

# Disfunkcije metabolizma sfingolipida

---

**Hefer, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:331978>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-11**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marija Hefer

**Disfunkcije metabolizma sfingolipida**

(Sphingolipid metabolism dysfunctions)

**Završni rad**

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: Marija Paurević, asistent

Osijek, 2018. godine

## Sažetak

Sfingolipidi su glavne komponente staničnih membrana u živčanom sustavu svih eukariota. S obzirom da su uklopljeni u stanične membrane, oni kontroliraju i bitne stanične signalne puteve. Najveću ulogu u staničnoj signalizaciji ima ceramid koji inducira staničnu smrt mijenjajući pritom strukturu membrana. Ostali sfingolipidi koji su odgovorni za izgradnju dijele se na glikosfingolipide i fosfosfingolipide. Disfunkcijom metabolizma bilo kojeg sfingolipida dolazi do njihovog nakupljanja, a samim time i pojave neuroloških oboljenja. Lizosomske bolesti nakupljanja kod kojih dolazi do pogrešne razgradnje i skladištenja tih lipida nazivaju se sfingolipidoze. Sfingolipidoze su nasljedne bolesti uzrokovane nedostatkom enzima za razgradnju ili sfingolipid aktivirajućih proteina (SAP). Iako terapije za većinu tih bolesti nisu dostupne zbog neistraženosti njihove etiologije, daljnjim istraživanjima otkrivaju se nove potencionalne metode za njihovo liječenje.

**ključne riječi:** sfingolipidi, ceramid, stanična membrana, sfingolipidoze, živčani sustav

## **Abstract**

Sphingolipids are the main constituents of cell membranes in the nervous system of all eukaryotes. Being embedded in the cell membranes they also control some of the most important cellular signaling pathways. Ceramide plays a major role in intracellular signaling, changing the structure of cell membranes and thereby inducing the apoptosis. The remaining sphingolipids that act as building blocks are divided into glycosphingolipids and phosphosphingolipids. Dysfunctions in sphingolipid metabolism lead to their accumulation in lysosomes, acting as a trigger for neurological disorders. Lysosomal storage diseases, which arise because of the defects in degradation and storage of sphingolipids, are called sphingolipidoses. Sphingolipidoses are a group of hereditary genetic diseases caused by a lack of sphingolipid-degrading enzymes or sphingolipid activator proteins (SAP). Treatments for most of these diseases are not yet established because of the poor understanding of their etiologies, although, novel studies are discovering potentially new methods for their treatment.

**keywords:** sphingolipids, ceramide, cell membrane, sphingolipidoses, nervous system

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Biokemijska i funkcionalna svojstva sfingolipida</b> .....	2
2.1. Strukturna klasifikacija sfingolipida.....	2
2.2. Uloga sfingolipida u izgradnji stanične membrane .....	4
2.3. Uloga sfingolipida u apoptozi i autofagiji .....	7
<b>3. Metabolizam i intracelularni transport sfingolipida</b> .....	10
3.1. <i>De novo</i> sinteza u ER-u.....	10
3.2. Sinteza kompleksnih sfingolipida u Golgijevom tijelu .....	11
3.3. Transport i katabolizam kompleksnih sfingolipida .....	13
3.4. Regulacija sinteze sfingolipida.....	15
<b>4. Disfunkcije metabolizma sfingolipida</b> .....	17
4.1. Sfingolipidoze .....	17
4.1.1. Anderson-Fabry .....	20
4.1.2. Gaucher.....	23
4.1.3. Niemann-Pick .....	26
4.1.4. GM2-ganglioziidoze.....	31
4.2. Uzroci disfunkcije metabolizma sfingolipida .....	34
4.2.1. Nedostatak sfingolipid aktivirajućih proteina.....	34
<b>5. Zaključak</b> .....	36
<b>6. Popis kratica</b> .....	37
<b>7. Literatura</b> .....	40

## 1. Uvod

Sfingolipidi su klasa lipida koja je prvi puta otkrivena 1870. godine u živčanim stanicama mozga, a ime su dobili po mitološkoj Sfingi zbog svoje zagonetne prirode. Zajedno s fosfolipidima i kolesterolom, oni čine glavne komponente membranskog lipidnog dvosloja. Za razliku od fosfolipida, čiju osnovu čini glicerol, okosnicu sfingolipida čini alkohol sfingozin. Sfingolipidi izgrađuju plazmatske membrane svih eukariotskih stanica, iako se u najvećoj koncentraciji nalaze u stanicama središnjeg živčanog sustava. Njihova točna uloga za sada još nije određena, ali je poznato kako pojedini sfingolipidi mogu poslužiti kao prijenosnici signala [1, 2].

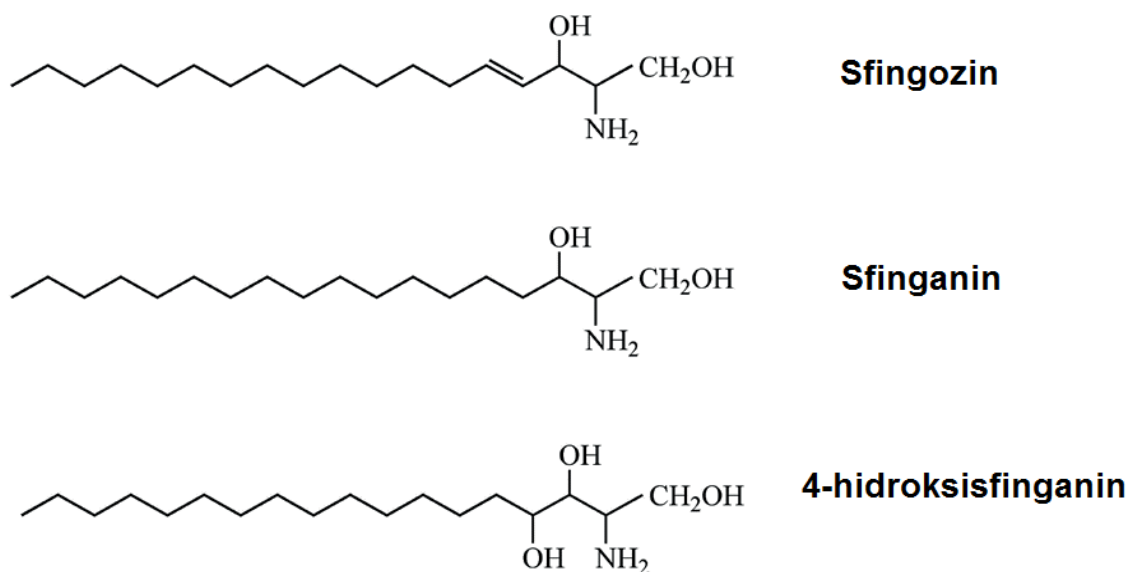
Sfingolipidi, kao biološki aktivne molekule, sudjeluju u kontroliranju ključnih staničnih procesa kao što su stanično dijeljenje i stanična smrt. S obzirom da većina tih procesa čini osnovu za nastanak patoloških stanja, sfingolipidi su ključni za pojavu određenih neuroloških bolesti. Iako su pojedina istraživanja dokazala da sfingolipidi sudjeluju u prijenosu signala i razvoju bolesti, molekularni mehanizmi po kojima se ti procesi odvijaju ostaju nerazjašnjeni [3].

## 2. Biokemijska i funkcionalna svojstva sfingolipida

### 2.1. Strukturna klasifikacija sfingolipida

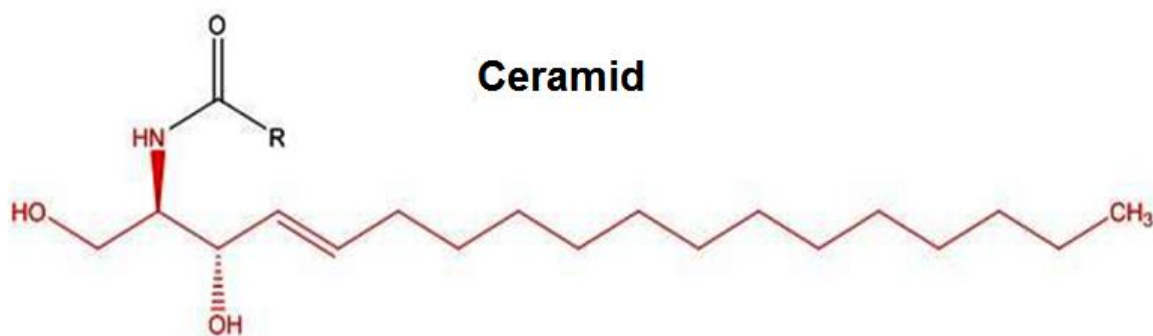
Sfingolipidi su amfipatske molekule s hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima, čija polarnost ovisi o supstituiranosti terminalne hidroksilne skupine ceramida. Hidrofobni dio sfingolipida čini sfingoidna dugolančana baza, odnosno dugolančani alifatski lanac sa slobodnom terminalnom hidroksilnom skupinom i masnom kiselinom vezanom na amino skupinu drugog ugljikovog atoma lanca. U hidrofilnom dijelu molekule terminalna hidroksilna skupina može biti supstituirana fosfatnom skupinom te šećernim ostacima, ovisno o vrsti sfingolipida. S obzirom na strukturne razlike sfingolipidi se dijele na: sfingoidne baze i ceramide te kompleksne sfingolipide [4].

Sfingoidne baze su dugolančani alifatski amino alkoholi koji čine definirajuće strukturne jedinice sfingolipida. Postoji preko 60 različitih sfingoidnih baza koje se međusobno razlikuju po duljini alkilnoga lanca, stupnju zasićenosti i poziciji dvostruke veze te prisustvu hidroksilnih skupina. Najčešće sfingoidne baze u tkivima sisavaca su sfingozin, sfinganin te 4-hidroksisfinganin, čije su strukturne formule prikazane na Slici 1. Među najznačajnijima je sfingozin, odnosno 2-amino-4-oktadecen-1,3-diol, s obzirom da on čini glavnu okosnicu za nastanak kompleksnijih sfingolipida [5].



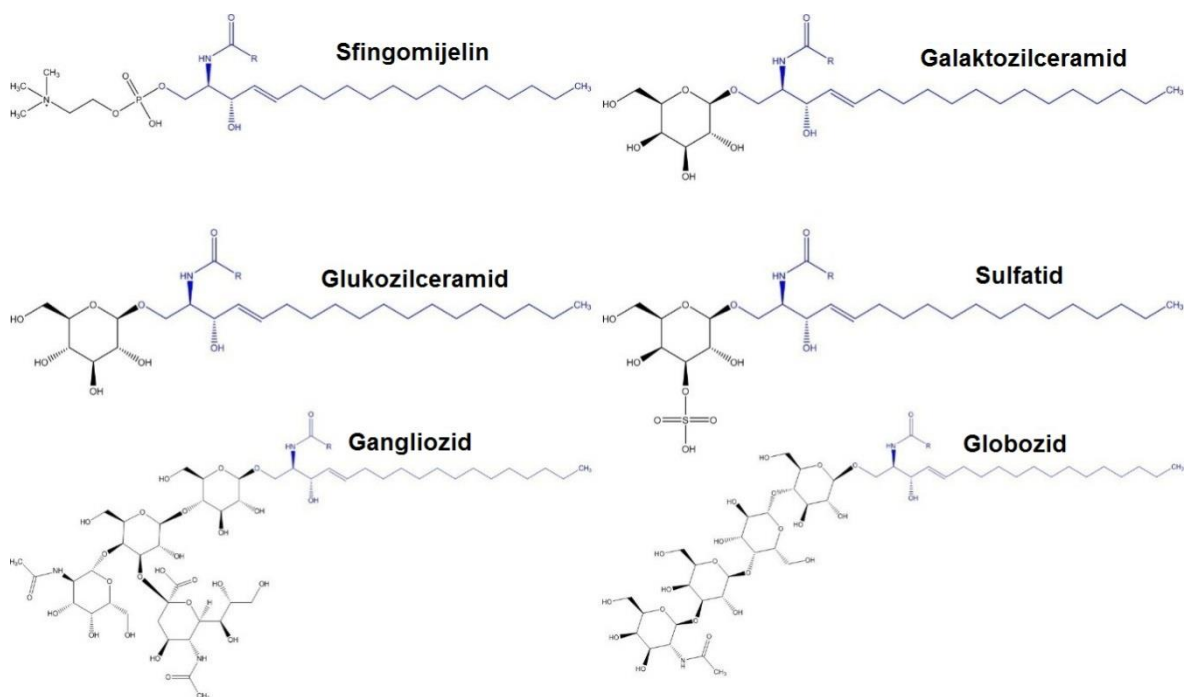
**Slika 1.** Strukturne formule sfingozina, sfinganina i 4-hidroksisfinganina, adaptirano iz [5].

Najjednostavniji sfingolipidi su ceramidi koji se sastoje od dugog N-acilnog lanca sa 16–26 ugljikovih atoma. Varijacije u duljini alkilnog lanca uzrokovane su postojanjem 6 različitih ceramid sintaza koje kataliziraju nastanak ceramida različitih duljina. Na Slici 2. prikazana je struktura ceramida s 18 C-atoma s obzirom da kod sisavaca jedino taj ceramid može poslužiti kao prekursor za nastanak kompleksnijih sfingolipida [6, 7].



**Slika 2.** Strukturna formula ceramida s 18 C-atoma, adaptirano iz [7].

Kompleksni sfingolipidi nastaju supstitucijom terminalne hidroksilne skupine ceramida fosfatnom skupinom i šećernim ostacima. S obzirom na različite supstituente, kompleksni sfingolipidi dijele se na: cerebrozide (glukožilceramid te galaktožilceramid), sulfatide, globozide, ganglioziide i sfingomijeline (Slika 3.) [7].





**Slika 3.** Strukturne formule kompleksnih glikosfingolipida i fosfosfingolipida, adaptirano iz [7].

Kompleksni sfingolipidi, glikosfingolipidi i fosfosfingolipidi, primarno su strukturne komponente plazmatske membrane. Cerebrozidi, sulfatidi, globozidi i gangliozidi čine četiri glavne vrste glikosfingolipida, a formiraju se dodatkom šećernog ostatka na ceramid. Cerebrozidi su najzastupljeniji glikosfingolipidi u živčanom tkivu mozga, a izgrađeni su od ceramida koji je supstituiran glukozom, odnosno galaktozom, pri čemu nastaju glukocerebrozid (glukozilceramid) i galaktozilcerebrozid (galaktozilceramid). Također, dodatkom sulfatne skupine cerebrozidima, nastaju sulfatidi, glikozilacijom cerebrozida nastaju globozidi, a dodatkom sijalinske kiseline gangliozidi kao najkompleksniji sfingolipidi [7].

