \pm 14.82	173.20 \pm 22.36					
LD54	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	55.51 \pm 1.84	57.75 \pm 2.83	51.72 \pm 0.42	59.49 \pm 7.67	80.46 \pm 9.41	105.00 \pm 2.25	93.00 \pm 4.55	112.78 \pm 7.64					
	5 μ M	73.87 \pm 4.74	103.32 \pm 8.12	87.85 \pm 7.98	89.59 \pm 2.29	60.67 \pm 5.52	101.00 \pm 2.66	76.80 \pm 2.23	93.27 \pm 5.94					
LD72	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	83.71 \pm 4.57	113.02 \pm 7.71	100.16 \pm 6.48	121.57 \pm 0.66	89.55 \pm 19.53	111.49 \pm 1.88	139.02 \pm 11.99	183.15 \pm 5.59					
	5 μ M	74.08 \pm 6.24	107.46 \pm 5.57	83.23 \pm 5.54	106.11 \pm 7.99	92.96 \pm 4.90	110.57 \pm 1.26	150.31 \pm 19.89	200.73 \pm 22.50					
	10 μ M	76.90 \pm 16.04	104.15 \pm 3.37	82.31 \pm 7.24	86.99 \pm 9.84	---	---	---	---	---				
LD125	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	68.94 \pm 15.10	92.65 \pm 2.51	75.68 \pm 6.53	76.48 \pm 13.74	---	---	---	---	---				
	5 μ M	72.43 \pm 12.96	107.64 \pm 8.67	84.83 \pm 3.91	118.63 \pm 11.78	89.73 \pm 8.46	110.36 \pm 1.65	135.81 \pm 14.46	175.20 \pm 17.21					
	10 μ M	67.61 \pm 11.64	76.28 \pm 5.24	44.39 \pm 7.97	77.31 \pm 3.79	66.19 \pm 4.27	103.54 \pm 1.30	54.54 \pm 25.49	60.57 \pm 34.93					
LD127	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	85.84 \pm 9.25	86.21 \pm 9.53	98.92 \pm 5.65	90.48 \pm 5.85	84.92 \pm 13.34	101.48 \pm 0.48	100.80 \pm 3.67	115.35 \pm 4.12					
	5 μ M	106.03 \pm 7.32	91.56 \pm 9.56	101.34 \pm 4.28	106.89 \pm 11.30	95.30 \pm 12.66	105.00 \pm 3.73	111.96 \pm 6.92	116.99 \pm 3.27					
	10 μ M	110.02 \pm 2.06	119.21 \pm 8.73	103.83 \pm 6.02	119.49 \pm 7.39	---	---	---	---	---				
LD153	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	117.35 \pm 3.24	126.51 \pm 3.44	97.48 \pm 8.01	16.90 \pm 7.17	---	---	---	---	---				
	5 μ M	97.79 \pm 12.90	106.44 \pm 4.14	104.45 \pm 3.96	105.70 \pm 5.90	100.98 \pm 12.60	105.00 \pm 1.10	107.02 \pm 6.06	121.85 \pm 3.76					
	10 μ M	67.76 \pm 12.02	95.42 \pm 4.27	76.50 \pm 3.58	89.51 \pm 6.15	66.74 \pm 6.52	102.51 \pm 1.93	97.65 \pm 8.95	134.33 \pm 7.52					
LD159	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	29.07 \pm 2.49	47.02 \pm 2.57	41.83 \pm 2.42	34.83 \pm 6.83	---	---	---	---	---				
	5 μ M	81.12 \pm 5.93	119.89 \pm 7.51	108.44 \pm 5.84	113.17 \pm 5.91	107.79 \pm 7.67	107.00 \pm 0.92	115.53 \pm 6.68	144.79 \pm 4.63					
	10 μ M	90.07 \pm 11.90	127.26 \pm 7.86	108.03 \pm 8.29	125.65 \pm 1.05	101.43 \pm 9.24	108.18 \pm 0.79	142.43 \pm 15.09	189.15 \pm 17.04					
LD166	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	0.1 μ M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	77.19 \pm 17.06	102.44 \pm 11.33	102.50 \pm 5.84	109.43 \pm 1.07	98.98 \pm 10.73	103.40 \pm 1.46	128.26 \pm 6.07	144.41 \pm 3.74					
	5 μ M	83.02 \pm 20.06	114.81 \pm 7.22	100.43 \pm 4.02	110.01 \pm 4.09	83.37 \pm 2.86	107.93 \pm 4.13	116.20 \pm 12.10	183.46 \pm 11.18					
	10 μ M	92.93 \pm 9.19	119.91 \pm 7.96	108.85 \pm 6.22	124.36 \pm 8.11	84.00 \pm 15.71	103.00 \pm 1.02	114.73 \pm 5.81	139.61 \pm 5.57					
LD177	CONTROL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1 μ M	67.42 \pm 7.53	102.08 \pm 5.17	81.93 \pm 5.17	100.22 \pm 9.15	55.81 \pm 6.74	103.99 \pm 3.96	115.61 \pm 14.56	175.75 \pm 18.88					
	10 μ M	23.34 \pm 3.07	40.99 \pm 1.90	44.47 \pm 1.98	40.99 \pm 8.39	---	---	---	---					

Table S3. Normalized lysosomal glycosidase activities of fibroblasts after the treatment with LD and reference compounds for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the ratio between treated and untreated (0.1% DMSO) cells. Values are the Median \pm CI performed by triplicates. * Values statistically different $p < 0.05$.

Compd	Concentration	α -galactosidase	β -galactosidase	α -glucosidase	β -hexosaminidase
NN	1 μ M	0.77 \pm 0.25	1.01 \pm 0.13	0.52 \pm 0.07*	0.89 \pm 0.15
	10 μ M	0.79 \pm 0.02*	1.09 \pm 0.01	0.48 \pm 0.03*	0.97 \pm 0.08
IFG	1 μ M	0.81 \pm 0.04*	0.96 \pm 0.09	0.92 \pm 0.05	0.93 \pm 0.04
	10 μ M	0.82 \pm 0.02*	0.87 \pm 0.09*	0.83 \pm 0.14	0.81 \pm 0.02*
LD25	1 μ M	0.90 \pm 0.03	0.91 \pm 0.36	0.87 \pm 0.27	0.96 \pm 0.18
	10 μ M	1.10 \pm 0.17	1.06 \pm 0.15	1.22 \pm 0.15	1.05 \pm 0.12
LD54	1 μ M	0.84 \pm 0.05	1.16 \pm 0.19	0.90 \pm 0.04	0.93 \pm 0.03
	10 μ M	0.73 \pm 0.11	0.99 \pm 0.07	0.93 \pm 0.09	0.91 \pm 0.07*
LD72	1 μ M	0.95 \pm 0.14	1.13 \pm 0.26	0.89 \pm 0.14*	1.03 \pm 0.02
	10 μ M	1.00 \pm 0.27	1.06 \pm 0.26	0.79 \pm 0.17*	0.67 \pm 0.27
LD125	1 μ M	1.15 \pm 0.17	1.28 \pm 0.10*	1.16 \pm 0.10	1.02 \pm 0.11
	10 μ M	0.97 \pm 0.16	1.28 \pm 0.31	1.24 \pm 0.23	0.99 \pm 0.17
LD127	1 μ M	0.94 \pm 0.18	1.23 \pm 0.02*	1.05 \pm 0.03	0.99 \pm 0.06
	10 μ M	0.86 \pm 0.12	1.19 \pm 0.15	1.11 \pm 0.06	1.05 \pm 0.03
LD153	1 μ M	0.86 \pm 0.05	1.14 \pm 0.07	0.91 \pm 0.04	0.82 \pm 0.05*
	10 μ M	0.77 \pm 0.11*	1.25 \pm 0.13	0.96 \pm 0.13	0.80 \pm 0.10*
LD159	1 μ M	0.80 \pm 0.08	1.09 \pm 0.12	1.02 \pm 0.05	0.92 \pm 0.12*
	10 μ M	1.01 \pm 0.15	0.96 \pm 0.15	0.99 \pm 0.06	0.90 \pm 0.06*
LD166	1 μ M	0.96 \pm 0.09	1.08 \pm 0.33	1.02 \pm 0.05	1.03 \pm 0.18
	10 μ M	1.04 \pm 0.08	1.23 \pm 0.09*	0.99 \pm 0.06	0.92 \pm 0.02*
LD177	1 μ M	1.01 \pm 0.02	1.02 \pm 0.12	0.91 \pm 0.04	1.01 \pm 0.05
	10 μ M	0.93 \pm 0.03	1.15 \pm 0.05	0.96 \pm 0.13	0.98 \pm 0.11

CAPÍTOL 1

Identificació de noves xaperones farmacològiques

Article 2

Potenciadors de la glucocerebrosidasa per genotips seleccionats de la malaltia de Gaucher que s'han sintetitzat per modificació dels imino-D-xilitols (DIXs) amb substitució del C-1- α .

RESUM

S'han sintetitzat una sèrie d'anàlegs híbrids resultants de la combinació de l'estructura de l'iminoxilitol, present a la molècula de referència 1C9-DIX, amb les cadenes laterals de tipus triazolilalquil presents en els aminociclitols LD de segona generació. Els compostos resultants es van estudiar com a potencials xaperones farmacològiques per a la malaltia de Gaucher. Es van seleccionar alguns d'ells per ser assajats com a potenciadors de la glucocerebrosidasa (GBA1) en fibroblasts de pacients Gaucher portadors de diferents genotips. Alguns d'aquests compostos van ser capaços d'augmentar l'activitat de l'enzim amb la mutació G202R. En particular, el compost DIX-28 augmentava l'activitat d'aquest enzim 3 i 5 vegades, a 10nM i a 100nM, respectivament. Malgrat les similituds estructurals d'aquests nous productes amb la isofagomina i amb els aminociclitols LD, els nous compostos es van comprovar com a inhibidors no competitius, amb l'excepció del compost DIX-28, que va mostrar característiques cinètiques d'inhibidor de tipus mixt.

REFERÈNCIA

Jenny Serra Vinardell*, Lucía Díaz*, Josefina Casas, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Helen Michelakakis, Irene Mavridou, Johannes M F G Aerts, Camille Decroocq, Philippe Compain, Antonio Delgado. Glucocerebrosidase Enhancers for Selected Gaucher Disease Genotypes by Modification of A-1-C-Substituted Imino- D -Xylitols (DIXs) by Click Chemistry. *ChemMedChem*. 9: 1744–1754, 2014.

* Autors que han contribuït equivalentment a l'article.

DOI: 10.1002/cmdc.201402023

Glucocerebrosidase Enhancers for Selected Gaucher Disease Genotypes by Modification of α -1-C-Substituted Imino-D-xylitols (DIXs) by Click Chemistry

Jenny Serra-Vinardell,^[a] Lucía Díaz,^[b] Josefina Casas,^[b] Daniel Grinberg,^[a] Lluïsa Vilageliu,^[a] Helen Michelakakis,^[c] Irene Mavridou,^[c] Johannes M. F. G. Aerts,^[d] Camille Decroocq,^[e] Philippe Compain,^{*,[e, f]} and Antonio Delgado^{*,[b, g]}

A series of hybrid analogues was designed by combination of the iminoxylitol scaffold of parent 1C9-DIX with triazolylalkyl side chains. The resulting compounds were considered potential pharmacological chaperones in Gaucher disease. The DIX analogues reported here were synthesized by CuAAC click chemistry from scaffold 1 (α -1-C-propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol) and screened as imiglucerase inhibitors. A set of selected compounds were tested as β -glucocerebrosidase (GBA1) enhancers in fibroblasts from Gaucher patients bearing different genotypes. A number of these DIX compounds were

revealed as potent GBA1 enhancers in genotypes containing the G202R mutation, particularly compound DIX-28 (α -1-C-[(1-(3-trimethylsilyl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol), bearing the 3-trimethylsilylpropyl group as a new surrogate of a long alkyl chain, with approximately threefold activity enhancement at 10 nM. Despite their structural similarities with isofagomine and with our previously reported aminocyclitols, the present DIX compounds behaved as non-competitive inhibitors, with the exception of the mixed-type inhibitor DIX-28.

Introduction

Lysosomal storage disorders constitute a group of genetic diseases characterized by the accumulation of non-degraded substrates within the lysosomes.^[1] These types of disorders are usually classified according to the nature of the substrate accumulated. In particular, sphingolipidoses are the result of the abnormal lysosomal metabolism of glycosphingolipids. Among the different sphingolipidoses, Gaucher disease (GD) is particularly relevant, due to its prevalence. It is characterized by the accumulation of glucosylceramide (GlcCer), as a result of the deficiency of β -glucocerebrosidase (GCase or GBA1), a lysosomal β -glucosidase that hydrolyses GlcCer into glucose and ceramide.^[2] The disease has classically been divided into three types, based on neurological involvement: type 1 (non-neuro-

nopathic), type 2 (acute neuronopathic), and type 3 (subacute neuronopathic).

Despite current therapeutic approaches for the treatment of GD, such as enzyme replacement and substrate reduction therapies, alternative strategies are desirable in order to avoid the drawbacks associated with the above classical approaches.^[3,4] The deficiency of GBA1, in most instances, results from the presence of one or several enzyme mutations that give rise to misfolded forms of the enzyme that are prematurely removed in the endoplasmic reticulum (ER) by the ER-associated degradation (ERAD) system before reaching the lysosome.^[5] In this context, pharmacological chaperones have become an active field of research.^[6]

[a] J. Serra-Vinardell,* Prof. Dr. D. Grinberg, Prof. Dr. L. Vilageliu
Departament de Genètica, Universitat de Barcelona (UB)
IBUB; CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)
Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona (Spain)

[b] Dr. L. Díaz,* Dr. J. Casas, Prof. Dr. A. Delgado
Research Unit on BioActive Molecules (RUBAM)
Departament de Química Biomèdica
Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)
Jordi Girona 18, 08034 Barcelona (Spain)

[c] Prof. Dr. H. Michelakakis, Dr. I. Mavridou
Department of Enzymology & Cellular Function
Institute of Child Health, Athens 11527 (Greece)


[d] J. M. F. G. Aerts
Department of Medicinal Biochemistry, Academic Medical Center
Meibergdreef 15, 1105 AZ, Amsterdam (The Netherlands)

[e] Dr. C. Decroocq, Prof. Dr. P. Compain
Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives
Université de Strasbourg/CNRS (UMR 7509)
Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg (France)
E-mail: philippe.compain@unistra.fr

[f] Prof. Dr. P. Compain
Institut Universitaire de France
103 Bd. Saint-Michel, 75005 Paris (France)

[g] Prof. Dr. A. Delgado
Facultat de Farmàcia, Unitat de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Universitat de Barcelona (UB)
Avda. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona (Spain)
E-mail: delgado@rubam.net

[*] These authors contributed equally to this work.

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201402023>.

Application of this concept to the development of alternative strategies for GD has focused on the discovery of small molecules able to target the mutated enzyme, thus preventing its premature degradation, giving rise to an enzyme activity enhancement. Although classical approaches for the development of pharmacological chaperones have relied on the use of ligand-related reversible enzyme inhibitors, other approaches based on allosteric ligands have recently been disclosed.^[7,8]

Since Sawkar et al.^[9] demonstrated that *N*-nonyldeoxynojiricin (NN-DNJ) produced a 1.5- to 2-fold increase in the activity of the N370S mutation, several molecules have been evaluated, primarily for mutations N370S and L444P,^[10,11] the two most frequent GD mutant alleles. In particular, isofagomine (IFG), which was shown to produce one of the highest increases in the N370S mutant GBA1,^[12,13] entered clinical trials. However, after the results of Phase I and II, the trials were discontinued.^[10,14]

In recent years, our laboratories have been actively working on the discovery of new small GBA1 inhibitors as potential pharmacological chaperones of diverse mutant forms of this enzyme. Thus, a series of potent iminocyclitol derivatives^[15,16] culminated in the second generation iminocyclitol derivative 1C9-DIX (Figure 1), whose efficiency as pharmacological chaperone at low nanomolar concentration in N370S fibroblasts from GD patients was reported.^[17] Interestingly, this compound was used by Overkleeft as a chemical tool to understand GC metabolism and the basis of GD.^[18,19]

Similarly, with a series of aliphatic *N*-alkyl aminocyclitols,^[20,21] interesting GBA1 enhancement in patient fibroblasts with different enzyme mutations were obtained.^[22] Subsequent modifications at the nitrogen side chain using Cu-promoted alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) between a parent aminocyclitol and a set of azides, carefully chosen to ensure a high degree of diversity in the resulting library, led to aminocyclitols of the general structure AC-x (see Figure 1). These were reported as

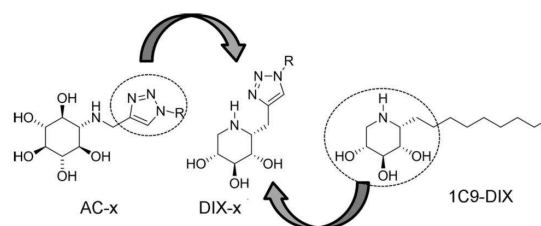


Figure 1. Conceptual design of DIX-x compounds by molecular hybridization of the iminocyclitol scaffold present in 1C9-DIX with the *N*-substituted triazolyl side chain of AC-x compounds.

potent GBA1 inhibitors^[23,24] and also exhibited interesting *in vitro* and *in cellular* enzyme enhancement activities toward several GBA1 mutations (unpublished results).

Results and Discussion

Collection design

The remarkable effects elicited by the *N*-substituted triazolylalkyl side chain in aminocyclitols AC-x prompted us to use this structural motif to explore the chemical diversity around the iminocyclitol scaffold present in compound 1C9-DIX (Figure 1). In conceptually related approaches, the use of click chemistry to explore the chemical diversity in *N*-substituted 1-deoxynojiricin^[25] and the thiol-ene click reaction in α -1-C-substituted imino-D-xylitols^[26] have also been reported. In this way, a small library of iminocyclitols, DIX-x (Figure 1), arising from the substitution of the parent 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol scaffold (DIX) with some of the most interesting triazolylalkyl side chains used in compounds AC-x,^[23] was assembled by means of CuAAC chemistry from iminocyclitol 1 and the azides shown in Figure 2 and Scheme 1. The required azides were selected

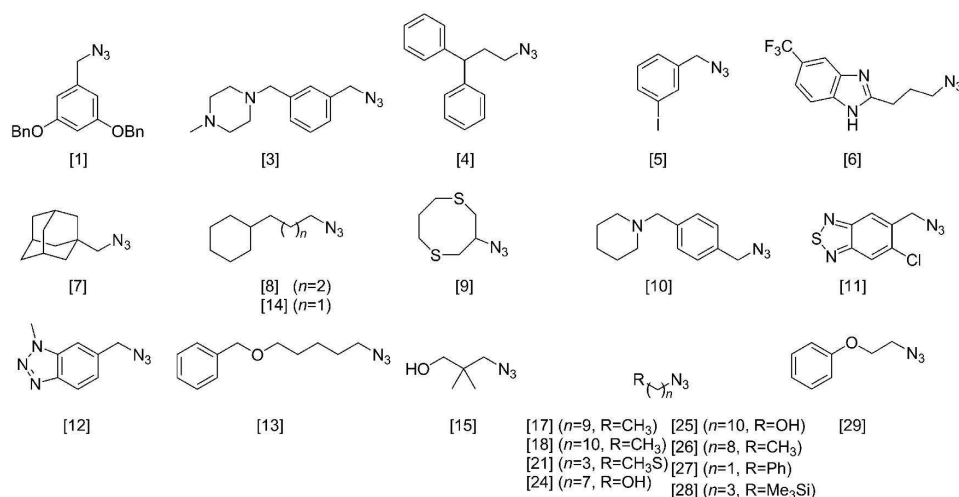
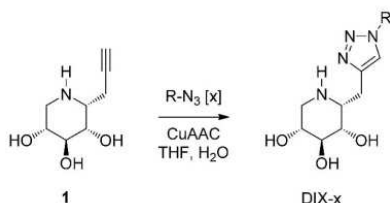


Figure 2. Azides used in the click chemistry reaction of iminocyclitol 1 under conventional CuAAC conditions. Azide numbering has been maintained for comparison with data reported in ref. [23].



Scheme 1. General approach to DIX-x compounds. The azide partner is denoted by [X] (for azide structures, see Figure 2).

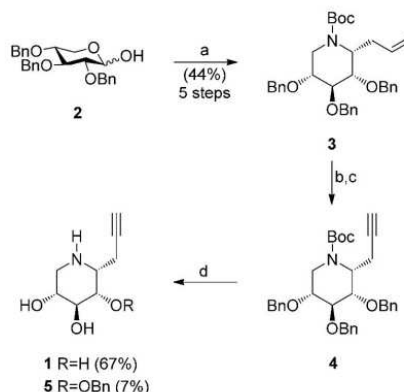
from a collection of commercial precursors (mainly alcohols and bromides), which were filtered as previously described.^[23] In addition, a new silyl-containing side chain was found to confer interesting properties to the resulting DIX adduct (see below).

Synthesis of iminoxyitol scaffold 1

Our approach was based on the protected advanced intermediate **3**,^[27] recently synthesized in one of our groups in five steps and 44% overall yield from 2,3,4-tri-*O*-benzyl-*D*-xylopyranose (**2**)^[28] (Scheme 2). Conversion of alkene **3** into the corresponding alkyne **4** was performed in two steps (68% combined yield) by means of Lemieux-Johnson oxidative cleavage and reaction of the intermediate aldehyde with an excess of the Bestmann–Ohira reagent.^[29] At this stage, the chemoselective deprotection of the *O*-benzyl groups in **4** proved difficult, and our first attempts using boron trichloride^[30] or TMSI^[31,32] led to a complex mixture of products. In this context, the deprotection of *O*-benzyl groups using boron trichloride in the presence of an alkyne functionality were described as troublesome,^[23] due to the reactivity of the C–C triple bond. Fortunately, a combination of boron trichloride and pentamethylbenzene was found to be optimal, leading to the concomitant deprotection of the *O*-benzyl and *N*-*tert*-butoxycarbonyl groups. The interest in pentamethylbenzene as a cation scavenger for related boron trichloride-mediated debenzoylation of aryl benzyl ethers was previously reported.^[33] The main advantage of this scavenger is that it does not decrease the Lewis acidity of boron trichloride. This one-pot process afforded the desired iminoxyitol **1** in 67% yield after chromatographic purification. It is noteworthy that the corresponding monobenzylated analogue **5**, resulting from a partial debenzoylation reaction, was also isolated in 7% yield. ¹H and ¹³C-HMBC NMR experiments showed that the benzyl group was attached to the C2 position of the iminoxyitol system.

Library synthesis and preliminary screening

The iminoxyitols used in this study were obtained by the CuAAC of scaffold **1** with the azides shown in Figure 2, following our previously reported protocol (see Experimental Section).^[23] Reactions were carried



Scheme 2. Reagents and conditions: a) for details, see Ref. [27]; b) OsO₄, NaIO₄, THF/H₂O (1:1), RT, 3 h; c) (MeO)₂P(O)C(N₂)C(O)Me, K₂CO₃, MeOH, RT, 5 h, 68% over two steps; d) BCl₃, pentamethylbenzene, CH₂Cl₂, –78 °C, 4 h.

out on a small scale (~8 mg of scaffold and a 1.2 molar ratio of the required azide; Figure 2) in 1 mL of an H₂O/THF (1:1) mixture for 24 h at room temperature to ensure total consumption of the starting scaffold. The identity of the resulting DIX adducts was confirmed by UPLC-MS analysis of the crude reaction mixtures. As the components of the click reaction (copper salts and ascorbic acid) do not interfere with the enzymatic assay,^[23] the crude mixtures were individually screened as GBA1 inhibitors in recombinant imiglucerase to determine the IC₅₀ value at the optimal pH for enzyme activity (5.2) and at the neutral pH of the ER (7.0) (Table 1).

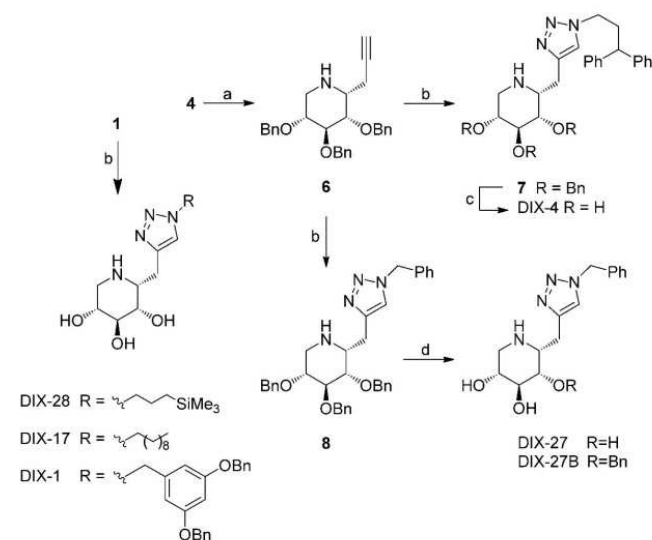
On the basis of the results obtained from in situ screening of the crude CuAAC reaction mixtures (see below), the five most promising iminoxyitol derivatives were selected for further biological evaluation. Compounds DIX-1, DIX-4, DIX-17,

Table 1. IC₅₀ values for the library of iminoxyitols DIX toward imiglucerase at pH 5.2 and pH 7.0.^[a]

Iminoxyitol	IC ₅₀ [nM]		Iminoxyitol ^[b]	IC ₅₀ [nM]	
	pH 5.2	pH 7.0		pH 5.2	pH 7.0
DIX-1	7.9 ± 0.2	6.1 ± 0.31	DIX-14	12.5 ± 0.5	6.8 ± 0.3
DIX-3	166.0 ± 8.3	116.0 ± 5.7	DIX-15	355.0 ± 16.5	314.8 ± 15.1
DIX-4	8.7 ± 0.3	4.6 ± 0.2	DIX-17	7.6 ± 0.5	5.5 ± 0.2
DIX-5	17.2 ± 0.6	7.5 ± 0.4	DIX-18	7.6 ± 0.4	10.0 ± 0.4
DIX-6	160.0 ± 7.5	57.5 ± 3.1	DIX-21	112.0 ± 5.1	50.5 ± 2.3
DIX-7	11.6 ± 0.5	5.9 ± 0.3	DIX-24	83.0 ± 3.9	44.5 ± 2.1
DIX-8	8.1 ± 0.3	5.1 ± 0.2	DIX-25	18.9 ± 0.7	12.1 ± 0.5
DIX-9	29.4 ± 1.2	10.4 ± 0.4	DIX-26	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.3
DIX-10	223.0 ± 10.5	115.9 ± 4.7	DIX-27	7.7 ± 0.4	7.2 ± 0.3
DIX-11	33.0 ± 1.4	20.9 ± 1.1	DIX-28	7.8 ± 0.3	6.4 ± 0.2
DIX-12	223.0 ± 10.8	136.4 ± 6.5	DIX-29	94.0 ± 4.5	27.3 ± 1.2
DIX-13	8.2 ± 0.5	5.8 ± 0.3	1C9-DIX	6.8 ± 0.3 ^[b]	3.9 ± 0.2

[a] All compounds, except 1C9-DIX, were tested as crude mixtures from the CuAAC reaction between **1** and the appropriate azide (Figure 2). Inhibitors were tested at five different concentrations from a 47 mM click reaction mixture, assuming a quantitative conversion of the starting iminoxyitol (for details, see Experimental Section). [b] Data taken from Ref. [16].

DIX-27, and DIX-28 were thus resynthesized and fully characterized (Scheme 3). With the aim of facilitating purification of the iminosugars obtained by CuAAC, iminoxylitols were prepared in two steps from the corresponding azides and protected alkyne **6**, which was obtained, in turn, by treatment of **4** with trifluoroacetic acid (TFA). This strategy, which was first



Scheme 3. Reagents and conditions: a) TFA/CH₂Cl₂ (1:4), RT, 1 h, 93%; b) CuSO₄·5H₂O, Na ascorbate, azide, H₂O/THF (1:1), RT, 15 h, 66% (DIX-28); 60% (DIX-17); 78% (DIX-1); 79% (7); 86% (8); c) BCl₃, CH₂Cl₂, -60 °C → RT, 16 h, 80%; d) BCl₃, CH₂Cl₂, -60 °C → 0 °C, 4 h, 40% (DIX-27); 59% (DIX-27B).

performed to synthesize DIX-4, DIX-27, and DIX-27B gave unsatisfactory results for DIX-1, DIX-17, and DIX-28, which were finally obtained in acceptable yields by click reactions from fully deprotected **1**. The boron trichloride-mediated removal of the O-benzyl groups from **7** and **8** required longer reaction times and higher temperatures to avoid partial debenzoylation reactions, as exemplified by the formation of DIX-27B. In fact, this iminoxylitol was obtained as the major compound from debenzoylation of **8** and, due to its structural singularity, was included in the GBA1 enhancement assays described below.

Imiglucerase is the recombinant DNA-produced analogue of human β -glucocerebrosidase used in enzyme replacement therapy of GD. The results of the imiglucerase inhibitory assay are shown in Table 1. In general, all compounds behaved as potent imiglucerase inhibitors, with IC₅₀ values in the nanomolar range. It is worth mentioning the higher inhibitory potency elicited by iminoxylitol derivatives in comparison with the corresponding aminocyclitol counterparts. Thus, for identical side chain substitution, even in crude reaction mixtures, compounds with the iminoxylitol scaffold (see Figure 1) gave rise to significantly more potent inhibitors than the corresponding aminocyclitol counterparts, which were active in the micromolar range.^[23,24]

As with the aminocyclitol analogues,^[23,24] compounds with an aliphatic chain (DIX-17, DIX-18, and DIX-26) were among the most potent members of the series with IC₅₀ values in the low nanomolar range, similar to that of 1C9-DIX. In general, the affinity of alkylated iminosugar^[15–17] or aminocyclitol^[24] derivatives toward GBA1 increases with the length of the alkyl chain. However, long alkyl chain derivatives may also be cytotoxic, mainly due to membrane insertion and pore formation.^[34] To shorten the alkyl chain length while maintaining an optimal level of lipophilicity, a 3-trimethylsilylpropyl group was introduced as a substituent by means of azide [28] (see Figure 2). Interestingly, the resulting iminoxylitol, DIX-28, showed an inhibitory potency similar to that of the above longer alkyl chain analogues. In agreement with this observation, the short chain and polar DIX-15 was a less potent member of the library, while other short chain analogues bearing strongly lipophilic aryl substituents, such as DIX-1, DIX-4, and DIX-27 were among the most potent inhibitors. The negative effect of a terminal polar substituent is again evidenced in DIX-3, DIX-6, DIX-10, and DIX-21, which were less potent members of the series, albeit with IC₅₀ values still below the micromolar range.

Biochemical studies with purified compounds

From the above preliminary screening with crude CuAAC reaction mixtures, iminoxylitols DIX-1, DIX-4, DIX-17, DIX-27, DIX-27B, and DIX-28 were selected for further biochemical studies and resynthesized for complete chemical characterization (Scheme 3). The IC₅₀ values (see Table 2) were within the range of those obtained with the crude reaction mixtures. The new DIX compounds behaved as non-competitive imiglucerase inhibitors, with the exception of DIX-28, which showed mixed-type inhibition kinetics (Figure 3). In all cases, the K_i values were in the nanomolar range, with the exception of the weak inhibitor DIX-27B.

Compd	IC ₅₀ [nM]		K _i [nM] ^[a]	
	pH 5.2	pH 7.0	pH 5.2	pH 7.0
DIX-1	4.7 ± 0.2	4.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1
DIX-4	10.2 ± 0.4	7.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2
DIX-17	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	3.5 ± 0.2
DIX-27	26.7 ± 1.2	22.2 ± 1.1	16.5 ± 0.7	10.1 ± 0.4
DIX-27B	83.8 ± 4.7	71.4 ± 3.8	> 100	> 100
DIX-28	6.5 ± 0.2	3.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1 ^[b]	1.7 ± 0.1 ^[c]
1C9-DIX	6.8 ± 0.3 ^[e]	3.9 ± 0.2	2.2 ± 0.1 ^[d]	2.2 ± 0.1 ^[de]

[a] Noncompetitive inhibitors (unless otherwise noted). [b] Mixed-type inhibitor ($\alpha = 3.6$). [c] Mixed-type inhibitor ($\alpha = 2.3$). [d] Data taken from Ref. [16]. [e] Competitive inhibitor.

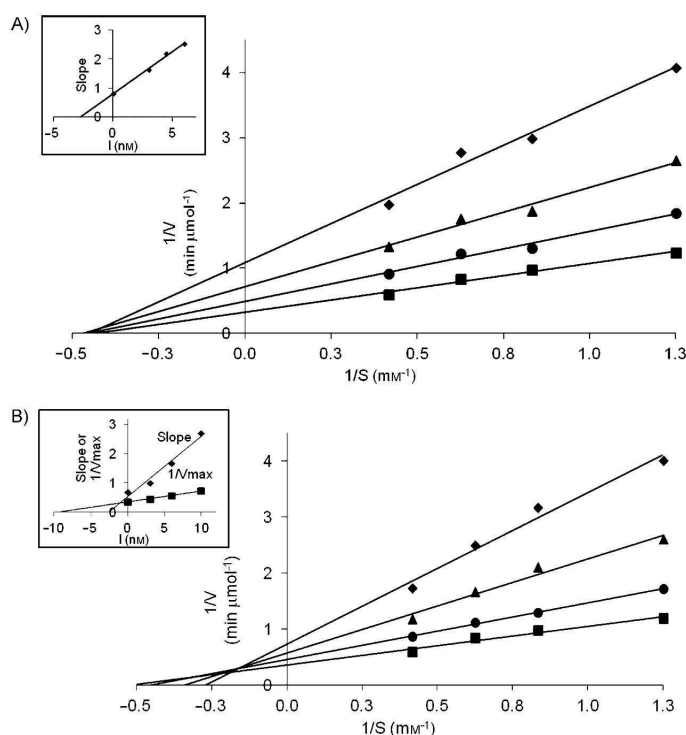


Figure 3. Kinetics for the inhibition of imiglucerase by DIX-17 and DIX-28. Double reciprocal plot of imiglucerase incubated at different concentrations of substrate and compounds. A) DIX-17: 0 μM (■); 3 μM (●); 4.5 μM (▲); 6 μM (◆). B) DIX-28: 0 μM (■); 3 μM (●); 6 μM (▲); 10 μM (◆). Regression lines arise from data obtained in two different experiments performed in triplicate.

Biological studies with purified compounds

The selected compounds were nontoxic in a wild-type (WT) fibroblasts MTT assay at concentrations up to 300 nM after 6 days incubation (Figure S1). The above compounds were next evaluated for their ability to enhance GBA1 residual activity in several GD genotypes (Figures 4 and 5, and Table 1; see also, Figures S2 and S3 in the Supporting Information). In particular, six different genotypes, together with WT fibroblasts, were used in this study (see Experimental Section).

1C9-DIX,^[17] with a reported enhancement of N370S enzyme activity (1.6-fold at 10 nM), was used as a reference. In order to determine whether this compound was active against other mutant GBAs, we tested it on the fibroblasts used in this study. The best results were found for those bearing the genotypes G202R/[L444P; E326K] (genotype E) and G202R/G202R (F) (2–3-fold increase, at 10 nM). For N370S/N370S (C), an enhancement similar to that previously reported was observed (Figure 4).

DIX-28 exhibited the best activity enhancement, reaching a 2.5–3-fold increase for genotypes E and F at 10 nM (Figure 4) and up to 4–5-fold increase at 100 nM (Table S1 and Figure S2). This compound behaved similarly to 1C9-DIX at low concentrations (10 nM) but showed a wider enhancement window, as it was significantly more efficient than 1C9-DIX at higher concen-

trations (Figure 5). Considering that a relatively small amount of enzyme activity may be enough to avoid substrate accumulation,^[35] the observed increase in activity could be clinically significant. Compound DIX-28 also showed a remarkable effect on the N370S/N370S genotype, close to that of 1C9-DIX at 10 nM (Figure 4) and even greater than that of 1C9-DIX at 100 nM (Table S1). This is relevant, considering the high prevalence of the N370S mutation, which is related to the non-neuropathic GD type I.

In all cases, the selected DIX compounds showed preferential GBA1 enhancement towards genotypes E and F (Figure 4; see also Table S1 in the Supporting Information). Compound DIX-1 was the most potent member of the series toward the latter, with a twofold increase in activity at concentrations as low as 0.05 nM (Figure S2). This trend was found even for the weak inhibitor DIX-27B, which showed a modest activity enhancement at 100 nM concentration (Table S1 in the Supporting Information).

As the concentration that gave a maximal activity enhancement differed for different compounds, a wide range of concentrations was analyzed for each product and genotype (Figure 5; see also Figures S2 and S3 in the Supporting Information).

It is worth noting that genotypes E and F contain the G202R mutation, which affects trafficking of the enzyme, precludes its transport to the lysosome,^[36] and is associated with the neuropathic phenotype of the disease. It has been reported that both the N370S and G202R mutations are located in the catalytic domain,^[37] but the latter is located much farther from the active site than N370S. We found that, in most cases, compounds that increase the activity of N370S/N370S (genotype C) also increase the activity of genotypes containing the G202R mutation, as reported by others.^[38] Moreover, the difference is greater in genotypes containing the G202R mutation than in the N370S/N370S genotype. Some authors suggest that, while the N370S mutation affects substrate binding and catalytic activity, the G202R mutation destabilizes GBA but does not disrupt the catalytic activity of the folded protein.^[38] This could be the reason for the good results of several pharmacological chaperones toward the G202R mutation. In this regard, several compounds have been evaluated against this mutation with successful results, such as a DNJ analogue described by Sawkar

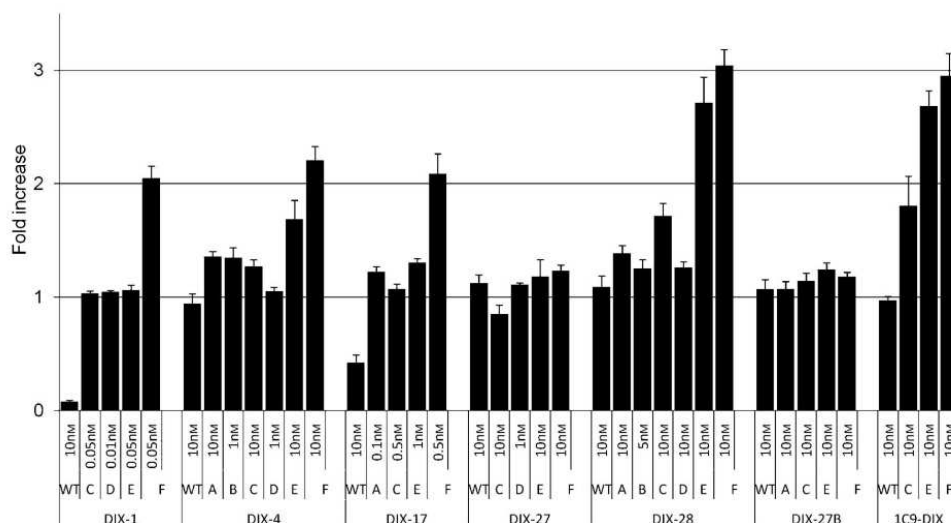


Figure 4. Enhancement of residual GBA1 activity of selected compounds in fibroblasts from GD patients. Fold increase: Increase of the residual GBA1 activity in GD fibroblasts in comparison with untreated cells at different DIX concentrations (for complete data, see Table S1 in the Supporting Information). Genotypes: WT: wild-type; A: [D409 H;H255Q]/[D409 H;H255Q]; B: [D409 H;H255Q]/L444P; C: N370S/N370S; D: L444P/L444P; E: G202R/[L444P;E326 K]; F: G202R/G202R. Values are the median \pm confidence interval (CI) of 3–6 separate experiments performed in triplicate.

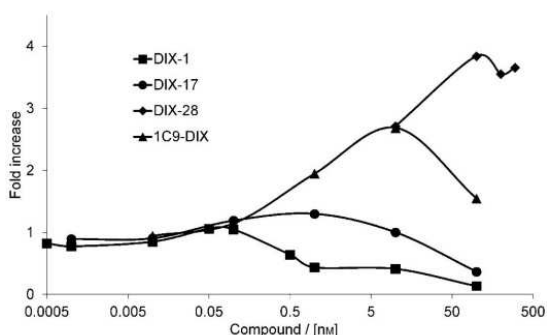


Figure 5. Activity enhancements (fold increase relative to untreated cells) for selected DIX compounds at different concentrations toward fibroblasts containing the G202R/[L444P;E326K] genotype.

et al.^[38] with a 270% increase in activity, bicyclic nojirimycin analogues with sp² iminosugar structure^[39] and approximately a 250% increase in activity, and an azepine analogue^[40] with a modest 20% increase in activity. The best results were obtained for isofagomine derivatives,^[41] with a 7.2-fold increase in activity. However, it must be mentioned that this result was obtained at a concentration of 150 μ M, which is above the threshold for clinical use.

Finally, none of the DIX compounds proved efficient against genotype D (Figure 4; see also Table S1 in the Supporting Information), and only a negligible effect was observed for some of the compounds against genotypes A and B. In the case of genotypes containing the L444P mutation, it is important to note that this mutation is not located at the catalytic domain

of GBA and may be the reason why none of our compounds produced a significant enhancement in activity. In fact, examples of pharmacological chaperones able to target this mutation are scarce in the literature. Calystegine B₂ was the first to be reported on fibroblasts with the L444P/L444P genotype (230% activity increase at 10 μ M)^[11] and, more recently, some bicyclic iminocyclitols have shown promise as enzyme enhancers in induced pluripotent stem cell (iPSC) lines with the L444P/G202R genotype^[42] and in monkey kidney fibroblast COS-7 cells expressing the L444P mutation.^[43]

On the other hand, none of the DIX compounds showed appreciable GBA2 inhibition (in mouse testes homogenates) at concentrations up to 1 μ M, which indicates an irrelevant effect on this enzyme. With regard to other lysosomal enzymes, compounds were inactive against the two human α -glucosidases tested, namely α -glucosidase and α -galactosidase. On the other hand, human β -galactosidase was slightly inhibited by compound DIX-17 (25% inhibition) at 10 μ M, a concentration four orders of magnitude higher than required for the observed GBA1 activity enhancements (Table S2 in the Supporting Information). Finally, despite the fact that activity of human β -hexosaminidase was somehow affected by several of the tested compounds, no good concentration–inhibition correlation was observed. In summary, these compounds exhibited an excellent selectivity towards GBA1. With regard to other carbohydrate-processing enzymes, 1C9-DIX was recently described as an inhibitor of the cytosolic β -glucosidase GBA3.^[18] However, as this enzyme does not appear to modify GD manifestations, no efforts along this line were carried out.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging were used to determine whether DIX-28 increased trafficking of the G202R mutant enzyme to the lysosome

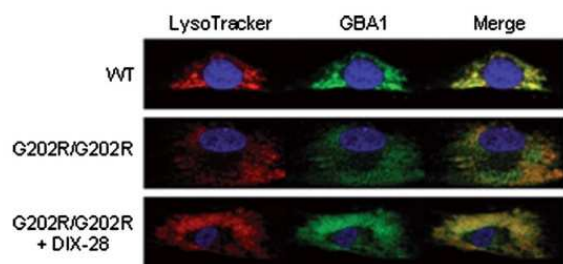


Figure 6. Confocal laser microscope images of immunofluorescence staining for lysosomes (red) and GBA1 (green) in cultured fibroblasts derived from a healthy individual (WT) and a GD patient with the G202R/G202R genotype untreated (middle) and after treatment with DIX-28 (bottom). Nuclei were stained with DAPI (blue). Immunofluorescent labeling of GBA1 was performed with the 8E4 monoclonal antibody, and LysoTracker was used to detect lysosomes.

(Figure 6). Fibroblasts from a Gaucher patient homozygous for the G202R mutation were incubated for 6 days with or without 100 nM of DIX-28. In treated cells, GBA colocalization of the mutant enzyme with a lysosomal marker (LysoTracker) clearly increased, as shown by higher stain intensity compared to untreated cells (Figure 6). In fact, the degree of colocalization following treatment was similar to that observed in wild-type fibroblasts (Figure 6). These results are in agreement with the idea that the G202R mutation does not disrupt the catalytic site. Thus, compound DIX-28 induced the correct folding and trafficking of the enzyme into the lysosome, as shown in Figure 6 and, once there, the enzyme could perform its role, as indicated by the activity results shown here (Figures 4 and 5; see also Table S1 in the Supporting Information).

Conclusions

A new series of α -1-C-substituted DIXs were designed by combination of the iminoxylyl scaffold present in parent 1C9-DIX with the triazolylalkyl side chains present in a series of aminocyclitols previously reported by our groups as GBA1 enhancers with application in GD. The resulting hybrid structures were synthesized using standard CuAAC click chemistry from scaffold **1** and were initially screened as imiglucerase inhibitors. In general, for identical side chain substitution, the DIX scaffold gives rise to appreciably more potent inhibitors than the corresponding aminocyclitol counterparts. The most potent members of the series were resynthesized and tested as GBA1 activity enhancers in fibroblasts from GD patients bearing different genotypes. In general, the DIX compounds reported here were shown to be potent GBA1 enhancers in genotypes containing the G202R mutation, which is responsible for a neuronopathic phenotype of the disease. In particular, 1C9-DIX and the silyl derivative DIX-28 showed approximately threefold activity enhancements at 10 nM, and four- to fivefold increases in activity at 100 nM (Table S1 in the Supporting Information). Moreover, these two compounds are also among the most potent members of the series toward the highly prevalent N370S mutation. Combining click chemistry and an in situ screening approach

allowed identification of the 3-trimethylsilylpropyl group as a promising surrogate of long alkyl chains that are known to induce cytotoxicity.^[34] Interestingly, incorporation of this group into DIX-28 gives rise to a compound with low cytotoxicity exhibiting a remarkable GBA1 enhancement. Regardless of their structural similarities with IFG and with our previously reported aminocyclitol analogues,^[23] the present DIX compounds behaved as non-competitive inhibitors, with the exception of the mixed-type inhibitor DIX-28. However, even though our compounds were inspired by the common "active site-directed ligand strategy" that has classically guided the design of pharmacological chaperones,^[6] our results represent an interesting breakthrough that deserves further attention.

Experimental Section

Chemistry

General: CH_2Cl_2 was distilled over CaH_2 under argon. MeOH was distilled over Mg/I_2 under argon. Tetrahydrofuran (THF) was dried by passage through an activated alumina column under argon. Flash column chromatography was carried out using silica gel 60 (230–400 mesh, 0.040–0.063 mm) purchased from Merck. Automatic flash chromatography was carried out in a Grace Reveleris flash system equipped with UV/Vis and ELSD detectors. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on aluminum sheets coated with silica gel 60 F_{254} purchased from Merck. IR spectra (cm^{-1}) were recorded on a Perkin-Elmer SpectrumOne spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 or Bruker 1C 400 spectrometer, with residual solvent peaks used as reference. Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. ^1H and ^{13}C signals were assigned by COSY (correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum correlation spectroscopy), and HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy) experiments. Coupling constants (J) are in Hertz (Hz), and multiplicity is described as (s) singlet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, and (br) broad. Electrospray ionization (ESI)-high-resolution mass spectrometry (HRMS) mass spectrometry was carried out on a Bruker MicroTOF spectrometer. Specific rotations were determined at room temperature (20 °C) in a PerkinElmer 241 polarimeter for sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Purity of compounds used for enzyme assays was $\geq 95\%$, as judged by HPLC analysis (Gemini C18 column, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) under the following chromatographic conditions: mobile phase A, water containing 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA); mobile phase B, CH_3CN containing 0.1% v/v TFA; flow rate of 1.0 mL min^{-1} ; detection, SATIN-ELS (evaporative light scattering) ($\lambda = 254 \text{ nm}$); gradient elution, 0 min, from 80% A/20% B to 0% A/100% B over 20 min. Each run was followed by a 3 min wash with 80% CH_3CN and 20% water.

α -1-C-Propargyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-tert-butoxycarboxylimino-D-xylitol (4): OsO_4 (2.5% w/w in $t\text{BuOH}$, 0.058 mmol, 590 μL , 10% mol) was added to a solution of **3** (313 mg, 0.576 mmol) in THF/water (1:1, 7.4 mL), followed by addition of NaIO_4 (246 mg, 1.151 mmol, 2 equiv). The mixture was stirred for 3 h at RT, then water (3 mL) was added to the reaction. The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 10 \text{ mL}$). The extracts were combined and dried over Na_2SO_4 . The solution was filtered, and the solvent was removed in vacuo. The crude aldehyde (320 mg) was used in the next step without purification. This residue was dissolved in MeOH (9 mL), and K_2CO_3 (159 mg,

1.152 mmol, 2 equiv) was added. Then, Bestmann–Ohira reagent (104 μ L, 0.691 mmol, 1.2 equiv) was added, and the solution was stirred for 5 h at RT. Et₂O (20 mL) and a solution of NaHCO₃ (5%, 15 mL) were added. The aqueous phase was extracted with Et₂O (3 \times 15 mL), and the extracts were combined and dried over Na₂SO₄. The solution was filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by automatic flash column chromatography (EtOAc/petroleum ether, 0:1 to 1:4) to afford a **4** as a colorless oil as a mixture of rotamers, according to NMR data (212 mg, 68% over two steps): R_f = 0.52 (EtOAc/petroleum ether, 1:3); $[\alpha]_D^{20}$ = -14.0 (c = 1, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.45 (s, 9H), 1.94 (br s, 1H), 2.50 (ddd, J = 17.5, 11.0 and 2.4 Hz, 1H), 2.61–2.85 (m, 2H), 3.34–3.70 (m, 3H, H-2), 4.13 (br dd, J = 13.5 and 5.3 Hz, 0.5H), 4.42–4.58 (m, 1H), 4.60–4.78 (m, 4H), 4.78–4.98 (m, 2.5H), 7.27–7.40 ppm (m, 15H); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 16.1, 28.4, 40.0; 41.5, 50.8, 52.4, 70.3, 72.9, 73.2, 73.3, 75.7, 75.8, 77.4, 78.3, 78.4, 79.0, 79.4, 80.5, 80.7, 81.9, 82.0, 127.7, 127.88, 128.97, 128.02, 128.4, 128.6, 138.1, 138.3, 138.9, 154.8 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 1694 cm⁻¹ (C=O); HRMS (ESI): m/z [M +Na⁺] calcd for C₃₄H₃₉NNaO₅: 564.272, found: 564.271.

α -1-C-Propargyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (1) and α -1-C-propargyl-2-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (5): Pentamethylbenzene (1.790 g, 12.07 mmol, 15 equiv) was added to a solution of **4** (436 mg, 0.805 mmol) in CH₂Cl₂ (16 mL). Then, BCl₃ (7.24 mL, 7.24 mmol, 9 equiv) was added dropwise at -78 °C, and the mixture was stirred for 4 h. MeOH/H₂O (1:20, 2 mL) was added at -78 °C, and the mixture was evaporated to dryness. This step was repeated twice, and the residue was purified by column chromatography (CH₃CN/H₂O/NH₄OH, 15:0.5:0.5 to 10:0.5:0.5). Monobenzylated compound **5** eluted first and was obtained as a colorless oil (14.5 mg, 7%): R_f = 0.45 (CH₃CN/H₂O/NH₄OH, 10:0.5:0.5); $[\alpha]_D^{20}$ = -22.0 (c = 0.33, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 2.36 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.42 (ddd, J = 16.8 Hz, 7.8 and 2.6 Hz, 1H), 2.48 (ddd, J = 16.8 Hz, 7.4 and 2.5 Hz, 1H), 2.78 (dd, J = 13.2 and 5.1 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 13.1 and 3.3 Hz, 1H), 3.22 (td, J = 7.6 and 3.3 Hz, 1H), 3.52 (br q, J = 5.0 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 5.0 and 3.4 Hz, 1H), 3.85 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.25–7.38 (m, 3H), 7.38–7.45 ppm (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): δ = 19.8, 47.1, 54.8, 69.8, 70.7, 71.8, 74.1, 78.8, 81.7, 128.9, 129.39, 129.44, 139.4 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3291 cm⁻¹ (O–H); HRMS (ESI): m/z [M +H⁺] calcd for C₁₅H₂₆N₂O₃: 262.144, found: 262.145. The second fraction was constituted of compound **1** obtained as a white solid (92.5 mg, 67%): R_f = 0.29 (CH₃CN/H₂O/NH₄OH, 10:0.5:0.5); $[\alpha]_D^{20}$ = -9.0 (c = 1, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 2.31 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.36 (ddd, J = 16.6 Hz, 7.4 and 2.5 Hz, 1H), 2.46 (ddd, J = 16.6 Hz, 7.8 and 2.5 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 13.3 and 4.1 Hz, 1H), 3.05 (dd, J = 13.3 and 2.7 Hz, 1H), 3.09 (td, J = 7.5 and 2.6 Hz, 1H), 3.55 (br qd, J = 4.1 and 1.0 Hz, 1H), 3.69–3.73 (m, 1H), 3.76 ppm (t, J = 4.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): δ = 20.5, 47.5, 55.4, 70.4, 71.2, 71.3, 71.3, 82.0 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3282 cm⁻¹ (O–H); HRMS (ESI): m/z [M +H⁺] calcd for C₈H₁₄N₂O₃: 172.097, found: 172.096.

α -1-C-Propargyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (6): TFA (1 mL) was added to a solution of **4** (113 mg, 0.21 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL). After stirring for 1 h at RT, the reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and washed with a 5% aq solution of NaHCO₃ (10 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL), and the extracts were combined and dried over Na₂SO₄. The solution was filtered and evaporated to afford **6** (86 mg, 93%) of sufficient purity, as judged by ¹H NMR, to be used directly in the next CuAAC step: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.01 (t, J = 2.7 Hz, 1H),

2.20 (br s, 1H), 2.40–2.58 (m, 2H), 2.90 (dd, J = 13.1 and 6.2 Hz, 1H), 3.05 (dd, J = 13.2 and 4.0 Hz, 1H), 3.27 (td, J = 7.7 and 3.4 Hz, 1H), 3.45 (br q, J = 5.1 Hz, 1H), 3.61–3.72 (m, 2H), 4.57 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.65 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 7.22–7.39 ppm (m, 15H).

α -1-C-((1-(3,3-Diphenylpropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (7): CuSO₄·5H₂O (2.0 mg, 0.008 mmol, 0.1 equiv) and sodium ascorbate (3.2 mg, 0.016 mmol, 0.2 equiv), dissolved in water (1 mL), was added to a solution of **6** (35.5 mg, 0.080 mmol) and 1,1-diphenyl-3-azidopropane (26.7 mg, 0.113 mmol, 1.4 equiv) in THF (1 mL). The mixture was stirred overnight at RT. The mixture was diluted with EtOAc (5 mL), and the phases were separated. The organic phase was washed with a 10% aq solution of NH₄OH (5 mL) and then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 1:0 to 95:5) to afford **7** as a pale yellow oil (43 mg, 79%): R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); $[\alpha]_D^{20}$ = -5.0 (c = 1, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.12 (br s, 1H), 2.78 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 2.98–3.20 (m, 4H), 3.48–3.55 (m, 1H), 3.55–3.64 (m, 1H), 3.68 (dd, J = 6.3 and 3.8 Hz, 1H), 3.89 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.68 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.77–4.87 (m, 3H), 7.28–7.57 ppm (m, 26H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 24.7, 36.0, 44.5, 48.3, 48.7, 55.2, 72.1, 72.5, 74.1, 76.8, 77.4, 78.1, 122.0, 126.8, 127.68, 127.70, 127.73, 127.8, 127.86, 127.87, 127.93, 128.1, 128.4, 128.5, 128.9, 138.6, 138.7, 143.3, 145.8 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3260 cm⁻¹ (N–H); HRMS (ESI): m/z [M +H⁺] calcd for C₄₄H₄₇N₄O₃: 679.364, found: 679.365.

α -1-C-(1-Benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (8): CuSO₄·5H₂O (2.3 mg, 0.010 mmol, 0.1 equiv) and sodium ascorbate (3.7 mg, 0.020 mmol, 0.2 equiv), dissolved in water (1 mL), were added to a solution of **6** (42 mg, 0.095 mmol) and benzylazide (16.5 mg, 0.124 mmol, 1.3 equiv) in THF (1 mL). The mixture was stirred overnight at RT. The mixture was diluted with EtOAc (5 mL), and the phases were separated. The organic phase was washed with a 10% aq solution of NH₄OH (5 mL) and then dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 1:0 to 95:5) to afford **8** as a pale yellow oil (47 mg, 86%): R_f = 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); $[\alpha]_D^{20}$ = -3.0 (c = 1, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.07 (br s, 1H), 2.96–3.15 (m, 4H), 3.43–3.59 (m, 2H), 3.62 (dd, J = 6.3 and 4.0 Hz, 1H), 3.83 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.71–4.79 (m, 3H), 5.52 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 5.58 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 7.28–7.54 ppm (m, 21H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 24.7, 44.4, 54.1, 55.2, 72.1, 72.4, 74.0, 76.8, 77.4, 78.1, 121.7, 127.6, 127.70, 127.73, 127.86, 127.92, 128.0, 128.10, 128.15, 128.39, 128.44, 128.7, 129.1, 135.0, 138.6, 138.7, 146.4 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3295 cm⁻¹ (N–H); HRMS (ESI): m/z [M +H⁺] calcd for C₃₆H₃₉N₄O₃: 575.302, found: 575.301.

α -1-C-((1-(3,3-Diphenylpropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-4): BCl₃ (1 M in CH₂Cl₂, 0.4 mL, 0.4 mmol, 6 equiv) was added dropwise to a solution of **7** (44 mg, 0.065 mmol) in CH₂Cl₂ (2.5 mL) at -60 °C. The solution was allowed to warm to RT and was stirred overnight. Then, MeOH/H₂O (20:1, 3 mL) was added, and the solution was evaporated to dryness. This step was repeated, and the residue was purified by column chromatography (CH₃CN/NH₄OH/H₂O, 15:0.5:0.5) to afford DIX-4 as a white solid (21 mg, 80%): R_f = 0.29 (CH₃CN/NH₄OH/H₂O, 10:1:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -6.5 (c = 1, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 2.69 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 3.11 (dd, J = 14.8 and 7 Hz, 1H), 3.16–3.30 (m, 2H), 3.44 (dd, J = 13.2 and 2.0 Hz, 1H), 3.70–3.82 (m, 2H), 3.88–4.01 (m, 3H), 4.33 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.09–7.23 (m, 3H), 7.23–7.37 (m, 7H),

7.82 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 25.9, 36.8, 47.5, 49.6, 50.1, 56.3, 67.8, 68.0, 69.6, 125.0, 127.6, 128.8, 129.7, 142.9, 145.0 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3330, 3025 cm^{-1} (O–H and N–H); HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3$: 409.225, found: 409.223.

α -1-C-((1-Benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-27) and α -1-C-((1-Benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-2-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-27B): BCl_3 (1 M in CH_2Cl_2 , 0.5 mL, 0.50 mmol, 6 equiv) was added dropwise to a solution of **8** (47 mg, 0.082 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL) at -60°C . The mixture was allowed to warm to 0°C over 3 h. Then, MeOH/ H_2O (20:1, 3 mL) was added and, after 10 min of stirring at 0°C , the solvent was evaporated. This step was repeated, and the residue was purified by column chromatography ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 15:0.5:0.5 to 10:0.5:0.5). Monobenzylated compound DIX-27B was eluted first (19 mg, 59%); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.0$ ($c=1$, MeOH); ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 2.80–3.03 (m, 3H), 3.10 (dd, $J=13.6$ and 2.2 Hz, 1H), 3.26–3.37 (m, 1H), 3.55–3.60 (m, 1H), 3.64 (br t, $J=3.4$ Hz, 1H), 3.74–3.79 (m, 1H), 4.52 (d, $J=11.9$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J=12.2$ Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 7.18–7.41 ppm (m, 10H), 7.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 27.6, 48.3, 54.9, 56.2, 67.7, 68.6, 73.3, 77.2, 124.4, 128.8, 128.9, 129.1, 129.4, 129.5, 130.0, 136.8, 139.5, 145.8 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3276, 3032, 2918 cm^{-1} (O–H, N–H); HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$: 395.208, found: 395.207. The second fraction was constituted of DIX-27, obtained as a pale yellow oil (10 mg, 40%); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.0$ ($c=0.55$, MeOH); ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 3.11 (dd, $J=15.1$ and 6.9 Hz, 1H), 3.17–3.28 (m, 2H), 3.43 (dd, $J=13.1$ and 1.8 Hz, 1H), 3.70–3.74 (m, 1H), 3.78 (br td, $J=8.4$ and 1.8 Hz, 1H), 3.90–3.99 (m, 2H), 5.59 (s, 2H), 7.28–7.43 (m, 5H), 7.92 ppm (s, 1H); ^{13}C (75 MHz, MeOD): δ = 25.9, 47.5, 55.0, 56.3, 67.8, 68.0, 69.6, 124.9, 129.3, 129.6, 130.0, 136.7, 143.3 ppm (C-7); IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3240, 3124, 3001 cm^{-1} (O–H, N–H); HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$: 305.161, found: 305.160.

General method for CuAAC from scaffold 1

Iminoxylitol **1** and the corresponding azide (1.3 equiv) were solubilized in THF (1 mL). Next, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg, 0.010 mmol, 0.1 equiv) and sodium ascorbate (0.2 equiv) in water (1 mL) were successively added. The mixture was stirred overnight at RT, then the solvents were evaporated to dryness. The crude product was filtered through a plug of Celite and purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 15:0.5:0.5).

α -1-C-((1-(3,5-bis(Benzyloxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-1): Following the general method, iminoxylitol **1** (16 mg, 0.093 mmol) was combined with 1-azidomethyl-3,5-bis(benzyloxy)benzene^[23] (42 mg, 0.122 mmol) to afford DIX-1 as a white solid (37.5 mg, 78%); $R_f=0.12$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 10:0.5:0.5); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.0$ ($c=0.17$, MeOH); ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 2.99 (dd, $J=14.7$ and 7.2 Hz, 1H), 3.03–3.15 (m, 2H), 3.22–3.30 (m, 1H), 3.57 (td, $J=7.4$ and 2.2 Hz, 1H), 3.61–3.65 (m, 1H), 3.73–4.81 (m, 1H), 3.87 (t, $J=3.8$ Hz, 1H), 5.03 (s, 4H), 5.47 (s, 2H), 6.53–6.58 (m, 2H), 6.59–6.62 (m, 1H), 7.23–7.44 (m, 10H), 7.78 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 26.4, 47.5, 54.9, 56.2, 69.0, 69.3, 70.4, 71.2, 103.1, 108.4, 124.7, 128.6, 128.9, 129.5, 138.4, 138.8, 144.6, 161.8 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3253 cm^{-1} (O–H and N–H); HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_3$: 517.245, found: 517.244.

α -1-C-((1-Decyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-17): Following the general method, iminoxylitol **1** (18 mg, 0.105 mmol) was combined with 1-azidodecane^[23] (25 mg, 0.137 mmol) to afford DIX-17 as a white solid (22.2 mg,

60%); $R_f=0.22$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 10:1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.0$ ($c=1$, MeOH); ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 0.90 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.17–1.46 (m, 14H), 1.80–1.97 (m, 2H), 3.12 (dd, $J=14.8$ and 6.6 Hz, 1H), 3.17–3.29 (m, 2H), 3.44 (dd, $J=13.1$ and 2.0 Hz, 1H), 3.71–3.74 (m, 1H), 3.78 (td, $J=7.3$ and 1.7 Hz, 1H), 3.90–4.01 (m, 2H), 4.39 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.91 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 14.4, 23.7, 25.9, 27.5, 30.1, 30.4, 30.5, 30.6, 31.3, 33.0, 47.5, 51.4, 56.3, 67.9, 68.0, 69.6, 124.8, 142.9 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3348 cm^{-1} (O–H and N–H); HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3$: 355.271, found: 355.270.

α -1-C-((1-(3-(Trimethylsilyl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol (DIX-28): Following the general method, iminoxylitol **1** (17 mg, 0.099 mmol) was combined with 3-azidopropyltrimethylsilane^[44] (20.3 mg, 0.129 mmol) to afford DIX-28 as a white solid (21.6 mg, 66%); $R_f=0.43$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 10:1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.5$ ($c=1$, MeOH); ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 0.0 (s, 9H), 0.44–0.56 (m, 2H), 1.83–1.98 (m, 2H), 3.12 (dd, $J=14.9$ and 6.7 Hz, 1H), 3.18–3.39 (m, 2H), 3.45 (dd, $J=13.1$ and 1.9 Hz, 1H), 3.71–3.76 (m, 1H), 3.79 (td, $J=7.5$ and 1.5 Hz, 1H), 3.90–4.01 (m, 2H), 4.37 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.92 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = -1.9, 14.3, 25.9, 26.3, 47.5, 54.4, 56.4, 67.8, 68.0, 69.6, 124.9, 142.8 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3336, 3022 (O–H and N–H) cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z [$M+H^+$] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3\text{Si}$: 329.201, found: 329.200.

General method for parallel click chemistry and direct screening: A solution of iminoxylitol **1** (8 mg, 0.047 mmol) and the corresponding azides [1]–[29] (0.055 mmol) in a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1, 1 mL) in a 5 mL screw cap vial was treated with a catalytic amount of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (around 250 μg), followed by sodium ascorbate (5 μmol , around 1 mg). After stirring for 24 h at RT, an aliquot was analyzed (UPLC-HRMS) to confirm click adduct formation. The crude reaction mixtures containing compounds DIX were used directly as mother solutions (47 mM) for in vitro IC_{50} calculation of imiglucerase inhibition (Table 1).

In vitro activity was determined as previously reported.^[24] IC_{50} values were determined by plotting percent activity versus $\log [I]$, using at least five different inhibitor concentrations. Type of inhibition and K_i values for the most active inhibitors were determined by Lineweaver–Burk and Dixon plots of assays performed with different concentrations of inhibitor and substrate. IC_{50} data from crude click chemistry mixtures are reported in Table 1. Data from individually synthesized compounds are reported in Table 2.

Biological evaluation

Fibroblast culture assay: Skin fibroblasts were obtained from non-neurological (type 1) and neurological (types 2 and 3) GD patients with distinct genotypes, which were diagnosed, in most cases (genotypes: N370S/N370S, L444P/L444P, [D409H;H255Q]/[D409H;H255Q], G202R/G202R, [D409H;H255Q]/L444P), at the Institute of Child Health, Athens. In one case (G202R/[L444P;E326K]), diagnosis was performed at the Institut de Bioquímica Clínica, Barcelona. Fibroblasts from healthy individuals were used as controls. Fibroblast cultures were established following routine procedures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS).

Lysosomal glucocerebrosidase assay (GBA1): For the assay of GBA1 in intact cells, 10000 cells were plated into 24-well assay plates over 6 days in DMEM with 10% FBS serum at 37°C under 5% CO_2 , either with or without DIX compounds at different concentrations. Culture media was replaced at day 3 with fresh media supplement-

ed with the corresponding compound dissolved in DMSO. Cells were washed, and the enzyme assay was performed as follows: substrate (100 μL , 5 mM 4MU- β -glucopyranoside) in 0.1 M acetate buffer (pH 5.2) was added to each well, up to a total volume of 260 μL , then the plates were incubated for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. The enzyme reaction was stopped with 2 mL of 100 mM glycine/NaOH, pH 10.7, and the released fluorescence was measured (λ_{ex} : 355 nm; λ_{em} : 460 nm). For each experiment, untreated (no compound added) and treated cells were plated in quadruplicate. Nonspecific GBA1 activity was evaluated by addition of CBE (2 h 0.5 mM) to control wells and was shown to account for about 1% of the activity in control fibroblasts.

Non-lysosomal glucocerebrosidase assay (GBA2): The effect of DIX compounds on GBA2 activity was determined in mouse testes homogenates, following a procedure described by Walden et al.^[45] with modifications. Homogenates were prepared in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 5.8 (1:3; w/v) using a manual glass homogenizer and were centrifuged for 15 min at 13500 rpm at 4 $^{\circ}\text{C}$ (Beckman J2-21). The pellets were washed three times in phosphate buffer and resuspended in the same buffer (1:1; w/v). The concentration was adjusted to 1 mg mL^{-1} of protein, and the aliquots were stored at -80°C . For the GBA2 assay, aliquots of mouse testes homogenates were pre-incubated at room temperature with conduritol β -epoxide (CBE) (Toronto Research Chemicals, Downsview, ON, Canada) at a final concentration of 2.5 mM for 30 min. Then, 20 μL of homogenates and 5 μL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.8), supplemented with products to the desired concentration, were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Then, 15 μL of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (Sigma) was added to a final concentration of 3 mM, and the mixture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min. The reaction was stopped by adding 100 μL of 100 mM glycine/NaOH, pH 10.7, and the released fluorescence was measured (λ_{ex} : 355 nm; λ_{em} : 460 nm).

Cytotoxicity assay: The cytotoxicity of the selected compounds and the cell viability over a period of 6 days were tested by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay^[23] (see Supporting Information).

Immunofluorescence staining and confocal microscopy imaging: For immunofluorescence, 5000 cells per well were seeded overnight on 10 mm glass coverslips (Marienfeld) in 24-well plates. The cells were then incubated for 6 days in fresh medium (DMEM, 10% FBS) at 37 $^{\circ}\text{C}$ under 5% CO_2 in the absence or presence of 100 nM of DIX-28. Culture media was replaced every 3 days with fresh media supplemented with 100 nM of DIX-28. The untreated cells were incubated with 0.1% DMSO. On day 6 of treatment, the cells were incubated for 1 h with 75 nM LysoTracker Red DND-99 (L7528; Invitrogen) at 37 $^{\circ}\text{C}$. Then, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at room temperature. The cover slips were then washed 4 times for 5 min each with 0.3 M PBS, and the cells were permeabilized with 0.1% Tween in PBS. The cells were then incubated with primary antibody (mouse monoclonal anti-GBA 8E4, diluted 1:100)^[46] in a solution of PBS with 10% NDS (normal donkey serum, Millipore) and 0.1% Tween at 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight. The coverslips were then washed three times with 0.3 M PBS and incubated for 1 h with secondary antibody anti-mouse (Cy2-conjugated AffinPure donkey anti-mouse IgG (H+L), diluted 1:100, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) followed by DAPI staining (1:10000 dilution in a solution of PBS with 10% NDS and 0.1% Tween for 10 min; Invitrogen). Staining was viewed with a Leica TCS-SP2, and the images were analyzed using Fiji-Image J software.

Statistical analysis

For all measures, the hypothesis of normality was rejected, and the nonparametric Mann-Whitney U test was used. Normal distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. The SPSS statistical program was used for statistical analysis.

Supporting Information

Toxicity of DIX compounds (MTT assay) and GBA1 enhancements by DIX compounds on G202R/G202R, N370S/N370S, and GBA1 enhancements by DIX compounds on different genotypes. Copies of ^{13}C and ^1H NMR spectra for DIX compounds (19 pages).

Abbreviations

CuAAC: Cu-promoted alkyne-azide cycloaddition; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIX: 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol; ER: endoplasmic reticulum; GBA1: β -glucocerebrosidase; GD: Gaucher disease; GCase: β -glucocerebrosidase.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Universitaire de France (IUF), the French National Center for Scientific Research (CNRS), the University of Strasbourg (France), the French National Agency for Research (ANR) (grant no. 11-BS07-003-02), the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) (grant SAF 2011-25431), and the Generalitat de Catalunya, Spain (grants 2009SGR-1072 and 2009SGR-971). The following fellowships are also gratefully acknowledged: a doctoral fellowship from the French Department of Research to C.D., a FI predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya to J.S.-V., and a JAE-predoctoral fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain to L.D. The "CIBER de Enfermedades Raras" is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Spain). The authors thank the Institut de Bioquímica Clínica (Barcelona, Spain) for collaboration, and Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) for a generous supply of imiglucerase (Cerezyme).

Keywords: activity enhancement · chaperones · click chemistry · Gaucher disease · glucosyl ceramide · iminoxylitol

- [1] F. M. Platt, B. Boland, A. C. van der Spoel, *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 723–734.
- [2] E. Beutler, G. A. Grabowski in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* (Eds.: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), McGraw-Hill, New York, **2001**, pp. 3635–3668.
- [3] F. M. Platt, R. H. Lachmann, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 737–745.
- [4] M. Beck, *IUBMB Life* **2010**, *62*, 33–40.
- [5] S. S. Vembar, J. L. Brodsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 944–957.
- [6] D. Ringe, G. A. Petsko, *J. Biol.* **2009**, *8*, 80.
- [7] R. A. Denny, L. K. Gavrin, E. Saiah, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1935–1944.
- [8] I. Bendikov-Bar, G. Maor, M. Filocamo, M. Horowitz, *Blood Cells Mol. Dis.* **2013**, *50*, 141–145.
- [9] A. R. Sawkar, W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15428–15433.
- [10] R. E. Boyd, G. Lee, P. Rybczynski, E. R. Benjamin, R. Khanna, B. A. Wustman, K. J. Valenzano, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2705–2725.

- [11] J. M. Benito, F. J. M. García, O. C. Mellet, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 885–903.
- [12] H. H. Chang, N. Asano, S. Ishii, Y. Ichikawa, J. Q. Fan, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082–4092.
- [13] R. Steet, S. Chung, W. S. Lee, C. W. Pine, H. Do, S. Kornfeld, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1376–1383.
- [14] K. J. Valenzano, R. Khanna, A. C. Powe, R. Boyd, G. Lee, J. J. Flanagan, E. R. Benjamin, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 213–235.
- [15] L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744.
- [16] P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356–1359.
- [17] F. Oulaidi, S. Front-Deschamps, E. Gallienne, E. Lesellier, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, O. R. Martin, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 353–361.
- [18] N. Dekker, T. Voorn-Brouwer, M. Verhoek, T. Wennekes, R. S. Narayan, D. Speijer, C. E. Hollak, H. S. Overkleef, R. G. Boot, J. M. Aerts, *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, *46*, 19–26.
- [19] T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, T. J. Boltje, W. E. Donker-Koopman, B. Kuijper, G. A. van der Marel, A. Strijland, C. P. Verhagen, J. Aerts, H. S. Overkleef, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1258–1283.
- [20] P. Serrano, J. Casas, M. Zucco, G. Emeric, M. Egido-Gabás, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 43–52.
- [21] M. Egido-Gabás, D. Canals, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 992–994.
- [22] G. Sánchez-Ollé, J. Duque, M. Egido-Gabás, J. Casas, M. Lluch, A. Chabás, D. Grinberg, L. Vilageliu, *Blood Cells Mol. Dis.* **2009**, *42*, 159–166.
- [23] L. Díaz, J. Casas, J. Bujons, A. Llebaria, A. Delgado, L. Díaz, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2069–2079.
- [24] L. Díaz, J. Bujons, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5248–5255.
- [25] J. D. Diot, I. G. Moreno, G. Twigg, C. O. Mellet, K. Haupt, T. D. Butters, J. Kovensky, S. G. Gouin, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7757–7768.
- [26] E. D. Goddard-Borger, M. B. Tropak, S. Yonekawa, C. Tysoe, D. J. Mahuran, S. G. Withers, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2737–2745.
- [27] C. Decroocq, L. M. Laparra, D. Rodríguez-Lucena, P. Compain, *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, *30*, 559–574.
- [28] O. N. Nadein, A. Kornienko, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 831–834.
- [29] S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett* **1996**, 521–522.
- [30] S. Desvergnès, Y. Vallee, S. Py, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2967–2970.
- [31] O. R. Martin, O. M. Saavedra, F. Xie, L. Liu, S. Picasso, P. Vogel, H. Kizu, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1269–1278.
- [32] O. Gaurat, J. Xie, J. Valery, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 645–656.
- [33] K. Okano, H. Tokuyama, T. Fukuyama, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 296–309.
- [34] H. R. Mellor, F. M. Platt, R. A. Dwek, T. D. Butters, *Biochem. J.* **2003**, *374*, 307–314.
- [35] U. H. Schueler, T. Kolter, C. R. Kaneski, G. C. Zirzow, K. Sandhoff, R. O. Brady, *J. Inherited Metab. Dis.* **2004**, *27*, 649–658.
- [36] M. Schmitz, M. Alfalah, J. M. Aerts, H. Y. Naim, K. P. Zimmer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 2310–2320.
- [37] H. Dvir, M. Harel, A. A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, A. H. Futerman, J. L. Sussman, *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 704–709.
- [38] A. R. Sawkar, S. L. Adamski-Werner, W. C. Cheng, C. H. Wong, E. Beutler, K. P. Zimmer, J. W. Kelly, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1235–1244.
- [39] Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. Garcia-Moreno, C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2780–2792.
- [40] S. D. Orwig, Y. L. Tan, N. P. Grimster, Z. Yu, E. T. Powers, J. W. Kelly, R. L. Lieberman, *Biochemistry* **2011**, *50*, 10647–10657.
- [41] Z. Yu, A. R. Sawkar, L. J. Whalen, C. H. Wong, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 94–100.
- [42] G. Tiscornia, E. L. Vivas, L. Matalonga, I. Berniakovich, M. B. Monasterio, C. Eguizabal, L. Gort, F. González, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, A. Ribes, A. Veiga, I. J. C. Belmonte, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 633–645.
- [43] P. Alfonso, V. Andreu, A. Pino-Angeles, A. A. Moya-García, M. I. Garcia-Moreno, J. C. Rodríguez-Rey, F. Sanchez-Jimenez, M. Pocovi, C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, P. Giraldo, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 943–949.
- [44] A. Amore, R. van Heerbeek, N. Zeep, J. van Esch, J. N. Reek, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1851–1860.
- [45] C. M. Walden, R. Sandhoff, C. C. Chuang, Y. Yildiz, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, A. C. van der Spoel, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32655–32664.
- [46] J. M. Aerts, W. E. Donker-Koopman, G. J. Murray, J. A. Barranger, J. M. Tager, A. W. Schram, *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 655–663.

Received: February 11, 2014

Published online on June 27, 2014

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2014

Glucocerebrosidase Enhancers for Selected Gaucher Disease Genotypes by Modification of α -1-C-Substituted Imino-D-xylitols (DIXs) by Click Chemistry

Jenny Serra-Vinardell,^[a] Lucía Díaz,^[b] Josefina Casas,^[b] Daniel Grinberg,^[a] Lluïsa Vilageliu,^[a] Helen Michelakakis,^[c] Irene Mavridou,^[c] Johannes M. F. G. Aerts,^[d] Camille Decroocq,^[e] Philippe Compain,^{*[e, f]} and Antonio Delgado^{*[b, g]}

cmdc_201402023_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of contents:

Figure S1. Toxicity of DIX compounds (MTT assay)	S3
Figure S2. GCase enhancements of DIX compounds on genotype G202R/G202R	S4
Figure S3. GCase enhancements of DIX compounds on genotype N370S/N370S	S5
Table S1. GCase enhancements by DIX compounds on different genotypes	S6
Table S2. Normalized lysosomal glycosidase activities	S7
Copies of ^{13}C and ^1H NMR spectra of DIX compounds	
Figure S4 Compound 4	S8
Figure S5 Compound 1	S9
Figure S6 Compound 5	S10
Figure S7 Compound 6	S11
Figure S8 Compound 7	S12
Figure S9 Compound DIX-4	S13
Figure S10 Compound 8	S14
Figure S11 Compound DIX-27	S15
Figure S12 Compound DIX-27B	S16
Figure S13 Compound DIX-28	S17
Figure S14 Compound DIX-17	S18
Figure S15 Compound DIX-1	S19

Figure S1. Viability (% respect to cells treated with 0.1% DMSO) of WT human fibroblasts incubated for six days with DIX compounds , determined by the MTT test

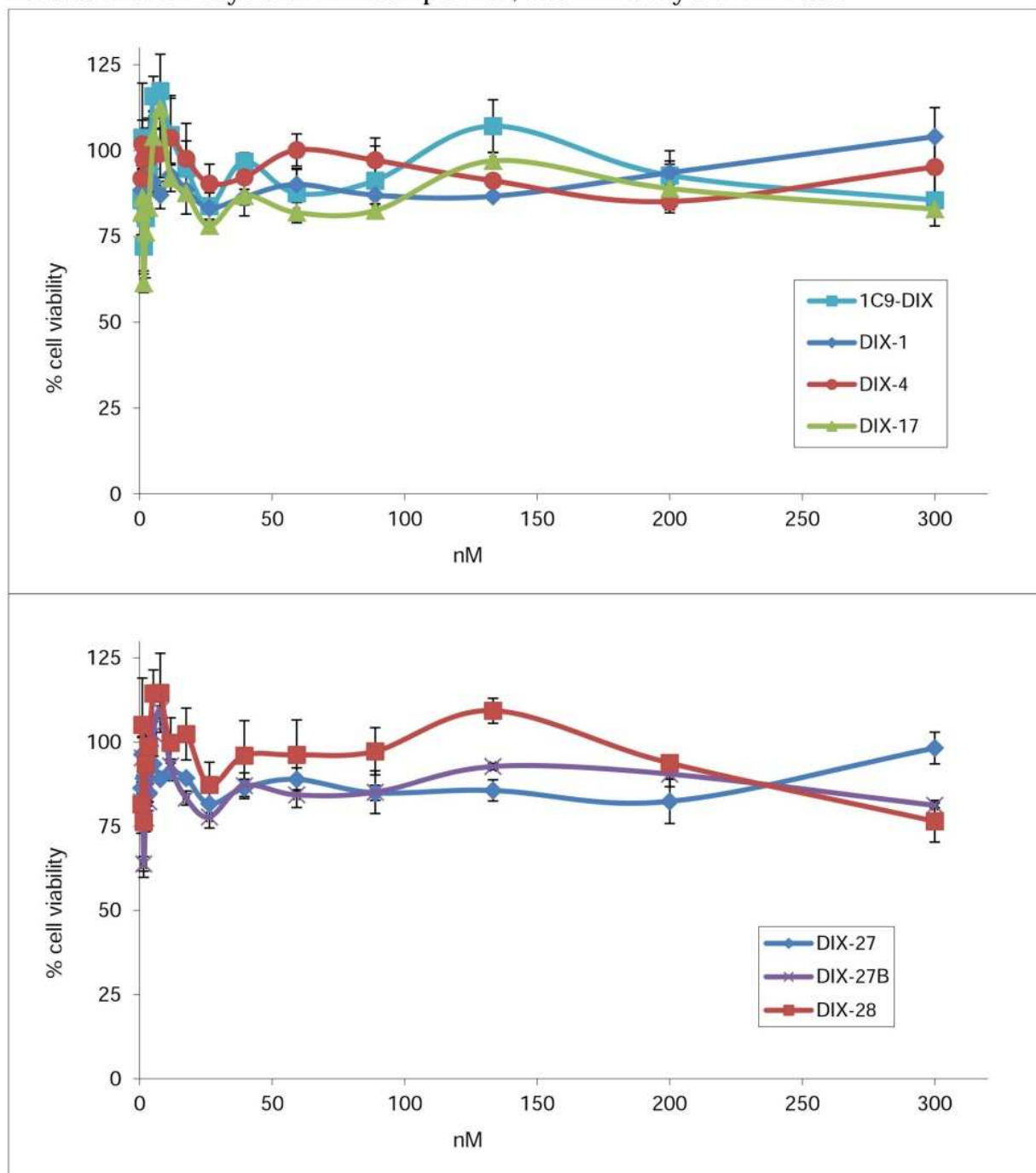


Figure S2. Activity enhancements (fold increase related to untreated cells) for the selected **DIX** compounds at different concentrations on fibroblasts containing the G202R/G202R mutation.