Sfingomijelin (SM) je jedini kompleksni sfingolipid koji je također i fosfolipid, a sastoji se od fosforilkolina ili fosfoetanolamina povezanog na terminalnu hidroksilnu skupinu ceramida. Fosforilkolin i fosfoetanolamin čine polarni dio, dok ceramid čini nepolarni dio molekule SM-a. Kao jedini fosfosfingolipid, on se nalazi u životinjskim staničnim membranama, posebno u mijelinskoj ovojnici koja pokriva aksone živčanih stanica [8].

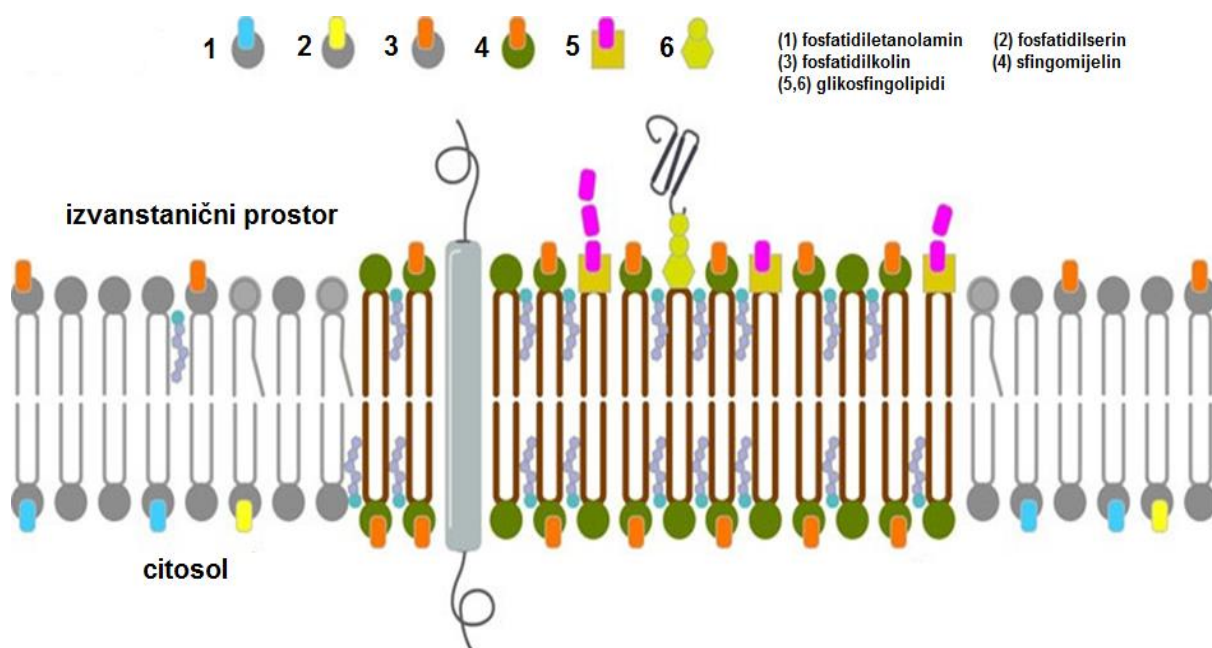
## **2.2. Uloga sfingolipida u izgradnji stanične membrane**

Biološke se membrane sastoje od lipidnog dvosloja s uklopljenim membranskim proteinima. Kod eukariota, membrane su primarno izgrađene od fosfolipida, kolesterola i sfingolipida. Sastav lipida na vanjskoj i unutrašnjoj površini membrane je drukčiji čime se odražavaju i različite funkcije membrane. Lipidni dvosloj je fluidan, a sastoji se od amfipatskih molekula lipida, najviše od fosfolipida. Pet glavnih fosfolipida u plazmatskoj membrani kod sisavaca su: fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i SM, te fosfatidilinozitol u manjim količinama. Fosfolipidi se sastoje od polarne glave i dva hidrofobna ugljikovodična lanca, izgrađena od masnih kiselina. Jedan rep se inače sastoji od nezasićene masne kiseline s jednom ili više dvostrukih cis-veza, dok se drugi rep sastoji od zasićene masne kiseline. Upravo zbog razlike u duljini i zasićenosti, ugljikovodični lanci fosfolipida utječu na fluidnost membrane radi pakiranja u guste slojeve. Molekule

kolesterola smanjuju permeabilnost membrane orijentirajući hidroksilnu skupinu prema polarnom dijelu fosfolipida. Samim time smanjuje se pokretljivost ugljikovodičnih lanaca fosfolipida te mogućnost faznih prijelaza [9, 10].

Raspoređenost lipida u membranama mijenja se ovisno o različitim organelama. Sfingolipidi se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu (ER) i membranama Golgijevog tijela te se prenose do plazmatske membrane, gdje izgrađuju vanjski dio membrane. 10-20% plazmatske membrane čine sfingolipidi, koji mogu formirati domene za organiziranje proteina za signaliziranje, izgrađujući pritom komplekse sa sterolima [10].

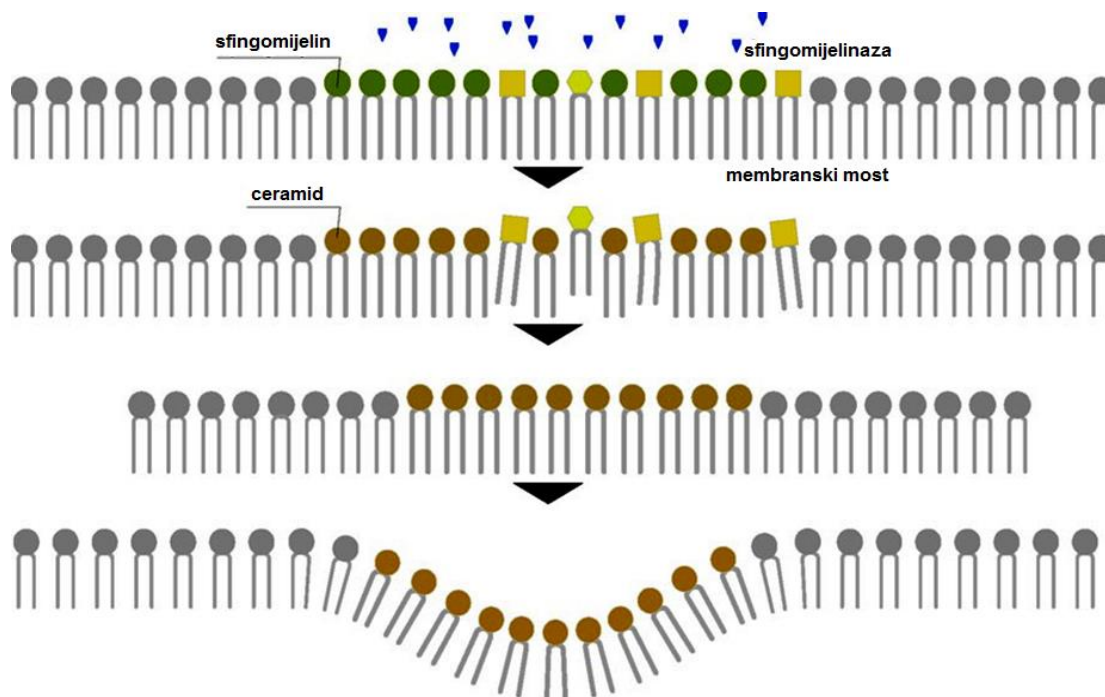
Građa vanjskog i unutarnjeg sloja membrane razlikuje se po sastavu lipida. Citoplazmatski, odnosno unutarnji sloj membrane sastoji se od aminofosfolipida kao što su fosfatidilserin i fosfatidiletanolamin, dok se vanjski sloj sastoji od SM-a, fosfatidilkolina i glikolipida (Slika 4.). SM, zajedno s kolesterolom i glikosfingolipidima, izgrađuje membranske mostove u plazmatskoj membrani [11].



**Slika 4.** Raspoređenost membranskih lipida u staničnoj membrani, adaptirano iz [11].

Također, pojedini membranski mostovi izgrađeni su od ceramida, koji služi kao hidrofobni lipidni sekundarni glasnik za provođenje signala. Membranski mostovi su glavno mjesto za djelovanje enzima sfingomijelinaze koji katalizira razgradnju SM-a do ceramida. Na Slici 5. prikazana je modifikacija membranskih lipidnih mostova uslijed

nastanka ceramida razgradnjom SM-a uz enzim sfingomijelinazu. Prilikom nastanka ceramida dolazi do izdvajanja ostalih lipida iz membrane te nastaju membranske platforme bogate ceramidom (CRP, eng. *ceramide-rich platforms*) [11].



**Slika 5.** Nastanak membranskih platformi bogatih ceramidom, adaptirano iz [11].

Ceramidi se, za razliku od SM-a, ne miješaju s kolesterolom, već se vežu međusobno i tvore koncentrirane mikro-domene. Dugolančani zasićeni ceramidi, stabilizirani vodikovim vezama i van der Waalsovima silama, induciraju fazno razdvajanje fosfolipidnog dvosloja. S obzirom da polarni dio ceramida omogućava gusto pakiranje, ceramidi ne stvaraju komplekse s ostalim lipidima, već tvore CRP [11]. Te platforme služe za modifikaciju receptora i signalnih molekula kako bi se olakšala stanična signalizacija. Modifikacija receptornih molekula unutar CRP-a rezultira grupiranjem tih molekula, čime se povećava njihova gustoća i učinkovitost prijenosa signala. Također, CRP mogu povećati ili smanjiti broj signalnih molekula koje utječu na provođenje signala. Grupiranje tih molekula blizu klastera receptora potpomaže prijenosu aktivacijskog signala [12].

Sfingolipidi ne sudjeluju samo kao gradivni materijali, već utječu i na određene regulatorne procese u stanicama. Različita koncentracija pojedinih sfingolipida ima utjecaj na diferencijaciju neurona, sinaptičku transmisiju i stabilnost mijelinske ovojnice. Svaka

promjena u metabolizmu sfingolipida dovodi do pogrešnog raspoređivanja sfingolipida u plazmatskoj membrani, što dovodi do razvijanja pojedinih neuroloških oboljenja [12, 13].

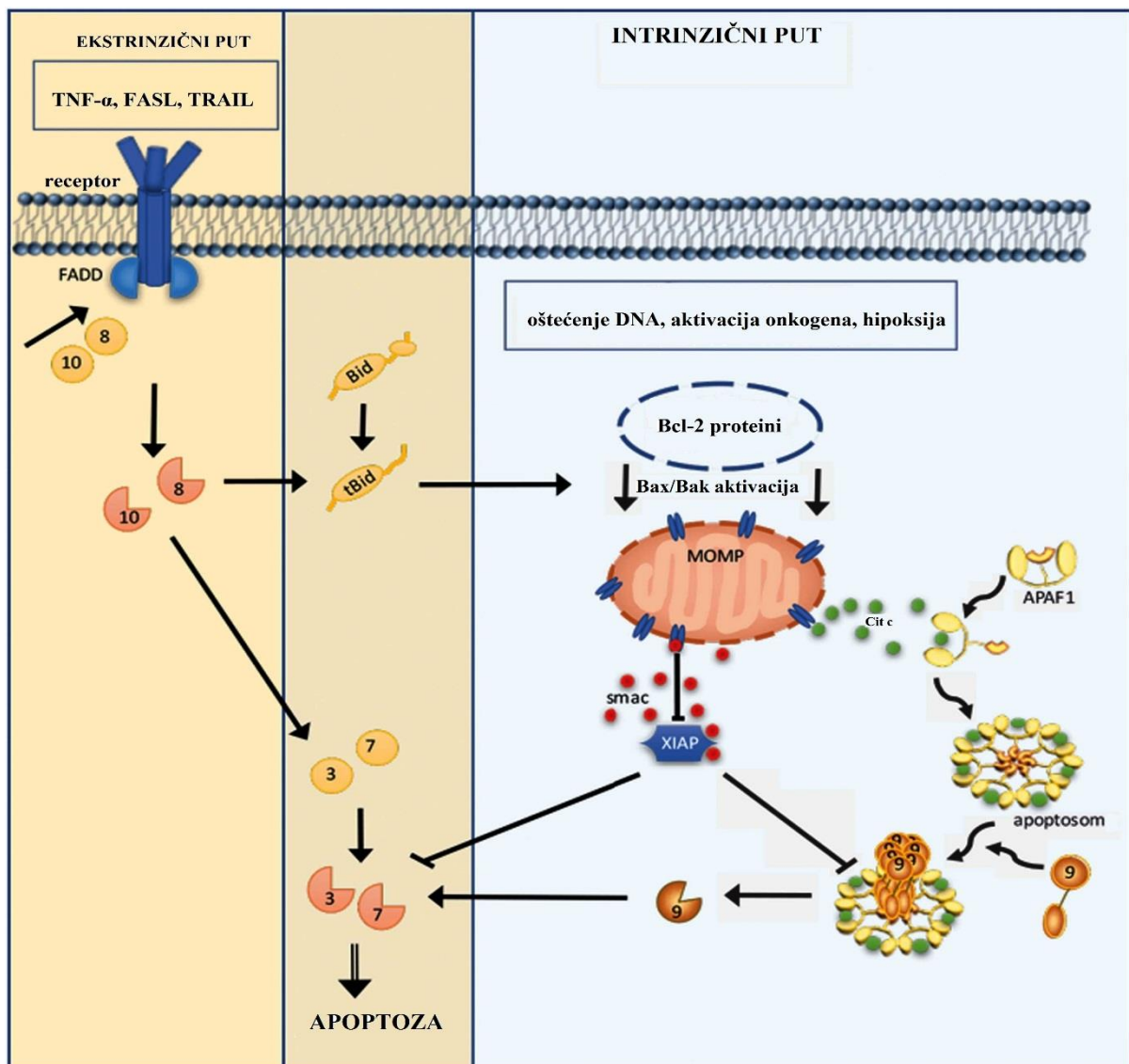
### 2.3. Uloga sfingolipida u apoptozi i autofagiji

Apoptoza i autofagija su dva glavna oblika programirane stanične smrti. Apoptoza je primarno stanična smrt, dok autofagija predstavlja zaštitni proces stanice koji može pridonijeti staničnoj smrti. Pojedini sfingolipidi mogu sudjelovati u apoptozi i autofagiji. Za ravnotežu između ova dva procesa najviše su odgovorni ceramid i sfingozin-1-fosfat (S1P) koji međusobno tvore sfingolipidni reostat. Ceramid je glavni sfingolipid koji sudjeluje u aktivaciji intrinzičnog ili mitohondrijskog puta apoptoze. Njegova povećana koncentracija sprječava rast stanice i inducira apoptozu, dok S1P pomiče ravnotežu prema autofagiji, odnosno prema staničnom preživljavanju. Za povećanje koncentracije ceramida je najviše odgovorna upotreba kemoterapije pri liječenju raka, dok do povećanja S1P-a dolazi zbog gladovanja pri čemu se izražava zaštitna uloga S1P-a u preživljavanju stanice [14, 15].