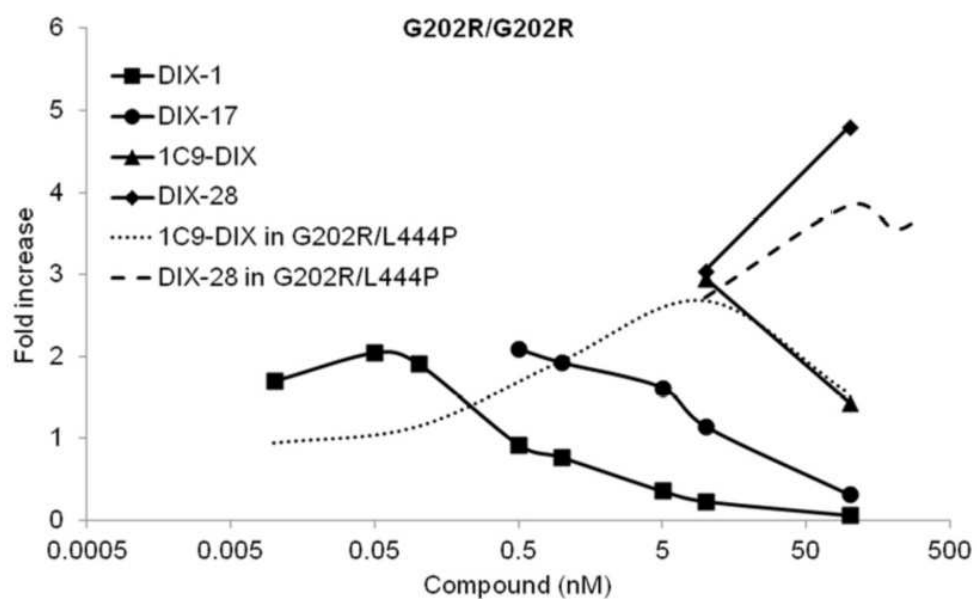


Figure S3. Activity enhancements (fold increase related to untreated cells) for the selected **DIX** compounds at different concentrations on fibroblasts containing the N370S/N370S mutation.

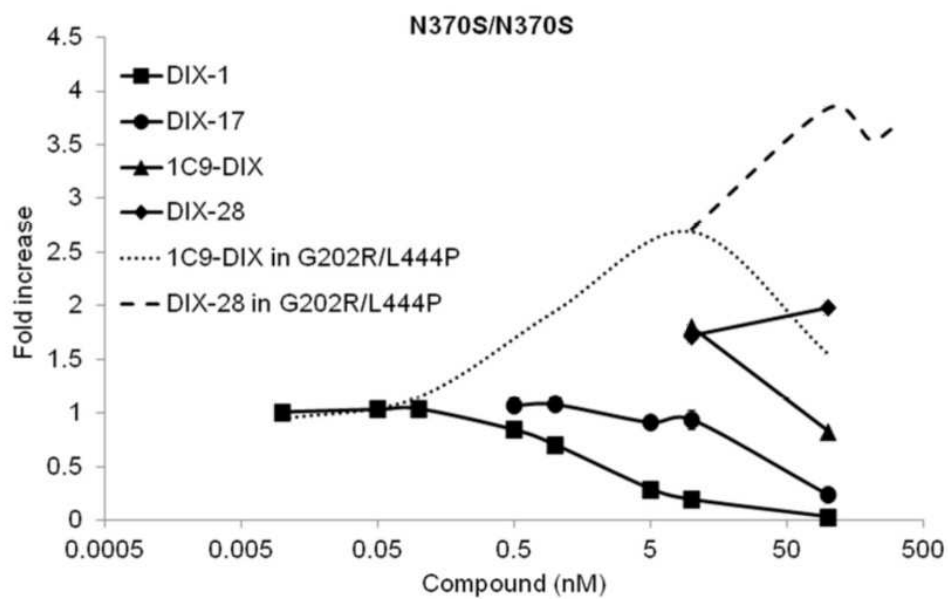


Table S1. Normalized GBA1 activity of fibroblasts from GD patients after the treatment with 1C9 and DIX compounds for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated and untreated (0.1% DMSO) cells. Values are the Median \pm CI of 3-6 separate experiments performed by triplicates. Values equal or lower than 100 were not remarked, whereas values statistically different were marked in yellow, red or green depending if $p < 0.1$, 0.01 or 0.001, respectively.

Compound	Concentration	WT	D409H;H255Q/ D409H;H255Q	D409H;H255Q/ L444P	N370S/N370S	L444P/L444P	G202R/ L444P;E325K	G202R/G202R
DIX-1	0.0005 nM	---	---	---	---	---	83.05 2.19	---
	0.001 nM	---	---	---	---	---	78.12 2.17	---
	0.01 nM	---	---	89.40 6.18	100.93 1.76	104.75 1.06	85.42 3.40	170.04 5.65
	0.05 nM	---	---	74.18 7.93	103.39 2.09	94.00 1.78	106.50 4.06	204.82 10.80
	0.1 nM	---	97.44 12.73	53.84 9.48	104.03 2.56	91.05 2.90	105.12 3.49	191.98 31.11
	0.5 nM	---	---	40.18 4.61	84.31 2.04	45.35 1.03	64.37 1.27	93.078 4.35
	1 nM	---	54.22 6.37	23.29 3.68	70.26 3.42	28.66 1.25	44.22 1.93	77.28 3.74
	5 nM	---	33.18 3.88	5.50 0.98	29.07 1.14	9.05 0.44	---	36.32 0.85
	10 nM	7.94 1.45	60.31 16.17	13.58 3.56	19.16 3.01	4.94 0.62	41.80 13.38	23.47 1.83
	100 nM	1.28 0.24	55.06 11.83	8.34 2.90	2.97 0.96	2.10 .061	14.00 6.60	6.37 1.32
DIX-27	1 nM	---	---	---	---	111.27 1.33	---	---
	5 nM	---	86.06 18.41	---	---	109.58 3.46	---	---
	10 nM	112.69 7.06	93.83 5.12	90.36 5.66	85.09 8.22	107.74 5.34	118.49 14.73	123.18 5.24
	100 nM	83.25 3.10	99.73 10.75	72.76 3.92	114.02 4.79	80.53 3.75	132.38 23.20	170.59 12.52
	200 nM	---	73.98 5.52	---	---	---	122.88 3.46	---
	300 nM	---	---	---	---	---	120.72 1.16	---
DIX-4	0.01 nM	---	---	---	---	---	86.20 1.33	---
	0.1 nM	---	---	---	---	---	91.93 1.83	---
	0.5 nM	---	96.35 4.63	---	---	---	---	---
	1 nM	---	112.20 3.60	134.86 8.75	95.59 5.79	105.37 3.35	128.07 1.77	162.71 12.64
	5 nM	---	126.02 6.51	119.56 9.17	116.65 4.96	89.22 3.64	---	213.69 6.47
	10 nM	94.56 8.35	135.87 4.69	87.80 5.11	127.16 5.74	83.57 3.68	168.89 16.47	220.81 12.07
	100 nM	35.32 3.20	137.44 4.84	34.39 3.76	80.25 4.24	25.83 1.56	99.33 22.88	137.27 7.96
DIX-28	1 nM	---	---	---	---	119.68 3.17	---	---
	5 nM	---	131.96 5.34	125.59 7.67	---	121.57 4.11	---	---
	10 nM	109.11 9.71	138.75 6.77	112.22 5.55	171.69 11.20	126.27 4.97	271.66 22.68	304.35 14.24
	100 nM	104.95 8.03	135.49 5.51	89.25 5.18	198.53 6.09	111.02 4.99	384.16 33.43	480.07 22.97
	200 nM	---	126.39 2.09	---	---	---	355.33 10.68	---
	300 nM	---	123.23 5.24	---	---	---	365.72 12.76	---
DIX-17	0.001 nM	---	---	---	---	---	89.84 1.76	---
	0.01 nM	---	---	---	---	---	91.01 1.07	---
	0.1 nM	---	122.30 4.82	---	---	---	119.61 2.84	---
	0.5 nM	---	---	66.67 7.24	107.50 4.22	92.56 2.14	---	208.76 17.72
	1 nM	---	114.70 6.66	48.77 5.80	108.50 3.01	73.94 13.22	130.46 3.42	192.42 9.28
	5 nM	---	97.11 20.79	16.16 2.27	91.63 2.78	39.55 1.11	---	161.89 3.42
	10 nM	42.29 7.01	70.48 8.16	26.62 4.23	94.34 8.87	30.28 1.28	100.71 16.99	114.92 15.08
	100 nM	8.08 1.71	49.08 18.37	14.07 4.46	23.53 4.08	4.97 0.54	37.43 9.88	31.94 3.69
DIX-27B	1 nM	---	97.14 5.55	---	---	---	---	---
	5 nM	---	104.31 9.31	---	---	---	---	---
	10 nM	107.14 8.49	107.49 6.55	99.28 9.08	102.12 3.85	104.04 2.84	124.61 5.83	118.00 4.13
	100 nM	107.96 8.05	111.71 8.36	97.02 4.22	114.66 6.73	101.69 2.58	133.82 10.08	147.07 3.98
	200 nM	---	---	---	---	---	136.58 2.39	---
	300 nM	---	---	---	---	---	146.83 1.48	---
1C9-DIX	0.01 nM	---	---	---	---	---	95.02 1.81	---
	0.1 nM	---	---	---	---	---	115.05 5.63	---
	1 nM	---	141.38 11.17	---	---	---	195.00 2.45	---
	5 nM	---	141.40 6.44	---	---	---	---	---
	10 nM	97.51 3.44	115.76 7.58	87.38 3.28	180.52 26.43	91.95 3.47	268.72 3.17	295.15 18.90
	100 nM	33.99 2.11	86.12 5.39	28.75 1.30	82.82 17.74	21.71 1.34	155.14 13.36	144.10 20.56
CONTROL		99.96 2.26	100.93 5.05	100.31 1.31	100.54 1.02	101.29 2.91	99.32 1.14	99.50 3.00

Table S2. Normalized lysosomal glycosidase activities of fibroblasts after the treatment with IC9 and DIX compounds for 6 days. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated and untreated (0.1% DMSO) cells. Values are the Median \pm CI performed by triplicates. * Values statistically different $p < 0.05$.

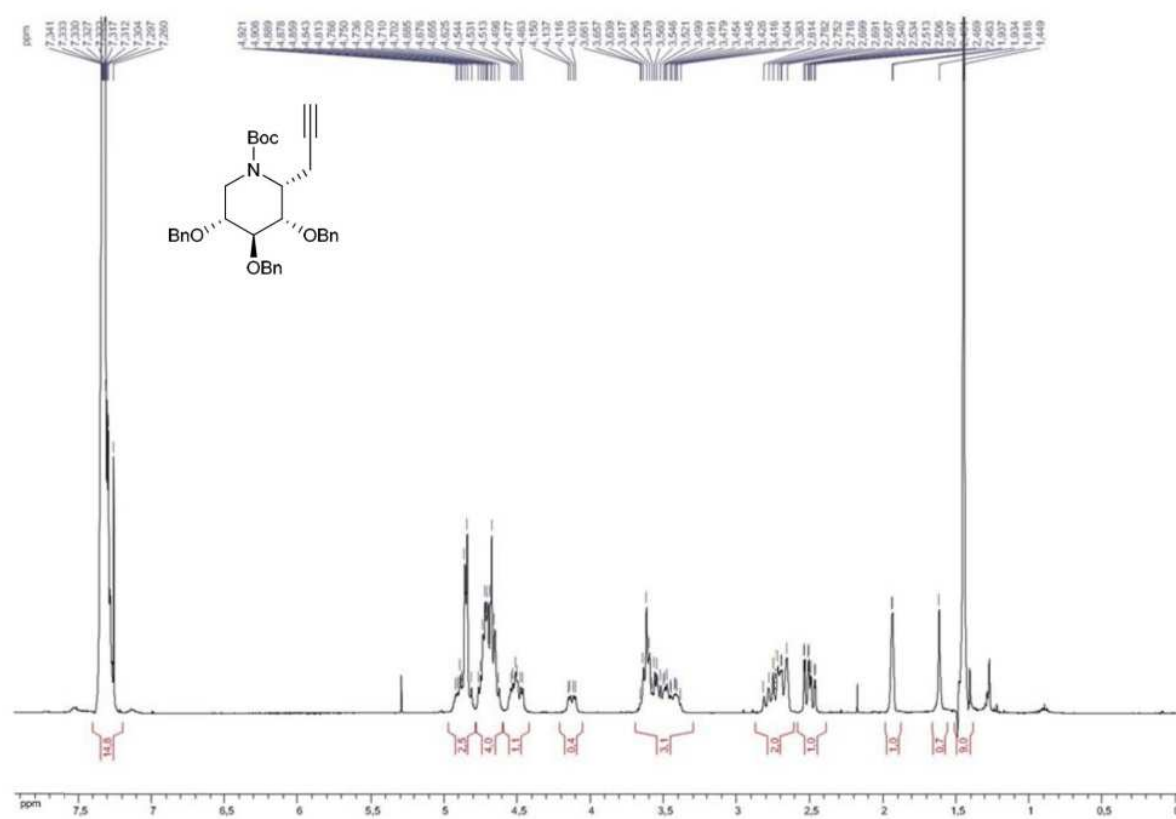
Compound	Concentration	α -galactosidase	β -galactosidase	α -glucosidase	B-hexosaminidase
DIX-1	10 μ M	1.04 \pm 0.03	0.70 \pm 0.16 (*)	0.93 \pm 0.13	0.67 \pm 0.13 (*)
DIX-1	1 μ M	1.03 \pm 0.06	0.83 \pm 0.01 (*)	1.02 \pm 0.04	0.77 \pm 0.09 (*)
DIX-1	0.1 μ M	0.86 \pm 0.13	0.80 \pm 0.06 (*)	0.94 \pm 0.08	0.73 \pm 0.18 (*)
DIX-27	10 μ M	1.00 \pm 0.11	0.82 \pm 0.10 (*)	1.04 \pm 0.14	0.82 \pm 0.10 (*)
DIX-27	1 μ M	1.01 \pm 0.14	0.81 \pm 0.18 (*)	0.90 \pm 0.20	0.68 \pm 0.11 (*)
DIX-27	0.1 μ M	0.93 \pm 0.24	0.74 \pm 0.19 (*)	0.85 \pm 0.25	0.67 \pm 0.24 (*)
DIX-4	10 μ M	0.98 \pm 0.16	0.80 \pm 0.14	0.88 \pm 0.19	0.79 \pm 0.23
DIX-4	1 μ M	1.08 \pm 0.02	0.90 \pm 0.04 (*)	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.08
DIX-4	0.1 μ M	1.09 \pm 0.08	0.82 \pm 0.04 (*)	0.98 \pm 0.06	0.93 \pm 0.06
DIX-28	10 μ M	0.97 \pm 0.04	0.69 \pm 0.04 (*)	0.88 \pm 0.01 (*)	0.62 \pm 0.02 (*)
DIX-28	1 μ M	1.08 \pm 0.17	0.71 \pm 0.17 (*)	0.96 \pm 0.03	0.61 \pm 0.08 (*)
DIX-28	0.1 μ M	1.00 \pm 0.05	0.75 \pm 0.04 (*)	0.88 \pm 0.03 (*)	0.66 \pm 0.03 (*)
DIX-17	10 μ M	1.06 \pm 0.06	0.68 \pm 0.13 (*)	0.87 \pm 0.22	0.60 \pm 0.10 (*)
DIX-17	1 μ M	1.16 \pm 0.07 (*)	0.86 \pm 0.13	1.01 \pm 0.08	0.69 \pm 0.16 (*)
DIX-17	0.1 μ M	1.14 \pm 0.04 (*)	0.88 \pm 0.10	1.01 \pm 0.06	0.74 \pm 0.07 (*)
DIX-27B	10 μ M	1.16 \pm 0.03 (*)	0.80 \pm 0.03 (*)	0.86 \pm 0.08 (*)	0.66 \pm 0.05 (*)
DIX-27B	1 μ M	1.24 \pm 0.12 (*)	0.97 \pm 0.10	1.02 \pm 0.07	0.93 \pm 0.19 (*)
DIX-27B	0.1 μ M	1.19 \pm 0.08 (*)	0.97 \pm 0.08	1.07 \pm 0.03 (*)	0.87 \pm 0.09 (*)
IC9-DIX	1 μ M	1.19 \pm 0.01 (*)	1.01 \pm 0.04	1.15 \pm 0.07 (*)	1.04 \pm 0.05 (*)
IC9-DIX	0.1 μ M	1.10 \pm 0.04 (*)	0.96 \pm 0.02	0.91 \pm 0.15	0.98 \pm 0.07

Selectivity for lysosomal glycosidases

In order to determine the selectivity for lysosomal glycosidases, fibroblasts were incubated with or without the corresponding DIX compounds for 6 days, as described above. Then, the cells were trypsinized and the pellets were lysed in H₂O by sonication at 10 sec on/off intervals for 2 min. The supernatants of the cell lysates were screened for α -galactosidase (20 μ L) in 500 mM acetate buffer (pH 4.5, 20 μ L), β -galactosidase (10 μ L) in 500 mM citrate buffer (pH 4.4, 10 μ L), β -hexosaminidase (10 μ L) in 500 mM citrate buffer (pH 4.4, 10 μ L) and α -glucosidase (25 μ L) in 100 mM acetate buffer (pH 4.0, 25 μ L). A pre-incubation time of 15 min at 37 °C was used in all the experiments. Next, the following substrates were added: 4-MU- α -D-galactopyranoside (10 mM in H₂O, 50 μ L) for α -galactosidase, 4-MU- β -D-galactopyranoside (1 mM in H₂O, 200 μ L) for β -galactosidase, 4-MU-N-acetyl- β -D-glucosaminide (3 mM in H₂O, 50 μ L) for β -hexosaminidase, and 4-MU- α -D-glucopyranoside (1 mM in 100 mM acetate buffer, pH 4.0, 50 μ L) for α -glucosidase. The α -galactosidase and β -galactosidase assays were incubated for 60 min at 37°C and the β -hexosaminidase and α -glucosidase assays for 15 min at 37°C. Finally, the reactions were stopped by addition of 500 mM carbonate buffer (pH 10.6, 3mL), except for the α -glucosidase assay, which was stopped by addition of 100 mM glycine/NaOH buffer (pH 10.6, 150 μ L). In all cases, the fluorescence of the released 4-MU was measured as indicated above.

Copies of NMR spectra

Figure S4. ^1H and ^{13}C NMR spectra (400 MHz and 100 MHz, CDCl_3) of compound **4**



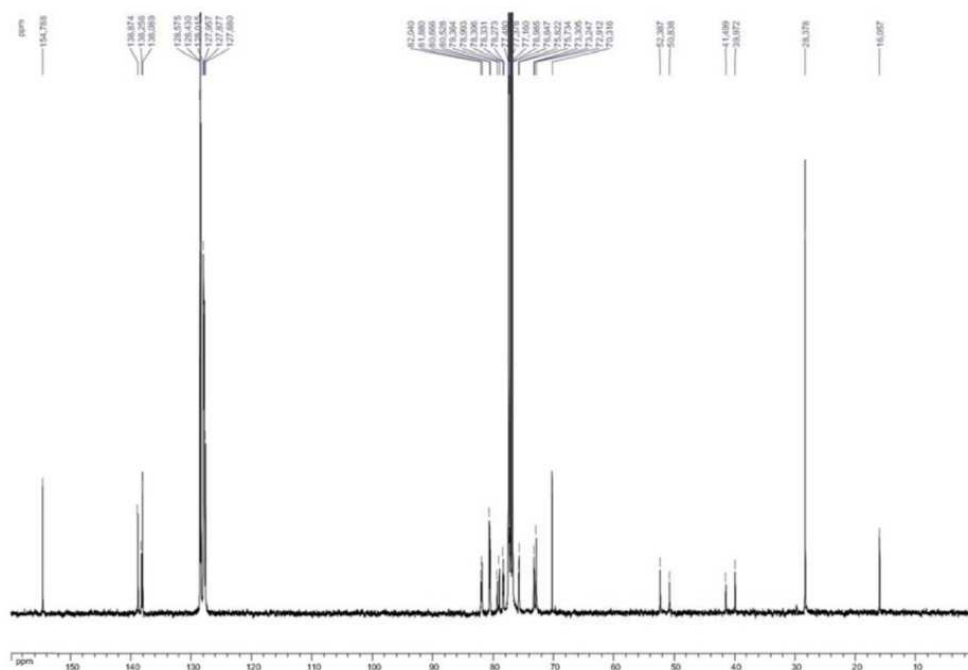
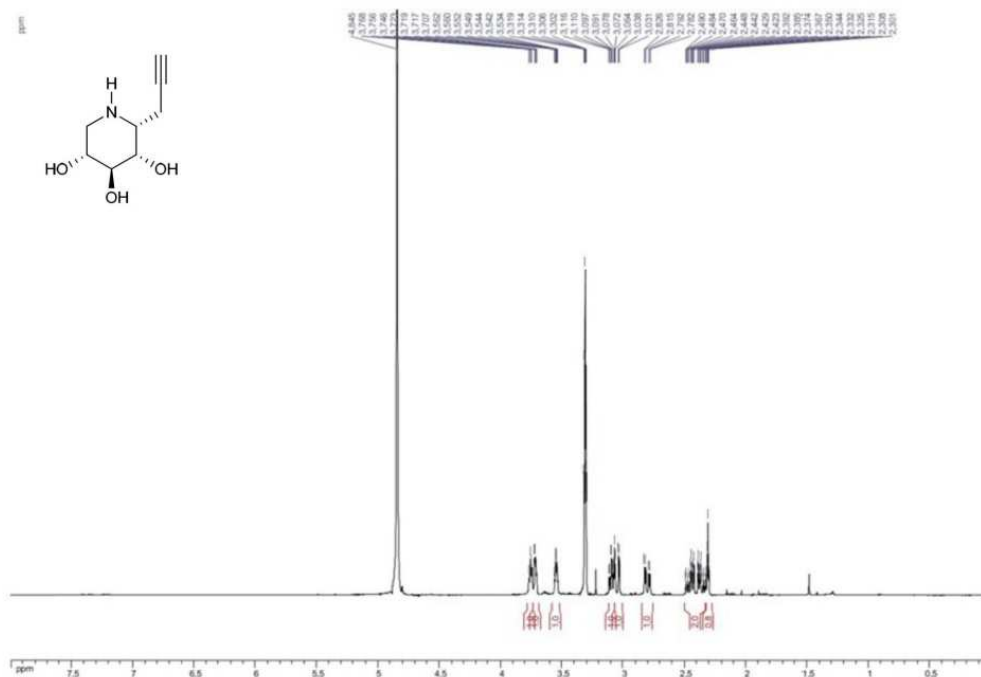


Figure S5. ^1H and ^{13}C NMR spectra (400 MHz and 100 MHz, CDCl_3) of compound 1



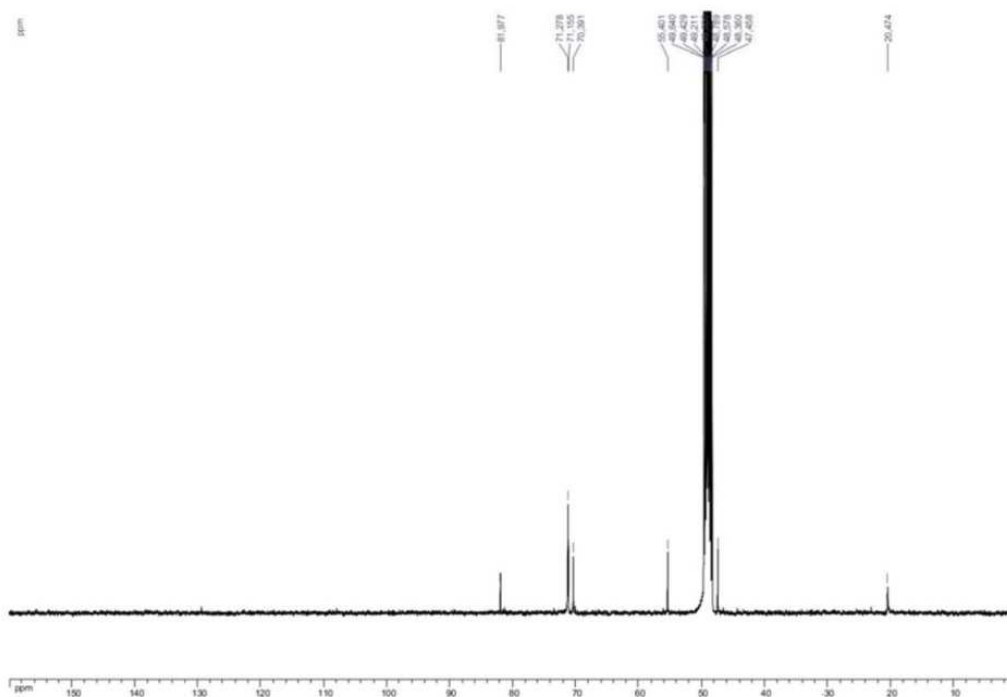
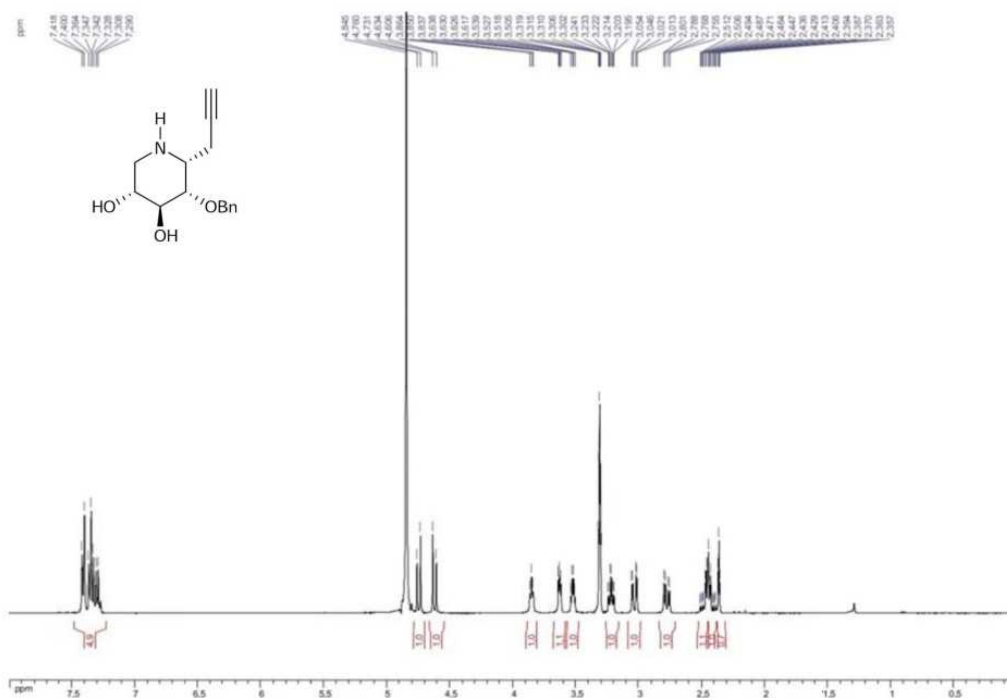


Figure S6 ¹H and ¹³C NMR spectra (400 MHz and 100 MHz, CDCl₃) of compound 5.



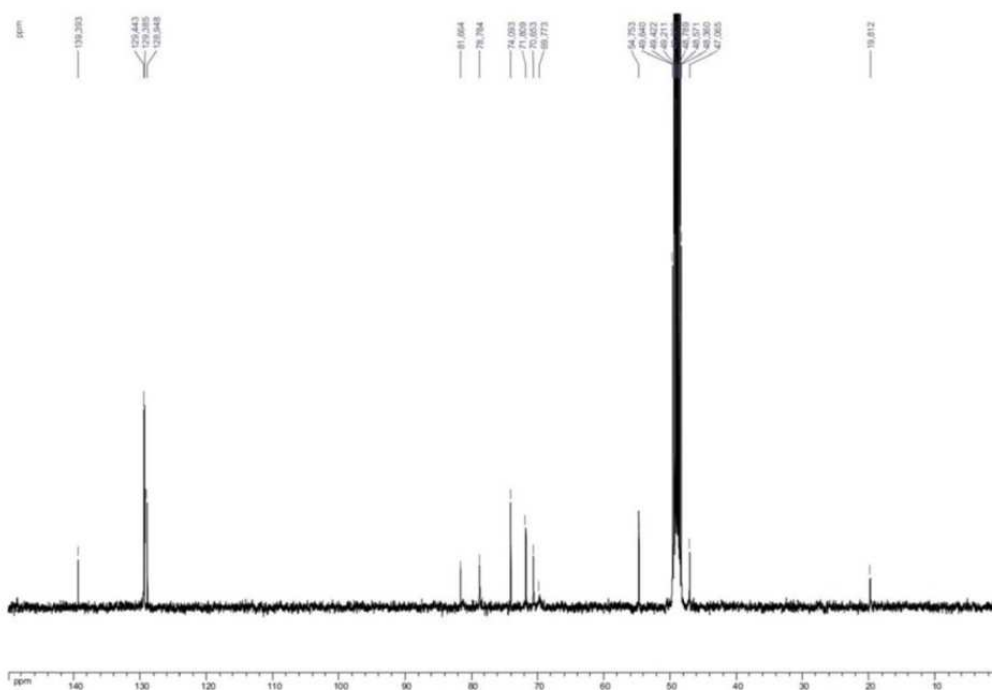


Figure S7. ¹H and ¹³C NMR spectra (400 MHz and 100 MHz, MeOD) of compound 6.

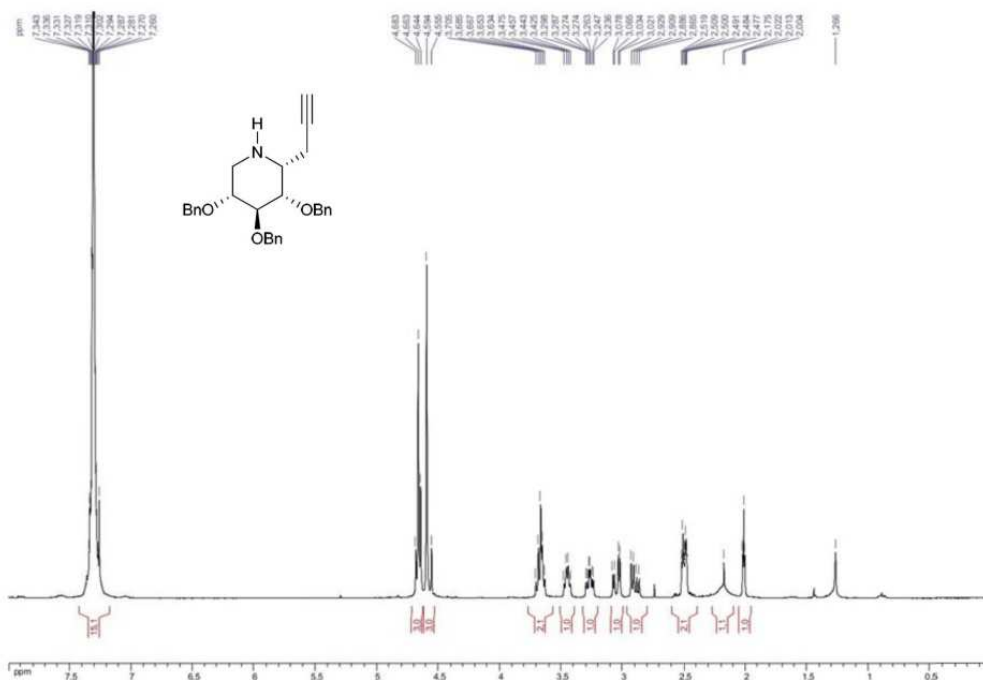


Figure S8 ¹H spectrum (300 MHz, MeOD) of compound 7.

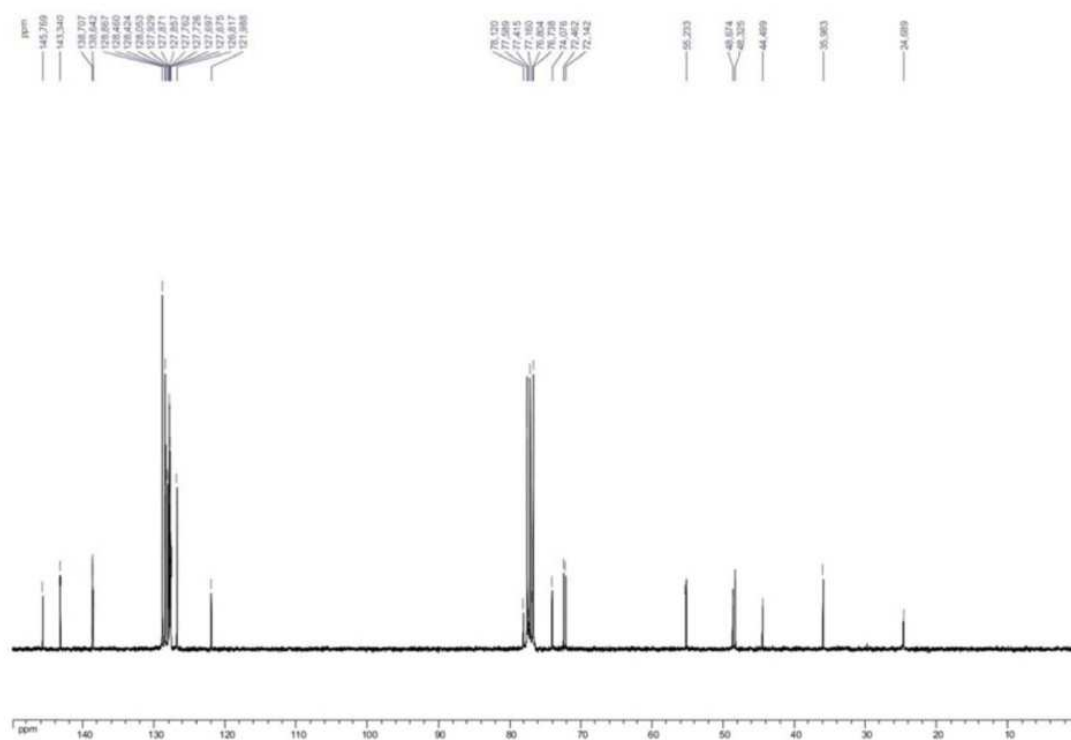
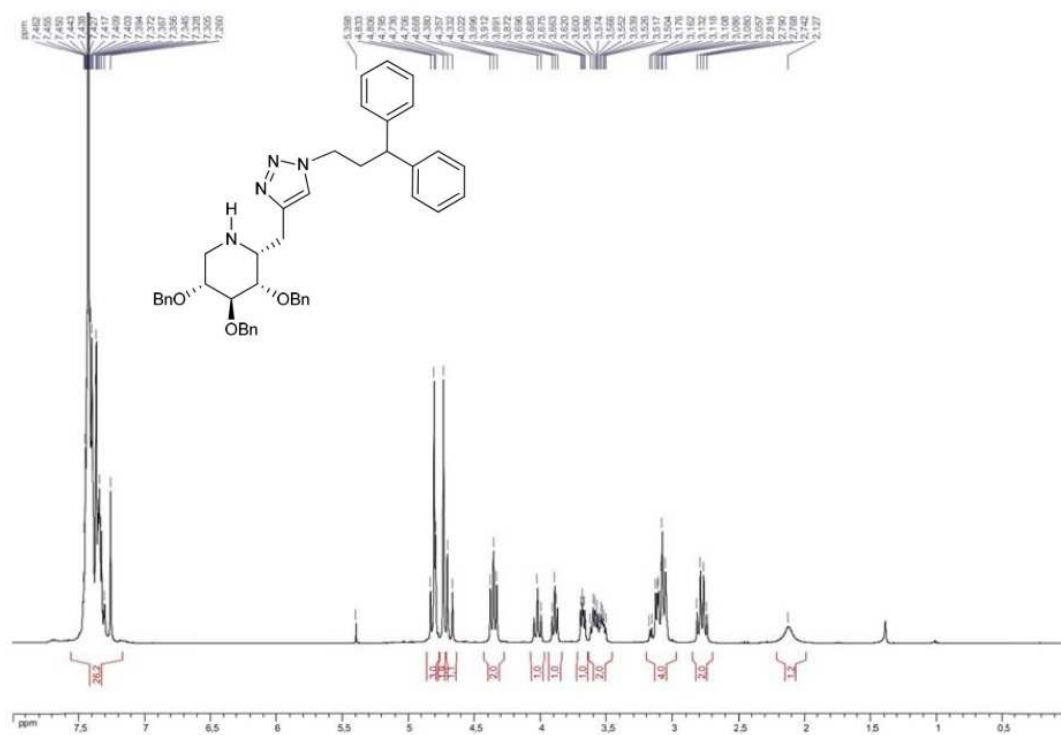


Figure S9. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, CDCl_3) of compound DIX-4.

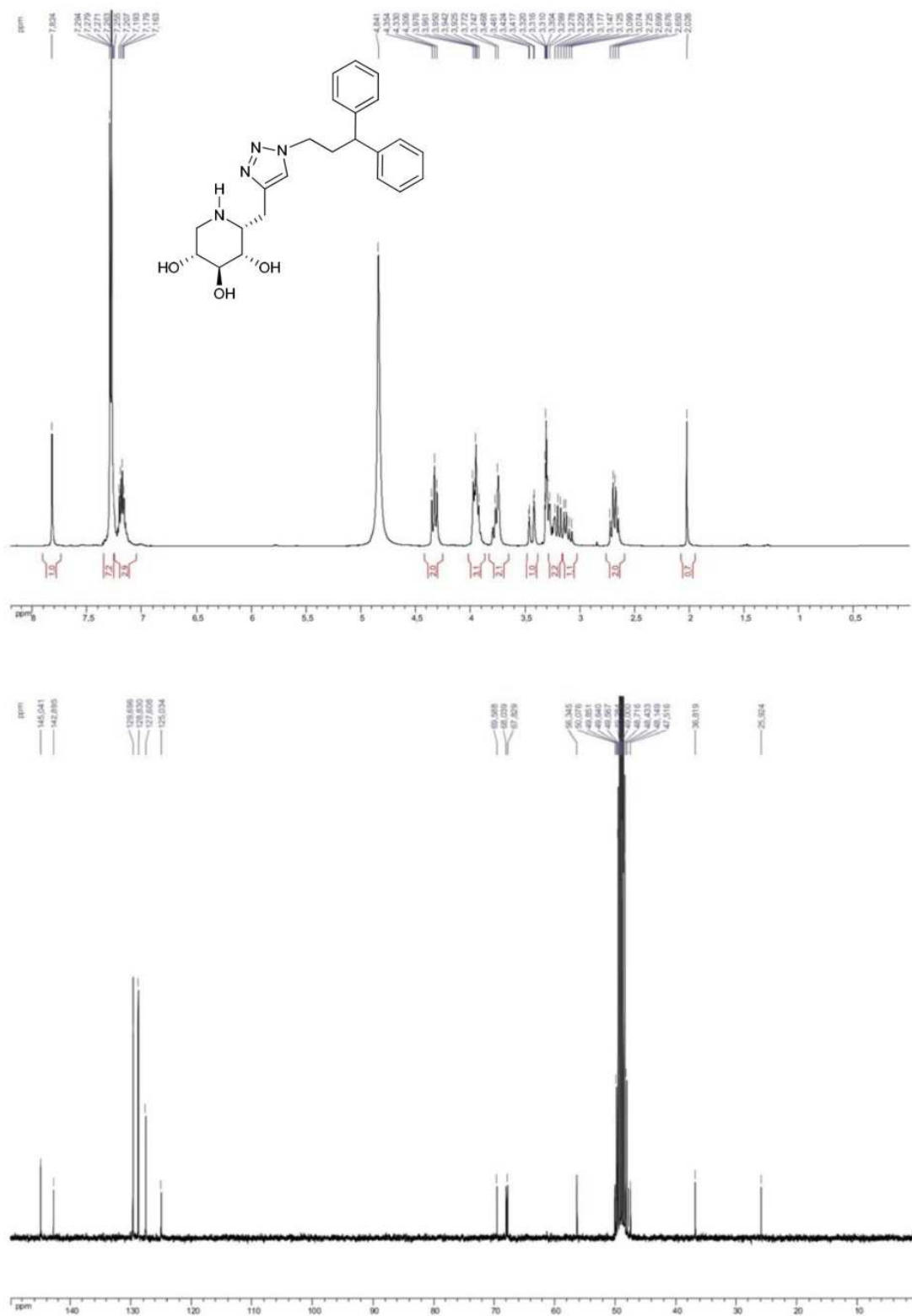


Figure S10. ¹H and ¹³C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, MeOD) of compound 8.

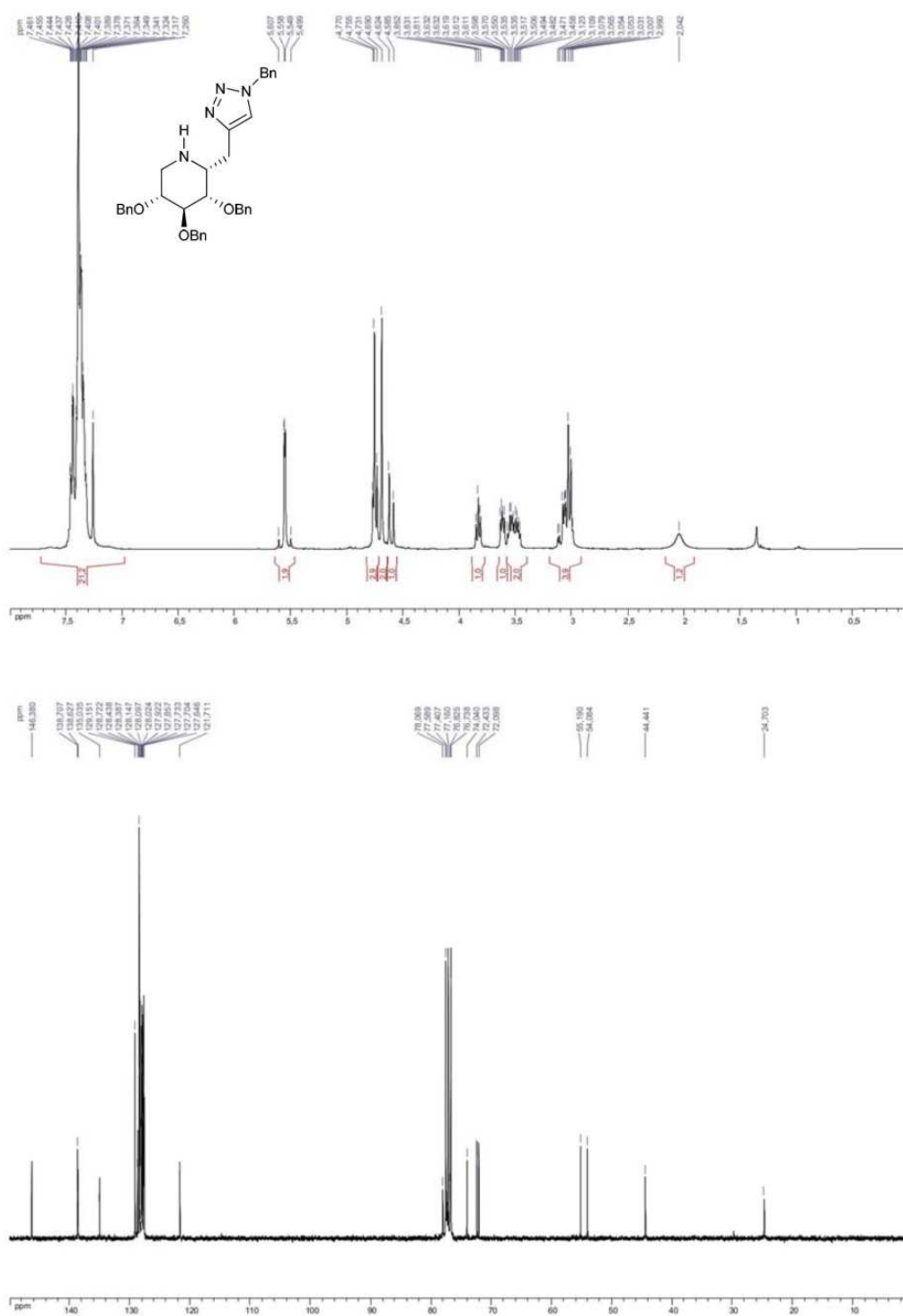


Figure S11. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, CDCl_3) of compound DIX-27.

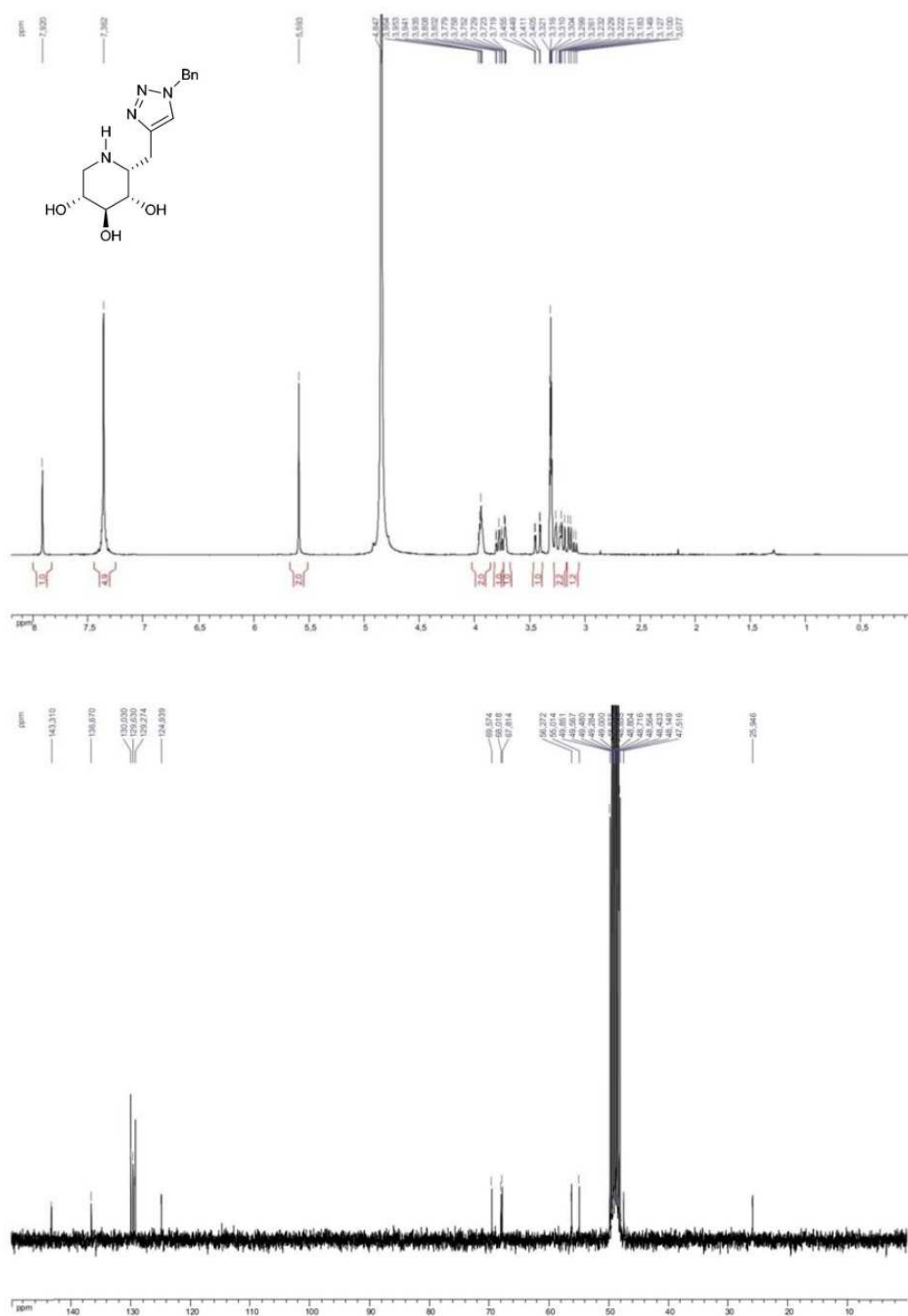


Figure S12. ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, MeOD) of compound DIX-27B.

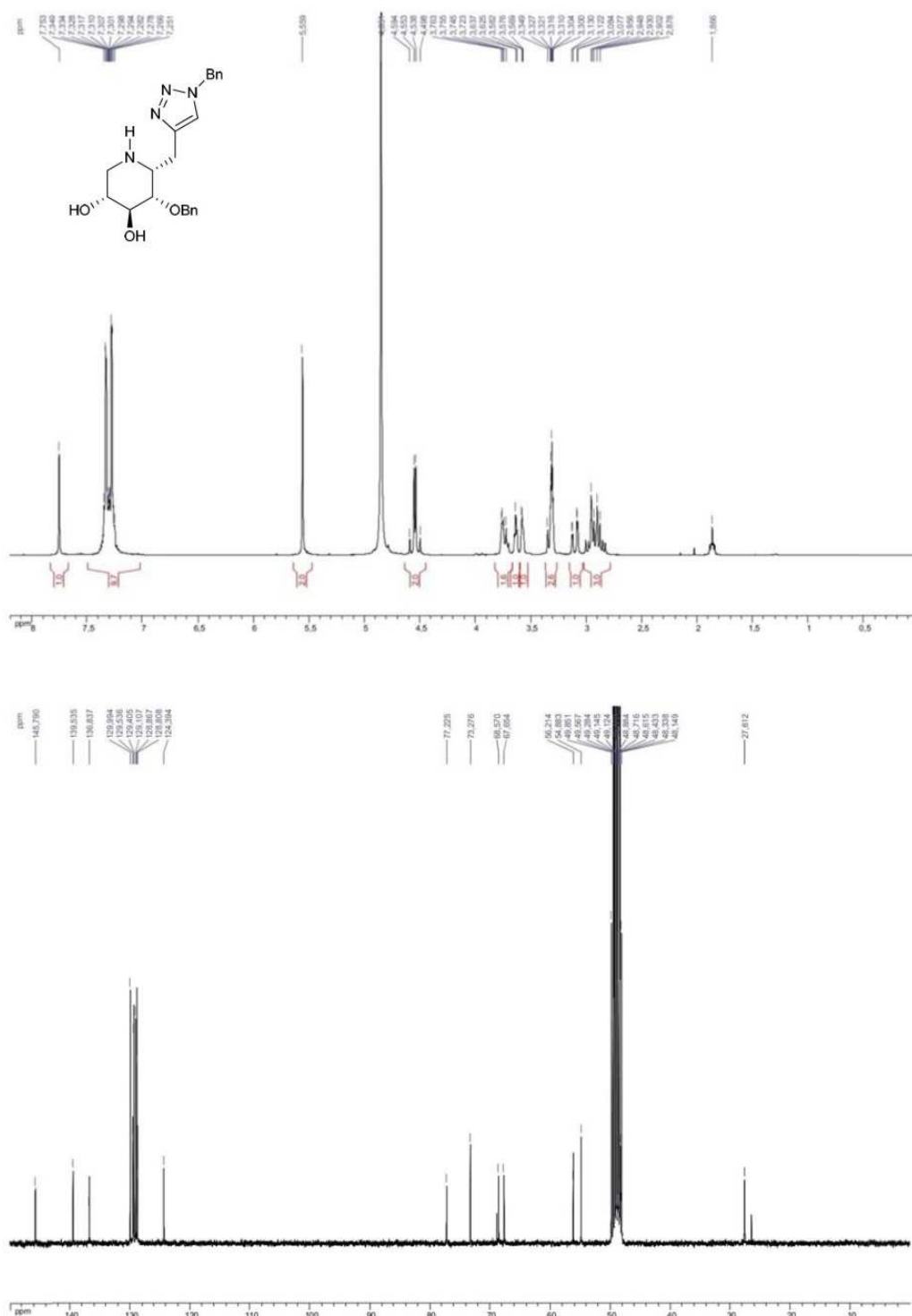


Figure S13 ^1H and ^{13}C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, MeOD) of compound DIX-28.

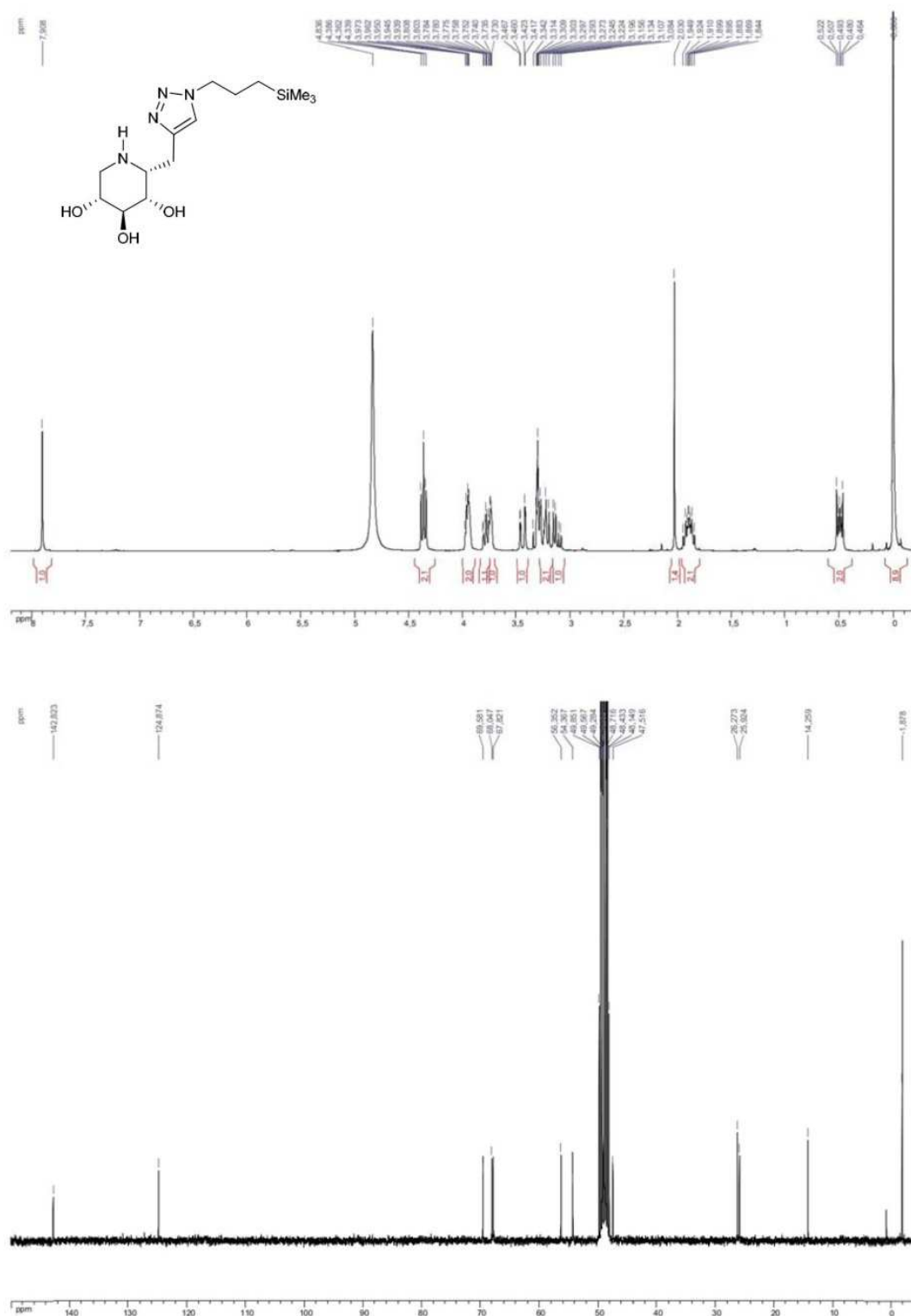


Figure S14. ¹H and ¹³C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, MeOD) of compound DIX-17.

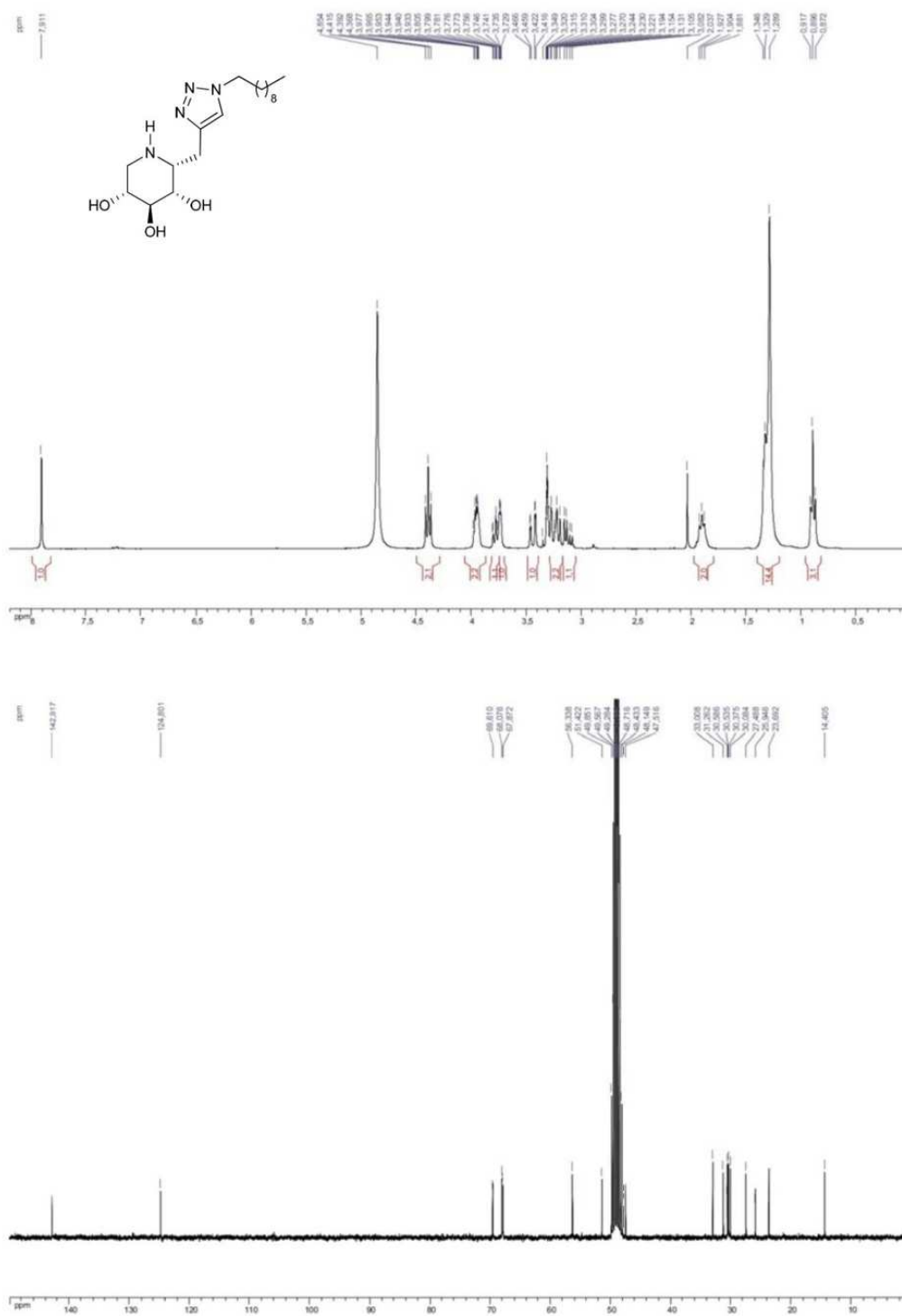
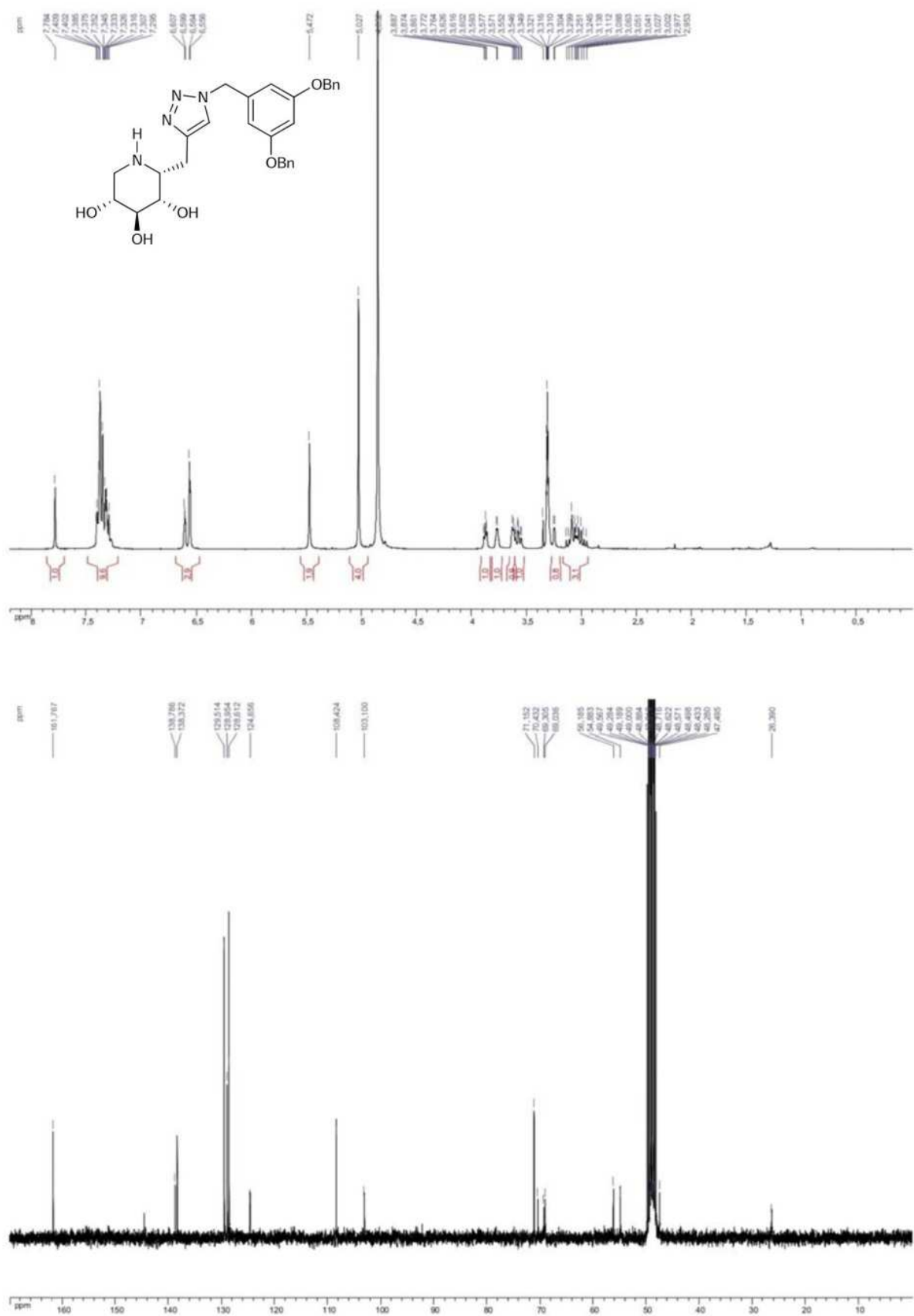


Figure S15. ¹H and ¹³C NMR spectra (300 MHz and 75.5 MHz, MeOD) of compound DIX-1.



CAPÍTOL 2

Elaboració d'un model osteoblàstic de la malaltia de Gaucher

Article 3

Elaboració d'un model osteoblàstic de la malaltia de Gaucher mitjançant l'ús d'iPSC.

RESUM

La malaltia de Gaucher (GD) és una malaltia de dipòsit lisosomal causada per la deficient activitat de l'enzim glucocerebrosidasa (GBA1). Les manifestacions esquelètiques observades en els pacients Gaucher de tipus 1 condicionen la vida del pacient i són altament refractàries a la teràpia de reemplaçament enzimàtic (ERT). A més, els mecanismes patològics que tenen lloc en l'alteració òssia en la GD són encara poc coneguts. Creiem que tant les cèl·lules mesenquimals com els osteoblasts hi poden jugar un paper important, ja sigui a través de l'alteració en la formació d'os o afectant la diferenciació dels monòcits cap a osteoclasts. Amb la finalitat d'estudiar la implicació d'aquestes cèl·lules en la patologia òssia en la GD, es va generar un model mesenquimal i osteoblàstic mitjançant la utilització de cèl·lules mare humanes pluripotents induïdes (hiPSC) de la GD. Els resultats preliminars han mostrat que les MSC provinents d'hiPSC GD poden diferenciar-se adequadament cap a osteoblasts, els quals són capaços de mineralitzar eficientment la matriu extracel·lular. D'altra banda, els osteoclasts que s'originen amb presència del medi condicionat per les cèl·lules mesenquimals GD són més grans que els originats pel medi condicionat de les mesenquimals WT. Aquest model serà útil per assajar nous fàrmacs, com per exemple les xaperones farmacològiques.

Generation of an osteoblastic cellular model for Gaucher disease using induced pluripotent stem cells

Serra-Vinardell et al. (in preparation)

ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder due to glucocerebrosidase enzyme (GBA1) deficiency. The skeletal manifestations observed in GD type 1 are the major impact on the life quality of the patients and are highly refractory to enzyme replacement therapy (ERT). Furthermore, the pathological mechanisms of bone alteration in GD are still poorly understood. We hypothesized that both, mesenchymal cells and osteoblasts, have an important role to explain the bone manifestations in GD, either through the alteration of bone formation or through their effect on the differentiation of monocytes into osteoclasts. In order to study the implication of these cells in bone pathology, a model of mesenchymal (MSC) and osteoblastic cells has been generated by GD human induced pluripotent stem cells (hiPSC). The preliminary results have shown that MSC derived from GD iPSC can differentiate properly into osteoblasts, which are able to efficiently mineralize extracellular matrix. The osteoclasts originated by the presence of conditional medium from GD MSC were larger than those originated by conditioned medium of WT MSC. This model will be useful to assay new drugs, such as pharmacological chaperones.

INTRODUCTION

The lysosomal storage diseases (LSD) are a group of more than 50 disorders, most of which result from the deficient activity of specific lysosomal enzymes. This deficiency produces a progressive accumulation of the specific substrate affecting different biochemical or cellular pathways, which then subsequently causes the tissue pathology (Futerman and van Meer 2004b). Gaucher disease (GD), the most common LSD is caused by the defective activity of glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45; GBA1), the lysosomal enzyme that is responsible for the hydrolysis of glucosylceramide (GlcCer) into glucose and ceramide, due to mutations in the *GBA1* gene (MIM# 606463). As a result of this autosomal recessive genetic defect, GlcCer and glucosylsphingosine (GlcSph) accumulate in the lysosomes (revised by Sidransky 2004) of macrophages generating the typical "Gaucher cells", hallmark of the disease. Based on the absence or presence and severity of neuronopathic involvement, Gaucher disease has been classified into three clinical phenotypes, non-neuronopathic (GD1), acute neuronopathic (GD2) and chronic or subacute neuronopathic (GD3).

GD1 is the most frequent form of the disease and it is characterized by heterogeneous manifestations including visceral (hepatosplenomegaly), hematological and skeletal symptoms. Bone involvement affects up to 90% of GD1 patients. In fact, it is the most debilitating feature of type 1 and has a major impact on the life quality of the patients (Giraldo 2005). Skeletal manifestation include Erlenmeyer flask deformity, fractures due to osteopenia or osteoporosis, osteosclerosis, osteonecrosis, bone pain, bone crisis, growth retardation during childhood and, rarely, acute osteomyelitis (Mikosch and Hughes 2010). The

majority of these manifestations could be explained by the disruption of the balance between osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption. The markers of bone metabolism are useful to measure changes in the osteoblasts and osteoclasts activity. However, controversial results on the alteration of bone formation and of bone resorption markers in GD and their response to enzyme therapy have been reported (revised by van Dussen *et al.* 2011). Moreover, the cause of this disruption in GD is still poorly understood.

It has been hypothesized that bone manifestations in GD can be explained by a combined involvement of Gaucher cells, immunitary system and bone cells, osteoblasts and osteoclasts. The infiltration of Gaucher cells within the bone marrow cavity seems to be the first step of the pathological process, causing vascular occlusion and compression, and producing an increased intraosseous pressure that may lead to osteonecrosis. Moreover, the Gaucher cells may promote additional inflammatory processes due to altered expression of different cytokines and inflammatory mediators, such as interleukin (IL)-6, IL-10 (Allen *et al.* 1996), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Michelakakis *et al.* 1996) and macrophage inflammatory protein (MIP-1 α and MIP-1 β) (van Breemen *et al.* 2007) that influence osteoblasts and osteoclasts activity. However, some of the reported levels of these inflammatory molecules are inconsistent among studies and among patients, and they do not always correlate with the clinical severity (revised by Mucci and Rozenfeld 2015). Moreover, it has been proposed that the disruption of the homeostatic balance of bone remodeling in Gaucher disease is due to an intrinsic dysfunction of osteoclasts, osteoblasts and/or mesenchymal stem cells (Campeau *et al.* 2009; Mistry *et al.* 2010; Mucci *et al.* 2012, 2013; Reed *et al.* 2013). One of the hypotheses to explain the diminished bone density is an increase in

bone resorption by the osteoclasts. An increased osteoclastogenesis has been reported by different authors (Mucci *et al.* 2012; Reed *et al.* 2013). Moreover, the use of a type I GD murine model allowed the detection of a defect in osteoblastic bone formation as a cause of the osteoporosis presented in GD. The same authors suggest that sphingosine production in GD1 patients contributes to the low-turnover bone loss (Mistry *et al.* 2010, 2014).

In the present study, we hypothesized that both, mesenchymal cells and osteoblasts, have an important role to explain the bone manifestations in GD, either through the alteration of bone formation or through their effect on the differentiation of monocytes to osteoclasts. For this reason, we use the GD human induced pluripotent stem cells (hiPSC) to generate a model of GD mesenchymal stem cells and osteoblasts. We present a preliminary characterization of the model. Furthermore, this model will be useful to assay new drugs, such as pharmacological chaperones, since the current treatments, enzyme replacement, substrate reduction and bisphosphonates therapies, do not revert bone pathology. A preliminary experiment with the compound DIX-28 (Serra-Vinardell *et al.* 2014) was performed as a proof of concept, and positive results were obtained.

MATERIALS AND METHODS

Culture of the iPS cells

The generation of the human Gaucher disease iPS cell line with the N370S/N370S (Panicker *et al.* 2012), G202R/L444P (Tiscornia *et al.* 2011) and N370S/84GG (Park *et al.* 2008) genotypes were previously described. Wild-type (WT) iPS cells

were generated by our group (Canals *et al.*, under revision) or a kind gift from the group of A. Raya. They were maintained on HES medium, consisting of KO-DMEM (Gibco, Life technologies, Carlsbad, Ca, USA) supplemented with 20% KO-serum Replacement (Gibco), 2mM Glutamax (Gibco), 50mM 2-beta-mercaptoethanol (Gibco), 1% non-essential aminoacids (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco) and 10ng/ml bFGF (Peprotech, Hamburg, Germany). Cultures were maintained on top of a human foreskin fibroblast feeder layer at 37°C, 5% CO₂ with media changes every day.

Induction of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells

When feeder-independent pluripotent stem cell colonies were at approximately 80% confluence in 100mm dishes, the protocol of embryonic body (EB) formation was started (FIG. 1). Culture medium was aspirated and washed twice with PBS (phosphate buffered saline). Then, 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) was added to dissociate the colonies in small clusters. The resulting suspension was transferred to 50ml falcon tubes and the desired amount of HES conditioned medium (HESc) was added. A volume of 100-120µl of resuspended cells was loaded into each well of 96-V bottom-well microtiter plates and centrifugated at 800g for 10 minutes to form iPSC aggregates in HESc, which were then placed in an incubator during 2-3 days. After these days, EBs were obtained and they were kept in suspension for 2-3 more days. Then, the formed EBs were transferred into 6 well plates coated with Matrigel (BD Biosciences, Sant Diego, CA, USA) and cultured in EB medium (KO-DMEM supplemented with 10% KO-serum Replacement, 2mM Glutamax, 50mM 2-beta-mercaptoethanol, 1% non-essential aminoacids and 1% penicillin/streptomycin) since outgrowths reach complete confluence. The

outgrowth culture was split three times using 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) at 37°C. The dissociated cells were subsequently resuspended in EB medium and plated at a 1:2 split ratio. The cells proliferated and were serially split two more times at 1:2 or 1:3 ratios until obtaining a homogenous monolayer of mesenchymal-like cells (this passage was considered as passage 0 of MSC like-cells and the cells were ready for validation). Most of the cells in culture had a fibroblast-like appearance.

Culture of MSC-like cells

MSC-like cells were maintained in 0.1% (W/V) gelatin-coated T75 flask with MSC medium, consisting of alpha-MEM (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2mM Glutamax (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Culture medium was changed every three days, and when the cells reached 80-90% confluence, they were subcultured using 0.05% trypsin-EDTA (Gibco).

Induction of osteogenic differentiation

For osteogenic differentiation, cells were seeded in 6-well, 12-well, 24-well culture dishes or 100mm dishes (Corning, NY, USA) depending on the specific experiment. When cells achieved 80% confluence, osteogenic differentiation was induced with alpha-MEM (Gibco) supplemented with 10% FBS (Hyclone Laboratories), 50µg/ml ascorbic acid (Sigma, Poole, UK), 10mM β -glycerophosphate (Sigma), 100nM Dexamethasone (Sigma), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Medium was changed every 3 days until the 21st day.

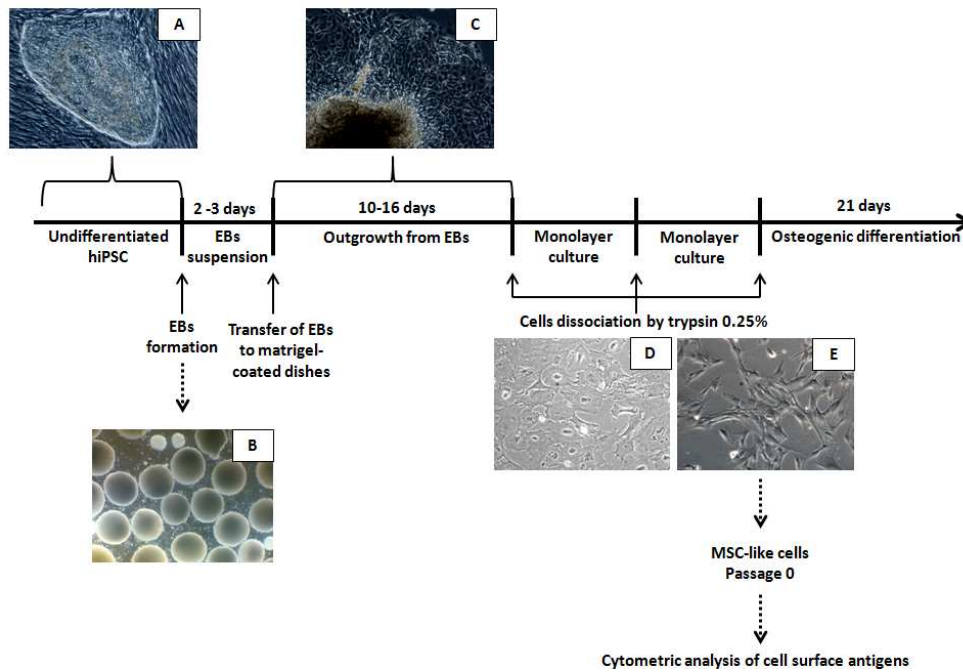


FIG. 1. Schematic diagram of the culture protocol for mesenchymal differentiation of hiPSC. A) hiPSC; B) embryonic body formation; C) cells outgrowth from EB; D) monolayer culture; E) MSC-like cells, considered as passage 0. After validation process by cytometric analysis of cell surface antigens, the osteogenic differentiation can take place.

Histochemical assays

For histochemical staining, cultures were washed twice with PBS and fixed with 4% (W/V) *paraformaldehyde* (PFA) for 10 min at RT and rinsed with double-distilled water.

For calcium deposits, the fixed cultures were covered with a 40mM alizarin red solution, pH=4.1 (adjusted with 10% NH_4OH) for 20 min and then rinsed with double-distilled water. Calcium deposits stained red.

Phosphate deposits were assessed by the von Kossa technique (McGee-Russell 1957). The fixed cultures were covered with a 1.0% (W/V) silver nitrate solution and kept for 1h under UV light. After rinsing twice with double-distilled water, a 5.0% (W/V) sodium thiosulphate was added for 2 min and then cultures were washed again. Phosphate deposits stained black. The cells were stored in Tris-buffered saline (TBS), in the dark until photographs were obtained.

ALP staining was determined using Alkaline Phosphatase Blue Membrane substrate solution (Sigma) following the protocol instructions. The presence of ALP stained blue. The cells were stored in Tris-buffered saline (TBS), in the dark until photographs were obtained.

Flow cytometric analysis of cell surface antigens

Expression of the cell surface antigen profile of MSCs was characterized using fluorescent-activated cell sorting (FACS). MSC-like cells were harvested using 0.05% trypsin. After neutralization, single cells suspension was washed in cold PBS. Then, $1-100 \times 10^5$ cells in 100ul PBS were incubated with each monoclonal antibody following the manufacture instruction. The following conjugated mouse anti-human antibodies were used in the analyses: allophycocyanin (APC)-conjugated against CD73, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated against CD90, phycoerythrin (PE)-conjugated against CD105, APC-cyanine™ 7 (APC-Cy™7)-conjugated against CD45, brilliant violet™ 421 (BV™421)-conjugated against CD34 (all from BD Pharmingen™, San Jose, CA). After 30 min incubation in ice, cells were washed twice with cold PBS, followed by centrifugation at 400g for 5 min. The pellet was resuspended with 300-500ul PBS. Unstained cells were used as a control. Samples were run on a Becton Dickinson FacsScanflow cytometric system (BD Biosciences), and analysis was completed using a FowJo Software (FlowJo, Ashland, OR, www.flowjo.com).

GBA 1 activity measurement

GBA1 enzyme activity measurement was performed at the MSC stage (day 0) and at 21st day of differentiation. The cells were plated into 24-well culture dishes (Corning) with MSC medium and osteoblast differentiation medium, respectively. For GBA1 activity, cells were washed twice with PBS and the enzyme assay was performed as follows: substrate (100 μ l, 5mM, 4-methylumbelliferyl β -glucopyranoside) in 0.1M acetate buffer (pH 5.2) was added to each well, up to a total volume of 160 μ l, and the plates were incubated for 1h at 37°C. The enzyme reaction was stopped with 2ml of 100mM glycine/NaOH, pH 10.7 and the released fluorescence was measured at λ_{ex} : 355nm; λ_{em} : 460nm. For each point (stages 0 and 21 days) cells were plated in a minimum of 6 -wells. The experiment was performed 3 times.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was assessed on MSC at passages 3-4. Cells were trypsinized and fixed with 70% ethanol for 2 hours. After ethanol removal, cells were washed twice with PBS and the pellet was incubated in a PBS solution containing 0.1% Triton-X-100 (sigma); 10ug/ml propidium iodide (Sigma), and 2mg/ml RNase A (Roche). Cell cycle analysis was performed by flow cytometry, and the proportion of cells in the G0/G1, S, and G2/M phase was calculated using the Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from cells plated in 100mm dishes using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany). cDNA was prepared using the

High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) following the manufacturer's instructions. Three independent experiments with three replicates each were performed. Real Time-PCR experiments were performed for six genes using the LightCycler 480 II system and the Universal Probe Library (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Gene assays were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center software (Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com). The sequence of the primers and probes are available upon request. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) and 18S were used as housekeeping genes. The relative amounts of mRNA were normalized by the mRNA value of WT at day 0.

Osteoclasts formation assay

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy blood donors in accordance with the approved ethical procedures. PBMC were isolated using Human Monocyte Enrichment Cocktail RosetteSep™ (Stemcell technologies, Vancouver, BC, Canada) following the manufacturer's instructions. After isolating the monocyte fraction, a culture purity of 90% was determined by FACS. Monocytes were seeded at 5×10^5 cells on 10mm glass cover slips (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and were incubated for 2 hours at 37°C in 5% CO₂ in completed medium, consisting in: alpha-MEM (Gibco), supplemented with 10% FBS (Gibco), 2mM Glutamax (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Non-adherent cells were washed out and adherent cells were used for the osteoclast formation assays. The adherent cells were cultured in two different conditioned media (CM), one from MSC cells (day 0), and the other collected at day 21 of osteoblast differentiation, both of them in a 1:1 ratio with completed medium

(described above), supplemented with 25ng/ml M-CSF (Peprotech). As positive control of osteoclasts formation, adherent cells were cultured in completed medium supplemented with 25ng/ml M-CSF (Peprotech) and 50ng/ml RANKL (Peprotech). All the cultures were maintained until the generation of multinucleated giant cells, which occurred around 21-24 days of culture. Culture medium was changed every 3 days and CM was added at each medium change.

Phalloidin and DAPI staining

The obtained osteoclasts were washed with PBS and fixed with 3.7% (W/V) PFA for 10 min. Then cells were permeabilized with 0.1% Triton-X-100 in PBS for 3-5 min. The cytoskeletal actin was stained with TRITC-Phalloidin (Sigma) and cell nuclei with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). The cytoskeleton actin and DAPI-stained nuclei were visualized by fluorescence microscopy.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Student's *t*-test. Data are presented as mean \pm SD.