Intrinzični put apoptoze predstavlja uništavanje stanice koje je uvjetovano permeabilizacijom vanjske mitohondrijske membrane (MOMP, *eng. mitochondrial outer membrane permeabilization*). MOMP je ireverzibilni korak koji je kontroliran pro- i anti-apoptotskim proteinima iz Bcl-2 obitelji. Anti-apoptotski proteini uključuju Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-b i Bcl-w; dok su pro-apoptotski proteini primarno Bax i Bak, te proteini s BH3 domenom. Iako nije točno određen način na koji se odvijaju interakcije između njih međusobno, poznato je kako ceramid i S1P utječu na MOMP aktivacijom ili inhibicijom tih proteina. Ceramid može inducirati apoptozu ili modifikacijom vanjske mitohondrijske membrane ili aktivacijom Bcl-2 proteina [16].

Na Slici 6. prikazani su ekstrinzični i intrinzični putevi apoptoze uzrokovani različitim čimbenicima koji utječu na Bcl-2 proteine. Intrinzični put apoptoze može biti pokrenut oštećenjem DNA, aktivacijom onkogena i hipoksijom. Nakon što se aktiviraju, Bax i Bak uzrokuju MOMP pri čemu dolazi do ispuštanja pro-apoptotskih međumembranskih proteina, među kojima su najbitniji citokrom c (Cit c) i sekundarni mitohondrijski proizveden aktivator kaspaze (smac, *eng. second mitochondria-derived*

*activator of caspases*). Cit c povezuje se s Apaf-1 pri čemu dolazi do njegove oligomerizacije i stvaranja multiproteinskog kompleksa-apoptosoma koji aktivira prokaspazu-9 koja sadrži domenu za aktivaciju kaspaza. Aktivirana kaspaza-9 potom aktivira ostale dvije kaspaze-3 i -7. U isto vrijeme, smac se veže za proteine koji inhibiraju apoptozu (XIAP, eng. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) te ih pritom inhibira i uzrokuje aktivaciju kaspaze-9, što dovodi do stanične smrti [17, 18].

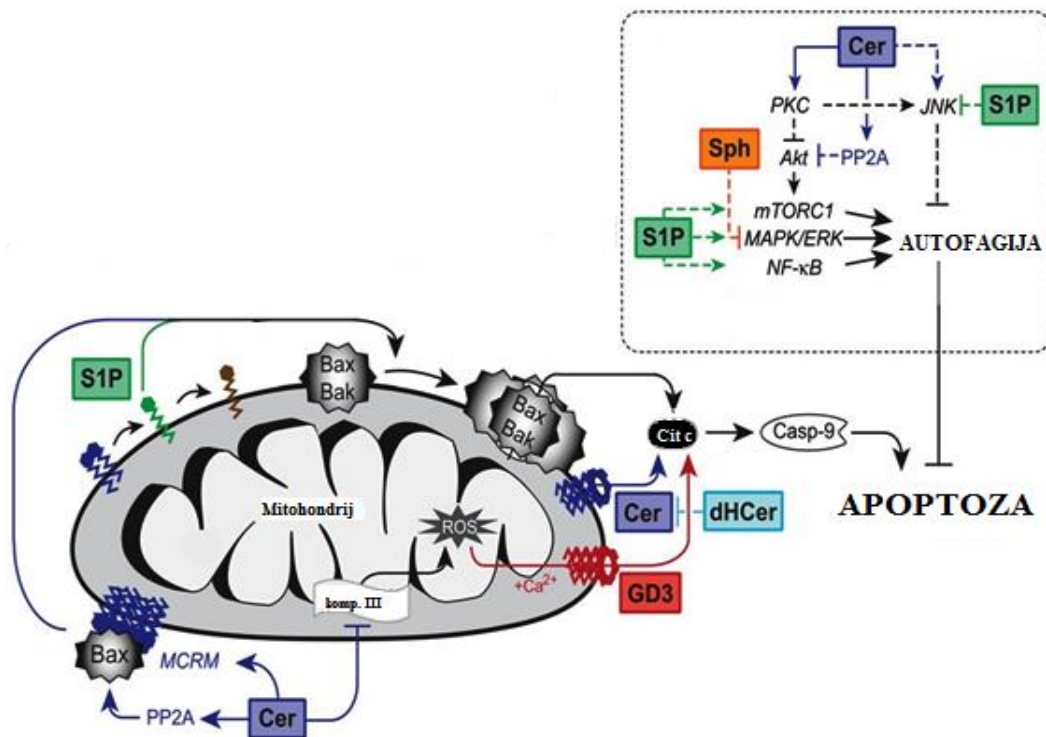


**Slika 6.** Prikaz ekstrinzičnog i intrinzičnog puta apoptoze, adaptirano iz [17].

Također, od značajnog utjecaja je i ekstrinzični put apoptoze koji se odvija preko receptora smještenih na površini vanjske membrane stanice, odnosno preko njegovih liganda  $TNF-\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), FASL (eng. *Fas ligand*) i TRAIL (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Zajedno s proteinom FADD-om (eng. *Fas-*

*associated protein with death domain*) i prokaspazom-8 ili -10, oni tvore signalni kompleks za induciranje apoptoze. Navedeni kompleks potpomaže dimerizaciju tih kaspaza koje aktiviraju kaspaze-3 i -7 ili dolazi do modifikacije BH3 proteina Bid čime se inducira apoptoza putem aktivacije Bax-a i Bak-a [17, 18].

Na Slici 7. prikazan je mehanizam mitohondrijskog puta apoptoze, koji je induciran visokom koncentracijom ceramida. Ceramid (Cer) inhibira mitohondrijski kompleks III pri čemu dolazi do nastanka reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, *eng. reactive oxygen species*) i ispuštanja Cit c koji aktivira kaspazu-9 (Casp-9) što dovodi do apoptoze. Također, ceramid dovodi do aktivacije proteina Bax-a defosforilacijom enzimom protein fosfatazom 2A (PP2A) i nastanka mitohondrijskih ceramidom bogatih makro-domena (MCRM, *eng. mitochondrial ceramide-rich macrodomains*) [19].



**Slika 7.** Mitohondrijski put apoptoze induciran ceramidom, adaptirano iz [19].

Nadalje, ceramid može aktivirati i protein kinazu C (PKC), koja pridonosi apoptozi aktivacijom Jun N-terminalne kinaze (JNK). JNK dalje inhibira anti-apoptotske proteine iz Bcl-2 obitelji fosforilacijom ili potiče ispuštanje Cit c. Ukoliko dođe do povećanja koncentracije S1P-a, poništava se utjecaj ceramidom inducirane apoptoze. S1P pri

povećanim koncentracijama aktivira mTORC1<sup>1</sup> (eng. *mammalian target of rapamycin complex 1*), MAPK/ERK<sup>2</sup> (eng. *mitogen activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase*) i NF-κB<sup>3</sup> (eng. *nuclear factor kappa B*) signalne puteve preko staničnih receptora pri čemu se ravnoteža pomiče prema autofagiji [19, 20].

### 3. Metabolizam i intracelularni transport sfingolipida

U najjednostavnijem obliku, sfingozin, sfinganin i 4-hidroksisfinganin služe kao okosnice na kojima se dalje izgrađuju kompleksniji sfingolipidi. Iako postoje velike strukturne razlike među sfingolipidima, njihova sinteza i razgradnja su povezane zajedničkim kataboličkim i anaboličkim putevima. *De novo* sinteza sfingolipida započinje nadogradnjom nesfingolipidnih prekursora na citoplazmatskoj strani ER-a, gdje četiri enzima upravljaju sintezom ceramida [21].

#### 3.1. *De novo* sinteza u ER-u

Prvi korak u sintezi sfingolipida katalizira enzim serin-palmitoil-transferaza (SPT). Reakcija započinje kondenzacijom citosolne aminokiseline serina i aktivirane masne kiseline palmitoil-CoA pri čemu nastaje 3-ketosfinganin. Nakon toga, uz NADPH koji ima ulogu prenositelja elektrona, enzim 3-ketodihidrosfingozin reduktaza (KDHR) katalizira redukciju 3-ketosfinganina do dihidrosfingozina. Dihidrosfingozin se dalje acilira aktiviranim masnim kiselinama upotrebom šest različitih ceramid-sintaza (CerS1-6) pri čemu nastaje dihidroceramid, odnosno cermidi različitih duljina [21].

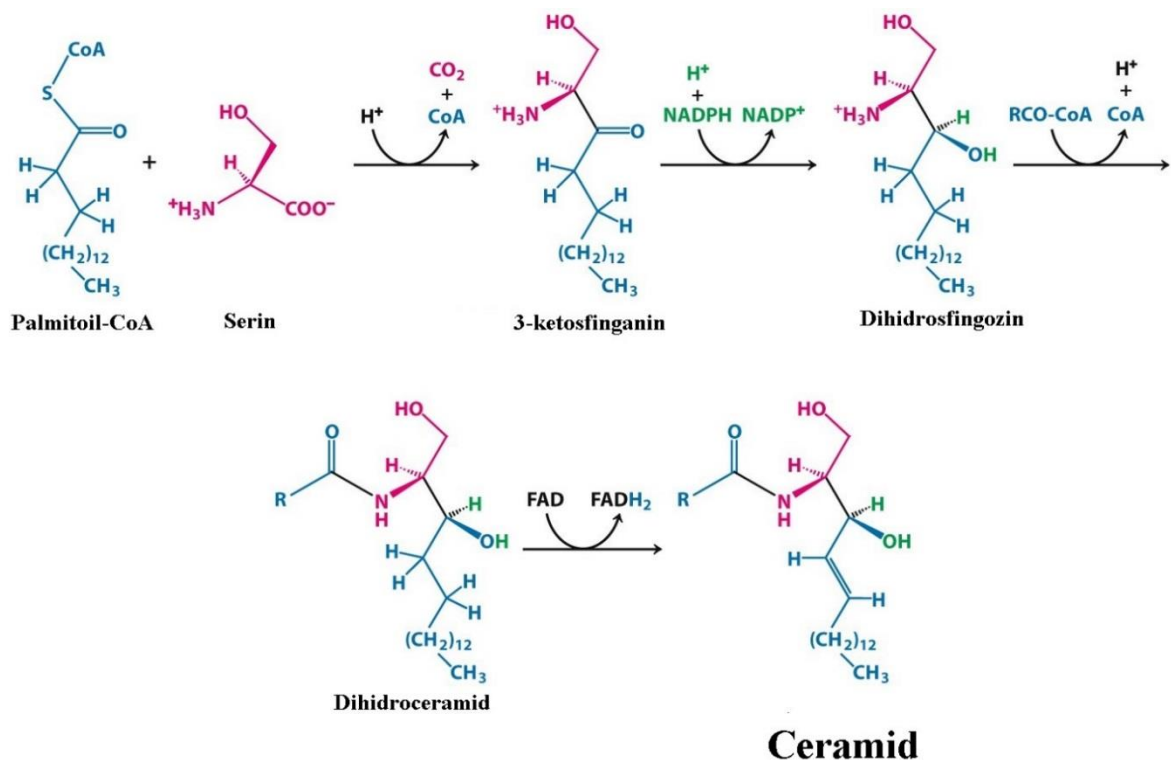
Četvrti korak čini dehidratacija dihidroceramida i uvođenje trans-4,5-dvostruke veze za nastanak ceramida. Taj korak je kataliziran enzimom dihidroceramid-desaturazom uz FAD koji prima elektrone otpuštene s dehidratiziranog dihidroceramida [21, 22]. Na Slici 8. prikazana je prva faza u sintezi sfingolipida, odnosno koraci u sintezi ceramida.

---

<sup>1</sup> proteinski kompleks koji služi kao senzor za kontrolu sinteze proteina

<sup>2</sup> proteini u stanici koji prenose signal od receptora na plazmatskoj membrani do DNA u jezgri

<sup>3</sup> proteinski kompleks koji kontrolira transkripciju DNA



**Slika 8.** Mehanizam sinteze ceramida u ER-u, adaptirano iz [23].

### 3.2. Sintaza kompleksnih sfingolipida u Golgijevom tijelu

Nastali ceramid prenosi se do Golgijevog tijela radi sinteze kompleksnih fosfosfingolipida i glikosfingolipida. Sintaza SM-a katalizirana je enzimom sfingomijelin sintazom (SMS). Reakcija započinje prijenosom fosforilkolina ili fosfoetanolamina na C-1 ceramida pri čemu nastaju SM i diacilglicerol (DAG). Postoje dva izomera sfingomijelin sintaze, SMS1 i SMS2. SMS2 se nalazi na trans strani Golgijevog tijela, dok se SMS1 nalazi na lumenu ER-a [24, 25].