RESULTS

Mesenchymal differentiation of hiPSCs via EB formation

For MSC differentiation we used a multistep culture method via EB formation, cell outgrowth from EBs on matrigel-coated dishes, and monolayer culture after cell dissociation. Cells with MSC-like phenotype were obtained, that were able to attach to regular culture dishes and proliferate in the MSC growth medium. In our

experience, the initial cell density was critical for monolayer culture and to avoid the induced mitotic arrest and large, flattened and irregular cell morphology.

Flow cytometry analyses demonstrated that MSC cell surface markers (CD73, CD90, CD105) were consistently and highly expressed in hiPSCs-derived MSCs with genotypes N370S/N370S (FIG. 2), L444P/G202R, and N370S/84GG (not shown). Expression of the hematopoietic markers, CD34 and CD45, was negative in all genotypes. Only cells with the N370S/N370S genotype were further analyzed in the present study.

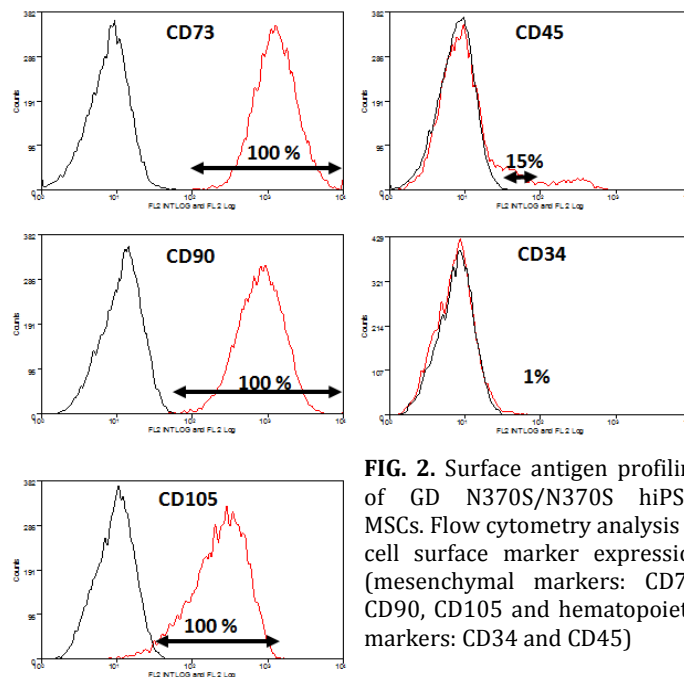


FIG. 2. Surface antigen profiling of GD N370S/N370S hiPSC-MSCs. Flow cytometry analysis of cell surface marker expression (mesenchymal markers: CD73, CD90, CD105 and hematopoietic markers: CD34 and CD45)

GBA1 activity measurement in MSC (day 0) and at day 21 of differentiation

In order to check the GBA1 activity before and after the differentiation process we analyzed enzyme activity in MSC cells (considered as day 0) and after 21 days of the differentiation process. We verified that the difference between GBA1 activity in WT and GD cells did not change during the differentiation process. WT GBA1

activity was 4-5 folds higher (4.72 at day 0; 3.98 at day 21) than that of the GD N370S/N370S cells (FIG. 3).

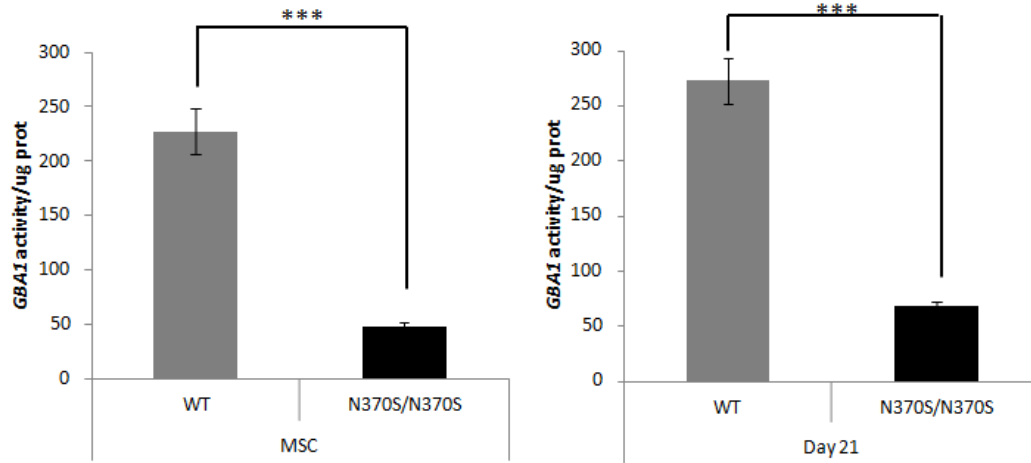


FIG. 3. The GBA1 activity in both N370S/N370S and WT genotype, determined at day 0 (MSC stage) and at day 21 of osteoblasts differentiation. Results are expressed as mean \pm S.D (standard deviation). Statistical differences (***) p-value < 0.001, using Student's *t*-test.

Cell cycle analysis

In order to investigate the possibility of alteration of the cell cycle in GD, the cell cycle analysis was performed at day 0 and at day 21 of differentiation process. As shown in FIG. 4, the proportion of cells with genotype N370S/N370S in S and G2/M is decreased compared to those with the WT genotype, at 21 days of differentiation. At day 0, only small differences are observed. It should be noted that the number of cells at day 21 was significantly lower, and this was more evident in the case for GD cells.

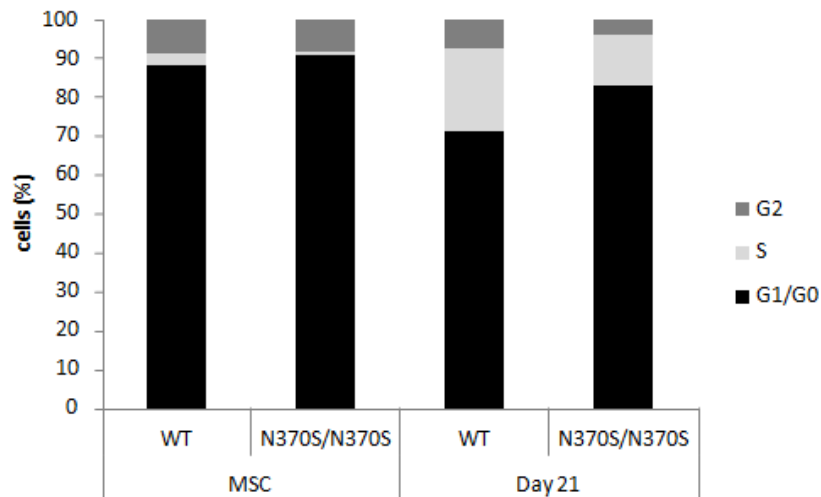


FIG. 4. The percentage of cells in each cell cycle phase at MSC stage (left) and at day 21 of differentiation process (right). It showed that GD cells have cell cycle arrest in G1/G0.

MSC osteoblastic potential

Changes in bone mass are the result of an unbalance between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts. We aimed to evaluate in vitro the potential impact of GBA1 deficiency on this tightly regulated process. For this purpose, some representative genes in each stage of osteoblasts differentiation process were chosen to be analyzed by qPCR. For example, *ALPL* and *RUNX2* were selected as representative genes for the early stages of differentiation, and *OSX* and *SOST* for the late stages. Preliminary results for *ALPL* are shown in FIG. 5. Low mRNA levels are observed at day 0 for WT and GD cells. Maximum relative expression was detected at day 7, followed by a decrease at days 14 and 21 for both genotypes. Small but significant differences were observed at day 7 (higher levels in GD cells) and at day 21 (lower levels in GD cells). In this regard it should be noted that while the expression in GD cells decrease from day 14 to day 21, *ALPL* expression levels in WT cells are similar at 14 and 21 days.

To evaluate the mineralization of the ECM during the process of osteoblasts differentiation at day 0, 7, 14 and 21, cells were analyzed for the presence of

calcium and phosphate deposits as determined by the presence of alizarin red-positive mineralized nodules and the von Kossa positive stained phosphate deposits. Alizarin red staining was observed from day 14 for both cell types. However, it was stronger in the GD cell culture (FIG. 6A). A similar scenario was observed for the von Kossa staining (FIG. 6B). Finally, and consistently with mRNA expression levels, ALPL histochemical staining results show the presence of the enzyme from day 7 onwards (FIG. 6C). The presences of ALPL become more evident at day 14 and 21, particularly in WT cells.

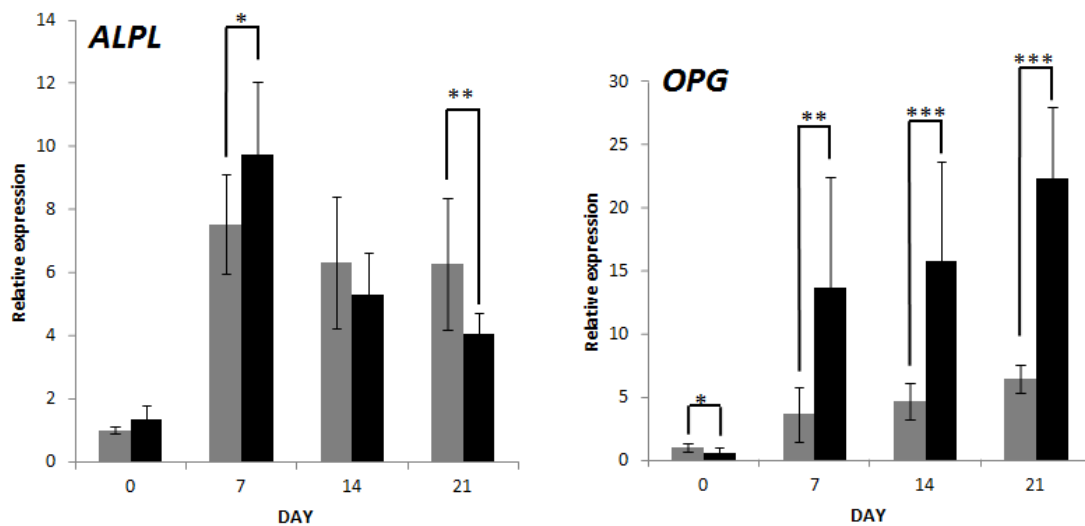


FIG. 5. Relative mRNA expression of ALPL and OPG at MSC during different days. Data represent the mean expression values (9 replicates) normalized by WT day 0 (WT MSC) \pm SD. Statistical differences (*) p-value < 0.05, (**) p-value < 0.01 and (***) p-value < 0.001 between GD (black) and WT (gray) genotype, using Student's *t*-test.

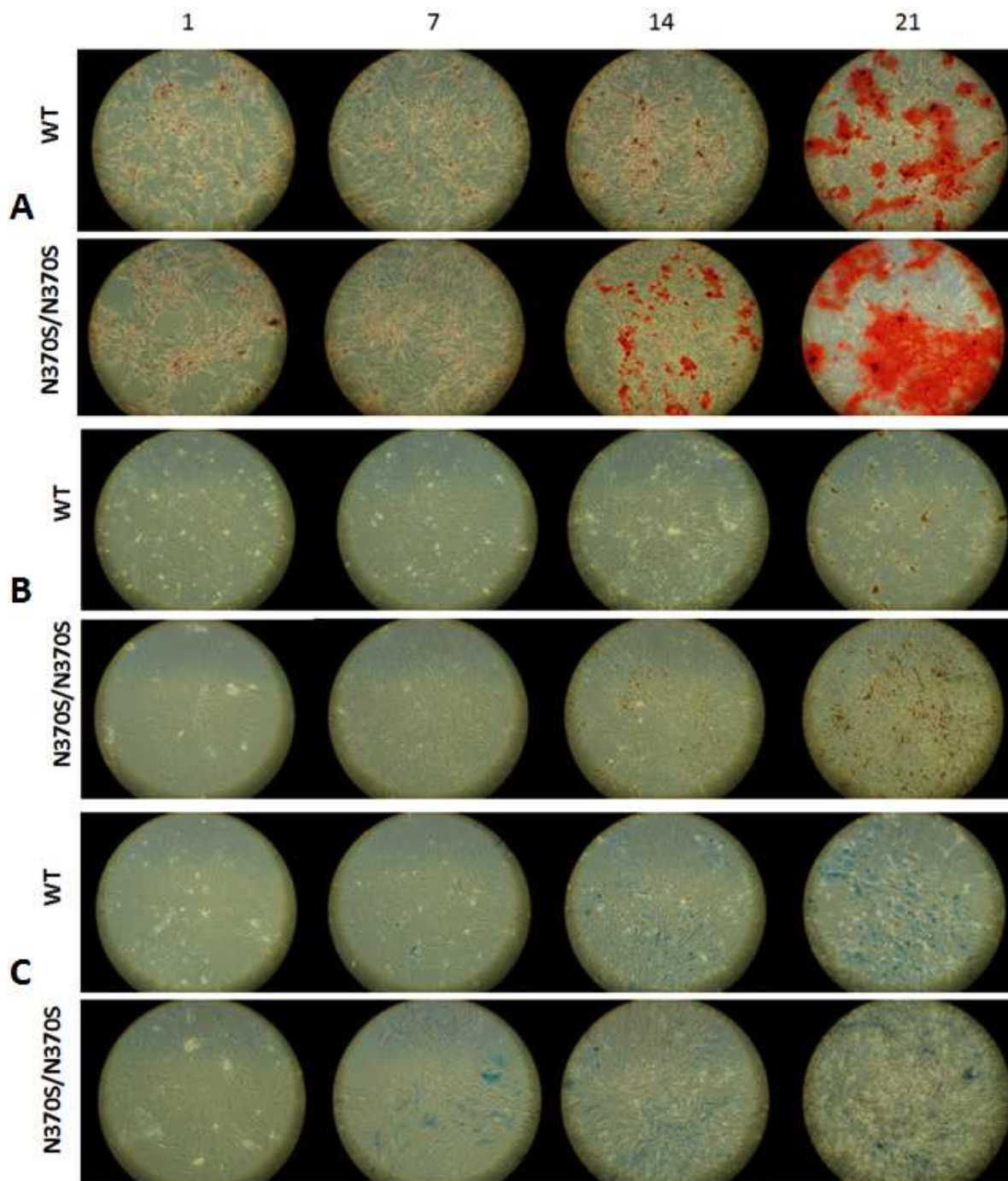


FIG. 6. Histochemical assays. A) alizarin red staining for calcium deposits, B) von Kossa staining for phosphate deposits and C) ALP staining for detect the ALPL protein in the ECM.

Effect of GD osteoblastic cells on osteoclastogenesis

In order to assess the impact of GBA1 deficiency on the OPG/RANKL balance, the mRNA levels of *TNFRSF11B* (the gene encoding OPG) and *TNFSF11* (the gene encoding RANKL) were measured at all time points. Preliminary results of *OPG* expression are shown in FIG. 5. Its expression increases gradually at WT genotype during the differentiation process. However, in N370S/N370S cells this expression was dramatically upregulated at day 7 and increased further thereafter. Significant differences between GD and WT cells were observed at days 7, 14, and 21. As shown in FIG. 6, the osteoclasts grown in medium containing RANKL and M-CSF (positive control) or in conditioned medium from N370S7N370S GD cells are larger than those grown in conditioned medium from WT cells. On the other hand, the number of polynuclear cells using both conditioned media is similar and clearly lower than the number of osteoclast found when the control medium was used (FIG. 7).

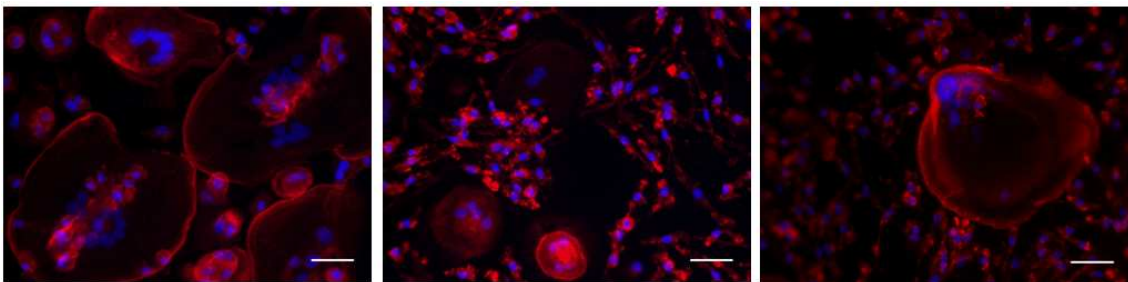


FIG. 7. Osteoclasts generated by the addition of RANKL and M-CSF (positive control), and by the conditioned medium of MSC of both genotypes, WT and N370S/N370S. The nuclei are stained with DAPI (blue) and the cytoskeleton actin with phalloidin (red). Scale bar: 500 μ m.

Chaperone effect of DIX-28 on mesenchymal GD cells

In order to assess the effect of DIX-28, mesenchymal N370S/N370S GD cells were treated with this compound at 10 μ M for six days. As shown in FIG. 8, an increase close to 50% was obtained, when compared with untreated cells (DMSO).

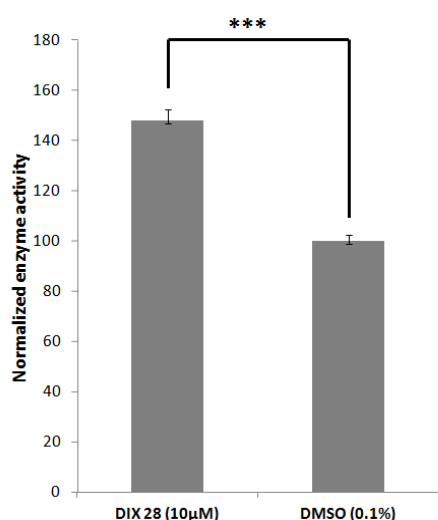


FIG. 8. Normalized GBA1 activity of N370S/N370S MSC after treatment with DIX-28 at 10 μ M. The normalized enzyme activity was calculated by the percentage between treated cells and untreated (0.1% DMSO). Values are the mean \pm SD. Statistical differences (***) p-value <0.001.

DISCUSSION

Since now the pathophysiology of the bone disorder observed in Gaucher disease has not been fully understood. Bone manifestations may also be partially explained by infiltration of the bone marrow by Gaucher cells that may trigger an inflammatory response, which may impact on bone remodeling. Contradictory results of metabolic markers of bone have been reported in several studies (Drugan *et al.* 2002; van Dussen *et al.* 2011; Giuffrida *et al.* 2012), but in general, in GD, markers of bone formation tend to be either normal or decrease, while markers of bone resorption are either normal or increased, in relation to healthy individuals. These findings are consistent with the results observed in several models for GD. Some of them suggested that in GD there is an intrinsic dysfunction

in the osteoblastic lineage, both in MSC (Campeau *et al.* 2009; Lecourt *et al.* 2012) and in osteoblasts (Mistry *et al.* 2010, 2014 ; Mucci *et al.* 2012, 2013). However, others have shown that osteoclastic dysfunction had a role in GD bone disease (Mucci *et al.* 2012, 2013; Reed *et al.* 2013).

All models have advantages and disadvantages. Some of the models described above were generated by the treatment with CBE that although mimicking some of the features of the pathology, is far from reproducing the genetic effect in GD. On the other hand, cells obtained from GD patients or GD mice were exposed to cytokines, which may have modified the specific effect of the mutations in the osteoblast GBA1 gene.

In the iPS-based model described here we were able to evaluate the specific effect of the mutations in the mesenchymal and osteoblastic cells, independently of extrinsic stimuli, such as those from cytokines and Gaucher cells.

Our preliminary results indicate that the N370S/N370S GD cells derived from iPS cells were able to differentiate to osteoblasts and to mineralize the ECM, as shown by calcium, phosphate and ALP staining, and by the *ALPL* mRNA levels.

ALPL relative expression was low at day 0 and increased thereafter attaining maximal values at day 7. Then, they decreased and reached a plateau at days 14 and 21. This pattern was similar for both genotypes (N370S/N370S and WT) but *ALPL* mRNA was higher for the N370S/N370S at any time point. Consistently, ALP staining showed the presence of the protein in de ECM at day 7, which was maintained during the process of differentiation. It is known that an enhanced expression of this enzyme takes place during the proliferation period and is apparently needed just before the onset of matrix mineralization, providing

localized enrichment of inorganic phosphate for hydroxyapatite crystal nucleation and proliferation (Bellows et al. 1991). The histochemical detection of ALPL is considered one of the earliest phenotype markers of the osteoblast lineage (Lian and Stein 1995) and the ECM maturation. Afterwards, the mineralization process takes place. In our study, we were able to detect the accumulation of calcium and phosphate of hydroxyapatite from day 14. These data suggest that the GBA1 deficiency does not alter the differentiation potential of MSCs. These observations are in accordance with those of the CBE MSC model generated by Lecourt *et al.* (2012). However, other authors have shown that the osteoblast differentiation was compromised in GD (Mistry *et al.* 2010; Mucci *et al.* 2013).

The OPG/RANK/RANKL system is a biological pathway that plays an essential role in the control of bone remodeling. *In vivo*, RANKL stimulates the differentiation and activity of the osteoclasts through the binding to its receptor, RANK, expressed at the osteoclast cell membrane. OPG is a soluble molecule that modulates RANKL activity through its interference in the RANK/RANKL interaction. RANKL and OPG are produced by stromal cells and osteoblasts (Boyle *et al.* 2003).

We found an increase in *OPG* mRNA levels during the osteoblastic differentiation, as expected. Surprisingly, the levels were higher in GD cells than in WT cells. This is consistent with the results obtained for *ALPL* expression, but questioned a possible regulation of GD bone manifestation through OPG. On the other hand, osteoclasts grown in the presence of conditional medium of GD mesenchymal cells were larger than those grown in WT conditional medium. However, the RANKL analysis, still ongoing, is necessary to reach any conclusion, since the OPG/RANKL ratio is the relevant parameter.

An important limitation of this work is that the MSC derived from WT iPS cells did not work as expected: they presented a low proliferative potential, which is needed for a correct differentiation, as shown in this study. Further studies with WT iPS cells from different sources will be needed to raise clear conclusions.

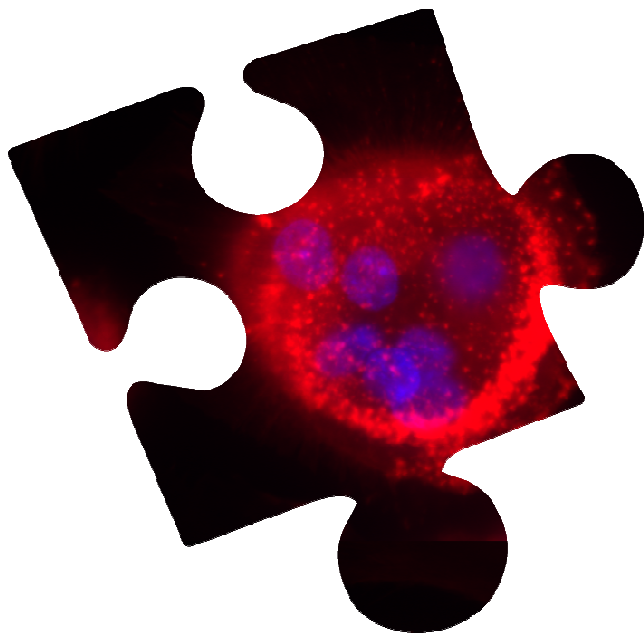
The idea was to use this model to test therapeutic approaches. In this sense, and as a proof of concept, the pharmacological chaperone DIX-28 was analyzed on the iPS-derived N370S/N370S mesenchymal cells. DIX-28 has been recently shown to act as a good chaperone on GD fibroblasts (Serra-Vinardell *et al.* 2014). A significant increase in GBA1 activity in these mesenchymal cells (compared to untreated cells) was observed. The increase of nearly 50% on the GBA1 activity suggests that this could be a clinically relevant option for the treatment of bone symptoms in Gaucher disease.

REFERENCES

- Allen, M. et al., 1996. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJ Med*, pp.19–25.
- Bellows, C.G., Aubin, J.E. & Heersche, J.N., 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and mineral*, 14(1), pp.27–40.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(May), pp.337–342.
- Van Breemen, M.J. et al., 2007. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels in type 1 Gaucher disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1772, pp.788–796.
- Campeau, P.M. et al., 2009. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood*, 114(15), pp.3181–3190.

- Drugan, C. et al., 2002. Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 28(1), pp.13–20.
- Van Dussen, L. et al., 2011. Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(7), pp.2194–205.
- Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7), pp.554–565.
- Giraldo, P., 2005. Quality of life related to type 1 Gaucher disease: Spanish experience. , pp.453–461.
- Giuffrida, G. et al., 2012. Bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. *Hematology Reports*, 4, pp.70–79.
- Lecourt, S. et al., 2012. Bone marrow microenvironment in an in vitro model of Gaucher disease: consequences of glucocerebrosidase deficiency. *Stem cells and development*, 21(2), pp.239–248.
- Lian, J.B. & Stein, G.S., 1995. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa orthopaedic journal*, 15, pp.118–140.
- McGee-Russell, S.M., 1957. Histochemical methods for calcium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 6, pp. 22-42
- Michelakakis, H. et al., 1996. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1317(3), pp.219–222.
- Mikosch, P. & Hughes, D., 2010. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, 160(23-24), pp.609–624.
- Mistry, P.K. et al., 2014. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), pp.4934–4939.
- Mistry, P.K. et al., 2010. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp.19473–19478.
- Mucci, J.M. et al., 2012. Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- α . *Gene*, 509(1), pp.51–59.
- Mucci, J.M. et al., 2013. Uncoupling of osteoblast-osteoclast regulation in a chemical murine model of gaucher disease. *Gene*, 532(2), pp.186–191.

- Mucci, J.M. & Rozenfeld, P., 2015. Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2015(2015), pp.1-6.
- Panicker, L.M. et al., 2012. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), pp.18054–18059.
- Park, I.-H. et al., 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), pp.877–886.
- Reed, M. et al., 2013. Enhanced differentiation of osteoclasts from mononuclear precursors in patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51(3), pp.185–194.
- Serra-Vinardell, J. et al., 2014. Glucocerebrosidase enhancers for selected gaucher disease genotypes by modification of α -1-C-substituted Imino- D -xylitols (DIXs) by click chemistry. *ChemMedChem*, 9(8), pp.1744–1754.
- Sidransky, E., 2004. Gaucher disease: Complexity in a “simple” disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83, pp.6–15.
- Tiscornia, G., Vivas, E.L. & Belmonte, J.C.I., 2011. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nature Medicine*, 17(12), pp.1570–1576.



DISCUSSIÓ

1. XAPERONES FARMACOLÒGIQUES (XF) COM ESTRATÈGIA PER A TRACTAR LA MALALTIA DE GAUCHER

Actualment existeixen 429 mutacions en el gen *GBA1* que produeixen la malaltia de Gaucher (HGMD® professional 2015.1), que es caracteritza per presentar elevats nivells del glucoesfingolípid GlcCer, a causa de la deficient activitat en el lisosoma de l'enzim GBA1, que pot ser deguda a una activitat catalítica reduïda i/o per la dificultat de l'enzim per arribar al lisosoma. L'activitat catalítica pot ser reduïda directament per mutacions que alteren la maquinària catalítica, o indirectament mitjançant l'alteració de la unió del substrat o de co-activadors (Grace *et al.* 1994). A més, algunes mutacions puntuals poden provocar una desestabilització estructural de l'enzim GBA1 (Nagy *et al.* 2004), que seguidament les xaperones moleculars del sistema de control de qualitat de l'ER intenten millorar-ne el plegament. Si no s'aconsegueix, la proteïna mal plegada es destina a la degradació proteolítica associada a l'ER (ERAD) (Ellgaard *et al.* 2003) i, per tant, el seu transport cap al lisosoma queda interromput i la concentració enzimàtica en aquest orgànul decreix.

Les dues estratègies terapèutiques aprovades per la GD, l'ERT i la SRT, estan dirigides a disminuir els nivells de substrat acumulat reduint la seva síntesi (SRT) o mitjançant el subministrament d'enzim exogen (ERT). Aquests tractaments són eficaços per les anomalies visceralis i hematològiques, però poc eficients per les anomalies esquelètiques i encara menys per les neurològiques, degut a que els agents terapèutics presenten escassa biodisponibilitat en l'os i són incapaços de passar la barrera hematoencefàlica. Per tant els GD2 i GD3 són refractaris a aquests tractaments.

La teràpia amb XF es basa en l'ús d'inhibidors específics d'un enzim que, a determinades concentracions, poden rescatar l'activitat residual d'aquest enzim mutat. Això ho aconseguen incrementant l'estabilitat de la proteïna mutada i ajudant-la en el transport cap al seu destí final. Aquest enfocament té com a fonament que, tot i que l'enzim defectuós es troba mal plegat o presenta inestabilitat és catalíticament actiu. En la GD hi ha evidències que l'acumulació del substrat és conseqüència d'uns nivells massa baixos de proteïna GBA1 funcional en el lisosoma, probablement a causa de la degradació proteosomal i no per una activitat catalítica disminuïda (Lu *et al.* 2010). A més, està descrit que una activitat enzimàtica de només un 10% és suficient per prevenir l'acumulació de substrat en les LSD (Schueler *et al.* 2004). Per tant, l'ús de XF és una estratègia terapèutica altament prometedora per la GD. A part, combina els beneficis de l'ús de molècules petites (que permeten la biodisponibilitat oral i la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica) amb especificitat enzimàtica. Per tant es creu que, en un futur no gaire llunyà, serà de gran utilitat per tractar les formes neuronopàtiques de la GD.

1.1. Tria dels possibles candidats com a XF

Les XF són dissenyades per tal que s'uneixin només a un determinat enzim. Per tant, els millors candidats per un enzim específic són els inhibidors reversibles d'aquest. Així, la majoria de XF sintetitzades per l'enzim GBA1 són inhibidors competitius reversibles, és a dir, s'uneixen al centre actiu de l'enzim i competeixen per aquest lloc d'unió amb el substrat. D'aquesta manera, si s'utilitzen a concentracions sub-inhibitòries, l'inhibidor podrà establir l'enzim unint-se al seu centre actiu i posteriorment, quan sigui necessari, aquest serà accessible al substrat, ja que estarà a major concentració que l'inhibidor i serà capaç de dissociar el complex inhibidor(XF)-enzim (Fan *et al.* 2008; Ringe *et al.* 2009). Per aquest motiu, la majoria d'autors han dissenyat inhibidors de l'enzim GBA1 del tipus iminosucres, els quals presenten una estructura glicomimètica al substrat, GlcCer. S'han obtingut bons iminosucres per l'enzim amb les mutacions N370S o G202R (Alfonso *et al.* 2005; Sawkar *et al.* 2005, 2002). D'altra banda, aquests iminosucres són poc selectius, ja que presenten capacitat inhibidora d'una àmplia gamma de glicosidases, i això podria suposar un problema si s'utilitzen clínicament, a causa dels efectes secundaris no desitjats.

Donades les limitacions dels iminosucres, es van dissenyar altres sistemes per tal d'intentar millorar el seu perfil terapèutic potencial.

En el marc d'una col·laboració amb el grup "Rubam" (CSIC-UB), es va considerar interessant l'estudi en profunditat d'una sèrie d'aminociclitols substituïts a l'àtom de nitrogen, amb una cadena alquílica de longitud variable, que havien estat sintetitzats per aquest grup. Les dades preliminars indicaven que es tractava d'inhibidors competitius de l'enzim GBA1 i que eren capaços d'establir tèrmicament l'enzim (Egido-Gabas *et al.* 2007, 2005). En una segona generació d'anàlegs, es va explorar la cadena lateral introduint diverses modificacions estructurals, que van donar lloc a compostos caracteritzats per la presència d'un sistema de tipus triazolilalquil, com a element estructural comú d'aquesta nova sèrie (Díaz *et al.* 2011, 2010; Díaz *et al.* 2011). Finalment, en una tercera generació de compostos, es va reemplaçar el sistema d'aminociclitol pel d'iminoxilitol (DIX), tot mantenint l'estructura general de les cadenes de triazolilalquil de la sèrie anterior (Figura 20). L'elecció del DIX, com a nucli base d'aquesta nova família de XF potencials, va estar condicionada pels resultats publicats pel compost 1C9-DIX, que és capaç d'augmentar el voltant d'1,6 vegades l'activitat de l'enzim GBA1 en fibroblasts homozigots per a la mutació N370S (Oulaïdi *et al.* 2011).

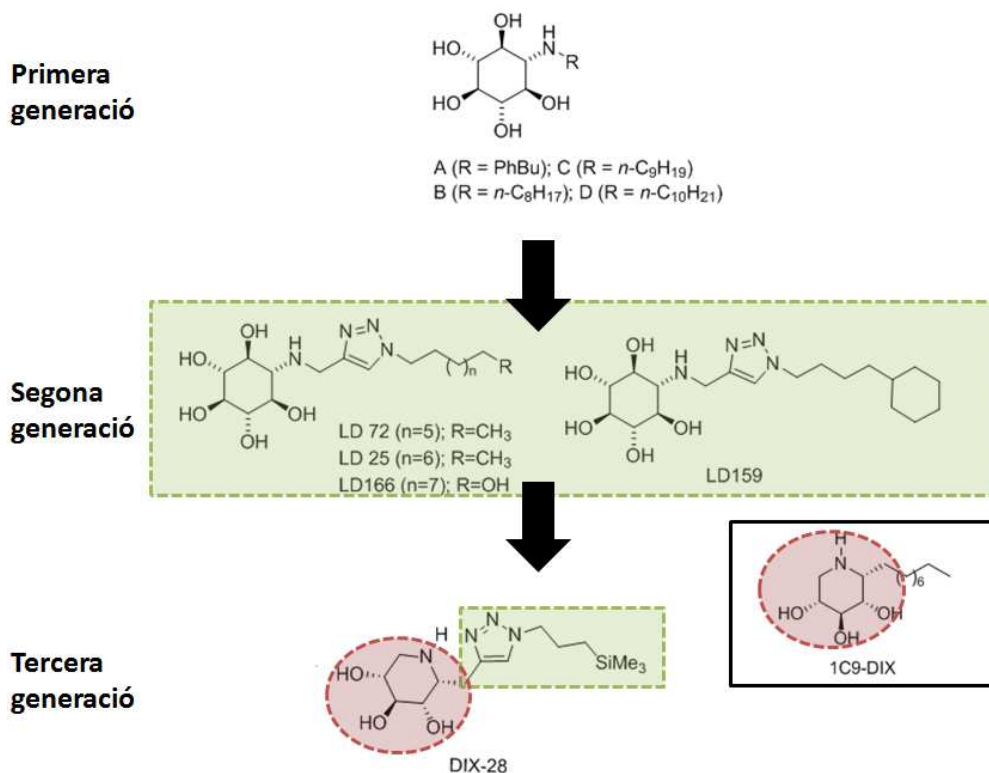


Figura 20. Esquema de les tres generacions de compostos. A la primera generació hi ha els N-alkil aminociclitols. A la segona, s'introdueix a la cadena N-alkil diversos sistemes alifàtics i clicloalifàtics i en resulten els compostos LD. A la tercera, el sistema aminociclitol dels productes LD és substituït pel sistema d'iminoxilitol present en el compost de referència 1C9-DIX.

1.1.1. Importància dels paràmetres IC₅₀ i K_i

(veure annex per informació dels paràmetres)

A fi de determinar la capacitat inhibidora de cada un dels compostos sintetitzats, es va avaluar la inhibició sobre l'enzim GBA1 recombinant (imiglucerasa, Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) i es va determinar la IC₅₀ i la constant de dissociació (K_i), tant a pH 5,2 com a pH 7,0, per predir l'efecte que produirien els nostres compostos tant en l'ER com en el lisosoma. Idealment, perquè un inhibidor sigui considerat bon candidat a ser XF cal que presenti major activitat inhibidora al pH neutre (7,0) de l'ER que al pH àcid (5,2) del lisosoma o, dit d'una altra manera, el valor d'IC₅₀ i de K_i a pH neutre ha de ser inferior al valor d'IC₅₀ i de K_i a pH àcid. D'aquesta manera, l'inhibidor en l'ER s'unirà fortament amb l'enzim aportant-li estabilitat i evitarà que sigui degradat pel proteosoma. En canvi, quan el complex inhibidor-enzim arribi al lisosoma es dissociarà (K_i lisosoma > K_i ER) i l'enzim podrà catalitzar la reacció d'hidròlisi del substrat.

El valor d'IC₅₀ i de K_i dels compostos iminoxilitols és de l'ordre dels nanomols, per la qual cosa els fa millors inhibidors que els aminociclitols, ja que aquests últims presenten valors d'IC₅₀ i de K_i que ascendeixen fins als micromols.

1.1.2. Lloc d'unió depenent del tipus d'inhibició

(veure annex per informació dels tipus d'inhibició)

La majoria de XF descrites són inhibidores competitives de l'enzim, per tant s'uneixen al lloc actiu d'aquest. Així és important que s'utilitzin a concentracions sub-inhibidores, perquè un cop arribin al lisosoma, les altes concentracions de substrat acumulat podran fàcilment desplaçar l'inhibidor sense comprometre l'activitat enzimàtica. No obstant, algunes vegades s'ha documentat que aquets tipus de XF s'uneixen tant fort al centre actiu, que s'observa inhibició inclús a baixes concentracions. Considerant que el temps de vida mitja de l'enzim (alguns dies) és superior al de la XF (algunes hores) (Parenti *et al.* 2015), alguns autors han realitzat un període de rentat de la XF (cultivant les cèl·lules amb medi en absència de la XF), abans de procedir a la determinació de l'activitat enzimàtica (Khanna *et al.* 2010a). S'ha de tenir present que si aquesta teràpia passés a assajos clínics caldria, en la majoria de casos, administrar la XF de forma discontinua, per tal d'observar un augment net significatiu de l'activitat residual enzimàtica (Khanna *et al.* 2010b).

Recentment, s'ha incrementat l'ús de XF al·lostèriques. El mecanisme d'acció d'aquest tipus de XF és semblant a les XF dirigides al centre actiu. Es requereix una afinitat d'unió suficient a fi d'augmentar l'estabilitat de l'enzim mutat en l'ER, i una de menor en el lisosoma perquè així el complex XF-enzim es pugui dissociar. No obstant, les xaperones al·lostèriques tenen l'avantatge addicional que poden romandre unides a l'enzim durant la catàlisi sense risc d'inhibició, sempre i quan l'inhibidor s'hagi utilitzat a concentracions sub-inhibitòries. D'altra banda, en aquest cas, el substrat no competirà amb el lloc d'unió de l'inhibidor i, per tant, la dissociació d'aquest amb l'enzim dependrà exclusivament de la K_i .

Per aquest motiu s'espera que els aminociclitols (inhibidors competitiu) s'uneixin específicament al centre actiu de l'enzim. En canvi, els iminoxilitols (inhibidors no competitiu) són potencialment inhibidors de tipus al·lostèric, els quals es podran unir a l'enzim, en un lloc diferent al centre actiu, però també al complex enzim-substrat. El DIX-28, per ser un inhibidor de tipus mixt, es podrà unir tant en el centre actiu com al·lostèricament.

1.1.3. Importància de la selectivitat cap a altres glicosidases i la GBA2

Per tal d'avaluar la selectivitat dels nostres compostos envers altres glicosidases, vam determinar quin efecte produïa cada un d'ells en l'activitat: α -glucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, i β -hexosaminidasa. Es va comprovar que els aminociclitols són generalment més selectius que els iminoxilitols. Això concorda amb el fet que els iminosucres presenten capacitat inhibidòria per a una àmplia gama de glicosidases. D'altra banda, és important senyalar que les concentracions

emprades per determinar aquesta selectivitat eren superiors que les utilitzades per obtenir l'efecte XF.

S'ha determinat també, l'efecte d'alguns d'aquests compostos sobre l'activitat de l'enzim GBA2 en homogenats de testicles de ratolí (presenten una sobreexpressió de l'enzim GBA2 respecte al GBA1). S'ha observat que ni els aminociclitols ni els iminoxilitols afectaven a l'activitat d'aquest enzim. En canvi, el mateix experiment portat a terme amb la NN-DNJ i la IFG, a concentracions inferiors a les avaluades amb els aminociclitols i els iminoxilitols, es produïa una inhibició enzimàtica de més d'un 50%.

1.2. Efectivitat dels compostos seleccionats sobre fibroblasts portadors de diferents genotips responsables de la malaltia de Gaucher

Els resultats obtinguts en els dos treballs realitzats, inclosos en aquesta tesi, indiquen que les dues famílies de compostos (els aminociclitols i els iminoxilitols) presenten una alta eficàcia en augmentar l'activitat intrínseca de l'enzim GBA1 amb la mutació G202R. Està descrit que l'enzim que conté aquesta mutació queda retinut en l'ER (Schmitz *et al.* 2005; Zimmer *et al.* 1999) i, per tant, és una mutació particularment susceptible a ser tractada amb XF. A més de comprometre substancialment el transport cap al lisosoma, l'enzim amb la mutació G202R també presenta baixa activitat residual (aproximadament un 10% respecte l'activitat de l'enzim WT) (Sawkar *et al.* 2005). Això fa que, quan la mutació es presenta en homozigosis o en heterozigosis composta amb una altra mutació greu com la L444P s'associa a la GD2 (Beutler *et al.* 1994).

En el cas dels aminociclitols (compostos LD), els que van ser capaços de produir un increment d'activitat més rellevant de l'enzim amb la mutació G202R, en fibroblasts homozigots per aquesta mutació, van ser el LD25 (1,73 vegades), el LD125 (1,75 vegades) i el LD153 (1,34 vegades), tots a 1 μ M i el LD159 (1,89 vegades) i el LD166 (1,83 vegades) a 5 μ M. L'anàlisi de localització subcel·lular va evidenciar un lleuger augment de l'enzim mutat G202R en el lisosoma, després de tractar les cèl·lules amb algun d'aquests compostos. Mitjançant l'addició d'una esfingosina marcada amb un N₃ (ω N₃Sph) va permetre avaluar la capacitat de l'enzim GBA1-G202R d'hidrolitzar la GlcCer, després de 6 dies de tractament (i un dia més amb medi sense tractament, període de rentat). Els resultats van mostrar que aquests productes eren capaços de reduir considerablement els nivells de la GlcCer.

Pel que fa els resultats obtinguts amb els iminoxilitols sobre el mateix enzim GBA1-G202R, tots els compostos analitzats van ser capaços, en menor o major mesura, d'augmentar de forma significativa l'activitat de l'enzim i, amb alguns d'ells, aquest augment va ser superior a l'obtingut amb els aminociclitols. El compost amb el que es va obtenir millors resultats, l'iminoxilitol DIX-28, va produir un augment de 4,8

vegades l'activitat residual de l'enzim amb la mutació G202R. També es va evidenciar un increment en la co-localització d'aquest enzim amb el compartiment lisosomal, després de tractar 6 dies els fibroblasts homozigots per aquesta mutació amb aquest compost. S'ha de destacar que els iminoxilitols eren capaços d'augmentar l'activitat de l'enzim G202R a baixes concentracions. Majoritàriament s'observava el màxim increment de l'activitat enzimàtica de l'enzim amb la mutació G202R entre 10 i 100nM. Però alguns d'ells, els inhibidors més potents, van ser capaços de produir un increment de fins a dos vegades l'activitat residual d'aquest enzim, a concentracions de l'ordre dels picomols (DIX-1 a 50pM i el DIX-17 a 500pM).

La N370S (associada a la GD1) és la mutació més prevalent en la població jueva asquenasa, on 1 de cada 865 naixements són homozigots o heterozigots per aquesta mutació (Beutler *et al.* 1993). És també la predominant en altres poblacions europees, encara que amb una freqüència més baixa (Cormand *et al.* 1995; Lacerda *et al.* 1994). L'alta prevalença de la mutació N370S la fa una candidata atractiva per a la intervenció farmacèutica.

Cap dels aminociclitols analitzats (compostos LD) va ser capaç d'incrementar considerablement l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S, ja que els més actius per aquest enzim produïen increments d'activitat de només 1,3 vegades. D'altra banda, en el cas dels iminoxilitols, el compost DIX-28 va poder augmentar 1,7 i 2 vegades l'activitat residual de l'enzim N370S a 10 i a 100nM, respectivament. Aquest compost de nova generació produïa uns increments majors d'activitat en comparació amb el producte del qual deriva, l'1C9-DIX. Aquest últim s'havia documentat que produïa un increment d'1,6 vegades a 10nM (Oulaïdi *et al.* 2011) i en el nostre laboratori s'ha observat un increment d'1,8 ± 0,26 vegades. S'ha utilitzat com a control extern ja que la diferència obtinguda en l'activitat s'atribueix en part a la utilització de fibroblasts amb el mateix genotip però de diferent pacient (diferències inter-individuals). A part d'això, s'ha de destacar que l'1C9-DIX a 100nM produeix un 20% d'inhibició de l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S. D'aquesta manera, el producte DIX-28 té una finestra terapèutica útil més ampla que el producte del qual deriva (1C9-DIX).

Altres autors havien descrit per a altres compostos, com ara la NN-DNJ (Sawkar *et al.* 2002), la NB-DNJ (Alfonso *et al.* 2005) i l' α -1-c-alkil-DNJ (Yu *et al.* 2006), que també eren capaços de duplicar l'activitat residual de l'enzim amb la mutació N370S, però per aconseguir-ho havien d'utilitzar-los a majors concentracions que les emprades en el compost DIX-28.

Com s'ha comentat, només un petit augment de l'activitat residual de l'enzim GBA1 pot ser suficient per evitar l'acumulació del substrat i els efectes fenotípics (Conzelmann i Sandhoff 1991). Schueler i col·laboradors van descriure, a partir d'un model de la GD, que una activitat β -glucosidasa de només 11-15% respecte a

la de l'enzim WT era suficient per prevenir un emmagatzematge de GlcCer rellevant (Schueler *et al.* 2004). Corroborant aquest fet, en pacients que reben l'ERT, només una fracció molt petita de l'enzim recombinant roman hores després de l'introducció intravenosa, però l'augment d'activitat és suficient per reduir l'hepatoesplenomegalia, les crisis òssies i millorar tant l'anèmia com la trombocitopènia (Beutler *et al.* 1995). D'aquesta manera, com que l'activitat residual de l'enzim amb la mutació N370S és alta, d'aproximadament un 32% respecte a la de l'enzim WT (Sawkar *et al.* 2005), duplicar-la pot ser suficient per no desenvolupar la GD. Per tant, l'increment produït per l'iminoxilitol DIX-28 a 100nM (d'aproximadament 2 vegades) podria superar aquesta mínima activitat necessària. L'increment, per part del mateix producte, de casi 5 vegades l'activitat de l'enzim amb la mutació G202R podria ser interessant, pel fet que l'enzim amb aquesta mutació presenta una activitat residual d'un 13% respecte a la de l'enzim WT (Zimmer *et al.* 1999). D'aquesta manera, l'activitat residual de l'enzim amb la mutació G202R arribaria a un 50% respecte a la del WT i, per tant, podria arribar a ser clínicament rellevant.

La mutació L444P (Tsuji i Suzuki 1987) és la segona mutació més prevalent en la població jueva asquenasa, i pot ser puntual o formar part d'un al·lel de recombinació (Tayebi *et al.* 2003). S'observen discrepàncies en la seva expressió fenotípica. Així, mentre que en la població sueca procedent de la província de Norrbotten els individus portadors d'aquesta mutació (en homozigosis o heterozigosis amb una altre de greu) presenten un fenotip característic a la GD3 (Dahl *et al.* 1990), els pacients japonesos amb el mateix genotip no manifesten símptomes neuronopàtics (Ida *et al.* 1997). A part d'aquesta última excepció, la mutació L444P en homozigosi o en heterozigosi composta amb una altra mutació greu, produeix la GD2 o la GD3.

Només amb el compost DIX-28 s'ha obtingut un augment d'1,3 vegades en l'activitat d'aquest enzim, GBA1-L444P. De manera similar, en la literatura s'han descrit poques XF capaces d'augmentar l'activitat d'aquest enzim mutat, incloent: la IFG (3,5 vegades en limfoblasts) (Khanna *et al.* 2010a), la calistegina B2 (2,3 vegades en fibroblasts) (Chang *et al.* 2006) i algun dels sistemes bicíclics fusionats (més de 3,5 vegades en cèl·lules COS-7) (Alfonso *et al.* 2013).

1.3. Relació entre l'estructura cristal·lina enzimàtica i l'activitat xaperona dels inhibidors competitius vs els no competitius

S'ha descrit que l'activitat catalítica de l'enzim GBA1 amb la mutació N370S és dependent de pH. A valors de pH per sobre de 5,0, l'enzim s'activa poc per part de la Sap C i és insensible a la inhibició pel CBE (inhibidor irreversible que s'uneix al centre actiu de l'enzim) i per la deoxinojirimicina (DNJ) (Grace *et al.* 1997; Van Weely *et al.* 1993), fet que indica que aquesta mutació produeix un efecte en el

centre actiu. D'altra banda, Dvir i col·laboradors van descriure que l'aminoàcid 370 es troba en el domini III (Figura 21), en una de les hèlix α , molt a prop de la interfase del domini II i III. El domini II de la GBA1 té un paper important en la interacció d'aquesta amb el seu activador, Sap C (Dvir *et al.* 2003). Models computacionals suggereixen que aquesta mutació també disminueix la flexibilitat de la proteïna al voltant del centre actiu (sobretot a pH neutre), en particular entre els residus 311-319. Aquesta rigidesa també pot evitar que s'estableixi una correcta interacció entre l'enzim GBA1 i la Sap C (Offman *et al.* 2010; Salvioli *et al.* 2005; Wei *et al.* 2011). Per tant, sembla que la mutació N370S altera la interacció amb la Sap C, l'estabilitat conformacional i l'activitat catalítica. A més, quan el pH ascendeix a valors per sobre de 5,0, s'incrementen aquests efectes i una part considerable de l'enzim acaba degradada pel proteosoma. Tot i així, sembla que aquesta mutació no afecta significativament el transport de l'enzim al lisosoma, però hi ha indicis que té lloc més lentament (Schmitz *et al.* 2005).

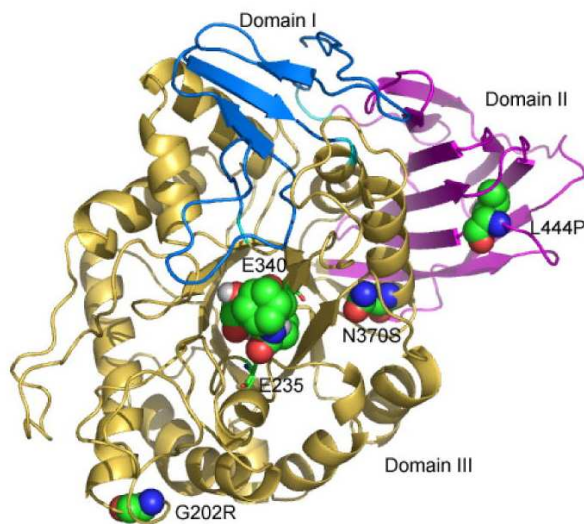


Figura 21. Estructura de raig X de la GBA1 en la que s'observa un derivat d'adamantil (inhibidor competitiu), que actua com a XF unint-se al lloc actiu o centre catalític (en els aminoàcids E235 i E340). També s'observa la posició que ocupa la mutació N370S, la G202R i la L444P (Yu *et al.* 2007)

La mutació G202R està localitzada en el mateix domini que la mutació N370S (Domini III, domini catalític), però mentre que el residu 370 està en estreta proximitat als residus del lloc actiu/lloc catalític, el residu 202 ocupa una posició més llunyana de la maquinària catalítica, a l'extrem d'una hèlix- α (Figura 21). Aquest enzim mutat també presenta una afinitat disminuïda pels inhibidors directes del lloc actiu: CBE, castanospermina i DNJ, indicant que el centre catalític està distorsionat (Grace *et al.* 1997). S'ha descrit que l'aminoàcid G202 es troba en una regió fortament empaquetada de la proteïna plegada, i la substitució de la glicina (aminoàcid apolar i petit) per una arginina (aminoàcid polar i voluminós) es considera desfavorable per a l'estructura. Així, la glicina 202 contribueix a mantenir l'estructura del centre actiu indirectament a través del plegament.

La mutació L444P es localitza en el domini II (domini hidrofòbic semblant a una immunoglobulina (Ig)) (Figura 21) i podria causar un canvi conformacional local, afectant les propietats hidrofòbiques, donant com a resultat un plegament alterat

d'aquest domini (Morel *et al.* 1999). Això és coherent amb la suposició de que aquesta mutació produeixi una proteïna inestable (Grace *et al.* 1994). Per tant, la mutació L444P distorsiona l'estructura del domini II, i sembla que això impedeix la interacció de l'enzim amb la Sap C i/o els fosfolípids àcids de la membrana lisosomal (Dvir *et al.* 2003).

Molts autors mantenen que els inhibidors que s'uneixen al centre actiu enzimàtic (Figura 21), majoritàriament els inhibidors competitiu, tendeixen a incrementar l'estabilitat dels enzims amb les mutacions N370S o G202R ja que, com s'ha comentat, tots dos presenten un centre catalític distorsionat. D'altra banda, en diversos treballs s'ha documentat que l'increment d'activitat enzimàtica sol ser major en l'enzim amb la mutació G202R que amb la N370S. En la mateixa línia, els aminociclitols (inhibidors competitiu), estudiats en el present treball, varen ser capaços de produir un cert increment en l'activitat de l'enzim amb la mutació G202R, i en canvi van produir un efecte menor en l'enzim amb la mutació N370S. Aquest fet és coherent amb la hipòtesi de que la mutació G202R condiciona l'estabilitat de l'enzim, però no afecta a l'activitat catalítica de la proteïna. D'aquesta manera la XF estabilitza l'enzim el qual serà exitosament transportat cap el lisosoma, com s'ha demostrat amb l'increment de co-localització entre el compartiment lisosomal i l'enzim amb la mutació G202R, després de ser tractat amb alguns dels aminociclitols o amb l'iminoxilitol DIX-28. En canvi, hi ha diversitat d'opinions de si és necessari l'ús de XF pel correcte transport lisosomal de l'enzim amb la mutació N370S. Com que s'ha dit, sembla que aquest enzim presenta una alteració en el lloc d'unió de la Sap C, així quan arriba al lisosoma (sol o acompanyat per la XF), no es dona la correcta interacció amb l'activador. Per aquesta raó, no s'observava un increment important en l'activitat catalítica. Això explica perquè amb l'ús de XF específiques del centre actiu (competitiu), s'obtenen generalment millors resultats amb l'enzim amb la mutació G202R que amb l'enzim amb la mutació N370S, encara que les dos mutacions produeixen centres catalítics distorsionats. No obstant, en altres treballs d'altres autors s'han descrit resultats d'increments rellevants en l'activitat de l'enzim GBA1-N370S, amb l'ús de XF específiques del centre actiu. En aquests casos, possiblement, s'ha aconseguit estabilitzar la unió entre l'enzim i la Sap C. Concretament, mitjançant una simulació de dinàmica molecular van demostrar que la DNJ i la IFG, a més de contribuir en el correcte plegament de l'enzim N370S i el subseqüent transport al lisosoma, també ajudaven a que hi hagués una bona interacció entre l'enzim GBA1 i la Sap C (Offman *et al.* 2010).

Generalment, els iminoxilitols (no-competitiu) han funcionat millor com a XF per l'enzim amb la mutació G202R que els aminociclitols. Aquesta mutació, encara que s'ubiqui en el domini catalític, pel fet de trobar-se allunyada del centre actiu, possiblement, l'enzim pot estabilitzar-se tant amb l'ús de XF específiques de centre actiu com amb les XF que s'uneixen a un lloc al·lostèric. De fet, el compost DIX-28, un inhibidor de tipus mixt, és amb el que hem observat un increment més rellevant

en l'activitat d'aquest enzim. Segurament aquest és capaç d'estabilitzar l'enzim mitjançant els dos mecanismes: de forma al·lostèrica i per la unió al centre actiu. De forma similar, aquest compost podria unir-se al centre actiu de l'enzim amb la mutació N370S i alhora, estabilitzar de forma al·lostèrica la unió d'aquest amb la Sap C. No obstant, seria necessari confirmar aquestes hipòtesis amb experiments de simulació de dinàmica molecular.

El fet que la mutació L444P produeixi un enzim mal plegat, però sense distorsió del centre actiu, fa que sigui un mal candidat per ser estabilitzat amb les XF específiques del lloc actiu, ja que la unió en aquest pot no afavorir-ne el plegament. És probable que, per aquest motiu, sigui difícil trobar bones xaperones per aquest enzim. Alguns autors creuen que seria necessari que la XF fos capaç d'unir-se i estabilitzar el domini compromès per la mutació L444P (domini II) (Sawker *et al.* 2005). Així, l'ús de XF al·lostèriques (no competitives) podria ser una bona alternativa per intentar augmentar l'activitat residual d'aquells enzims dels quals no s'han obtingut bons resultats amb les XF específiques del centre actiu. D'altra banda, cap dels iminoxilitols, emprats en aquest estudi, ha estat capaç d'augmentar-ne l'activitat, possiblement perquè la diana d'unió d'aquestes XF no coincideix amb el domini que s'ha d'estabilitzar. Manquen experiments de dinàmica molecular per poder afirmar aquesta suposició. Per contra, alguns autors han argumentat que la proteïna mutada pot presentar una alteració massa gran en el plegament perquè la XF s'hi pugui unir en l'ER (Sawkar *et al.* 2005).

1.4. Influència de la Sap C i el pH intralisosomal en els resultats obtinguts

La Sap C té un punt isoelèctric de pH 4,3 a 4,4. A pH 5,5 es sotmet a un canvi conformacional, en el qual queden exposats residus hidrofòbics que es trobaven prèviament a l'interior de la proteïna plegada, que li donaven la capacitat de penetrar en la membrana i unir-se als fosfolípids aniònics (de Alba *et al.* 2003; Vaccaro *et al.* 1995). Per tant la unió entre Sap C i els fosfolípids aniònics és dependent de pH (veure apartat 3.4.2).

A més, cal comentar que el pH intralisosomal varia dependent del tipus cel·lular. Ja s'ha mencionat que la mutació N370S és dependent de pH, per aquesta raó les propietats catalítiques de l'enzim GBA1 amb la mutació N370S canvien en funció del tipus cel·lular (Van Weely *et al.* 1993). S'ha documentat que el pH intralisosomal és menor en cèl·lules limfocitàries que en fibroblasts. Això podria explicar perquè en el present treball no s'han obtingut bons resultats en l'enzim amb la mutació N370S. A més, la Sap C també protegeix contra la degradació proteolítica (Sun *et al.* 2003) i, per tant, la taxa de degradació de l'enzim N370S podria ser superior a la que hi hauria en altres línies cel·lulars amb un pH lisosomal inferior. A més, és possible que, en fibroblasts, la unió de la Sap C amb els fosfolípids aniònics no és doni de forma òptima i, per tant, l'activació de la GBA1

tampoc. Per aquest motiu, seria oportú validar els nostres resultats en diverses línies cel·lulars per confirmar que no se n'hagin subestimat alguns. A més, el pH intralisosomal també varia entre individus. Això dificulta la generalització dels resultats a partir de la utilització de cèl·lules d'un sol individu. Per tant, idealment, per avaluar l'efecte xaperona d'un producte sobre un enzim amb una mutació determinada, els experiments s'haurien de fer amb cèl·lules provinents d'individus diferents però amb el mateix genotip. No obstant, les dificultats ètiques i econòmiques que això comporta fan difícil atendre totes aquestes opcions.

La diferència de pH inter-individual podria explicar part de l'heterogeneïtat en l'expressió clínica dels individus malalts portadors de la mutació N370S. Entre aquests n'hi ha que presenten algunes o totes les manifestacions de la GD1 (viscerals, hematològiques i esquelètiques) i, en canvi, altres són asimptomàtics tota la vida.

1.5. La teràpia amb XP com a teràpia addicional

Ja s'ha comentat que l'ERT és el tractament més utilitzat degut a l'eficàcia que presenta per tractar malalts Gaucher de tipus 1. D'altra banda, la rapidesa i el grau de resposta a la teràpia poden variar a causa de diversos factors, incloent l'edat d'aparició dels símptomes, els òrgans afectats, l'abast de les manifestacions i la presència de patologia irreversible (com fibrosis de fetge, de melsa i de pulmó i osteonecrosi). Així, les manifestacions hematològiques i visceral, en general, responen amb més rapidesa al tractament que les pulmonars i les òssies. En alguns casos, per tal d'assolir els objectius terapèutics, és necessari augmentar la dosi d'enzim recombinant (Pastores *et al.* 2004). Però, la quantitat de dosi administrada via intravenosa no és la mateixa que la que arriba als òrgans. Una part de l'enzim recombinant es desnatura a causa del pH neutre de la sang (Xu *et al.* 1996). Per tant, en aquest escenari, la XF podria contribuir a augmentar l'estabilitat i el transport lisosomal, tant de l'enzim endogen com el del recombinant (exogen) (Benjamin *et al.* 2012). De fet, s'ha descrit que la pre-incubació en sèrum de la IFG amb l'enzim recombinant augmenta l'estabilitat d'aquest en presència de condicions desnaturants com a pH neutre o a la desnaturació tèrmica (Sun *et al.* 2012). A més, l'ERT implica una gran despesa econòmica (el cos mitjà pel tractament d'un pacient adult és de l'ordre de 200.000 dòlars/any) i la segona teràpia d'elecció, la SRT, no redueix significativament aquests costos. Per tant, la teràpia amb XF juntament amb l'ERT ofereix tant la possibilitat d'augmentar l'eficàcia de l'enzim recombinant i millorant el plegament de l'endogen mutat (Figura 22), com la de disminuir la dosi, la freqüència i els costos de l'ERT.

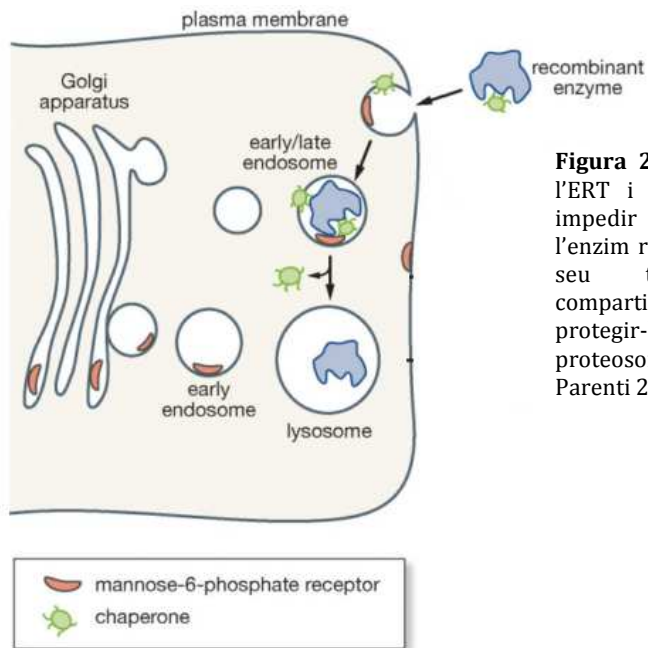


Figura 22. Efecte sinèrgic entre l'ERT i les XF. Les XF poden impedir la desnaturalització de l'enzim recombinant, potenciar el seu transport cap al compartiment lisosomal i protegir-lo de la degradació proteosomal. Figura extreta de Parenti 2009.

2. MODELS

Molts dels coneixements actuals sobre els mecanismes subjacents a les malalties genètiques humanes, però també els processos cel·lulars normals els han proporcionat l'ús de models.

2.1. Les diferents opcions pel modelatge de malalties

La utilització de cèl·lules immortals ha estat la principal font en l'elaboració de models cel·lulars. D'altra banda, la majoria de les línies cel·lulars humanes que s'utilitzen avui en dia porten artefactes genètics i epigenètics, per tal de poder ser utilitzades en cultiu. A més, deriven de teixits malignes o es modifiquen genèticament per impulsar el creixement immortal (Grimm 2004), ja que molt sovint són necessàries grans quantitats de material biològic per realitzar els estudis experimentals. A banda d'això, a vegades les línies cel·lulars disponibles no són específicament del mateix teixit que es vol estudiar, cosa que dificulta l'anàlisi. Per altra banda, les cèl·lules humanes provinents de cultius primaris tenen una vida útil limitada en cultiu i dificulta la investigació.

Els sistemes biològics que permeten un anàlisi de tot l'organisme es consideren més informatius que els enfocaments *in vitro*. Els ratolins s'han convertit en el model animal per excel·lència a ser manipulat genèticament, ja que comparteixen el 82% d'identitat nucleotídica amb els humans i, els costos subjacents i els consentiments ètics són menors que si s'utilitzés el primat, l'ordre filogènicament més semblant a l'espècie humana. No obstant i això, pel fet de ser espècies diferents, divergeixen en característiques tals com les bioquímiques, fisiològiques i anatòmiques. Subjacent a aquestes diferències és el fet que l'arquitectura de la regulació genètica en ambdues espècies ha anat divergint considerablement al llarg del temps (Odom *et al.* 2007). Això es fa palès en el fet que moltes vegades el model de ratolí, creat per modelitzar una malaltia humana, no reproduïx exactament el fenotip humà esperat. Pel que respecte a la GD es va observar que la generació del ratolí *knockout* complert pel gen *GBA1* presentava letalitat neonatal (Tybulewicz *et al.* 1992), i no s'ha pogut utilitzar per estudiar exhaustivament la malaltia. L'elaboració de models murins basats en diferents mutacions puntuals humanes en el gen *GBA1* va solucionar considerablement la letalitat primerenca. D'altra banda, la majoria dels models generats mitjançant aquesta filosofia, inclús quan presentaven activitats enzimàtiques semblants a la GD humana, no l'imitaven completament, ja que l'acumulació de GlcCer en els diferents òrgans i la presència de cèl·lules Gaucher no sempre era evident (Liu *et al.* 1998; Mizukami *et al.* 2002; Xu *et al.* 2003). Òbviament, les dues espècies també difereixen en l'eficàcia terapèutica de moltes drogues (Perel *et al.* 2007). Sense anar més lluny, ja s'ha comentat el cas de la IFG, una XF amb un gran potencial. Però, encara que s'havien

obtingut resultats satisfactoris en ratolins (Khanna *et al.* 2010), va tenir escassa milloria en els pacients de l'assaig clínic de fase II, i per aquest motiu no va passar a la fase III. Tot això fa que, de vegades, els models animals no siguin del tot adequats per investigar algunes malalties.

Amb l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC) el 1988 (Gearhart 1998) es va obrir una nova opció en el modelatge de malalties. Les hESC són cèl·lules immortals pluripotents i per tant potencialment són capaces de generar qualsevol tipus cel·lular. Per tant, si produïm la mutació desitjada en aquestes hESC, podem estudiar la patologia i l'eficàcia de les drogues en diferents tipus de cèl·lules humanes diferenciades (ja sigui en neurones, osteoblasts, mioblasts, condrocits, adipòcits, etc). Però, la necessitat de l'ús d'embrions per obtenir-les comporta una gran preocupació ètica. La generació de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) el 2007 per Yamanaka i col·laboradors (Takahashi *et al.* 2007) va permetre reprogramar cèl·lules somàtiques humanes adultes cap a un estat pluripotent. Així, igual com passava amb les ESC, les iPSC són capaces de diferenciar-se a qualsevol tipus cel·lular. Les malalties monogèniques que afecten determinats tipus cel·lulars que de manera eficient es poden derivar de les iPSC, són les millors candidates per aquest enfocament (Onder i Daley 2012). Ja s'ha comentat que la majoria de les LSD són trastorns monogènics, i els mecanismes implicats en la iniciació o progressió de la seva patogènia són, en la majoria de casos, poc coneguts. A més, la manca d'un tractament econòmic i eficaç fa indispensable la cerca de teràpies més adients. Tot això fa que les LSD siguin unes bones candidates a ser modelades mitjançant iPSCs .

2.1.1. Les iPSC per la malaltia de Gaucher

La GD ha estat ja modelada per diversos grups d'investigació. La majoria d'ells han focalitzat els esforços per generar macròfags a partir d'iPSC derivades de cèl·lules somàtiques de pacients Gaucher tipus 1, 2 i 3, per tal de determinar si els macròfags de la GD són anormalment activats i/o si els defectes funcionals que presenten es poden revertir, mitjanant la intervenció farmacològica (Panicker *et al.* 2014; Tiscornia *et al.* 2013) . D'altres han optat per la generació de neurones, les quals han esdevingut, també, un destí per a l'estudi de la neuropatologia present en la GD2 i la GD3, l'ús de possibles tractaments (Sun *et al.* 2015; Tiscornia *et al.* 2013) i l'avaluació dels mecanismes de la GD que poden influir en el desenvolupament de la PD (Mazzulli *et al.* 2011; Schöndorf *et al.* 2014).

Però, fins el moment encara no hi ha estudis publicats sobre l'ús de les iPSC en la generació de cèl·lules òssies, que ens ajudarien a entendre algunes de les manifestacions presents en el 90% dels malalts Gaucher i, en particular, en els GD1. Entendre adequadament els mecanismes que tenen lloc en la patologia òssia, la qual condiciona significativament la vida dels pacients (Giraldo 2005), seria de

gran utilitat a l'hora de cercar tractaments més econòmics i eficaços que els que existeixen actualment i/o noves dianes terapèutiques.

2.2. Generació d'un model mesenquimal i osteoblàstic per a la GD

Gran part de la patologia de la GD s'ha atribuït a la presència de les cèl·lules Gaucher. D'altra banda, les manifestacions òssies només poden ser explicades parcialment per la infiltració de les cèl·lules Gaucher en el moll de l'os. La subseqüent resposta inflamatòria pot produir un desequilibri en el remodelat ossi. Estudis independents han trobat resultats contradictoris analitzant els marcadors del metabolisme ossi (Dussen *et al.* 2011). Però, globalment, els marcadors de formació d'os tendeixen a ser normals o disminuïts, mentre que els marcadors de resorció òssia són normals o augmentats. Aquests descobriments són compatibles amb els resultats experimentals observats en la generació de diversos models. Alguns d'ells suggerien que en la GD hi ha una disfunció en el llinatge osteoblàstic, tant a nivell de les MSC (Campeau *et al.* 2009; Lecourt *et al.* 2012) com a nivell dels osteoblasts (Mistry *et al.* 2010, 2014; Mucci *et al.* 2012, 2013). D'altra banda, també s'ha demostrat una disfunció en la funció osteoclàstica (Mucci *et al.* 2012, 2013; Reed *et al.* 2013).

Per intentar descobrir què passa exactament en la patofisiologia òssia, vam creure oportú l'elaboració d'un model cel·lular osteoblàstic de la GD, mitjançant l'ús de les iPSC. Per una banda, els osteoblasts són cèl·lules difícils d'adquirir i obtenir-los a partir de MSC adultes d'un pacient GD seria una opció. No obstant, les MSC adultes normalment s'obtenen de la medul·la òssia o del greix, però per l'adquisició d'aquestes no només es requereixen procediments invasius i dolorosos sinó que, també, són reservoris en els que aquestes cèl·lules es troben en baixa freqüència: entre 0,001%-0,01% de les cèl·lules del moll de l'os i un 0,05% de les cèl·lules espirades en la liposucció (Pittenger *et al.* 1999). Així, l'ús de les iPSC confereix l'avantatge de proporcionar-nos una font inesgotable de MSC sense necessitat de recórrer a procediments invasius i, a més, ens permet estudiar l'afectació intrínseca de l'activitat deficient de l'enzim GBA1 en osteoblasts, sense la implicació de les cèl·lules Gaucher ni el sistema immunitari.

Diversos grups han derivat amb èxit iPSC a MSC utilitzant una gran varietat de mètodes. La diferència més important en les estratègies emprades és que algunes d'elles impliquen la formació de cossos embrionics (EBs) i d'altres no. Els EBs són agregats tridimensionals d'IPSC que permeten la generació de cèl·lules de les tres capes germinals. En el nostre treball hem optat passar per l'estadi d'EBs, els quals es cultiven en suspensió durant uns tres dies i es plaquegen en plaques recobertes amb gelatina o matrigel, per la generació de les MSC que comencen a sorgir pocs dies després al voltant de cada EB. Subseqüentment, es realitzen tres rondes de subcultius, per tal d'eliminar progressivament la part pluripotent (els EBs) i anar

seleccionant aquelles cèl·lules amb aparença de MSC. Després d'aquesta derivació, les cèl·lules es validen (veure més avall) i es congelen, considerant passe 0 a tots els vials congelats en aquell moment. En aquest punt, alguns autors han optat per enriquir les MSC seleccionant-les per citometria de flux (FACS). En aquest treball, per la diferenciació de les MSC cap a osteoblasts, s'ha partit de les alíquotes congelades a passe 0 obtingudes en el final del procés de derivació mesenquimal, les quals s'amplifiquen per tenir més quantitat de material biològic (fins a passe 3 o 4), abans de començar la diferenciació.

2.2.1. Validació de les MSC

L'any 2006, la Societat Internacional de Teràpia Cel·lular va recomanar una sèrie de criteris mínims (característiques fenotípiques i funcionals) que han de complir les MSC, per poder ser considerades com a tals. Primerament, han de poder adherir-se a la superfície del plàstic quan es mantenen en condicions de cultiu estàndard. Segon, han d'expressar els marcadors de superfície (CD; *cluster of differentiation*) CD73, CD90 i CD105 específics de les MSC i en canvi han de ser negatives per altres marcadors del llinatge hematopoètic, incloent els receptors de lipopolisacàrids CD14 i/o CD34 i l'antigen comú leucocitari, el CD45. Per últim, han de ser capaces de diferenciar-se *in vitro* a condrocits, osteoblasts i adipòcits (Dominici *et al.* 2006).

En aquest sentit es va creure necessari avaluar si les MSC generades mitjançant les iPSC complien els criteris anteriors. Es van avaluar cada un d'aquests, excepte el de la capacitat de diferenciació als 3 llinatges mesodèrmics. D'aquesta manera, es va demostrar que totes les MSC generades a partir de les iPSC amb els diferents genotips (WT, N370S/N370S, G202R/L444P i N370S/84GG) eren capaces d'adherir-se a la superfície del plàstic, sense necessitat de cap matriu sintètica. Pel que fa a l'expressió dels marcadors de superfície, tots els genotips de la GD van resultar ser positius per aquells específics de les MSC (CD90, CD75 i CD105), i negatius pels marcadors emprats de llinatge hematopoètic (CD34 i el CD35). D'altra banda, pel que fa a les MSC WT, aquestes no van mostrar el patró esperat, ja que només un 8% de les cèl·lules en cultiu eren positives pel marcador CD105 i un 53% pel CD73. A més, per contra, hi havia un percentatge massa gran, un 32%, de cèl·lules positives pel marcador hematopoètic CD34 (aquests resultats no figuren en el manuscrit en preparació). Així doncs, com que gran part de les cèl·lules del cultiu WT no expressaven els marcadors de superfície desitjats, subseqüentment es va decidir intentar enriquir per FACS la població cel·lular que expressaven els marcadors requerits. Però, es va obtenir una quantitat cel·lular massa petita per a la seva expansió.

D'altra banda, la metodologia emprada en la diferenciació de les iPSC cap a llinatge MSC és correcta, ja que dels 4 genotips (3 de la GD i 1 WT), només el WT no es va diferenciar correctament a destí mesenquimal. Creiem que durant la derivació hi va haver una eliminació incompleta de la part pluripotenta (els EBs) i es va intentar iniciar-la altra vegada a partir de noves iPSC, però els experiments es van haver d'aturar a causa de diverses contaminacions amb micoplasma. (Val a dir que s'estan realitzant periòdicament proves per detectar-ne i seguint protocols específics de neteja per prevenir-ne l'aparició. Tot el material emprat en aquesta tesi ha passat un control estricte, a fi de detectar qualsevol tipus de contaminació, la qual podria produir variacions en els resultats obtinguts). Solucionada aquesta contaminació, no es disposava de temps suficient per tornar a iniciar la derivació mesenquimal (es requereixen uns 3 mesos). Per solucionar aquest problema, el grup del Dr. Angel Raya, amb qui col·laborem en aquest projecte, ens va facilitar una al·lquota de cèl·lules MSC WT, que havia estat diferenciada a partir d'iPSC WT (obtingudes per re-diferenciació de queratinòcits), per poder iniciar els experiments de diferenciació osteoblàstica. A partir d'aquest moment quan s'esmentin les cèl·lules MSC WT serà en referència a aquestes últimes, sempre i quan no s'especifiqui el contrari.

2.2.2. Consideracions dels factors que poden influir en la diferenciació osetoblàstica i la metodologia emprada

2.2.2.1. Morfologia de les cèl·lules mesenquimals

La morfologia de les MSC és semblant a la dels fibroblasts, però sovint, molts autors han comentat el fet de trobar dos subtipus de morfologies diferents en les MSC adultes, inclús en el mateix cultiu; unes en forma de fus i petites i les altres aplanades i grans (Neuhuber *et al.* 2008). En treballs anteriors, van anomenar a les cèl·lules grans i aplanades com a cèl·lules de tipus II, les quals presentaven una baixa taxa de propagació. En canvi les que eren petites i en forma de fus se les va anomenar cèl·lules de tipus I i, a diferència de les de tipus II, eren molt proliferatives (Mets i Verdonk 1981). Les de tipus II se les va considerar cèl·lules madures amb divisió lenta, ja que estan en fase estacionaria i predominen en aquells cultius que s'acosten a la senescència (Colter *et al.* 2000; Digirolamo *et al.* 1999). Tot i així, s'ha observat que les cèl·lules amb morfologia de tipus II retenien la seva habilitat de diferenciar-se cap a osteoblasts, en canvi no conservaven la de diferenciar-se cap a adipòcits (Colter *et al.* 2000; Digirolamo *et al.* 1999).

En el nostre estudi es va observar que les MSC amb genotip N370S/N370S presentaven una morfologia corresponent a la de tipus I, en canvi, les MSC amb genotips G202R/L444P i N370S/84GG tenien una forma més aplanada i gran, corresponent a la de tipus II (Figura 23). A més, aquestes últimes presentaven baixa proliferació i això va impedir la seva amplificació, requerida per l'obtenció de

suficient material biològic pels experiments posteriors de diferenciació osteoblàstica. Es desconeix el motiu pel qual els genotips G202R/L444P i el N370S/84GG presentaven aquest tipus de senescència prematura.

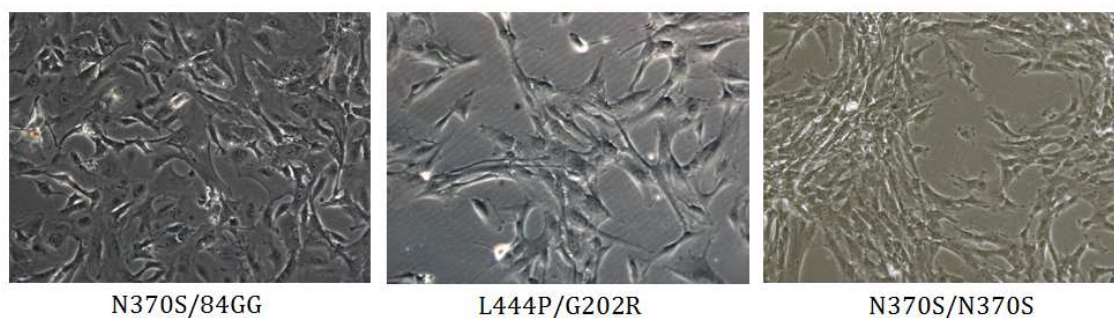


Figura 23. Aspecte morfològic de les MSC amb els tres genotips de la GD, totes a passe 1. Es pot apreciar que tant el genotip N370S/84GG com el L444P/G202R són més grans i aplanades que les N370S homozigòtiques.

En les MSC adultes l'edat del donant produeix efectes intrínsecs en la qualitat d'aquestes. En altres treballs, s'ha observat que les MSC provinents d'un pacient amb edat avançada tenien menor capacitat de proliferació i de diferenciació osteoblàstica, amb un major nombre de cèl·lules senescentes i apoptòtiques en el cultiu (Stolzing *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2008). No obstant, en aquest treball s'han generat MSC a partir d'iPSC, les quals tenen característiques semblants a les hESC, per tant l'edat del pacient no hauria de suposar un problema.

Mitjançant l'anàlisi del cicle cel·lular (Figura 24) es va demostrar que les MSC amb genotip N370S/84GG presentaven una aturada evident en la fase G1/G0 del cicle cel·lular, amb una dràstica disminució de cèl·lules en fase G2/M. Aquest fet podria confirmar la presència de senescència cel·lular en aquest cultiu. D'altra banda, l'altre genotip Gaucher, el N370S/N370S, analitzat per aquest mètode presentava també una petita aturada en G1/G0 respecte al WT. Això va sorprendre pel fet que en l'anàlisi morfològic no s'hi observaven evidències (almenys a passe 1) de cèl·lules senescentes, ja que tenien una morfologia de tipus I amb bona taxa de proliferació.

D'altra banda, tots els resultats obtinguts (inclòs aquest) en els experiments amb les cèl·lules WT s'han realitzat a passe 7-8, en canvi el número de passes emprats en els experiments amb les MSC amb genotip N370S/N370S han estat 3-4. A fi de minimitzar les variables, es va intentar que aquestes últimes arribessin a passes propers a les MSC WT, però després de provar-ho nombroses vegades, aquestes cèl·lules començaven a perdre la capacitat de dividir-se entre els passes 5-6 i, conseqüentment apareixien les cèl·lules de tipus II. Pel que fa a les MSC WT, a passes majors a 9 els passava exactament el mateix. Així el resultat del cicle cel·lular podria il·lustrar el fet que les cèl·lules ja estan entrant en un procés de parada. També podria ser que la GD expliqués part de l'aturada en fase G1/G0, ja

que la senescència no és l'únic factor que produeix l'aturada (Kuilman *et al.* 2010). S'està replicant l'experiment per poder avaluar estadísticament l'efecte de la GD en el cicle cel·lular.