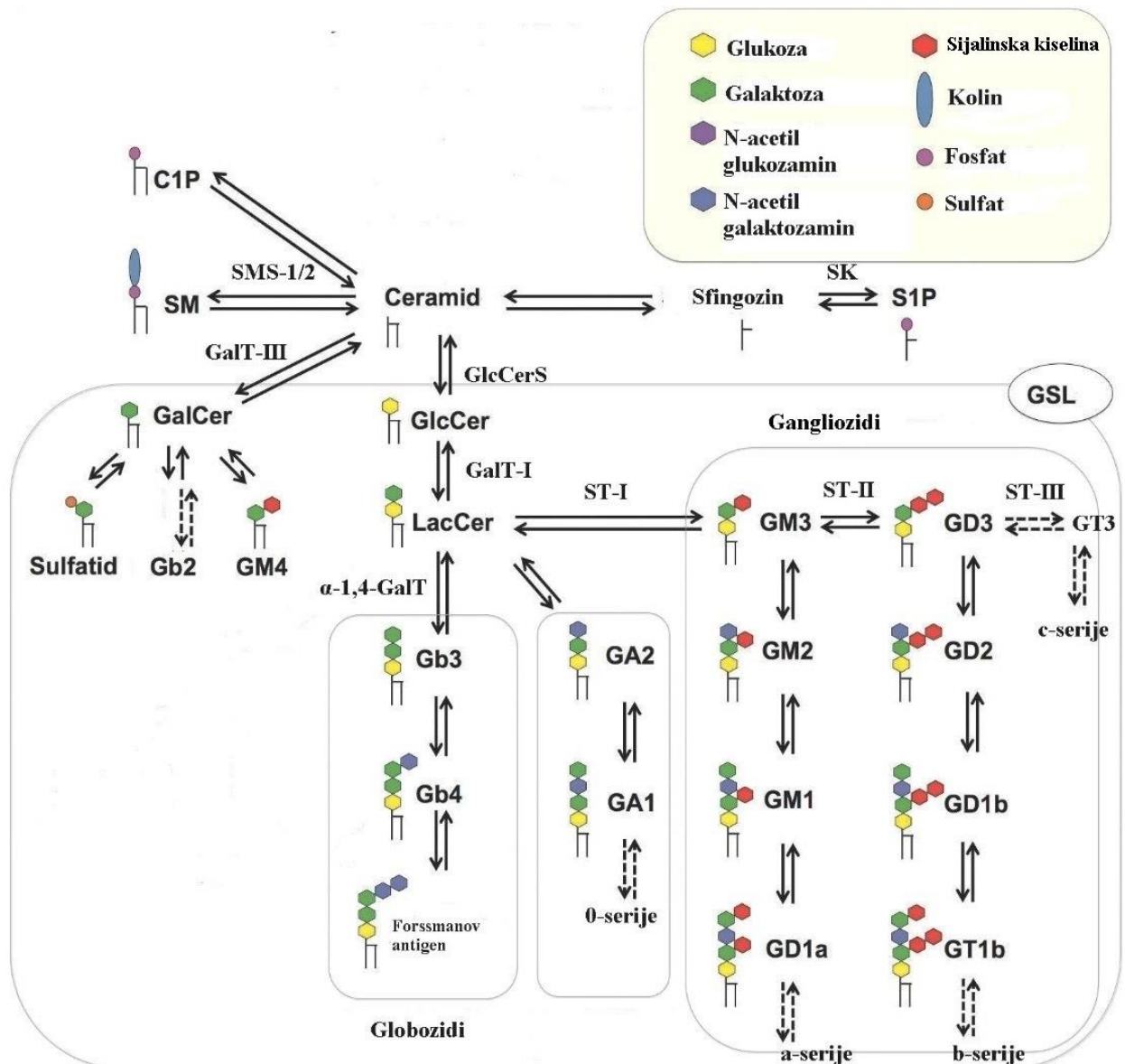
Sinteza glikosfingolipida cerebrozida odvija se uz pomoć enzima galaktoziltransferaze III (GalT-III), koji se nalazi u ER-u, i glukozilceramid sintaze (GlcCerS), koja se nalazi na *cis* strani Golgijevog tijela. Heksozni šećeri koji supstituiraju ceramid su aktivirane UDP-galaktoza i UDP-glukoza. Sintaza galaktozilceramida odvija se primarno na citosolnoj strani ER-a dodatkom UDP-galaktoze, dok u Golgijevom tijelu dodatkom UDP-glukoze nastaje glukozilceramid (GlcCer) [25, 26].



Laktozilceramid (LacCer) je prekursor za sintezu gangliozida, a nastaje prijenosom galaktoze s aktiviranog UDP-galaktozilceramida na UDP-glukozilceramid, što je katalizirano galaktoziltransferazom I. S obzirom da se sinteza gangliozida odvija na lumenu Golgijevog tijela, potrebna je translokacija galaktozilceramida. Biosinteza gangliozida katalizirana je glikoziltransferazama na lumenu Golgija, osim monosialogangliozida 4 (GM4) čiji prekursor nije LacCer. LacCer, zajedno s monosialogangliozidom 3 (GM3), disialogangliozidom 3 (GD3) te trisialogangliozidom 3 (GT3) služi kao prekursor za sintezu kompleksnih gangliozida 0-, a-, b- i c-serija [27].

Gangliozidi su sfingolipidi koji se sastoje od sijalinske kiseline. Oni se mogu sastojati od jedne ili više sijalinskih kiselina (*N*-acetilneuraminska i *N*-glikolilneuraminska). Ganglio-serije koje sadrže 0, 1, 2 ili 3 ostatka sijalinske kiseline povezana na C3 unutarnjeg galaktozalnog ostatka definiraju se kao 0-, a-, b- i c-serije. Također, gangliozidi koji imaju sijalinsku kiselinu povezanu na unutarnji *N*-acetilgalaktozaminski ostatak definiraju se kao alfa-serije [28].

Prvi korak u sintezi gangliozida je reakcija katalizirana ceramid glikoziltransferazama, osim GM4 koje se derivira iz galaktozilceramida. Prvo dolazi do nastanka najjednostavnijeg gangliozida GM3, koji je sintetiziran dodatkom aktivirane CMP-sijalinske kiseline LacCer-u, kataliza GM3 sintazom (ST-I, odnosno sijaliltransferaza). GD3 i GT3 sintetiziraju se dodatkom sijalinske kiseline na GM3 uz ST-II i ST-III. Nastali GD3 i GT3 služe za daljnju sintezu a-, b- i c-serija. 0-serije sintetiziraju se iz LacCer-a uz pomoć glikozil-transferaza samo drukčijim putem. Globozidi, odnosno globotriazolceramidi (Gb3), također se sintetiziraju iz LacCer-a dodatkom galaktoze na poziciju  $\alpha$ -1,4 što je katalizirano  $\alpha$ -1,4-galaktozil-transferazom ( $\alpha$ -1,4-GalT) [28, 29, 30]. Na Slici 9. prikazana je sinteza kompleksnih fosfosfingolipida i glikosfingolipida.

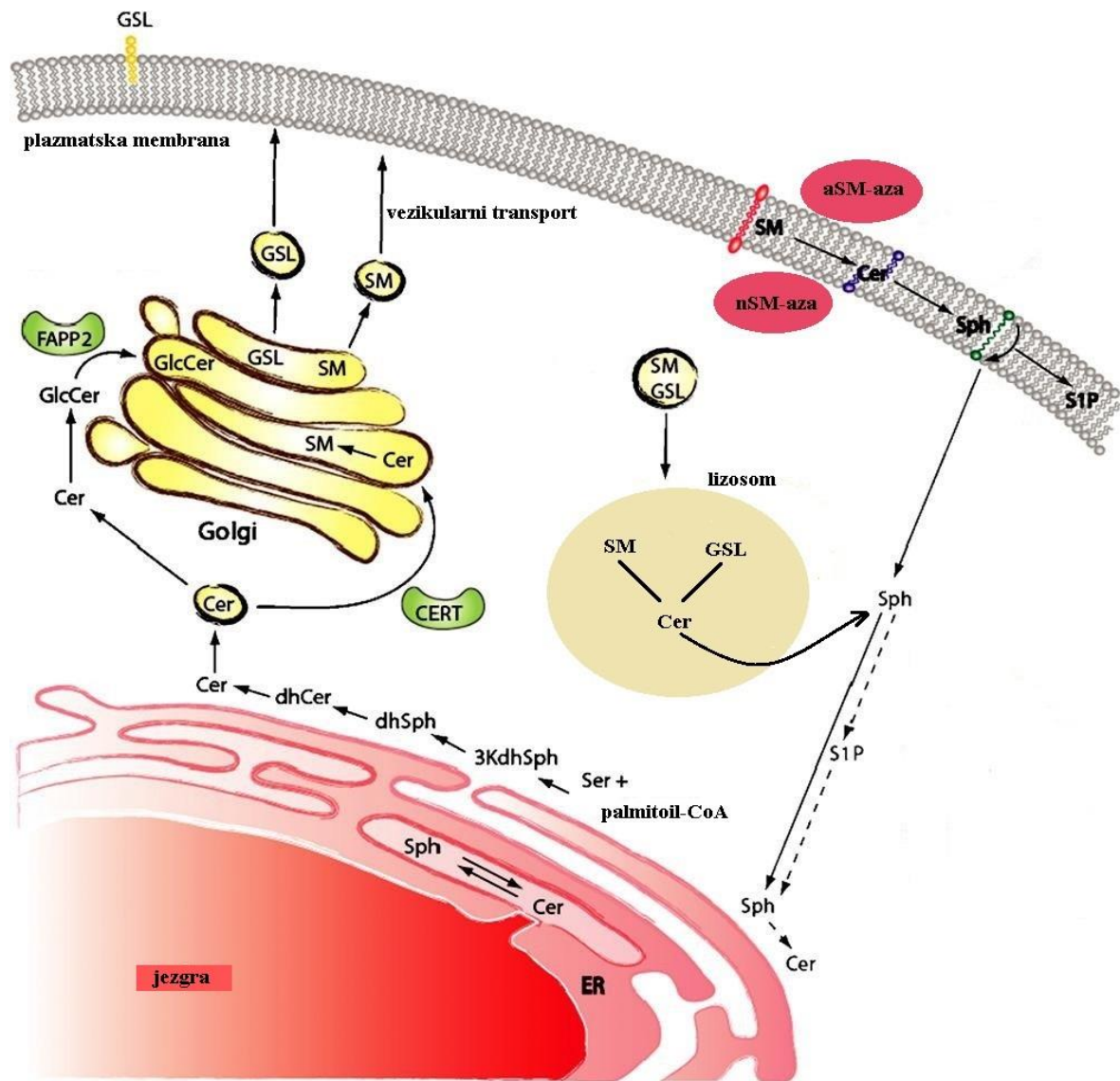


Slika 9. Sinteza kompleksnih sfingolipida, adaptirano iz [30].

### 3.3. Transport i katabolizam kompleksnih sfingolipida

Ceramid sintetiziran u ER-u prenosi se do Golgijevog tijela putem ceramid transportnih proteina (CERT) ili vezikula. Sinteza SM-a bazira se na prijenosu ceramida putem CERT-a, dok se sinteza glukozilceramida (GlcCer) odvija pomoću vezikularnog transporta. Transportni protein FAPP2 (*eng. phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2*) prenosi GlcCer sa citosolne na luminalnu stranu Golgijevog tijela, gdje se odvija sinteza glikosfingolipida (GSL). Ovaj je mehanizam potpomognut ABC transportnim P-

glikoproteinima. Nadalje, sintetizirani SM i kompleksni GSL transportiraju se do plazmatske membrane vezikularnim transportom. SM može metabolizirati do ceramida kiselom sfingomijelinazom (aSM-aza) na vanjskom dijelu ili neutralnom sfingomijelinazom (nSM-aza) na unutarnjem dijelu membrane. SM i GlcCer razgrađuju se do sfingozina u lizosomu, koji može poslužiti za resintezu ceramida [31,32]. Na Slici 10. prikazan je transport ceramida i kompleksnih sfingolipida.



**Slika 10.** Intracelularni transport i katabolizam sfingolipida, adaptirano iz [32].

SM i GSL se transportiraju do plazmatske membrane gdje prolaze reakcije razgradnje ili resinteze. Njihova razgradnja odvija se pri kiselom pH, primarno u lizosomima. SM se prevodi do ceramida uz pomoć SM-aza, dok kod GSL-a dolazi do postepenog otpuštanja šećernih ostataka uz hidrolaze koje imaju optimalno djelovanje pri

kiselom pH. Ceramid se dalje prevodi do sfingozina kako bi mogao izaći iz lizosoma, što je katalizirano kiselim ceramidazama. Sfingozin se dalje upotrebljava ili za ponovnu sintezu ceramida ER-u ili za sintezu S1P-a putem sfingozin kinaza (SK). Ovi metabolički putevi pokazuju bitnu ulogu pravilne razgradnje i skladištenja sfingolipida u staničnim signalnim procesima s obzirom da svaka nepravilnost može dovesti do njihovog nakupljanja i narušavanja ravnoteže [33].

### 3.4. Regulacija sinteze sfingolipida

Ključni korak u sintezi sfingolipida odvija se putem enzima SPT-e, koji katalizira kondenzaciju L-serina i palmitoil-CoA. SPT je membranski heterodimer s dvije podjedinice SPTLC1 i SPTLC2 čija aktivnost ovisi o prisutnosti kofaktora piridoksal-fosfata (PLP). Jedino SPTLC2 sadrži katalitički lizinski ostatak (Lys<sup>256</sup>) koji na sebe veže PLP, koenzim koji određuje slijed vezanja supstrata kako ne bi došlo do sporednih reakcija. Za razliku od SPTLC2, SPTLC1 nema Lys<sup>256</sup> ostatak, ali sadrži druge ostatke odgovorne za katalizu. Poznate su dvije male podjedinice ssSPTa (*eng. small SPT subunit a*) i ssSPTb (*eng. small SPT subunit b*) koje povećavaju maksimalnu katalitičku aktivnost kompleksa SPTLC1/SPTLC2 i utječu na supstratnu specifičnost. Također, do aktivacije SPT-a dolazi pri niskim koncentracijama ceramida koje signaliziraju da preteča za sintezu kompleksnih lipida nema dovoljno [34, 35, 36].

Na aktivnom mjestu SPT-a, PLP formira unutarnji aldimin sa  $\epsilon$ -amino skupinom Lys<sup>265</sup>. Unutarnji aldimin prolazi transaldiminaciju s prvim supstratom L-serinom za nastanak PLP-L-serina (vanjski aldimin). Nakon povezivanja za drugi supstrat, palmitoil-CoA, dolazi do deprotoniranja  $\alpha$ -C atoma i nastanka kinoidnog međuprodukta.  $\alpha$ -C atom kinoidnog međuprodukta napada palmitoil-CoA (Claisenova kondenzacija) kako bi nastao produkt koji dekarboksilacijom daje drugi kinoidni međuprodukt. Ponovno protoniranje daje vanjski aldimin PLP-KDS. Otpuštanjem 3-ketodihidrosfingozina (KDS) regenerira se unutarnji aldimin [37].

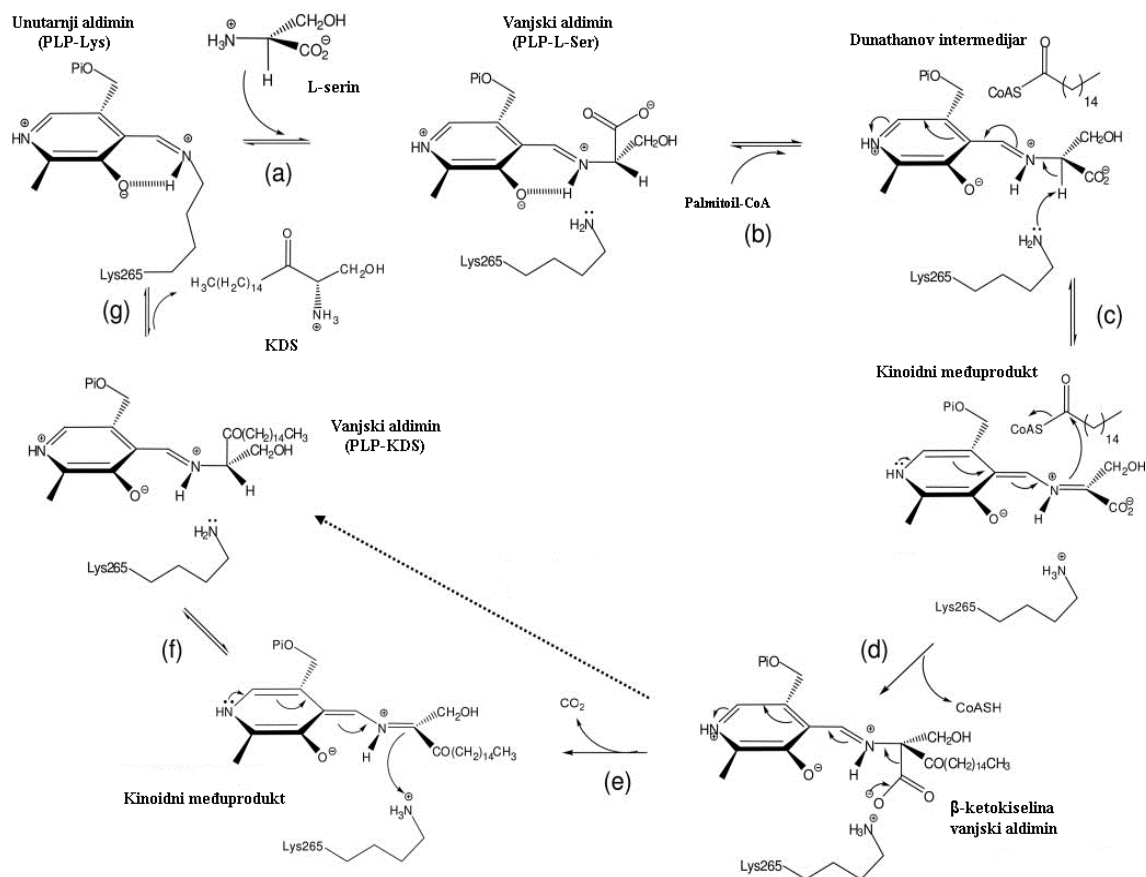
PLP-Lys (unutarnji aldimin) sadrži His<sup>159</sup> ostatak, povezan na piridoksalni prsten, koji je odgovoran za katalitičku aktivnost i stereospecifičnost enzima SPT-a. Taj ostatak regulira  $\alpha$ -deprotonaciju L-serina mijenjanjem konformacije PLP-L-serina (vanjski

aldimin) kako bi se spriječile neželjene reakcije. His<sup>159</sup> također pospješuje protoniranje  $\alpha$ -C atoma drugog kinoidnog međuprodukta radi formiranja PLP-KDS aldimina. S obzirom da je SPT u sisavaca primarno specifična za palmitoil-CoA mogu nastati samo sfingoidne baze s 18-C atoma [37, 38].

Mehanizam kondenzacije L-serina i palmitoil-CoA (Slika 11.):

- a) unutarnji aldimin uz pomoć L-serina prelazi u vanjski aldimin
- b) vezanje drugog supstrata palmitoil-CoA uzrokuje konformacijske promjene pri čemu nastaje Dunathan-ov intermedijar, nastao preklapanjem dvije paralelne  $\pi$ -orbitale
- c) formiranje kinoidnog međuprodukta deprotoniranjem  $\alpha$ -H atoma
- d) hidroliza tioesterske veze i otpuštanje CoA-SH za nastanak  $\beta$ -keto kiselinskog intermedijara
- e) dekarboksilacija za formiranje ketodihidrosfingzinskog kinoida
- f) ponovno protoniranje za formiranje vanjskog aldimina ketodihidrosfingozina
- g) otpuštanje ketodihidrosfingozina i vraćanje enzima u prvobitni oblik.

Također, koraci e) i f) mogu se zaobići drugim mehanizmom koji ne zahtijeva nastanak dodatnog kinoidnog međuprodukta [39].



Slika 11. Mehanizam kondenzacije L-serina i palmitoil-CoA, adaptirano iz [39].

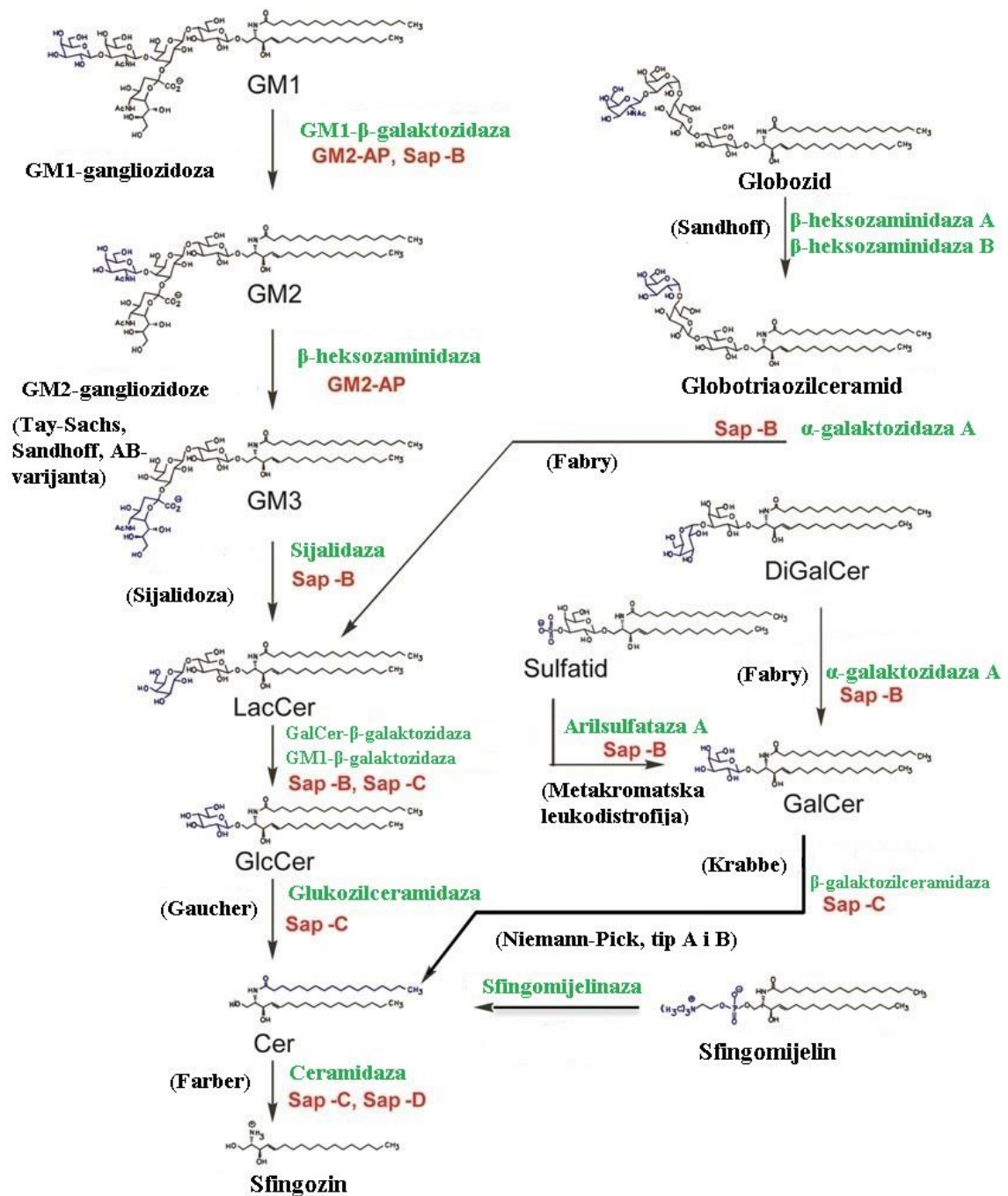
## 4. Disfunkcije metabolizma sfingolipida

### 4.1. Sfingolipidoze

Lizosomske bolesti uzrokovane disfunkcijom metabolizma sfingolipida nazivaju se sfingolipidoze, a nastaju zbog nakupljanja razgradnih produkata u pojedinim organima. Do njihovog nakupljanja dolazi zbog nedostatka enzima za razgradnju u lizosomima ili zbog manjka sfingolipid aktivirajućih proteina (SAP). Sfingolipidoze su grupa monogeniski nasljednih bolesti uvjetovane jednim genom ili parom alela. Osim Fabry-ja koji je recesivna bolest vezana za X spolni kromosom, ostale sfingolipidoze pripadaju autosomnim recesivnim bolestima, gdje podjednako oboljevaju pripadnici oba spola. Homozigoti sadrže dvije kopije alela i kod njih dolazi do obolijevanja, dok su heterozigoti

prijenosnici koji sadrže samo jedan alel zbog čega ne dolazi do izražaja fenotipa [40, 41, 42].

Gotovo svaka sfingolipidoza ima visoku stopu smrtnosti s obzirom da terapije nisu dostupne radi neistraženosti njihove etiologije. Najčešći oblici liječenja su nadomjesna enzimsko terapija (ERT, *eng. enzyme replacement therapy*), transplantacija koštane srži i terapija kemijskim šaperonima. S obzirom na terapijski pristup za sada se najbolje tretiraju Fabry i Gaucher ERT-om. No, iako se u zadnjih 15 godina aktivno istražuju, njihove etiologije još uvijek nisu dobro razrađene [42, 43].



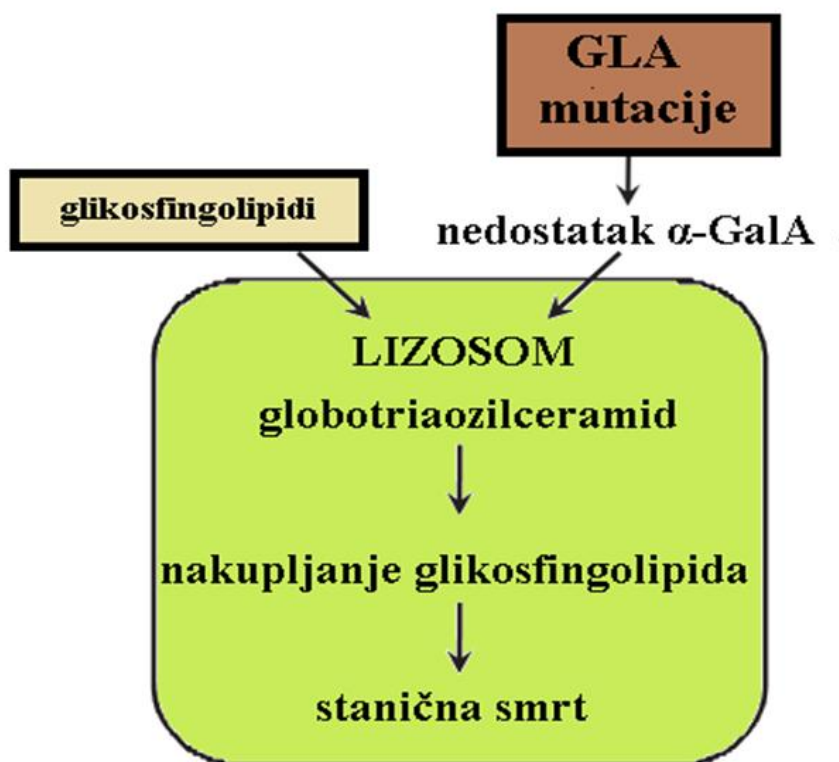
**Slika 12.** Shema nastanka sfingolipidoza, adaptirano iz [43].

Na Slici 12. prikazana je shema nastanka sfingolipidoza, s određenim enzimima i aktivatorskim proteinima te produktima razgradnje. Od prikazanih bolesti, dalje će detaljnije biti razrađene Anderson-Fabry, Gaucher, Niemann-Pick i GM2-ganglioziidoze s obzirom da kod njih dolazi do nakupljanja najbitnijih kompleksnih sfingolipida.



### 4.1.1. Anderson-Fabry

Anderson-Fabry je bolest vezana za spolni X kromosom koju uzrokuju abnormalnosti na *GLA* genu. Mutacije na *GLA* genu odgovorne su za manjak lizosomskog enzima  $\alpha$ -galaktozidaze A uslijed čega dolazi do nakupljanja glikosfingolipida, primarno Gb3-a, u organima. To se nakupljanje manifestira kao progresivno otkazivanje bubrega i srčani problemi. Također, kod oboljelih se javlja nakupljanje Gb3-a u lizosomima pojedinih stanica kao što su renalne, srčane te u neuralnim stanicama s karakterističnim prezentacijama: akroparestezija<sup>4</sup>, anhidroza<sup>5</sup> te angiokeratom<sup>6</sup>. S obzirom da se Gb3 nakuplja u neuronima dorzalnog korijena ganglija, to može dovesti do stanične apoptoze te pojave neuropatija. Na Slici 13. prikazana je shema nakupljanja glikosfingolipida u lizosomima, kao odgovor na manjak enzima  $\alpha$ -galaktozidaze A [44].