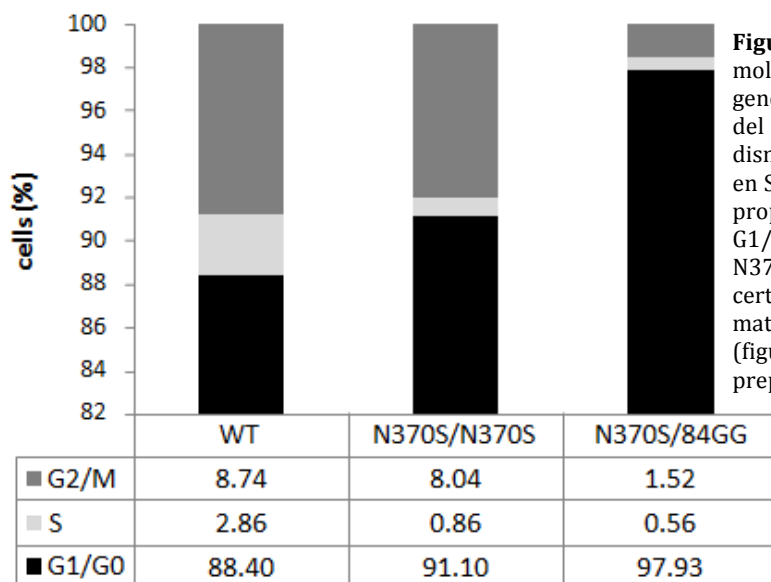


Figura 24. S'observa una parada molt evident en les MSC amb genotip N370S/84GG en fase G1/G0 del cicle cel·lular, pel fet que disminueix la proporció de cèl·lules en S i en fase G2/M i s'incrementa la proporció de cèl·lules en fase G1/G0. En el cas del genotip N370S/N370S també s'observa certa aturada del cicle cel·lular en la mateixa fase respecte les MSC WT (figura no inclosa en el manuscrit en preparació)

2.2.2.2. Confluència de les MSC en cultiu

Alguns autors van observar que en cultius de MSC adultes les cèl·lules de tipus II augmentaven, si el cultiu es mantenia durant molt temps amb confluència i/o al llarg de la realització successiva de subcultius (Neuhuber *et al.* 2008). Sembla ser que hi ha una transició entre les cèl·lules de tipus I i les de tipus II (Colter *et al.* 2000), a causa del contacte cèl·lula a cèl·lula o per l'exposició de factors paracrins o autocrins en el medi de cultiu (Neuhuber *et al.* 2008).

En el nostre estudi s'ha observat que controlar la confluència del cultiu de les MSC, tant la utilitzada durant l'expansió d'aquestes com la utilitzada per començar el procés de diferenciació, era clau per obtenir una bona taxa de proliferació. Vam determinar que el cultiu s'havia de dividir quan arribava a una confluència d'aproximadament un 80-90%. Practicar el passe abans o després d'aquesta podia significar la pèrdua de les propietats de proliferació del cultiu, amb la transició de les cèl·lules cap a tipus II i, per tant, la subseqüent entrada en senescència o fase estacionari. A més, la dilució emprada en la divisió havia de ser de com a màxim 1:3. D'aquesta manera, per totes les dificultats que comportava el cultiu de les MSC, es va intentar optimitzar les condicions d'aquest: en primer lloc, per tal de disminuir l'agressivitat de la peptidasa tripsina (Try), emprada per desadherir les cèl·lules de la superfície de la placa en el moment de la realització dels subcultius, es va utilitzar una Try 5 vegades més diluïda (Try 0,05) que la que s'utilitzava

habitualment (Try 0,25), ja que aquesta última produïa molts agregats cel·lulars; en segon lloc, en el període d'expansió de les MSC per obtenir grans quantitats de material biològic pels experiments, aquestes es van plaquejar amb plaques recobertes amb gelatina. Encara que totes les MSC eren capaces d'adherir-se a la superfície de la placa sense necessitat de cap tractament específic, aquestes es dispersaven de forma més homogènia i en monocapa quan s'utilitzava aquest material. Sense la gelatina les MSC tenien tendència a agrupar-se en petits clústers, i l'obtenció d'un cultiu amb monocapa era més difícil. Però, per tal que aquesta no interferís en el procés de diferenciació cap a llinatge osteoblàstic, no es va utilitzar a l'hora de plaquejar les cèl·lules per aquest fi.

2.2.2.3. Composició del medi de diferenciació

La composició del medi emprat en la diferenciació osteoblàstica és un factor clau per una correcta diferenciació. El medi utilitzat habitualment en la diferenciació de les MSC cap a osteoblasts conté dexametasona (Dex), àcid ascòrbic (Asc) i β -glicerofosfat (β -Gly) i cada un d'ells té un efecte fisiològic diferent en aquesta diferenciació (comentats més avall). D'altra banda, no hi ha una concentració estandarditzada per a cada un d'aquests components i, a més, alguns autors els han utilitzat amb l'addició de vitamina D3, el factor de creixement transformant β (TGF- β) i les proteïnes morfogèniques òssies (BMPs) (revisat a Vater *et al.* 2011).

Dexametasona

La Dex és un glucocorticoide sintètic que s'utilitza com a antiinflamatori en patologies reumàtiques i cutànies, entre altres, i s'ha documentat que és un component essencial per la diferenciació de les MSC cap a osteo-progenitors (Herbertson *et al.* 1995; Leboy *et al.* 1991). Sembla ser que indueix la diferenciació osteogènica de les MSC mitjançant diversos mecanismes (Figura 25): 1) augmentant la transcripció de FHL-2, la qual s'uneix a la β -catenina i potencia el transport d'aquesta cap al nucli, on s'uneix a TCF/LEF-1 i activa la transcripció de *RUNX2*. 2) contribuint a la diferenciació osteogènica mitjançant l'augment de l'expressió del co-activador de *RUNX2*, TAZ (Hong *et al.* 2009). 3) induint l'expressió del gen que codifica la fosfatasa MKP-1 que desfosforila la serina 125 de *RUNX2* i n'augmenta la seva activació (Phillips *et al.* 2006). D'altra banda, s'ha documentat que hi ha diversos factors tals com la matriu extracel·lular (ECM) o el fosfat inorgànic extracel·lular, que poden iniciar l'activació de la via de les cinases que responen a factors extracel·lulars (ERK; *extracellular related kinase*), les quals fosforilen un residu de serina diferent al 125 de *RUNX2* i l'activen (Renny *et al.* 2003; Phillips *et al.* 2006). Això demostra que en resposta a Dex o altres estímuls canvia el patró de fosforilació en *RUNX2* i també la seva activitat. El factor de transcripció *RUNX2* es va identificar com a Cbfa1 (core-binding factor a-1, però és coneguda com a *RUNX2*) (Ducy *et al.* 1997; Hoshi *et al.* 1999; Komori *et al.* 1997).

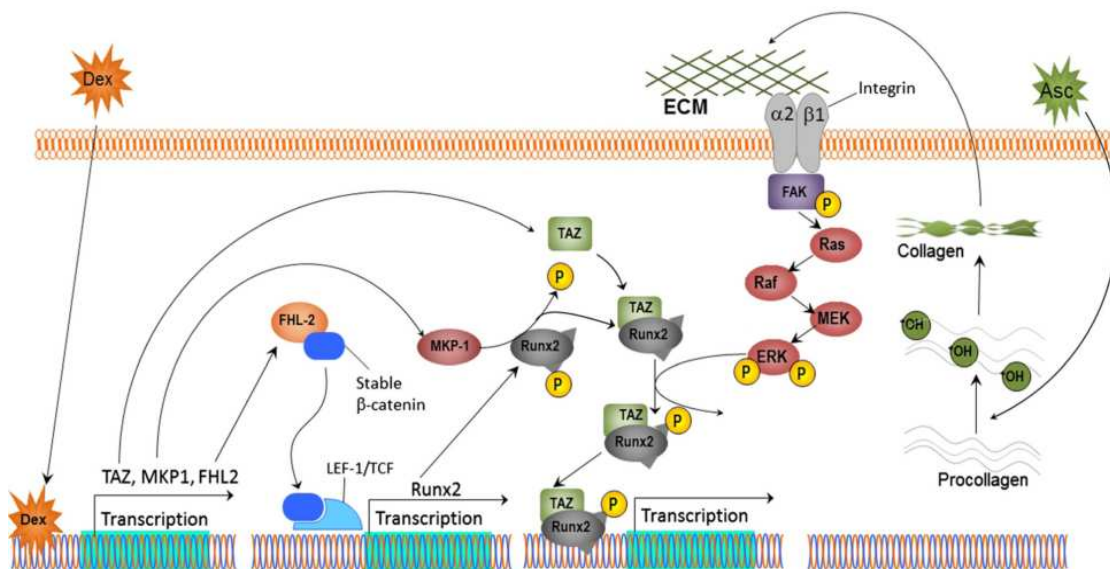


Figura 25. El paper de la Dex i de l'Asc en la diferenciació osteoblàstica. Es mostra com la Dex activa el factor de transcripció RUNX2, mitjançant l'augment de la transcripció de TAZ, MKP1 i FHL2. A més, l'Asc permet la hidròlisi del pro-col·lagen i subseqüentment s'allibera Col1 en l'ECM. Les cèl·lules s'uneixen a l'ECM mitjançant Col1 i les integrines $\alpha2\beta$ que activa les cinases, les quals podran fosforil·lar i activar a RUNX2. Figura extreta de Langenbach *et al* 2013.

Des de que el 1985 es va demostrar que la concentració òptima de Dex emprada en l'osteogènesi de cèl·lules de periosti de pollet era de 100nM (Tenenbaum i Heersche 1985), aquesta concentració s'ha utilitzat en molts treballs. En un estudi realitzat per Walsh i col·laboradors, van documentar que una concentració de 10nM és la concentració òptima per la formació del nòdul de mineralització (Walsh *et al.* 2001). En una revisió de Seong i col·laboradors es va assenyalar que les dues concentracions s'han utilitzat en freqüències similars en diversos treballs (Seong *et al.* 2010). Recentment, s'ha observat que el tractament transitori de Dex a 100nM, durant una setmana, redueix les variacions inter i intra-individuals en la diferenciació osteoblàstica de les MSC provinents de la medul·la òssia (Alm *et al.* 2012). A més, es va documentar que la Dex inhibeix l'apoptosi de les MSC en cultius confluents (Song *et al.* 2009) i promou la proliferació de les MSC (H. Wang *et al.* 2012). En consonància amb aquestes dues últimes premisses, es va observar que durant la primera setmana de diferenciació les MSC augmentaven considerablement en número i, a més, en aquells cultius que s'havia iniciat la diferenciació quan presentaven una confluència adequada, arribaven també a una bona confluència al finalitzar el procés. En canvi, quan la confluència inicial era bastant inferior a la desitjada, s'observava que durant el transcurs de la diferenciació bona part de les cèl·lules del cultiu entraven en apoptosi.

Àcid ascòrbic

El paper de l'Asc en la diferenciació osteoblàstica és principalment la de contribuir en la secreció del col·lagen de tipus 1 (COL1) a la matriu extracel·lular (ECM) (Figura 25). L'Asc és un co-factor dels enzims que hidrolitzen la prolina i la lisina

del pro-col·lagen. En absència d'Asc, la prolina no es pot hidrolitzar i les cadenes de col·lagen no són capaces de formar estructures helicoïdals (Franceschi *et al.* 1992). A més, el COL1 és un component imprescindible perquè la diferenciació tingui lloc (Kundu *et al.* 2009). De fet, sembla ser, que els osteoblasts perquè es puguin diferenciar s'han d'unir a l'ECM a través de COL1 i les integrines $\alpha 2\beta$. La unió amb aquestes últimes activa una cascada de cinases que acaben fosforilant i activant a RUNX2 (fosforilació comentada en l'anterior apartat) (Xiao *et al.* 2002). S'ha determinat que una concentració de 50 μ M d'àcid ascòrbic 2-fosfat, un anàleg més estable que l'Asc, és l'òptima per a la diferenciació osteoblàstica de les MSC provinents de medul·la òssia (Jaiswal *et al.* 1997). De fet, el contacte entre les cèl·lules i l'ECM, sense l'adició de Dex, Asc i β -Gly, pot ser suficient perquè esdevingui una diferenciació osteogènica espontània (revisat a Langenbach *et al.* 2013).

β -glicerofosfat

El β -Gly funciona com una font de fosfat en la formació dels cristalls d'hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que es dipositen entre les fibres de col·lagen de l'ECM. L'associació entre la hidroxiapatita i les fibres de col·lagen és la responsable de la duresa i la resistència de l'os. Normalment, en la diferenciació de les MSC se n'utilitza una concentració entre 5-10mM (revisat a Vater *et al.* 2011).

2.2.2.4. Epigenètica

Hi ha diversos treballs que estudien l'epigenètica de les cèl·lules iPS. S'ha documentat que les cèl·lules iPS a pocs passes tenen memòria transcripcional de les cèl·lules somàtiques d'origen, degut a que presenten els promotors dels gens que eren actius en les cèl·lules originals incompletament metilats i, per aquest motiu, tenen tendència a diferenciar-se cap al tipus cel·lular del qual provenen (Ohi *et al.* 2011). També, cal esmentar que alguns grups han observat que depenent de l'origen cel·lular de les iPS, aquestes poden variar en la capacitat de diferenciació cap a un tipus cel·lular determinat (Kajiwara *et al.* 2012; Liu *et al.* 2011). D'altra banda, un estudi recent va demostrar que les diferències observades en la capacitat de diferenciació cap a condrocits i/o osteoblasts de diferents iPSC, s'explicaven per l'existència de diferències clonals en les propietats epigenètiques i transcripcionals, independentment del tipus cel·lular del qual deriven. Això fa que cada clon d'iPSC difereixi en la capacitat de diferenciar-se cap a diferents llinatges (Nasu *et al.* 2013). D'aquesta manera, respecte al present estudi, el fet de partir d'iPSC que provenen de diferents tipus cel·lulars (queratinòcits o fibroblasts) no afegeix variabilitat a la inherent als diferents clons d'iPSC.

2.2.3. Avaluació del procés de diferenciació osteoblàstic

En aquest treball només s'ha portat a terme la diferenciació osteoblàstica a partir de les MSC WT i les Gaucher amb genotip N370S/N370S. Per tant, quan s'esmenta MSC GD es refereix a aquest últim genotip.

La utilització combinada d'enfocaments moleculars, bioquímics, histoquímics i estructurals permet la identificació dels estadis de desenvolupament del llinatge osteoblàstic (MSC, pre-osteoblast, osteoblast, osteòcit), així com la seva capacitat en la formació, maduració i mineralització de l'ECM (Figura 26).

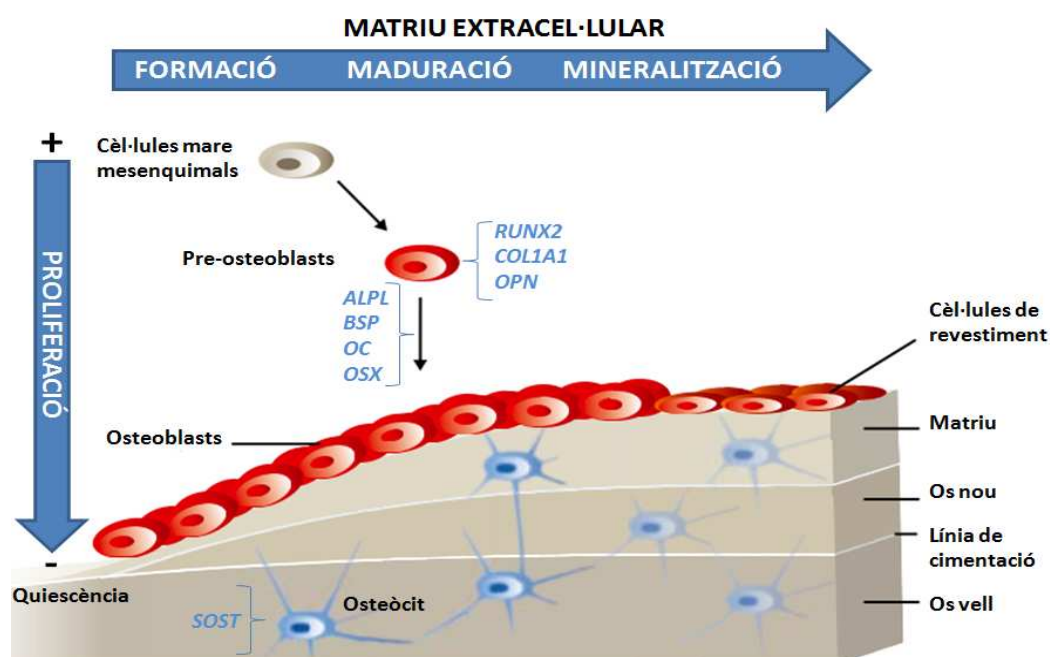


Figura 26. Esquema de les etapes del procés de mineralització de la matriu extracel·lular (ECM): formació, maduració i mineralització acompanyada d'un descens de la proliferació cel·lular, que s'explica per la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) cap a un estadi osteoblàstic i més tard cap a osteòcit (estadi quiescent).

A nivell molecular, la diferenciació osteogènica de les MSC està controlada per les interaccions entre les diferents hormones i factors de transcripció. El factor de transcripció RUNX2 i les proteïnes morfogèniques òssies (BMPs) constitueixen els reguladors més potents de la diferenciació osteoblàstica a partir de les MSC (Yamaguchi *et al.* 2000). A mesura que les cèl·lules precursors es van diferenciant, expressen a la membrana cel·lular proteïnes específiques o marcadors. L'expressió de RUNX2 és la primera evidència de la diferenciació osteogènica (Yamaguchi *et al.* 2000) la qual arriba al seu màxim nivell d'expressió en l'estadi pre-osteoblast. Els gens COL1A1 (gen que codifica dues de les tres cadenes del col·lagen de tipus 1) i OPN també s'expressen de forma primerenca en les cèl·lules osteoprogenitores. Igualment, la fosfatasa alcalina (ALPL), la sialoproteïna òssia (BSP) i l'osteocalcina (OC) són marcadors de diferenciació del pre-osteoblast a osteoblast i apareixen

quan s'inicia la mineralització. En la mateixa línia, osterix (OSX) regula la diferenciació del pre-osteoblast a l'osteoblast madur (Koga *et al.* 2005; Nakashima *et al.* 2002) i activa l'expressió de la proteïna esclerostina (codificada pel gen *SOST*) (Yang *et al.* 2010), la qual és un marcador de l'estadi d'osteòcit. D'aquesta manera, l'expressió de *BSP*, *OC*, *OSX* i *SOST* resulta especialment útil per avaluar els estadis finals de la diferenciació osteoblàstica i, en canvi, *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1* i *OPN* ho són pels estadis inicials (Figura 26).

A fi de detectar alguna alteració intrínseca de les MSC GD en el procés de diferenciació osteoblàstica, s'han escollit els gens: *RUNX2*, *ALP*, *OSTERIX* i *SOST* com a representants de cada un dels estadis de desenvolupament osteoblàstic (MSC, pre-osteoblast, osteoblast, osteòcit) i, mitjançant la tècnica de qRT-PCR, s'analitzen els seus nivells d'expressió en les MSC (dia 0) i als dies 7, 14, 21 del procés de diferenciació osteoblàstica, tant en el model WT com en el model GD. Fins el moment només es disposa de l'expressió relativa del gen *ALPL*, en el que s'evidència una baixa expressió a dia 0 tant en el genotip GD com en el WT. No obstant, a dia 7 es va observar un increment significatiu de l'expressió relativa d'*ALPL*, la qual disminueix a dia 14, mantenint el mateix nivell d'expressió a dia 21. Estudis anteriors indiquen que l'augment de l'expressió d'aquest enzim és aparentment necessari just abans de l'aparició de la mineralització de l'ECM, la qual proporciona el fòsfor inorgànic per a que tingui lloc la formació dels cristalls d'hidroxiapatita i després la seva expressió decreix. A més, és un indicador de l'aturada de l'estat de proliferació del cultiu ja que arriba a l'estadi osteoblàstic responsable de la maduració de l'ECM. De fet, la detecció histoquímica de l'*ALPL* es considera un dels primers marcadors fenotípics del llinatge osteoblàstic (Lian *et al.* 1995) la qual en aquest treball es va evidenciar a partir del dia 7, tant en la diferenciació de les cèl·lules WT com la de les cèl·lules GD.

El període de proliferació és fonamental pel desenvolupament del fenotip de les cèl·lules òssies i l'expressió de diversos gens associats a la formació de la matriu extracel·lular, com el *COL1A1* i l'*ALPL*. Després, durant el període de post-proliferació, la matriu extracel·lular sofreix una sèrie de modificacions en la composició o organització que potencia la seva mineralització.

Els agregats o nòduls de mineralització d'hidroxiapatita poden ser tenyits mitjançant la tinció amb vermell d'alizarina (pel calci) i/o von Kossa (pel fòsfor). Utilitzant aquestes tincions, s'ha observat que tant en la condició WT com en la GD la mineralització de l'ECM es feia evident a partir del dia 14. El descens en els nivells de mRNA d'*ALPL* entre el dia 7 i 14 ja indicava que durant aquest període havia tingut lloc la maduració de l'ECM i l'inici de la seva mineralització.

Pel que fa a les diferències entre el genotip GD i el WT s'ha evidenciat que, en nombroses ocasions, la matriu produïda per les MSC GD estava més mineralitzada

que la produïda per les MSC WT. Igualment, respecte als nivells d'expressió relativa de l'*ALPL* eren majors en el genotip GD que en el WT. Aquests resultats han sorprès, ja que alguns estudis documentats han trobat justament el contrari. Per exemple, Mistry i col·laboradors, mitjançant el model de ratolí de la GD1 (comentat en nombroses ocasions a la introducció) van confirmar que hi havia una reducció de l'expressió del gen *ALPL* però també *BSP*, *RUNX2* i *OSX*, confirmant un problema en la diferenciació osteoblàstica en la GD (Mistry *et al.* 2010). D'altra banda, altres autors tampoc van detectar diferències en els nivells d'expressió d'*OSX* ni de *RUNX2* entre MSC WT i MSC tractades amb CBE, simulant la condició GD (Lecourt *et al.* 2012). En aquest treball manquen els resultats de l'expressió relativa dels altres gens comentats per extreure'n conclusions.

Es creu que el fet de partir de MSC WT en major nombre de passes (entre 7 i 8) que les MSC GD (entre 3 i 4) pot afectar a la capacitat de diferenciació osteoblàstica. S'ha documentat que el número de passes afecta l'activitat de l'enzim *ALPL* i la subseqüent capacitat de mineralització de l'ECM (Coelho *et al.* 2000). Aquesta observació suggereix que, tal i com hem anat comentat en apartats anteriors, de la realització de subcultius en resulta la progressiva aparició d'una població cel·lular amb una capacitat de proliferació disminuïda i, per tant, condiona la capacitat de diferenciació osteoblàstica. En concordança amb aquests fets, es va observar que la maduració de l'ECM i la seva mineralització eren reforçades quan la diferenciació s'iniciava a cultius amb una confluència mínima d'un 80%, la qual és difícil d'assolir en aquells amb baixa taxa de proliferació. La importància de la confluència cel·lular es feia evident quan en una mateixa placa es trobaven zones que diferien en la confluència, les quals també es mineralitzaven de forma diferent (Figura 27).

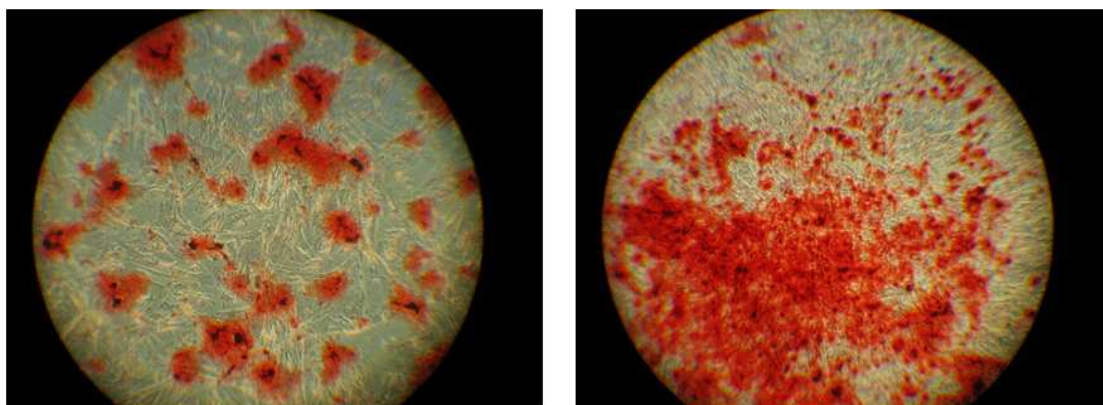


Figura 27. Tinció de calci (alizarina red) d'un cultiu a dia 21 del procés de diferenciació de les MSC WT. S'observa com en una mateixa placa hi ha zones amb més o menys confluència cel·lular. Les zones més confluents (imatge dreta) es mineralitzen millor que les menys confluents (imatge esquerra).

2.2.4. Avaluació de la capacitat d'induir l'osteoclastogènesi per part de les cèl·lules del llinatge osteoblàstic de la GD

Un altre dels propòsits importants d'aquest treball era avaluar la capacitat de les cèl·lules del llinatge osteoblàstic de la GD d'induir l'osteoclastogènesi, mitjançant el sistema OPG/RANK/RANKL que juga un paper important en el control del remodelat ossi. L'activació dels osteoclasts podria explicar algunes de les manifestacions òssies dels malalts Gaucher. De fet, Reed i col·laboradors van observar que els pacients de la GD tenien l'osteoclastogènesi augmentada i que els osteoclasts d'aquests eren més actius i més grans que els de persones sanes (Reed *et al.* 2013). Altres autors van observar que cultivant monòcits provinents de sang perifèrica (PBMCs), juntament amb medi condicionat per cèl·lules del llinatge osteoblàstic que presentaven l'enzim GBA1 inhibit amb l'inhibidor CBE, s'incrementava l'osteoclastogènesi (Lecourt *et al.* 2012; Mucci *et al.* 2012). D'aquesta manera, si existeix una disfunció en el procés de diferenciació osteoblàstica és possible que el sistema OPG/RANK/RANKL es vegi alterat i, per tant, l'osteoclastogènesi. Per aquest motiu, s'està avaluant mitjançant qRT-PCR l'expressió d'*OPG* i *RANKL* en diferents temps de diferenciació osteoblàstica (a dies 0, 7, 14 i 21). Paral·lelament, sota la hipòtesi de l'alliberació d'*OPG* i *RANKL* soluble per part de les cèl·lules de llinatge osteoblàstic, es va recollir medi condicionat per aquestes (a cada un dels 4 temps indicats) per cultivar PBMCs de persones sanes amb cada un d'aquests medis condicionats.

S'ha observat que els nivells de mRNA d'*OPG*, tant en les cèl·lules WT com les GD, s'incrementen durant el procés de diferenciació osteoblàstica. A més, en tots els temps, a excepció del dia 0 (MSC), l'expressió relativa d'*OPG* en el genotip Gaucher era superior a la del genotip WT. La interacció entre *RANKL* i el seu receptor, *RANK*, produeix una activació de la diferenciació i de l'activitat de reabsorció dels osteoclasts. Els efectes de *RANKL* són inhibits per *OPG*, així l'expressió del gen *OPG* és inversament proporcional a l'osteoclastogènesi. En aquest sentit, que l'expressió relativa d'*OPG* en el genotip GD sigui superior a la del genotip WT, seria indicatiu que l'increment documentat de l'osteoclastogènesi en la GD no s'explica com a conseqüència d'una disminució de l'expressió relativa del gen *OPG*. No obstant, en aquest moment només es disposa d'una informació parcial, ja que encara no s'han obtingut els resultats dels nivells relatius d'expressió de *RANKL*.

Respecte a la diferenciació de les PBMC amb els medis condicionats a diferent temps, els resultats preliminars apunten que tant les MSC WT com les MSC GD són capaces d'induir la diferenciació de les PBMC cap a osteoclast. Però, s'observa que els osteoclasts obtinguts a partir de les PBMC tractades amb el medi condicionat per les MSC GD tendeixen a ser de mida major que els obtinguts amb el medi condicionat generat per les MSC WT. Contràriament, el medi condicionat per les cèl·lules a dia 21 no ha induït en cap cas la diferenciació de les PBMC cap a

osteoclast. S'està treballant per optimitzar el protocol per obtenir resultats concloents.

2.3. Avaluació de la capacitat d'incrementar l'activitat de l'enzim GBA1 de les MSC GD (amb genotip N370S/N370S) per part de la XF DIX-28.

Es va utilitzar la XF DIX-28 (descrita en l'article 2) per comprovar si també era capaç d'augmentar l'activitat residual de l'enzim GBA1 amb la mutació N370S en les cèl·lules mesenquimals, tal i com ho feia en cèl·lules fibroblàstiques amb el mateix genotip. Es va observar que l'augment d'activitat enzimàtica, produït per aquest compost, en les MSC era similar a l'obtingut en els fibroblasts amb el mateix genotip (1,5 vegades en les MSC respecte 1,72 en els fibroblasts). Per tant, creiem que aquest model serà de gran utilitat per avaluar l'efecte d'altres xaperones i d'alguns bisfosfonats.

2.4. La complexitat de la regulació òssia, l'heterogeneïtat clínica de la GD i l'ús de iPSC.

L'os és un teixit dinàmic que es renova contínuament mitjançant l'acció coordinada de, sobretot, els osteoclasts i els osteoblasts, però també les MSC, els osteòcits, l'ECM, les cèl·lules immunitàries, les citocines i un llarg etcètera. Les vies implicades en aquesta regulació són molt extenses i, en la majoria de casos, poc conegudes. Com s'ha anat comentant, hi ha molts condicionants a controlar i això ha suposat un gran desavantatge a l'hora d'obtenir resultats concloents. Si a tot això se li suma la gran heterogeneïtat clínica de la GD fa que estudiar la patologia òssia en aquesta malaltia sigui un autèntic repte.

La utilització de les iPSC en la modelització de malalties representa una estratègia molt atractiva per entendre la malaltia en qualsevol tipus cel·lular. Però tot i el seu potencial, el temps requerit en la seva utilització ha esdevingut un factor que ha condicionat el desenvolupament d'aquesta tesi.

A més, la complexitat i les despeses econòmiques vinculades en l'ús de les iPSC en l'experimentació limita disposar d'un ventall ampli d'aquestes, amb diversos genotip i provinents d'individus diferents. Per tant, la variabilitat inter-individual no queda contemplada i pot fer que s'obtinguin resultats que no s'ajustin a la realitat.

2.5. Experiments en curs i futurs

S'està avaluant el perfil lipídic del model Gaucher, en concret l'esfingosina i l'esfingosina-1-fosfat (S1P) que podrien aportar resultats interessants. Hi ha evidències recents que demostren que la interacció entre els osteoclasts i els osteoblasts és mitjançant l'S1P, ja que la que és secretada pels osteoclasts promou

la diferenciació dels osteoblasts i la formació d'os (Lotinun *et al.* 2013; Pederson *et al.* 2008). En aquest escenari, la catepsina K inhibeix la formació d'S1P, mitjançant la disminució de l'esfingosina cinasa 1 i, per tant, impedeix que els osteoclasts estimulin la formació d'os. Les catepsines estan elevades en la GD, incloent la catepsina K i, per tant, es creu que podrien estar implicades en la pèrdua de massa òssia (Moran *et al.* 2000). Pel que fa als nivells d'S1P es va observar disminuïda en el model generat per Campeau i col·laboradors (Campeau *et al.* 2009) i, recentment, s'ha demostrat que l'esfingosina inhibeix la formació dels osteoblasts (Mistry *et al.* 2014).

S'estan replicant els experiments del cicle cel·lular i s'analitzarà l'expressió relativa dels altres gens comentats.

S'està intentat tornar a iniciar el procés de derivació de les iPSC WT cap a MSC, procurant eliminar la part pluripotent que creiem que pot haver interferit en la correcta derivació d'aquestes, com ja s'ha comentat. Obtenir un model MSC WT amb el mateix nombre de passes que el model GD ens permetria comparar les dos condicions sense que aquests influeixin.

Es replicaran els experiments de diferenciació de les PBMC cap a osteoclasts, per poder calcular estadísticament la implicació del llinatge osteoblàstic de la GD en la diferenciació osteoclàstica.

CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

Identificació de noves xaperones farmacològiques (XF)

Compostos LD:

1. S'ha comprovat que els compostos LD són inhibidors competitius de l'enzim GBA1.
2. Els millors van ser capaços de duplicar l'activitat residual de l'enzim amb la mutació G202R, augmentar el seu transport cap al lisosoma i reduir els nivells de GlcCer.
3. Cap d'ells va ser capaç d'incrementar considerablement l'activitat de l'enzim amb la mutació N370S (la mutació més prevalent).

Compostos DIX:

4. Els compostos DIX són inhibidors més forts que els LD, i presenten una inhibició de tipus no competitiva. En particular, el compost DIX-28 presenta una inhibició de tipus mixta.
5. Tots ells van ser capaços, en menor o major mesura, d'augmentar l'activitat residual de l'enzim amb la mutació G202R i amb alguns d'ells l'augment produït va ser superior a l'obtingut en els aminociclitols.
6. L'inhibidor de tipus mixt, el DIX 28, va produir un increment de 4,8 vegades en l'activitat de l'enzim amb la mutació G202R i va millorar el transport d'aquest enzim cap al compartiment lisosomal. Aquest efecte podria ser suficient per evitar l'acumulació de la GlcCer.
7. El compost DIX-28 va duplicar l'activitat residual de l'enzim amb la mutació més prevalent, la N370S. A més, presenta una finestra terapèutica útil per aquest enzim, més ampla que la produïda pel compost del qual deriva (1C9-DIX).
8. Cap dels compostos ha estat eficaç per augmentar l'activitat de l'enzim amb la mutació L444P.
9. Generalment els valors d'increment d'activitat han estat superiors amb els compostos DIX (no-competitiu) que amb els compostos LD (competitiu). D'altra banda, aquests últims presentaven més selectivitat envers altres glicosidases que els compostos DIX. Cap de les dos famílies no va inhibir l'enzim GBA2.

Estudi dels mecanismes moleculars en la patofisiologia òssia en la GD

10. S'han generat cèl·lules mare mesenquimals (MSC) a partir de cèl·lules iPS amb tres genotips diferents de la malaltia de Gaucher i un genotip WT. El protocol emprat per aquesta derivació ha tingut lloc de forma eficient en els genotips GD, però no en el genotip WT.
11. Les MSC amb genotip N370S/84GG i G202R/L444P presentaven una taxa de proliferació disminuïda i una morfologia similar a cèl·lules senescents. A més, l'anàlisi del cicle cel·lular va evidenciar una aturada en la fase G1/G0.
12. S'ha observat que la capacitat de proliferació, la confluència del cultiu i la composició del medi de diferenciació condicionen la capacitat de diferenciació osteoblàstica.
13. Els resultats preliminars suggereixen que la deficient activitat de l'enzim GBA1 en les MSC amb genotip N370S/N370S no condiciona el potencial d'aquestes a diferenciar-se a osteoblasts.
14. Els osteoblasts generats de la GD són capaços de mineralitzar de forma eficient la matriu extracel·lular.
15. Els osteoclasts produïts per estimulació amb medi condicionat de les MSC GD no difereixen en nombre, però sí en mida, dels produïts per estimulació amb medi condicionat de les MSC WT.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abrahamov, A. et al., 1995. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet*, 346(8981), pp.1000–1003.
- Adema, G.J. et al., 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387(6634), pp.713–717.
- Aerts, J.M.F.G. & Hollak, C.E.M., 1997. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillière's Clinical Haematology*, 10(4), pp.691–709.
- Alattia, J.R. et al., 2006. Direct Visualization of Saposin Remodelling of Lipid Bilayers. *Journal of Molecular Biology*, 362(5), pp.943–953.
- Alattia, J.-R. et al., 2007. Molecular imaging of membrane interfaces reveals mode of beta-glucosidase activation by saposin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), pp.17394–17399.
- Alfonso, P. et al., 2013. Bicyclic derivatives of L-idonojirimycin as pharmacological chaperones for neuronopathic forms of Gaucher disease. *ChemBioChem*, 14(8), pp.943–949.
- Alfonso, P. et al., 2013. Bicyclic Derivatives of L-Idonojirimycin as Pharmacological Chaperones for Neuronopathic Forms of Gaucher Disease. *ChemBioChem*, 14(8), pp.943–949.
- Alfonso, P. et al., 2005. Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid β -glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), pp.268–276.
- Allen, M. et al., 1996. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJ Med*, pp.19–25.
- Alm, J.J. et al., 2012. Transient 100 nM dexamethasone treatment reduces inter- and intraindividual variations in osteoblastic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 18(9), pp.658–666..
- Amaral, O. et al., 1996. Type 1 Gaucher disease: Identification of N396T and prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Portuguese. *Human Mutation*, 8(3), pp.280–281.
- Amory, J.K. et al., 2007. Miglustat has no apparent effect on spermatogenesis in normal men. *Human Reproduction*, 22(3), pp.702–707.

- Andermann, E. et al., 1986. Action myoclonus-renal failure syndrome: a previously unrecognized neurological disorder unmasked by advances in nephrology. *Advances in neurology*, 43, pp.87–103.
- Arai, K. et al., 1993. Purification and Characterization of Lysosomal H⁺-ATPase. *the Journal of Biological Chemistry*, 268(8), pp.5649–5660.
- Ashburn, T.T. & Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(8), pp.673–683.
- Aureli, M. et al., 2012. Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(6), pp.1081–1091.

B

- Barak, V. et al., 1999. Cytokines in Gaucher's disease. *European cytokine network*, 10(2), pp.205–210.
- Barneveld, R.A. et al., 1983. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Human genetics*, 64(3), pp.227–231.
- Barton, R.W. & Neufeld, E.F., 1971. The Hurler corrective factor. Purification and some properties. *The Journal of biological chemistry*, 246(24), pp.7773–7779.
- Bellows, C.G., Aubin, J.E. & Heersche, J.N., 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and mineral*, 14(1), pp.27–40.
- Bendikov-Bar, I. et al., 2013. Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(2), pp.141–145.
- Benito, J.M., García Fernández, J.M. & Ortiz Mellet, C., 2011. Pharmacological chaperone therapy for Gaucher disease: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(6), pp.885–903.
- Benjamin, E.R. et al., 2012. Co-administration With the Pharmacological Chaperone AT1001 Increases Recombinant Human α -Galactosidase A Tissue Uptake and Improves Substrate Reduction in Fabry Mice. *Molecular Therapy*, 20(4), pp.717–726.
- Berg-fussman, A. et al., 1993. Human Acid & Glucosidase. *Biochemistry*, 268(20), pp.14861–14866.
- Bernier, V. et al., 2004. Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15(5), pp.222–228.

- Berrebi, A., Wishnitzer, R. & Von-der-Walde, U., 1984. Gaucher's disease: unexpected diagnosis in three patients over seventy years old. *Nouvelle revue française d'hématologie*, 26(3), pp.201–203.
- Beutler, E., Grabowski GA., 1995. Gaucher disease. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edn. New York: McGraw-Hill.
- Beutler, E., Gelbart, T., et al., 1995. Five new Gaucher disease mutations. *Blood cells, molecules & diseases*, 21(1), pp.20–24.
- Beutler, E. et al., 1993. Gaucher disease: gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *American journal of human genetics*, 52(1), pp.85–88.
- Beutler, E., 1992. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, 256(5058), pp.794–799.
- Beutler, E., 2006. Lysosomal storage diseases: Natural history and ethical and economic aspects. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(3), pp.208–215.
- Beutler, E., Demina, a & Gelbart, T., 1994. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(1), pp.82–92.
- Beutler, E., Kuhl, W. & Vaughan, L.M., 1995. Failure of alglucerase infused into Gaucher disease patients to localize in marrow macrophages. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(3), pp.320–324.
- Blanz, J. et al., 2009. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand ??-glucocerebrosidase. *Human Molecular Genetics*, 19(4), pp.563–572.
- Bodennec, J. et al., 2002. Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by glucosylceramide. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(13), pp.1814–1816.
- Boot, R.G. et al., 2004. Marked elevation of the chemokine CCL18 / PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. , 103(1), pp.33–39.
- Boot, R.G. et al., 1998. The human chitotriosidase gene: Nature of inherited enzyme deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), pp.25680–25685.
- Boustany, R.-M.N., 2013. Lysosomal storage diseases--the horizon expands. *Nature reviews. Neurology*, 9(10), pp.583–598.

- Boven, L. a. et al., 2004. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *American Journal of Clinical Pathology*, 122, pp.359–369.
- Boyd, R.E. et al., 2013. Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(7), pp.2705–2725.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(May), pp.337–342.
- Brady, R.O. et al., 1966. Demonstration of a deficiency of glucocerebroside-cleaving enzyme in Gaucher's disease. *Journal of Clinical Investigation*, 45(7), pp.1112–1115.
- Brady, R.O., 2006. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annual review of medicine*, 57, pp.283–296.
- Burke, D.G. et al., 2013. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(5), pp.869–872.
- Butters, T.D., 2007. Gaucher disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(4), pp.412–418.