**Slika 13.** Nakupljanje glikosfingolipida u lizosomima, adaptirano iz [44].

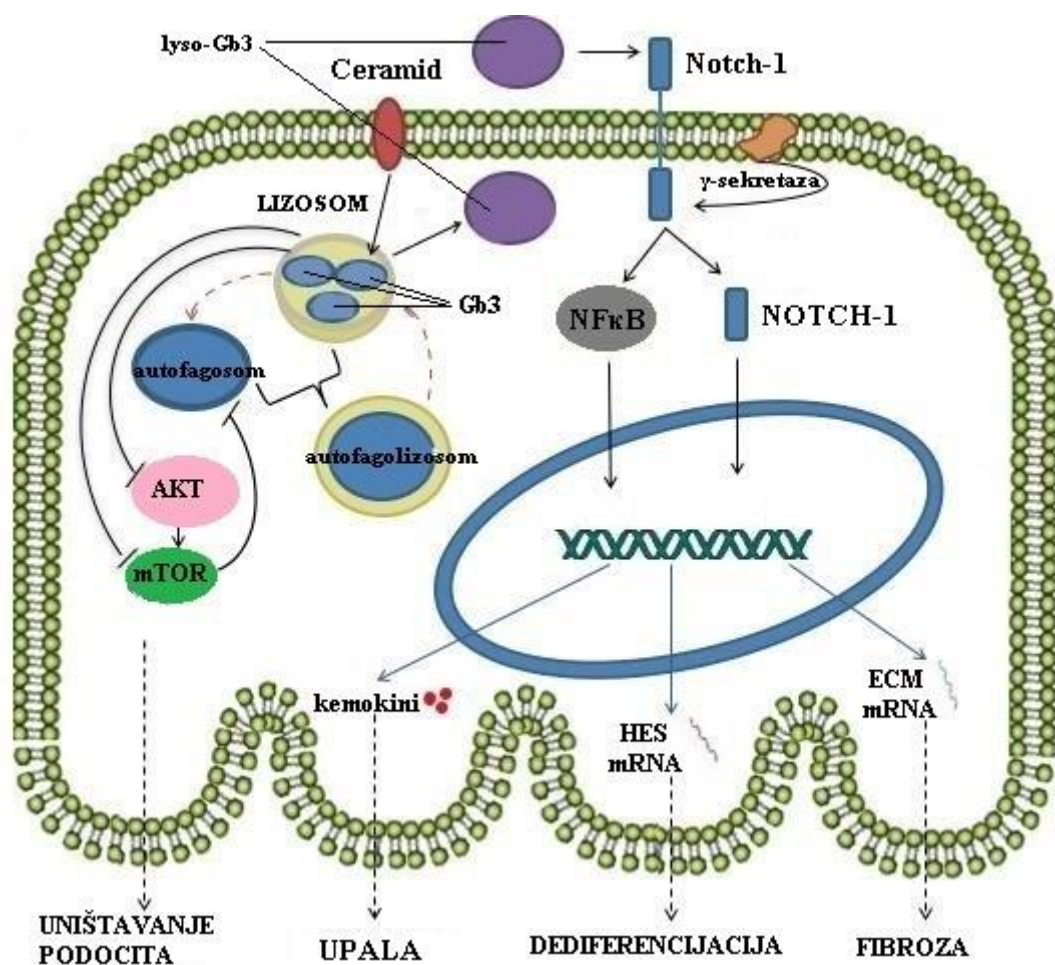
<sup>4</sup> neurološki senzorni poremećaj kojega karakterizira trnjenje i pečenje na ekstremitetima

<sup>5</sup> nemogućnost znojenja

<sup>6</sup> vaskularne kožne lezije

Enzim  $\alpha$ -galaktozidaza A katalizira hidrolitičko cijepanje terminalnog galaktoznog ostatka Gb3-a. Manjak  $\alpha$ -galaktozidaze A dovodi do nakupljanja Gb3-a i drugih glikosfingolipida, kao što je globotriaosilsfingozin (lyso-Gb3). Kod Fabryeve bolesti Gb3 se u velikim količinama nalazi i u drugim staničnim organelama kao što su plazmatska membrana, ER i jezgra. Pretpostavljeno je da Gb3 može dovesti do disfunkcije u intracelularnom transportu ili modifikacije membranskih mostova. S obzirom da membranski mostovi ulaze u interakciju s ostalim lipidima i proteinima, narušena je i stanična signalizacija. Također, iako se kod Fabryeve bolesti najviše nakuplja Gb3, on se ne povezuje nužno s kliničkom slikom, već lyso-Gb3 s obzirom da on dovodi do glomerularnog oštećenja u bubrezima oboljelih. Lyso-Gb3 je direktno uključen u staničnu proliferaciju vaskularnog glatkog mišića te također uzrokuje stvaranje posrednika u podocitima koji uzrokuju glomerularno oštećenje [44, 45].

U bubrezima oboljelih od Fabryeve bolesti nalaze se podociti koji sadrže visoke količine Gb3-a, što dovodi do njihovog oštećenja i smrti. Na Slici 14. prikazan je mehanizam stanične signalizacije putem Gb3-a i lyso-Gb3-a, što dovodi do uništavanja podocita, neobično oblikovanih stanica u bubrežnom tjelašcu nefrona. Visoke koncentracije lyso-Gb3-a imaju proinflamatorску ulogu u podocitima aktivacijom NOTCH-1 signalnog puta. Vezanjem na pripadni receptor, protein Notch-1 prolazi serije proteolitičkog cijepanja za aktivaciju pomoću enzima  $\gamma$ -sekretaze pri čemu nastaje domena NICD (*eng. Notch intracellular domain*). Notch-1 pojačava vezanje NF $\kappa$ B-a, koji regulira upalne procese na DNA. Nadalje, NICD se prenosi do jezgre i inducira ekspresiju *HES1* gena pri čemu dolazi do dediferencijacije podocita, proteina iz ekstracelularnog matriksa (ECM, *eng. extracellular matrix proteins*) te kemokina što dovodi do upale. Prema tome, NOTCH aktivacija potiče transkripciju tih gena i gena koji kodiraju ECM pri čemu se inducira dediferencijacija i fibroza podocita [45, 46].



**Slika 14.** Mehanizam aktivacije signalnih puteva za uništavanje podocita prilikom nakupljanja Gb3-a i lyso-Gb3-a, adaptirano iz [46].

Također, nakupljanje Gb3-a u lizosomima inhibira Akt i mTOR puteve pri čemu dolazi do disregulacije signalnih puteva za autofagiju u podocitima. Drugi deacilirani oblik Gb3-a, Lyso-Gb3, sudjeluje u oštećenju podocita potičući upalne procese, fibrozu i dediferencijaciju podocita. On također aktivira NOTCH signalni put preko  $\gamma$ -sekretaze i NF $\kappa$ B-a što dovodi do otpuštanja kemokina<sup>7</sup> [46].

Iako se Fabryeva bolest prenosi po principu vezanom za X kromosom, simptomi mogu biti prisutni i kod žena s normalnim ili smanjenim količinama enzima  $\alpha$ -galaktozidaze A koje su nosioci defektivnog gena. No, i kod njih može doći do jednakih komplikacija kao i kod muškaraca. Fabryeva bolest najčešće se javlja kod muškaraca koji naslijeđuju X-kromosom s defektivnim genom. Žene također naslijeđuju jedan kromosom s defektivnim genom, no s obzirom da one imaju dva X-kromosoma, normalni kromosom

<sup>7</sup> sekundarni proinflamatorni posrednici koji induciraju nakupljanje leukocita na području upale

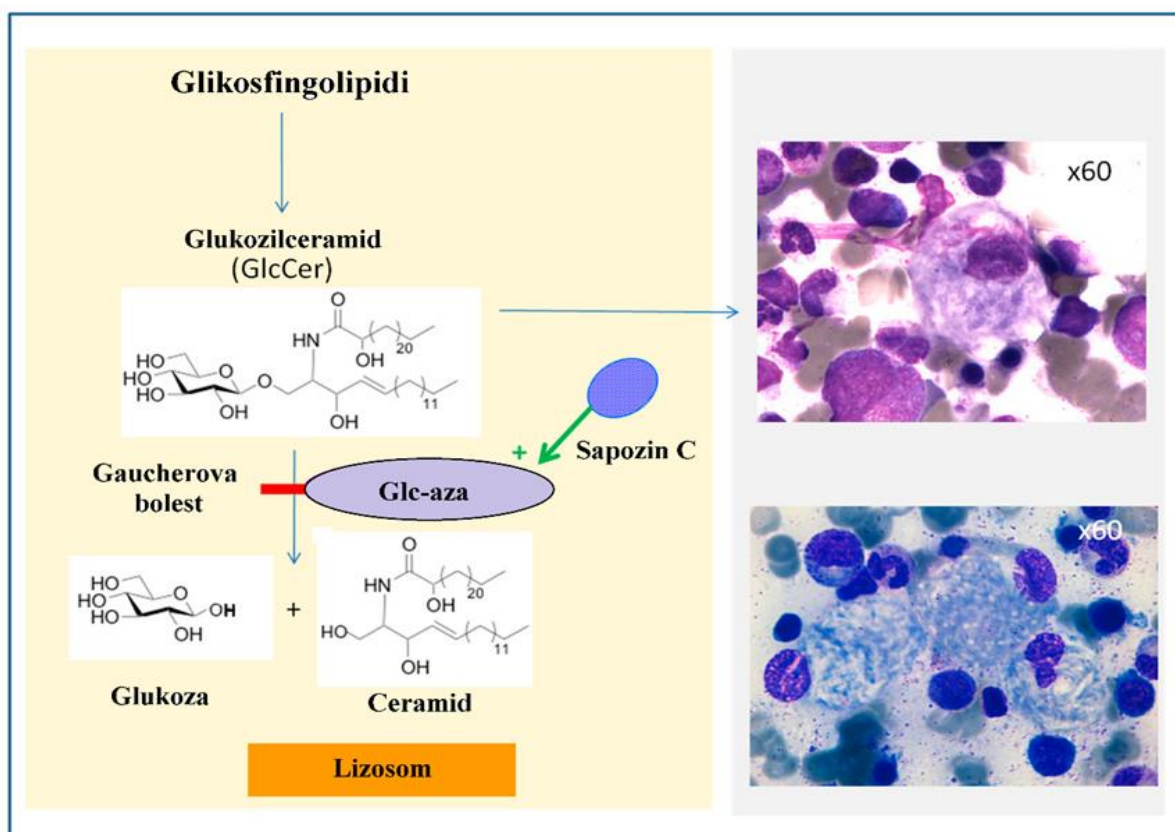
može pružiti određenu zaštitu te se bolest nužno ne naslijeđuje. Ako je majka nositelj defektivnog gena, oba spola imaju 50%-tnu vjerojatnost da ga naslijede od majke. Ako je otac nositelj gena, dolazi do naslijeđivanja kod žena, ali ne i muškaraca s obzirom da oni naslijeđuju zdravi Y-kromosom [47, 48].

Dijagnoza Anderson-Fabryeve bolesti temelji se na razini enzima  $\alpha$ -galaktozidaze A u plazmi ili leukocitima, dok je kod žena je potrebno dodatno genetičko testiranje koje potvrđuje bolest. Najučinkovitija terapija za ovu bolest je ERT iako se pokušava uvesti i liječenje genskom supstitucijom. Danas se najčešće koristi rekombinatna ljudska  $\alpha$ -galaktozidaza A, koja je dostupna u dva izomerna oblika: agalzidaza alfa te agalzidaza beta. Marker za određivanje učinkovitosti ERT-a je koncentracija Gb3-a, no on najčešće služi samo za identifikaciju bolesti, ali ne i za određivanje njezinog napredovanja, jer samo promjene u razini Gb3-a pokazuju aktivnost enzima. S obzirom da ERT može samo usporiti ireverzibilne promjene u srčanoj i renalnoj funkciji, bitna je rana detekcija bolesti genetičkim testiranjem [49, 50].

#### 4.1.2. Gaucher

Gaucherova bolest je najčešći oblik sfingolipidoze, od koje primarno obolijevaju europski Židovi. Kod Gaucherove bolesti dolazi do nakupljanja GlcCer-a, zbog nedostatka lizosomskog enzima glukozilceramidaze (Glc-aza). Glc-aza je enzim koji katalizira hidrolizu GlcCer-a na ceramid i glukozu [51].

Mutacije na *GBA1* genu dovode do smanjenja aktivnosti tog enzima, pri čemu dolazi do nakupljanja supstrata u makrofagima, koji se pretvaraju u Gaucherove stanice. Gaucherove stanice su tipično povećane s kondenziranim kromatinom zbog prisutnosti glukozilceramidnih agregata koji se slažu u obliku fibrila. Te se stanice najčešće infiltriraju u koštanu srž, slezenu i jetru pri čemu se manifestiraju razni simptomi. Makrofagi oboljelih uvelike su izmjenjeni jer se u njima nalaze visoke količine glikosfingolipida koji služe kao izvor za nastanak glikozilceramida. Na Slici 15. prikazana je hidroliza GlcCer-a enzimom Glc-azom te izgled Gaucherove stanice [51].



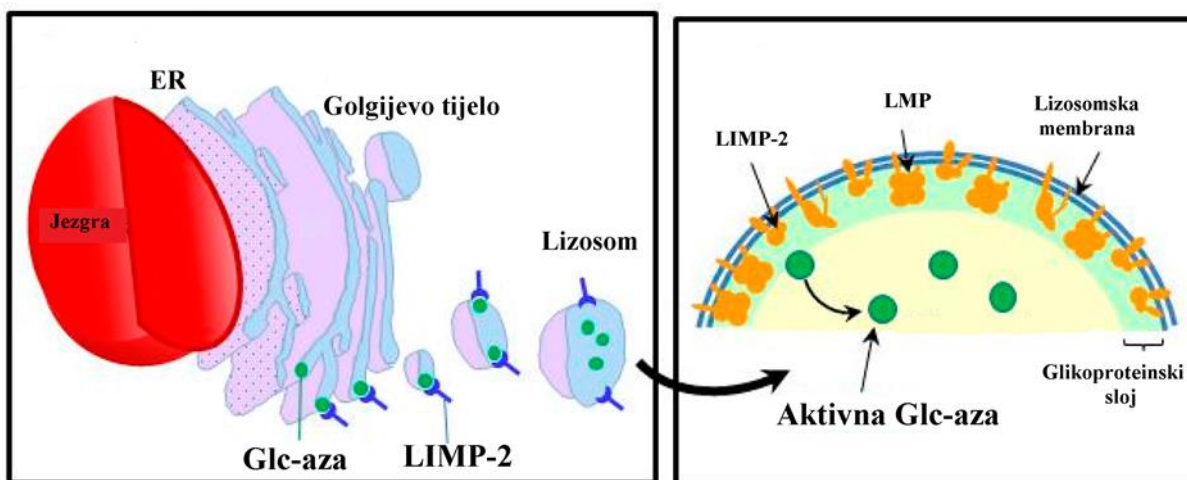
**Slika 15.** Mehanizam djelovanja Glc-aze i nastanak Gaucherovih stanica, adaptirano iz [51].

Nakupljanje GlcCer-a u Gaucherovim stanicama prvi je korak u nastanku koštanih problema koji dovode do vaskularne kompresije, koja je glavni izvor za nastanak nekrotičnih komplikacija. Do neuroloških deficita dolazi samo ako je aktivnost enzima relativno niska do čega dolazi samo pri određenim *GBA1* mutacijama. Vrlo rijetko Gaucherova bolest može biti uzrokovana mutacijom na *PSAP* genu, što dovodi do nedostatka saposina C koji omogućava vezanje Glc-aze i GlcCer-a, bez defekta u proizvodnji enzima [51].

Do nedostatka enzima ne dolazi samo zbog intrinzične enzimske disfunkcije već i zbog abnormalnosti do kojih dolazi pri transportu enzima do lizosoma. Ukoliko pri prolasku enzima kroz ER ne dođe do njegovog pravilnog pakiranja, može doći do preuranjene razgradnje u proteasomu<sup>8</sup>. Inače transport Glc-aze ovisi o lizosomskom integralnom membranskom proteinu 2 (LIMP-2). Na Slici 16. prikazan je transport

<sup>8</sup> kompleks za razgradnju proteina

kompleksa Glc-aza/LIMP-2 do lizosoma, gdje se pri kiselom pH odvija njegova razgradnja [51].



**Slika 16.** Transport i razgradnja kompleksa Glc-aza/LIMP-2, adaptirano iz [51]

Glc-aza koja je povezana za LIMP-2 je neaktivna. Kisela sredina u lizosomima omogućava odvajanje enzima s LIMP-2-a te samim time i njegovu aktivaciju. Mutacije na LIMP-2, odnosno mutacije *SCRAB2* gena, povezane su s neurološkim oboljenjima. Također, bitnu ulogu u transportu ima i progranulin koji djeluje kao ko-šaperon koji povezuje Glc-azu i LIMP-2. Istraživanjima je utvrđeno kako su razine progranulina kod pacijenata s Gaucherovom bolešću bitno niže nego kod zdravih ljudi zbog čega dolazi do povećanja koncentracije Glc-aze u citoplazmi. Gubitak progranulina dovodi do disfunkcije u transportu te do nakupljanja kompleksa Glc-aza/LIMP-2 zbog čega dolazi do pojačane razgradnje Glc-aze [52].

Gaucherova bolest dijeli se na 3 tipa s obzirom na fenotip:

- Tip 1 (neneuropatski)
- Tip 2 (infantilni, neuropatski)
- Tip 3 (juvenilni, neuropatski)

Tip 1 je najčešći oblik kod kojega nisu pogođeni leđna moždina i mozak. Bolest se pojavljuje u bilo kojoj dobi s raznolikom prezentacijom od lakših do težih simptoma. Glavni simptomi uključuju povećanje jetre i slezene (hepatosplenomegalija), niska razina crvenih krvnih stanica (anemija), oticanje očiju zbog smanjenja koncentracije trombocita (trombocitopenija) te abnormalnosti u koštanoj srži [53].

Tipovi 2 i 3 karakterizirani su defektima na centralnom živčanom sustavu. Ovi oblici uzrokuju napadaje, oštećenja na mozgu te probleme s očnim živcima. Tip 2 inače uzrokuje po život opasne simptome koji počinju pri rođenju. Tip 3 također utječe na živčani sustav, ali napreduje puno sporije od tipa 2. Kod tipa 2 karakteristične su okulomotorne disfunkcije zajedno s hepatospleomegalijom. Suha koža koja se ljuštri je bitna za razlikovanje ovoga tipa od ostalih tipova bolesti [53].

Gaucherova bolest dijagnosticira se na jednak način kao i Fabry, razinom enzima glukocerebrosidaze u leukocitima. Također, potrebno je identificirati mutacije *GBA1* gena s obzirom da kod nekih slučajeva nije dovoljno samo testiranje aktivnosti enzima. ERT je najčešće učinkovit kod tipova 1 i 3, jer kod većine pacijenata može smanjiti otečenost jetre i slezene te pomoći pri rješavanju krvnih abnormalnosti. Najčešće korišteni lijekovi za ova dva tipa su imigluceraza, velagluceraza alfa i taligluceraza beta, no za sada ne postoji lijek koji može liječiti sva 3 tipa bolesti, te pacijenti s tipom 2 umiru u ranoj dobi [53, 54].

Transplantacija koštane srži također se pokazala efektivnom kod uznapredovanih oblika te bolesti jer se zamjenjuju bolesne Gaucherove stanice sa zdravima. Iako su rezultati puno bolji ako se za liječenje koristi transplantacija, rizik od infekcije je visok pa se to izvodi vrlo rijetko, a pristup se ograničava na upotrebu lijekova za zamjenu enzima [53, 54].

#### **4.1.3. Niemann-Pick**

Niemann-Pickove bolesti odnose se na nedostatak aSM-aze (tipovi A i B) i defektivnu esterifikaciju kolesterola (tip C). Tip A je akutni neuropatski, tip B kronični neneuropatski, dok je tip C kronični neuropatski i razlikuje se od tipova A i B jer uključuje abnormalnosti u transportu lipida. Pacijenti s Niemann-Pickovom bolešću sadrže makrofage s visokim količinama lipida, najviše u slezeni, jetri i koštanoj srži. Nakupljanje pretrpanih makrofaga dovodi do hepatosplenomegalije i limfadenopatije<sup>9</sup>. Ukoliko se nakupljaju u jetri može doći i do hipertenzije i ciroze, dok nakupljanje u neuronima uzrokuje karakterističnu crvenu točku na mrežnici oka [55, 56].

---

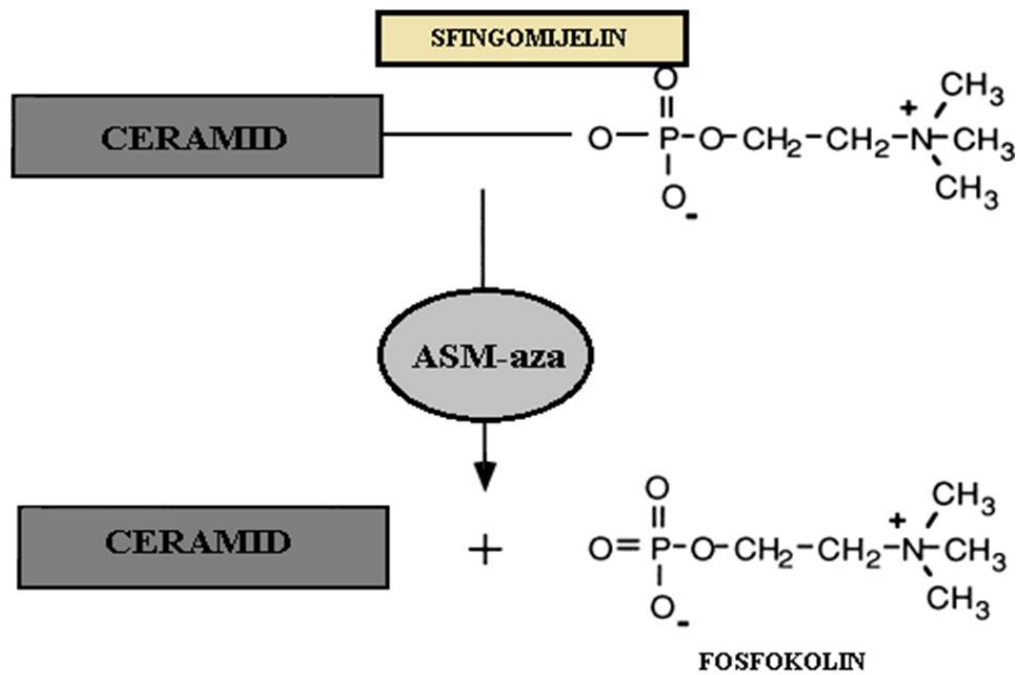
<sup>9</sup> abnormalno povećanje broja i veličine limfnih čvorova

Novorođenčad s Niemann-Pickovom bolešću tipa A razvija hepatosplenomegaliju do 3. mjeseca starosti te dolazi do nemogućnosti rasta i poteškoćama pri dobivanju na težini. Djeca se inače normalno razvijaju do 1. godine kada počne dolaziti do gubitka mentalnih i psihomotornih sposobnosti. Također razvija se i oštećenje na plućima koje može uzrokovati infekcije i respiratorno otkazivanje. Svako oboljelo dijete ima karakterističnu crvenu točku na mrežnici očiju, koja se može identificirati na oftamološkom pregledu. Djeca s Niemann-Pickovom bolešću tipa A ne prežive dalje od ranog djetinjstva [57].

Niemann-Pickova bolest tipa B javlja se u srednjim godinama djetinjstva. Simptomi nalikuju onima kod tipa A, ali nisu toliko ozbiljni. Kod pacijenata se u početku razvijaju hepatosplenomegalija, česte plućne infekcije i trombocitopenija. Za razliku od oboljelih od tipa A, djeca oboljela od tipa B inače dožive odraslu dob [58, 59].

Tipovi A i B uzrokovani su mutacijama na *SMPDI* genu, koji sadrži uputu za sintezu enzima aSM-aze. Taj enzim se primarno nalazi u lizosomima neurona i odgovoran je za hidrolizu SM-a do ceramida i fosfokolina, što je prikazano na Slici 17. Mutacije na *SMPDI* genu dovode do skraćivanja enzima aSM-aze, što dovodi do smanjenja broja enzima koji mogu vršiti hidrolizu i nakupljanja SM-a u stanicama. Najčešće pogođeni organi su mozak, pluća, slezena i jetra. Iako ne postoji lijek za ove bolesti, trenutno se razvija rekombinantna ljudska aSM-aza (olipudaza alfa) kako bi se mogla uvesti ERT, no lijek bi bio usmjeren samo na neneurološki oblik [58, 59].





**Slika 17.** Razgradnja SM-a enzimom aSM-azom, adaptirano iz [59].

Znakovi i simptomi tipova C1 i C2 su vrlo slični, ali se razlikuju po genetičkoj osnovi. Prvi znakovi bolesti inače započinju u djetinjstvu iako se mogu pojaviti bilo kada. Među glavnim simptomima su nemogućnost koordiniranih pokreta (ataksija) i vertikalna supranuklearna paraliza, te slabost mišića (distonija), jetrene i plućne bolesti. Pojedinci također razvijaju poteškoće s govorom i gutanjem, te progresivno usporavanje mentalnih funkcija i napadaje. Kod ovih tipova bolesti postoji mogućnost preživljavanja do odrasle dobi [59].

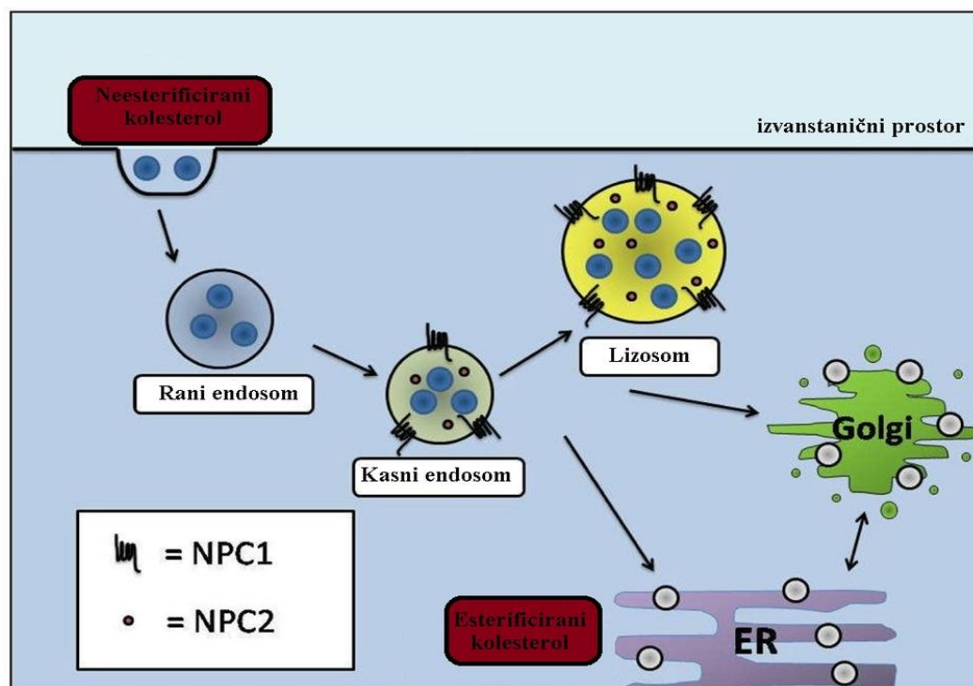
Mutacije na *NPC1* i *NPC2* gena uzrokuju tipove C1 i C2. Proteini koje kodiraju ovi geni odgovorni su za intracelularni transport SM-a. Mutacije također dovode do skraćivanja tih proteina što sprječava transport kolesterola i drugih lipida te dovodi do njihovog nakupljanja. S obzirom da se ti lipidi ne nalaze na predviđenom mjestu, njihovo nakupljanje dovodi do stanične smrti i odumiranja organa [59].

Defekt u transportu lipida u mozgu kod oboljelih od tipa C uzrokuje promjene u putu kojim kolesterol i drugi lipidi dolaze do neurona i premiještaju se unutar stanica. LDL donosi kolesterol do lizosoma, gdje se on razgrađuje i služi za transport nastalih produkata do ER-a ili Golgija gdje kolesterol služi za regulatorne procese i izgradnju membrane. Za izlazak kolesterola iz lizosoma potrebna su dva proteina: NPC1 i NPC2. LDL-kolesterol iz perifernog dijela ne prolazi krvno-moždanu barijeru za ulazak u središnji živčani sustav pa

je stoga potrebna de novo sinteza kolesterola u mozgu kako bi se normalno razvijao živčani sustav [60, 61].