C

- Campeau, P.M. et al., 2009. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood*, 114(15), pp.3181–3190.
- Carrington, P. a, Stevens, R.F. & Lendon, M., 1992. Pseudo-Gaucher cells. *Journal of Clinical Pathology*, 45(4), pp.360–360.
- Chandra, S. et al., 2005. α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3), pp.383–396.
- Chang, H.H. et al., 2006. Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *FEBS Journal*, 273(17), pp.4082–4092.
- Ciana, G. et al., 2005. Gaucher disease and bone: laboratory and skeletal mineral density variations during a long period of enzyme replacement therapy. *Journal of inherited metabolic disease*, 28(5), pp.723–732.
- Ciechanover, A., 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews*, 6, pp.79-86.
- Coelho, M.J., Cabral, a T. & Fernande, M.H., 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially

- passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials*, 21(11), pp.1087–1094.
- Colter, D.C. et al., 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp.3213–3218.
- Compain, P. et al., 2006. Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease. *ChemBioChem*, 7(9), pp.1356–1359.
- Conzelmann, E. & Sandhoff, K., 1991. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Developmental neuroscience*, 6(1), pp.58–71.
- Cormand, B. et al., 2000. A new gene-pseudogene fusion allele due to a recombination in intron 2 of the glucocerebrosidase gene causes Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 26(5), pp.409–416.
- Cormand, B. et al., 1995. Gaucher disease in Spanish patients: analysis of eight mutations. *Human mutation*, 5(4), pp.303–309.
- Cormand, B. et al., 1998. Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: Putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Human Mutation*, 11(4), pp.295–305.
- Cormand, B. et al., 1998. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNcil mutation. *American journal of medical genetics*, 80(4), pp.343–351.
- Cormand, B. et al., 1997. Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: Clinical signs and biochemical analyses. *American Journal of Medical Genetics*, 70(4), pp.437–443.
- Cox, T.M., 2010a. Eliglustat tartrate, an orally active glucocerebroside synthase inhibitor for the potential treatment of Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 11(10), pp.1169–1181.
- Cox, T.M., 2010b. Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. *Biologics : targets & therapy*, 4, pp.299–313.
- Cox, T.M., 2001. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *Journal of inherited metabolic disease*, 24 Suppl 2, pp.106–121; discussion 87–88.
- Cox, T.M. et al., 2008. Management of non-neuronopathic Gaucher disease with special reference to pregnancy, splenectomy, bisphosphonate therapy, use of

biomarkers and bone disease monitoring. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(3), pp.319–336.

D

Dahl, M. et al., 2015. Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Molecular Therapy*, 23(5), pp.835–844.

Dahl, N. et al., 1990. Gaucher disease type III (Norrbottnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *American journal of human genetics*, 47(2), pp.275–278.

De Alba, E., Weiler, S. & Tjandra, N., 2003. Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 42(50), pp.14729–14740.

De Duve, C. et al., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal*, 60(4), pp.604–617.

De Duve, C. & Wattiaux, R., 1966. Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28, pp.435–92.

De Fost, M. et al., 2008. Persistent bone disease in adult type 1 Gaucher disease despite increasing doses of enzyme replacement therapy. *Haematologica*, 93(7), pp.1119–1120.

Dekker, N. et al., 2011. The cytosolic β -glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(1), pp.19–26.

Diaz, L. et al., 2010. Click Chemistry Approach to New N-Substituted Aminocyclitols as Potential Pharmacological Chaperones for Gaucher Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, pp.5248–5255.

Diaz, L. et al., 2011. New Glucocerebrosidase Inhibitors by Exploration of Chemical Diversity of N-Substituted Aminocyclitols Using Click Chemistry and in Situ Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(7), pp.2069–2079.

Díaz, L. et al., 2011. Computational Prediction of Structure-Activity Relationships for the Binding of Aminocyclitols to beta-Glucocerebrosidase. *J Chem Inf Model*, 51, pp.601–611.

Digirolamo, C.M. et al., 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*, 107(2), pp.275–281.

- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp.315–317.
- Dou, D. & Joseph, R., 1996. Structure and organization of the human neuronatin gene. *Genomics*, 33(2), pp.292–297.
- Drugan, C. et al., 2002. Biochemical markers of bone turnover as tools in the evaluation of skeletal involvement in patients with type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 28(1), pp.13–20.
- Ducy, P. et al., 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), pp.747–754.
- Dvir, H. et al., 2003. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO reports*, 4(7), pp.704–709.

E

- Egido-Gabas, M. et al., 2007. Aminocyclitols as pharmacological chaperones for glucocerebrosidase, a defective enzyme in Gaucher disease. *ChemMedChem*, 2(7), pp.992–994.
- Egido-Gabas, M. et al., 2005. New aminocyclitols as modulators of glucosylceramide metabolism. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(7), pp.1195–1201.
- Ellgaard, L. & Helenius, A., 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(3), pp.181–191.
- Elstein, D. et al., 2004. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(6), pp.757–766.
- Enquist, I.B. et al., 2006. Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), pp.13819–13824.
- Enquist, I.B. et al., 2007. Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), pp.17483–17488.
- Enquist, I.B. et al., 2009. Successful low-risk hematopoietic cell therapy in a mouse model of type 1 Gaucher disease. *Stem cells*, 27(3), pp.744–752.
- Erikson, A., 1986. Gaucher disease--Norrbottnian type (III). Neuropaediatric and neurobiological aspects of clinical patterns and treatment. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement*, 326, pp.1–42.

Eyal, N., Wilder, S. & Horowitz, M., 1990. Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene*, 96(2), pp.277–283.

F

Fabrega, S. et al., 2000. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology*, 10(11), pp.1217–1224.

Faden, M. a. et al., 2009. The Erlenmeyer flask bone deformity in the skeletal dysplasias. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 149(6), pp.1334–1345.

Fan, J.-Q., 2008. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biological chemistry*, 389(1), pp.1–11.

Fleshner, P.R. et al., 1991. A 27-year experience with splenectomy for Gaucher's disease. *American journal of surgery*, 161(1), pp.69–75.

Franceschi, R.T. & Iyer, B.S., 1992. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(2), pp.235–246.

Franceschi, R.T. & Xiao, G., 2003. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *Journal of cellular biochemistry*, 88(3), pp.446–54.

Futerman, A.H. & Hannun, Y. a., 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5(8), pp.777–782.

Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004a. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7), pp.554–65.

Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004b. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7), pp.554–565.

G

García, J. & Cañada, F., 2000. Generalized Anomeric Effect in Action: Synthesis and Evaluation of Stable Reducing Indolizidine Glycomimetics as Glycosidase Inhibitors. *J. Org. Chem.*, 65, pp.136–143.

Gaspar, P. et al., 2014. Action myoclonus-renal failure syndrome: diagnostic applications of activity-based probes and lipid analysis. *Journal of lipid research*, 55(1), pp.138–145.

- Gearhart, J., 1998. New Potential for Human Embryonic Stem Cells. *Science*, 282(5391), pp.1061–1062.
- Germain, D.P. et al., 1998. Exhaustive screening of the acid beta-glucosidase gene, by fluorescence-assisted mismatch analysis using universal primers: mutation profile and genotype/phenotype correlations in Gaucher disease. *American journal of human genetics*, 63(2), pp.415–427.
- Giraldo, P., 2005. Quality of life related to type 1 Gaucher disease: Spanish experience. , pp.453–461.
- Giuffrida, G. et al., 2012. Bone turnover markers in patients with type 1 Gaucher disease. *Hematology Reports*, 4, pp.70–79.
- Goker-Alpan, O., 2013. Commentary on “Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease” By Zimran et al. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(2), pp.138–139.
- Goker-Alpan, O. et al., 2003. Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3. *The Journal of pediatrics*, 143(2), pp.273–276.
- Goldblatt, J. et al., 1988. Total hip arthroplasty in Gaucher’s disease. Long-term prognosis. *Clinical orthopaedics and related research*, (228), pp.94–8.
- Gonzalez, D.E. et al., 2013. Enzyme replacement therapy with velaglucerase alfa in Gaucher disease: Results from a randomized, double-blind, multinational, Phase 3 study. *American Journal of Hematology*, 88(3), pp.166–171.
- González, F., Boué, S. & Izpisúa Belmonte, J.C., 2011. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nature reviews. Genetics*, 12(4), pp.231–242.
- Grabowski, G. a. et al., 1996. Gaucher disease: A prototype for molecular medicine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 23(1), pp.25–55.
- Grabowski, G.A., 1997. Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genetic testing*, 1(1), pp.5–12.
- Grabowski, G.A., Golembo, M. & Shaaltiel, Y., 2014. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Molecular genetics and metabolism*, 112(1), pp.1–8.
- Grace, M.E. et al., 1994. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *The Journal of biological chemistry*, 269(3), pp.2283–2291.

Grace, M.E., Desnick, R.J. & Pastores, G.M., 1997. Identification and expression of acid beta-glucosidase mutations causing severe type 1 and neurologic type 2 Gaucher disease in non- Jewish patients. *J Clin Invest*, 99(10), pp.2530–2537.

Grimm, S., 2004. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. *Nature reviews. Genetics*, 5(3), pp.179–189.

Gruschus, J.M. et al., 2015. Dissociation of glucocerebrosidase dimer in solution by its co-factor, saposin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(4), pp.561–566.

H

Hammer, M.B. et al., 2013. Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity. *American Journal of Human Genetics*, 92(2), pp.245–251.

Hannun, Y. a & Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp.139–150.

Hannun, Y. a. & Luberto, C., 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in Cell Biology*, 10(2), pp.73–80.

Hein, L.K. et al., 2007. Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92(4), pp.336–345.

Herbertson, A. & Aubin, J.E., 1995. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10(2), pp.285–294.

Hieshima, K. et al., 1997. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(3), pp.1140–1149.

Higuchi, T. et al., 2014. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid- α -glucosidase in Pompe's iPSCs. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(1), pp.44–48.

Hobbs, J.R. et al., 1987. Beneficial effect of pre-transplant splenectomy on displacement bone marrow transplantation for gaucher's syndrome. *The Lancet*, 329(8542), pp.1111–1115.

Hodanová, K. et al., 1999. Analysis of the beta-glucocerebrosidase gene in Czech and Slovak Gaucher patients: mutation profile and description of six novel mutant alleles. *Blood cells, molecules & diseases*, 25(5-6), pp.287–298.

- Hollak, C. et al., 2001. Dixon quantitative chemical shift imaging is a sensitive tool for the evaluation of bone marrow responses to individualized doses of enzyme supplementation therapy in type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 27, pp.1005–1012.
- Hollak, C.E. et al., 1997. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 23(2), pp.201–212.
- Hollak, C.E. et al., 1994. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *The Journal of clinical investigation*, 93(3), pp.1288–1292.
- Holleran, W.M. et al., 1994. Ultrastructure and Permeability Barrier Alterations in Gaucher Disease. *The Journal of clinical investigation*, 93, pp.1756–1764.
- Hong, D. et al., 2009. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 116(1-2), pp.86–92.
- Horowitz, M. et al., 1989. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics*, 4(1), pp.87–96.
- Hoshi, K., Komori, T. & Ozawa, H., 1999. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone*, 25(6), pp.639–651.
- Huang, H.P. et al., 2011. Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Human Molecular Genetics*, 20(24), pp.4851–4864.

I

- Ida, H. et al., 1997. Mutation prevalence among 47 unrelated Japanese patients with Gaucher disease: identification of four novel mutations. *Journal of inherited metabolic disease*, 20(1), pp.67–73.
- Ito, S. & Barrett, a. J., 2013. Gauchers Disease—A Reappraisal of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Pediatric Hematology-Oncology*, 30(2), pp.61–70.

J

- Jaiswal, N. et al., 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 64(2), pp.295–312.

K

- Kacher, Y. et al., 2007. Changes in macrophage morphology in a Gaucher disease model are dependent on CTP:phosphocholine cytidyltransferase ?? *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 39(1), pp.124–129.
- Kajiwara, M. et al., 2012. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), pp.14716–14716.
- Kanamaru, F. et al., 2004. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in human T cells. *Immunology Letters*, 94(3), pp.239–246.
- Kanfer, J.N. et al., 1975. The Gaucher mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67(1), pp.85–90.
- Kayed, R. et al., 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), pp.486–489.
- Khanna, R., Soska, R., et al., 2010. The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin reduces tissue globotriaosylceramide levels in a mouse model of Fabry disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), pp.23–33.
- Khanna, R., Benjamin, E.R., et al., 2010. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS Journal*, 277(7), pp.1618–1638.
- Koga, T. et al., 2005. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine*, 11(8), pp.880–885.
- Kolter, T. & Sandhoff, K., 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, pp.81–103.
- Kolter, T. & Wendeler, M., 2003. Chemical chaperones--a new concept in drug research. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 4(4), pp.260–264.
- Komori, T. et al., 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), pp.755–764.
- Koprivica, V. et al., 2000. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *American journal of human genetics*, 66(6), pp.1777–1786.

- Korkotian, E. et al., 1999. Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp.21673–21678.
- Kozutsumi, Y. et al., 2002. Sphingolipids involved in the induction of multinuclear cell formation. *Biochimica et biophysica acta*, 1582(1-3), pp.138–143.
- Kuilman, T. et al., 2010. The essence of senescence. *Genes and Development*, 24(22), pp.2463–2479.
- Kundu, A.K., Khatiwala, C.B. & Putnam, A.J., 2009. Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(lactide-co-glycolide) substrates. *Tissue engineering. Part A*, 15(2), pp.273–283.
- Kuter, D.J. et al., 2013. Miglustat therapy in type 1 Gaucher disease: clinical and safety outcomes in a multicenter retrospective cohort study. *Blood cells, molecules & diseases*, 51(2), pp.116–124.

L

- Lacerda, L. et al., 1999. T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 25, pp.130–138.
- Lacerda, L. et al., 1994. The N370S mutation in the glucocerebrosidase gene of Portuguese type 1 Gaucher patients: linkage to the PvuII polymorphism. *Journal of inherited metabolic disease*, 17(1), pp.85–108.
- Lachmann, R.H. et al., 2004. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 97(4), pp.199–204.
- Lamghari, M. et al., 2005. Recombinant glucocerebrosidase uptake by Gaucher disease human osteoblast culture model. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), pp.348–354.
- Langenbach, F. et al., 2013. Scaffold-free microtissues: Differences from monolayer cultures and their potential in bone tissue engineering. *Clinical Oral Investigations*, 17(1), pp.9–17.
- Latham, T. et al., 1990. Complex alleles of the acid beta-glucosidase gene in Gaucher disease. *American journal of human genetics*, 47(1), pp.79–86.
- Le Coutre, P. et al., 1997. Molecular analysis of Gaucher disease: distribution of eight mutations and the complete gene deletion in 27 patients from Germany. *Human genetics*, 99(6), pp.816–821.

- Leboy, P.S. et al., 1991. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of cellular physiology*, 146(3), pp.370–708.
- Lecourt, S. et al., 2012. Bone marrow microenvironment in an in vitro model of Gaucher disease: consequences of glucocerebrosidase deficiency. *Stem cells and development*, 21(2), pp.239–248.
- Leibbrandt, A. & Penninger, J.M., 2008. RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143, pp.123–150.
- Lemonnier, T. et al., 2011. Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20(18), pp.3653–3666.
- Lian, J.B. & Stein, G.S., 1995. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa orthopaedic journal*, 15, pp.118–140.
- Lin, H. et al., 2004. N-Octyl- β -valienamine up-regulates activity of F213I mutant β -glucosidase in cultured cells: A potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1689(3), pp.219–228.
- Liu, H., Kim, Y. & Sharkis, S., 2011. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Science translational ...*, 3(82), pp.1–19.
- Liu, Y. et al., 1998. Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp.2503–2508.
- Lotinun, S. et al., 2013. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *Journal of Clinical Investigation*, 123(2), pp.666–681.
- Lu, J. et al., 2010. Decreased glucocerebrosidase activity in Gaucher disease parallels quantitative enzyme loss due to abnormal interaction with TCP1 and c-Cbl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), pp.21665–21670.
- Luan, Z. et al., 2009. Chaperone Activity of Bicyclic Nojirimycin Analogues for Gaucher Mutations in Comparison with N-(n-nonyl)Deoxynojirimycin. *ChemBioChem*, 10, pp.2780–2792.
- Luan, Z. et al., 2013. The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain & development*, 35(4), pp.317–322.

M

- Machaczka, M., 2013. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for treatment of Gaucher disease. *Pediatric hematology and oncology*, 30(5), pp.459–461.
- Maegawa, G.H.B. et al., 2009. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), pp.23502–23516.
- Martin, E. et al., 2013. Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *American Journal of Human Genetics*, 92(2), pp.238–244.
- Marugan, J.J. et al., 2011. Evaluation of quinazoline analogues as glucocerebrosidase inhibitors with chaperone activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(4), pp.1033–1058.
- Marugan, J.J., Huang, W., et al., 2012. Non-iminosugar glucocerebrosidase small molecule chaperones. *MedChemComm*, 3(1), p.56.
- Marugan, J.J. et al., 2013. Preparation of salicylic acid derivatives for use as glucocerebrosidase activators. *PCT Int. Appl.*, (WO2013148333A1), p.80pp.
- Marugan, J.J., Southall, N., et al., 2012. Preparation of substituted pyrazolopyrimidines as glucocerebrosidase activators. *PCT Int. Appl.*, (WO2012078855A1), p.71
- Mata, I.F. et al., 2008. Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. *Archives of neurology*, 65(3), pp.379–382.
- Matern, H., Gartzon, R. & Matern, S., 1992. β -Glucosidase activity towards a bile acid glucoside in human liver. *FEBS Letters*, 314(2), pp.183–186.
- Mazzulli, J.R. et al., 2011. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*, 146(1), pp.37–52.
- McEachern, K.A. et al., 2007. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), pp.259–267.
- Mucci, J.M. & Rozenfeld, P., 2015. Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2015(2015), pp.1-6
- McNeill, A. et al., 2014. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain*, 137(5), pp.1481–1495.

- Meikle, P.J., 1999. Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(3), pp.249–254.
- Mellman, I., 1989. Organelles observed: lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4906), pp.853–4.
- Mets, T. & Verdonk, G., 1981. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 16(1), pp.81–89.
- Miao, S. et al., 1994. Identification of Glu340 as the active-site nucleophile in human glucocerebrosidase by use of electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), pp.10975–10978.
- Michelakakis, H. et al., 1996. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1317(3), pp.219–222.
- Mikosch, P. & Hughes, D., 2010. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, 160(23-24), pp.609–624.
- Mistry, P.K. et al., 2014. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), pp.4934–4939.
- Mistry, P.K. et al., 2010. Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp.19473–19478.
- Mitsui, J. et al., 2009. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Archives of neurology*, 66(5), pp.571–576.
- Mizukami, H. et al., 2002. Systemic inflammation in glucocerebrosidase-deficient mice with minimal glucosylceramide storage. *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), pp.1215–1221.
- Moran, M.T. et al., 2000. Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood*, 96(5), pp.1969–1978.
- Morel, N. et al., 1999. Effect of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase. *Molecular pharmacology*, 55(6), pp.982–992.
- Mu, T.W., Fowler, D.M. & Kelly, J.W., 2008. Partial restoration of mutant enzyme homeostasis in three distinct lysosomal storage disease cell lines by altering calcium homeostasis. *PLoS Biology*, 6(2), pp.0253–0265.
- Mucci, J.M. et al., 2012. Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- α . *Gene*, 509(1), pp.51–59.

Mucci, J.M. et al., 2013. Uncoupling of osteoblast-osteoclast regulation in a chemical murine model of gaucher disease. *Gene*, 532(2), pp.186–191.

Mucci, J.M. & Rozenfeld, P., 2015. Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2015(2015), pp.1-6.

Mullins, C. & Bonifacino, J.S., 2001. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(4), pp.333–43.

N

Nagy, J.K. & Sanders, C.R., 2004. Destabilizing mutations promote membrane protein misfolding. *Biochemistry*, 43(1), pp.19–25.

Nakashima, K. et al., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), pp.17–29.

Nakashima, T. et al., 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17(10), pp.1231–1234.

Nakashima, T. et al., 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(3), pp.768–775.

Nakashima, T. & Takayanagi, H., 2009. Osteoimmunology: Crosstalk between the immune and bone systems. *Journal of Clinical Immunology*, 29(5), pp.555–567.

Nasu, A. et al., 2013. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PloS one*, 8(1), p.e53771.

Németh, K. et al., 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 42(1), pp.29–42.

Neuhuber, B. et al., 2008. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental hematology*, 36(9), pp.1176–1185.

Nilsson, O. & Svennerholm, L., 1982. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *Journal of neurochemistry*, 39(3), pp.709–18.

O

- O'Brien, J.S. et al., 1988. Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4869), pp.1098–1101.
- Odom, D.T. et al., 2007. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature genetics*, 39(6), pp.730–732.
- Offman, M.N. et al., 2010. Molecular basis of reduced glucosylceramidase activity in the most common Gaucher disease mutant, N370S. *J Biol Chem*, 285(53), pp.42105–42114.
- Ohi, Y. et al., 2011. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature cell biology*, 13(5), pp.541–549.
- Onder, T.T. & Daley, G.Q., 2012. New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22(5), pp.500–508.
- Ong, D.S.T. et al., 2010. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ increases enhance mutant glucocerebrosidase proteostasis. *Nature chemical biology*, 6(6), pp.424–432.
- Ortolano, S. et al., 2014. Treatment of lysosomal storage diseases: recent patents and future strategies. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*, 8(1), pp.9–25.
- Orvisky, E. et al., 2000. Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestation. *Pediatric research*, 48(2), pp.233–237.
- Orvisky, E. et al., 2002. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: Correlation with phenotype and genotype. *Molecular Genetics and Metabolism*, 76(4), pp.262–270.
- Ostlere, L. et al., 1991. Treatment of Type 1 Gaucher's Disease Affecting Bone with Aminohydroxypropylidene Bisphosphonate (Pamidronate). *QJM*, 79(3), pp.503–515.
- Oulaïdi, F. et al., 2011. Second-generation iminoxylitol-based pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease. *ChemMedChem*, 6(2), pp.353–361.
- Overkleeft, H.S. et al., 1998. Generation of Specific Deoxynojirimycin-type Inhibitors of the Generation of Specific Deoxynojirimycin-type Inhibitors of the Non-lysosomal Glucosylceramidase *. , 273(41), pp.26522–26527.

P

- Panicker, L.M. et al., 2014. Gaucher iPSC-derived macrophages produce elevated levels of inflammatory mediators and serve as a new platform for therapeutic development. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, pp.1–16.
- Panicker, L.M. et al., 2012. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), pp.18054–18059.
- Parenti, G., 2009. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: From concept to clinics. *EMBO Molecular Medicine*, 1(5), pp.268–279.
- Parenti, G., Andria, G. & Valenzano, K.J., 2015. Pharmacological chaperone therapy: preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Molecular Therapy*.
- Park, I.-H. et al., 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), pp.877–886.
- Pastores, G.M. et al., 2004. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Seminars in Hematology*, 41, pp.4–14.
- Patnaik, S. et al., 2012. Discovery, structure-activity relationship, and biological evaluation of noninhibitory small molecule chaperones of glucocerebrosidase. *J Med Chem*, 55(12), pp.5734–5748.
- Pederson, L. et al., 2008. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), pp.20764–20769.
- Pelled, D. et al., 2005. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiology of Disease*, 18(1), pp.83–88.
- Pelled, D., Shogomori, H. & Futerman, a. H., 2000. The increased sensitivity of neurons with elevated glucocerebroside to neurotoxic agents can be reversed by imiglucerase. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23(2), pp.175–184.
- Pentchev, P.G. et al., 1973. Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. *The Journal of biological chemistry*, 248(15), pp.5256–5261.
- Perel, P. et al., 2007. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ (Clinical research ed.)*, 334(7586), p.197-202.

- Phillips, J.E. et al., 2006. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *Journal of cell science*, 119(Pt 3), pp.581–591.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), pp.143–147.
- Platt, F.M. et al., 1994. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), pp.8362–8365.
- Platt, F.M., Boland, B. & van der Spoel, A.C., 2012. Lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *The Journal of cell biology*, 199(5), pp.723–734.
- Prenc, E.M., Chaturvedi, P. & Newburg, D.S., 1996. In vitro accumulation of glucocerebroside in neuroblastoma cells: A model for study of Gaucher disease pathobiology. *Journal of Neuroscience Research*, 43(3), pp.365–371.

R

- Reczek, D. et al., 2007. LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell*, 131(4), pp.770–783.
- Reed, M. et al., 2013. Enhanced differentiation of osteoclasts from mononuclear precursors in patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51(3), pp.185–194.
- Reissner, K. et al., 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. *Molecular genetics and metabolism*, 63(4), pp.281–288.
- Rigat, B. & Mahuran, D., 2009. Diltiazem, a L-type Ca²⁺ channel blocker, also acts as a pharmacological chaperone in Gaucher patient cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, 96(4), pp.225–232.
- Ringdén, O. et al., 1995. Ten years' experience of bone marrow transplantation for Gaucher disease. *Transplantation*, 59(6), pp.864–870.
- Ringe, D. & Petsko, G.A., 2009. What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J Biol*, 8(9), pp.80-84.
- Ron, I. & Horowitz, M., 2005. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, 14(16), pp.2387–2398.

S

- Saftig, P. & Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), pp.623–635.
- Salvioli, R. et al., 2005. The N370S (Asn370-->Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C. *Biochem J*, 390(Pt 1), pp.95–103.
- Samuel, R. et al., 1994. Aminohydroxy propylidene bisphosphonate (APD) treatment improves the clinical skeletal manifestations of Gaucher's disease. *Pediatrics*, 94(3), pp.385–389.
- Sánchez-Ollé, G. et al., 2009. Promising results of the chaperone effect caused by iminosugars and aminocyclitol derivatives on mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42(2), pp.159–166.
- Sawkar, A.R. et al., 2002. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp.15428–15433.
- Sawkar, A.R. et al., 2005. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chemistry and Biology*, 12(11), pp.1235–1244.
- Sawkar, A.R. et al., 2005. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chemistry and Biology*, 12(11), pp.1235–1244.
- Schiffmann, R. et al., 2002. Decreased bone density in splenectomized Gaucher patients receiving enzyme replacement therapy. *Blood cells, molecules & diseases*, 28, pp.288–296.
- Schiffmann, R. et al., 2008. Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Annals of Neurology*, 64(5), pp.514–522.
- Schmitz, M. et al., 2005. Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(11), pp.2310–2320.
- Schneider, E.L. et al., 1972. Infantile (type II) Gaucher's disease: in utero diagnosis and fetal pathology. *The Journal of pediatrics*, 81(6), pp.1134–1139.
- Schöndorf, D.C. et al., 2014. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature communications*, 5, p.4028-4045

- Schueler, U. et al., 2003. Toxicity of glucosylsphingosine (glucopsychosine) to cultured neuronal cells: a model system for assessing neuronal damage in Gaucher disease type 2 and 3. *Neurobiology of Disease*, 14(3), pp.595–601.
- Schueler, U.H. et al., 2004. Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(5), pp.649–658.
- Seong, J.M. et al., 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 5(6), pp.062001-062016.
- Sidransky, E., 2004. Gaucher disease: Complexity in a “simple” disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83, pp.6–15.
- Sidransky, E. et al., 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson’s disease. *The New England journal of medicine*, 361(17), pp.1651–1661.
- Sidransky, E. et al., 1996. The clinical, molecular, and pathological characterisation of a family with two cases of lethal perinatal type 2 Gaucher disease. *Journal of medical genetics*, 33(2), pp.132–136.
- Sidransky, E., Sherer, D.M. & Ginns, E.I., 1992. Gaucher Disease in the Neonate: A Distinct Gaucher Phenotype Is Analogous to a Mouse Model Created by Targeted Disruption of the Glucocerebrosidase Gene. *Pediatric Research*, 32(4), pp.494–498.
- Simonet, W.S. et al., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), pp.309–319.
- Sims, K.B. et al., 2008. Improvement of bone disease by imiglucerase (Cerezyme) therapy in patients with skeletal manifestations of type 1 Gaucher disease: Results of a 48-month longitudinal cohort study. *Clinical Genetics*, 73(5), pp.430–440.
- Sinclair, G.B. et al., 2007. Generation of a conditional knockout of murine glucocerebrosidase: utility for the study of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism*, 90(2), pp.148–156.
- Song, I.-H., Caplan, A.I. & Dennis, J.E., 2009. Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(2), pp.216–221.
- Sorge, J. a et al., 1987. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *American journal of human genetics*, 41(6), pp.1016–1024.

- Starer, F., Sargent, J.D. & Hobbs, J.R., 1987. Regression of the radiological changes of Gaucher's disease following bone marrow transplantation. *The British journal of radiology*, 60(720), pp.1189–1195.
- Steet, R. a et al., 2006. The iminosugar isofagomine increases the activity of N370S mutant acid beta-glucosidase in Gaucher fibroblasts by several mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), pp.13813–13818.
- Stephens, M.C. et al., 1978. The Gaucher mouse: differential action of conduritol B epoxide and reversibility of its effects. *Journal of neurochemistry*, 30(5), pp.1023–1027.
- Stewart, a J. & Jones, R.D., 1999. Pseudo-Gaucher cells in myelodysplasia. *Journal of clinical pathology*, 52(12), pp.917–918.
- Stolzing, A. et al., 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells : Consequences for cell therapies. , 129, pp.163–173.
- Stowens, D.W. et al., 1985. Skeletal complications of Gaucher disease. *Medicine*, 64(5), pp.310–22.
- Strasberg, P.M. et al., 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? *Biochemical medicine and metabolic biology*, 53(1), pp.16–21.
- Sun, Y. et al., 2012. Ex vivo and in vivo effects of isofagomine on acid β -glucosidase variants and substrate levels in Gaucher disease. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), pp.4275–4287.
- Sun, Y. et al., 2009. In vivo and ex vivo evaluation of L-type calcium channel blockers on acid β -glucosidase in Gaucher disease mouse models. *PLoS ONE*, 4(10), p.e7320.
- Sun, Y. et al., 2015. Properties of Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Gaucher Disease Type 2 Patient Fibroblasts: Potential Role in Neuropathology. *Plos One*, 10(3), p.e0118771.
- Sun, Y., Qi, X. & Grabowski, G. a., 2003. Saposin C is required for normal resistance of acid β -glucosidase to proteolytic degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), pp.31918–31923.

T

- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), pp.861–872.

- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Tamargo, R.J. et al., 2012. The role of saposin C in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), pp.257–263.
- Tayebi, N. et al., 2003. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *American journal of human genetics*, 72(3), pp.519–534.
- Tenenbaum, H.C. & Heersche, J.N., 1985. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*, 117(5), pp.2211–7.
- Theophilus, B. et al., 1989. Gaucher disease: molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *American journal of human genetics*, 45(2), pp.212–225.
- Tiscornia, G. et al., 2013. Neuronopathic Gaucher's disease: Induced pluripotent stem cells for disease modelling and testing chaperone activity of small compounds. *Human Molecular Genetics*, 22(4), pp.633–645.
- Tiscornia, G., Vivas, E.L. & Belmonte, J.C.I., 2011. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nature Medicine*, 17(12), pp.1570–1576.
- Tolar, J. et al., 2011. Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). *Blood*, 117(3), pp.839–847.
- Trajkovic-Bodennec, S., Bodennec, J. & Futerman, A.H., 2004. Phosphatidylcholine metabolism is altered in a monocyte-derived macrophage model of Gaucher disease but not in lymphocytes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 33(1), pp.77–82.
- Trapero, A. et al., 2011. Polyhydroxylated bicyclic isoureas and guanidines are potent glucocerebrosidase inhibitors and nanomolar enzyme activity enhancers in Gaucher cells. *J Am Chem Soc*, 133(14), pp.5474–5484.
- Trapero, A. et al., 2012. Potent aminocyclitol glucocerebrosidase inhibitors are subnanomolar pharmacological chaperones for treating gaucher disease. *J Med Chem*, 55(9), pp.4479–4488.
- Trapero, A., Egado-Gabás, M. & Llebaria, A., 2013. Adamantane substituted aminocyclitols as pharmacological chaperones for Gaucher disease. *MedChemComm*, 4(12), pp.1584-1589
- Trapero, A. & Llebaria, A., 2011. The myo-1,2-Diaminocyclitol Scaffold Defines Potent Glucocerebrosidase Activators and Promising Pharmacological

Chaperones for Gaucher Disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2, pp.614–619.

Trilck et al., 2013. Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, p.144-156

Tsuji, A. & Suzuki, Y., 1987. Biosynthesis of two components of human acid alpha-glucosidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 259(2), pp.234–240.

Tsuji, S. et al., 1988. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), pp.2349–2352.

Turkia, H. Ben et al., 2013. Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 88(3), pp.179–184.

Tybulewicz, V.L. et al., 1992. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature*, 357(6377), pp.407–410.

V

Vaccaro, A.M. et al., 1995. pH-Dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), pp.30576–30580.

Vaccaro, A.M. et al., 1999. Saposins and their interaction with lipids. *Neurochemical research*, 24(2), pp.307–314.

Van Breemen, M.J. et al., 2007. Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels in type 1 Gaucher disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1772, pp.788–796.

Van der Spoel, A.C. et al., 2002. Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: a nonhormonal approach to male contraception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), pp.17173–17178.

Van Dussen, L. et al., 2011. Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(7), pp.2194–2205.

Van Weely, S. et al., 1993. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1181(1), pp.55–62.

- Van Weely, S. et al., 1993. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in type 1 Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3), pp.1167–1175.
- Vater, C., Kasten, P. & Stiehler, M., 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), pp.463–477.
- Vitner, E.B. et al., 2014. Emerging therapeutic targets for Gaucher disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 19(3), pp.321–334
- Volles, M.J. & Lansbury, P.T., 2003. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42(26), pp.7871–7878.

W

- Walsh, S. et al., 2001. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(1), pp.74–83.
- Wang, F. et al., 2011. Ca²⁺ homeostasis modulation enhances the amenability of L444P glucosylcerebrosidase to proteostasis regulation in patient-derived fibroblasts. *ACS Chemical Biology*, 6(2), pp.158–168.
- Wang, H. et al., 2012. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 14(4), pp.423–430.
- Wei, R.R. et al., 2011. X-ray and biochemical analysis of N370S mutant human acid beta-glucosidase. *J Biol Chem*, 286(1), pp.299–308.
- Weilbaecher, K.N., Guise, T. a & McCauley, L.K., 2011. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews. Cancer*, 11(6), pp.411–425.
- Weinreb, N.J. et al., 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. *The American journal of medicine*, 113(2), pp.112–119.
- Weinreb, N.J., Brady, R.O. & Tappel, A.L., 1968. The lysosomal localization of sphingolipid hydrolases. *Biochimica et biophysica acta*, 159(1), pp.141–146.
- Wenstrup, R.J. et al., 2007. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(1), pp.119–126.

Wenstrup, R.J. et al., 2004. Gaucher disease: Alendronate disodium improves bone mineral density in adults receiving enzyme therapy. *Blood*, 104(5), pp.1253–1257.

Willemsen, R. et al., 1995. A biochemical and ultrastructural evaluation of the type 2 Gaucher mouse. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid*, 24(2-3), pp.179–92.

Winchester, B., Vellodi, a & Young, E., 2000. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment Abstract T h e lysosomal system is the main intracellular mechanism for the catabolism of naturally oc- T h e lysosomal system is the main intracellu-. *Biochem. Soc. Trans*, 28(2), pp.150–154.

Winfield, S.L. et al., 1997. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: Implications for Gaucher disease. *Genome Research*, 7(10), pp.1020–1026.

X

Xiao, G. et al., 2002. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(1), pp.101–110.

Xu, Y.H. et al., 1996. Turnover and distribution of intravenously administered mannose-terminated human acid beta-glucosidase in murine and human tissues. *Pediatric research*, 39(2), pp.313–322.

Xu, Y.-H. et al., 2008. Dependence of reversibility and progression of mouse neuronopathic Gaucher disease on acid beta-glucosidase residual activity levels. *Molecular genetics and metabolism*, 94(2), pp.190–203.

Xu, Y.-H. et al., 2003. Viable Mouse Models of Acid β -Glucosidase Deficiency. *The American journal of pathology*, 163(5), pp.2093–2101.

Y

Yahata, K. et al., 2000. Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 78(7), pp.389–394.

Yamaguchi, A., Komori, T. & Suda, T., 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine reviews*, 21(4), pp.393–411.

- Yang, F. et al., 2010. Sclerostin is a direct target of osteoblast-specific transcription factor osterix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(4), pp.684–688.
- Yap, T.L., Velayati, A., et al., 2013. Membrane-bound α -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*, 108(1), pp.56–64.
- Yap, T.L., Gruschus, J.M., et al., 2013. Saposin C protects glucocerebrosidase against α -synuclein inhibition. *Biochemistry*, 52(41), pp.7161–7163.
- Yap, T.L. et al., 2011. α -Synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and gaucher diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), pp.28080–28088.
- Yildiz, Y. et al., 2006. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), pp.2985–2994.
- Yin, T. & Li, L., 2006. The stem cell niches in bone. , 116(5), pp.1195–1201.
- Yoshino, M. et al., 2007. Roles of specific cytokines in bone remodeling and hematopoiesis in Gaucher disease. *Pediatrics International*, 49, pp.959–965.
- Yu, L. et al., 2006. alpha-1-C-Octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(23), pp.7736–7744.
- Yu, Z. et al., 2007. Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *Journal of medicinal chemistry*, 50(1), pp.94–100.

Z

- Zhou, S. et al., 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), pp.335–343.
- Zimmer, K.P. et al., 1999. Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease. *J. Pathol.*, 188(September 1998), pp.407–414.
- Zimran, a, Medicine, E. & Jolla, L., 1990. A Glucocerebrosidase Fusion Gene in Gaucher Disease. , 85(January), pp.219–222.
- Zimran, A. et al., 1989. Prediction of severity of gaucher's disease by identification of mutations at dna level. *The Lancet*, 334(8659), pp.349–352.

- Zimran, A. et al., 1995. Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease. *Lancet*, 345(8963), pp.1479–80.
- Zimran, A., Pastores, G.M., et al., 2013. Safety and efficacy of velaglucerase alfa in Gaucher disease type 1 patients previously treated with imiglucerase. *American Journal of Hematology*, 88(3), pp.172–178.
- Zimran, A., Altarescu, G. & Elstein, D., 2013. Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(2), pp.134–137.
- Zimran, A., Altarescu, G. & Elstein, D., 2014. Screening for Gaucher Disease : New Challenges , 16, pp. 723-724.

APÈNDIX

IC₅₀, K_i

IC₅₀: és la concentració d'inhibidor requerida per efectuar una reducció del 50% de l'activitat enzimàtica, en unes condicions de reacció específiques. Per tant, ens informa de la potència d'inhibició, ja que un inhibidor serà més potent quan la IC₅₀ sigui més baixa, perquè necessitarà menys concentració per inhibir el 50% de les molècules d'enzim. D'altra banda, la IC₅₀ pot variar en funció de la concentració i naturalesa del substrat i depenent del tipus d'inhibició.

K_i: és la constant de dissociació del complex enzim-inhibidor, és intrínseca per un conjunt de condicions d'assaig (temperatura, pH, força iònica) i és independent de la identitat i la concentració del substrat.

Tipus d'inhibició

Inhibició competitiva: el substrat i l'inhibidor no es poden unir a l'enzim al mateix temps (Figura XA). Normalment passa quan l'inhibidor té afinitat pel centre catalític de l'enzim i, per tant, el substrat i l'inhibidor competeixen pel mateix lloc d'unió. Aquest tipus d'inhibició es pot superar amb concentracions suficientment altes de substrat.

Inhibició no competitiva: l'inhibidor té afinitat tant per l'enzim lliure com pel complex enzim-substrat. (Figura XB). D'altra banda, la unió de l'inhibidor afecta a la unió del substrat, i viceversa. Aquest tipus d'inhibició es pot reduir, però no superar en augmentar les concentracions del substrat. Generalment és a causa d'un efecte al·lostèric (afinitat d'unió a un lloc diferent al centre actiu).

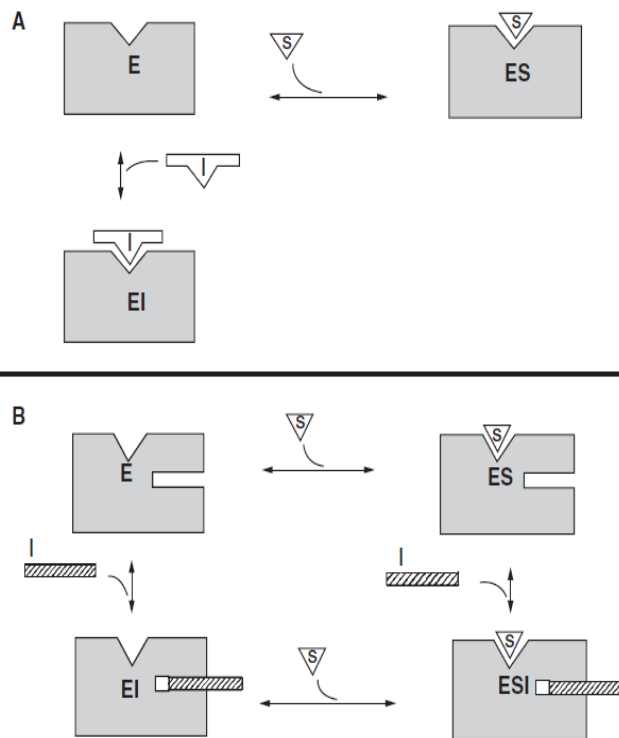
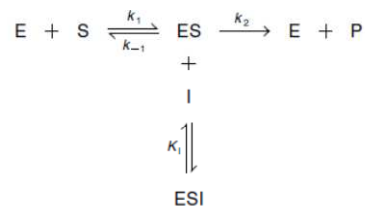


Figura X. Tipus d'inhibició. A) Competitiva, B) No-competitiva. E = Enzim; S = Substrat; I = inhibidor.

Inhibició acompetitiva: l'inhibidor només s'uneix al complex enzim-substrat (ES).



$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Inhibició mixta: l'inhibidor afecta l'afinitat de l'enzim pel substrat (també es considera com a una inhibició al·lostèrica). A diferència d'altres tipus d'inhibició, tant el complex ES com l'ESI són productius, és a dir, donen lloc al producte de la reacció enzimàtica.