Neuroni i druge stanice središnjeg živčanog sustava uzimaju potrebne količine kolesterola endogenom sintezom ili uzimanjem LDL-kolesterola koji je sintetiziran i otpušten u živčanom sustavu. Nakon što ciljane stanice preuzmu te čestice, neesterificirani kolesterol i ostali lipidi putuju iz lizosoma do Golgija i ER-a kako bi poslužili kao supstrati za daljnje reakcije. U NPC fibroblastima<sup>10</sup>, LDL-kolesteroli ulaze u stanicu, ali se zarobljuju unutar kasnih endosoma ili lizosoma. Nedovoljno izbacivanje kolesterola i lipida izvan tih organela uzrokuje nakupljanje neesterificiranih kolesterola, sfingolipida i gangliozida unutar vezikula u staničnoj citoplazmi dok u isto vrijeme dolazi do smanjenja količine kolesterola i ostalih esencijalnih lipida u organelama u kojima se trebaju nalaziti [60, 61].

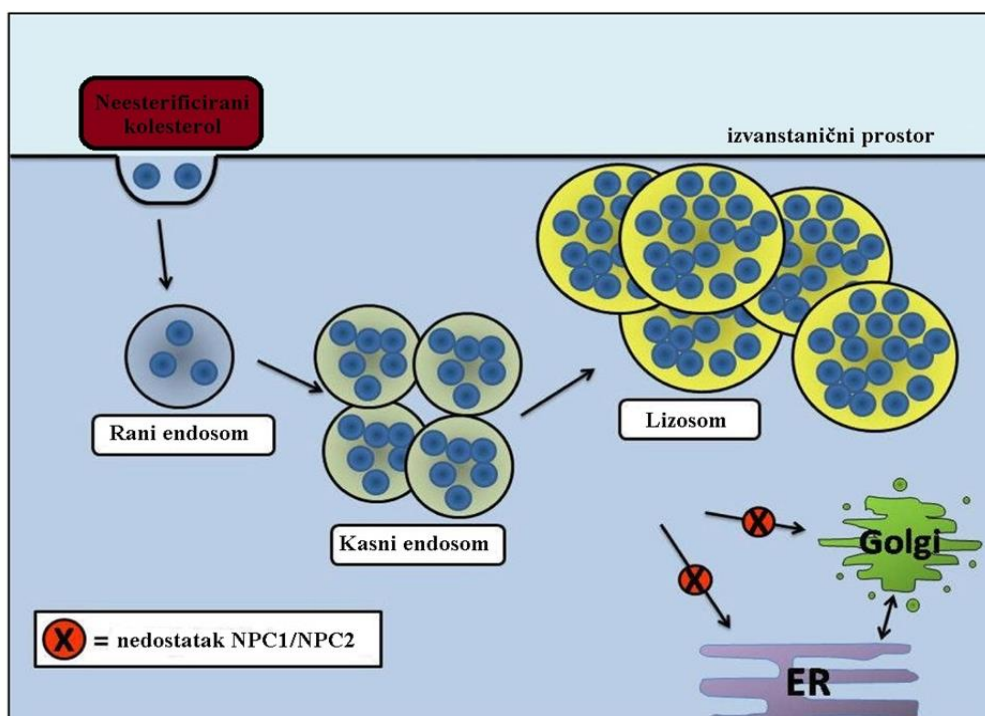
Smanjenje kolesterola u ER-u, Golgijevom tijelu i ostalim organelama dovodi do defekta u pravilnoj izgradnji stanične membrane. Poremećaj u transportu tih lipida također uzrokuje smanjenu sintezu ostalih derivata. Na primjer, smanjenje neesterificiranog kolesterola uzrokuje smanjenu sintezu oksisterola, koji dovode do povećane sinteze kolesterola te pojačanog nakupljanja kolesterola u Niemann-Pickovim stanicama [61].



**Slika 18.** Transport neesterificiranog kolesterola kod zdravih pacijenata, adaptirano iz [61].

<sup>10</sup> stanice vezivnog tkiva koje imaju ulogu u izgradnji svih komponenti tog tkiva

Na Slici 18. prikazan je transport neesterificiranog kolesterola pri normalnim uvjetima. Neesterificirani kolesterol ulazi u stanice nakon vezanja za stanične receptore. Zajedno s ostalim lipidima, prenosi se preko endosoma i lizosoma do ER-a i Golgija [61].



**Slika 19.** Transport neesterificiranog kolesterola kod pacijenata oboljelih od Niemann-Pickove bolesti tipa C, adaptirano iz [61].

Na Slici 19. prikazane su posljedice gubitka funkcije proteina NPC1 i NPC2. Kod Niemann-Pickovih bolesti tipa C1 i C2 dolazi do inhibicije izbacivanja neesterificiranog kolesterola i sfingolipida iz kasnih endosoma i lizosoma, što dovodi do njihovog nakupljanja. Samim time smanjuje se i koncentracija tih lipida u unutarstaničnim organelama gdje se oni razgrađuju [61, 62].

Dijagnoza bolesti tipa C temelji se na kliničkoj slici oboljelih. Među primarnim simptomima su intelektualni nedostaci, kognitivne disfunkcije, distonija i demencija. Bolest se teško dijagnosticira jer ne postoji točan biomarker koji može u potpunosti potvrditi bolest. S obzirom na navedeno, najpouzdaniji biomakeri su oksisteroli čija se koncentracija mjeri u plazmi oboljelih, zajedno s detaljnom kliničkom slikom. Također, niti za jednu od navedenih Niemann-Pickovih bolesti ne postoji lijek iako se trenutačno rade istraživanja za uvođenje genske terapije [62].

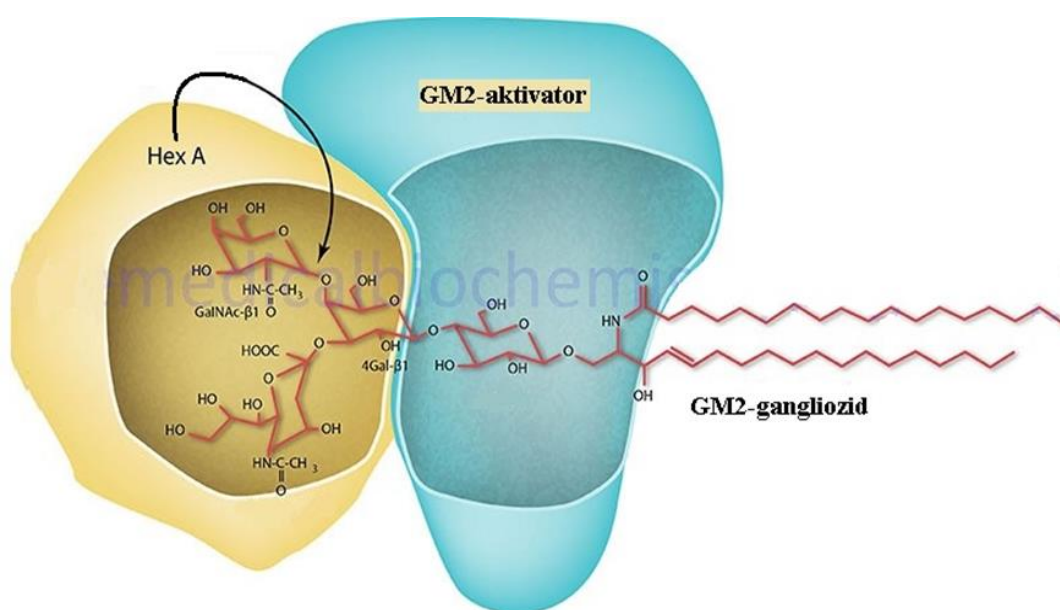
#### 4.1.4. GM2-gangliozi

GM2-gangliozi su psihomotorne bolesti uzrokovane nemogućnošću razgradnje membranskih gangliozida iz GM2-obitelji. Kako su membrane neuralnih stanica bogate GM2-gangliozidima, nakupljanje tih sfingolipida dovodi do njihovog propadanja. Razgradnja GM2-gangliozida zahtijeva enzim  $\beta$ -heksozaminidazu i GM2-aktivatorski protein, koji je kodiran *GM2A* genom. Heksozaminidaza (Hex) je dimer koji se sastoji od 2 podjedinice, ili  $\alpha$ -podjedinice, koja je kodirana *HEXA* genom, i/ili  $\beta$ -podjedinice, koju kodira *HEXB* gen [63].

Izomeri  $\beta$ -heksozaminidaze sastoje se od različitih kombinacija  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica:

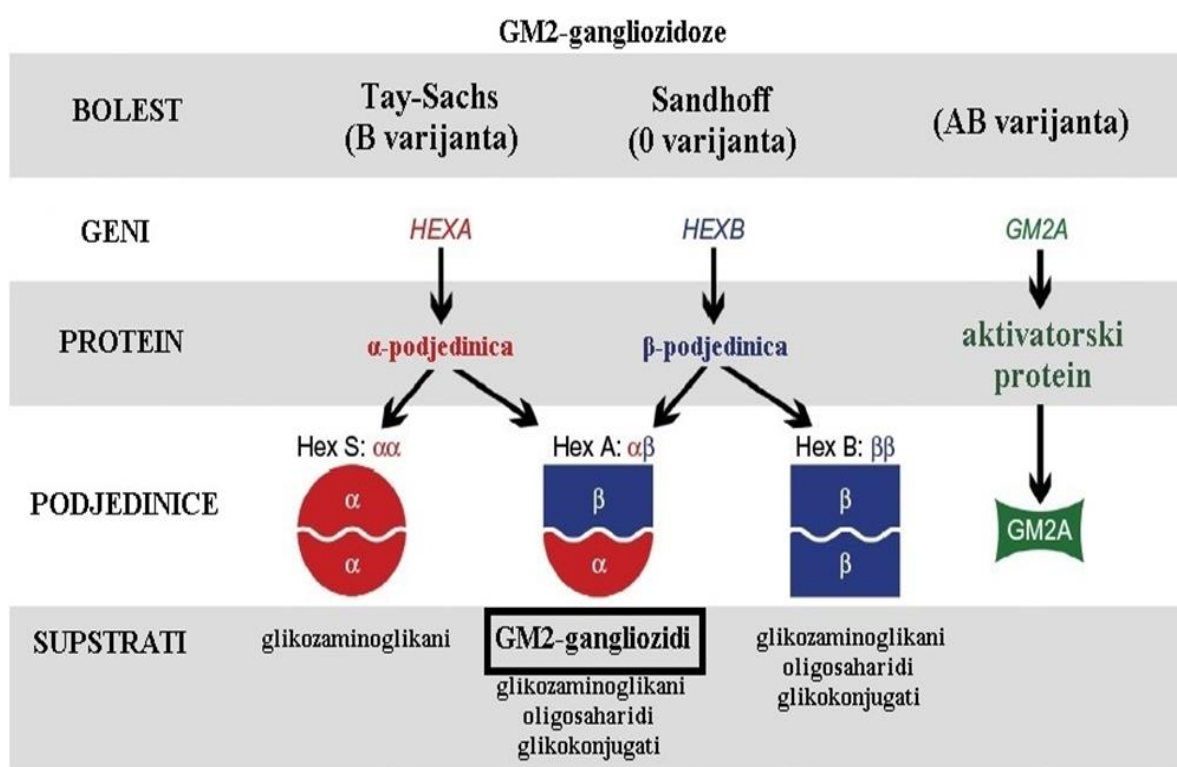
- $\beta$ -heksozaminidaza S (Hex S) - homodimer  $\alpha\alpha$
- $\beta$ -heksozaminidaza A (Hex A) - heterodimer  $\alpha\beta$
- $\beta$ -heksozaminidaza B (Hex B) - homodimer  $\beta\beta$ .

Jedino  $\alpha$ -podjedinica ima sposobnost katalize te jedino Hex A oblik  $\beta$ -heksozaminidaze može katalizirati cijepanje GM2-gangliozida. Prvo dolazi do povezivanja aktivatora s GM2-gangliozidom, nakon čega se veže i Hex A pri čemu dolazi do cijepanja veze, što se odvija u lizosomima (Slika 20.). Nemogućnost razgradnje tih sfingolipida dovodi do njihovog nakupljanja u lizosomima koji postaju sve veći i narušavaju stanične funkcije pri čemu dolazi do propadanja živčanog tkiva [63].



**Slika 20.** Mehanizam djelovanja  $\beta$ -heksozaminidaze A, adaptirano iz [63].

GM2-aktivatorski protein nema hidrolitičku aktivnost prema GM2-gangliozidima, ali je potreban za razgradnju putem HexA te s obzirom na to, GM2-gangliozidoze mogu biti uzrokovane manjkom bilo kojeg od 3 enzima. GM2-gangliozidoze dijele se na 3 varijante: varijanta B (Tay-Sachsova bolest) kod koje nedostaje  $\alpha$ -podjedinica pri čemu se uništavaju Hex A i Hex S, varijanta 0 (Sandhoffova bolest) kod koje nedostaje  $\beta$ -podjedinica pri čemu se uništavaju Hex A i Hex B, te varijanta AB (nedostatak GM2-aktivatora) kod koje ne dolazi do uništavanja Hex A i Hex B, ali se ne može razgraditi GM2-gangliozid. Na Slici 21. prikazane su 3 varijante bolesti s obzirom na gene, supstrate koji se nakupljaju te proteine i podjedinice [63, 64].



**Slika 21.** Prikaz karakteristika B, 0 i AB varijante, adaptirano iz [64].

S obzirom da je prezentacija svake varijante jednaka, bit će pojašnjena etiologija Tay-Sachsove bolesti. Tay-Sachsova bolest je uzrokovana mutacijama na *HEXA* genu koji kodira enzim Hex A. Kod Tay-Sachsove bolesti, ali i kod Sandhoffove bolesti, taj enzim ili nije funkcionalan ili ga nema dovoljno pa dolazi do nakupljanja GM2-gangliozida unutar neurona, što uzrokuje široku prezentaciju simptoma. Najčešći simptomi kod oboljelih su progresivno slabljenje motoričkih funkcija, neurodegeneracija, pojava karakteristične crvene točke na mrežnici oka te brza smrt [65, 66].

S obzirom na dob kod koje se javljaju prvi simptomi, bolest se dijeli na:

- Akutni infantilni oblik sa brzim napredovanjem i umiranjem prije 4. godine
- Juvenilni subakutni oblik sa kasnijim prezentacijama simptoma te preživljavanjem do adolescencije
- Kronični i kasni oblik koji nastaju u odrasloj dobi, ali ne uključuju nužno smrtni ishod.

Akutni infantilni oblik utječe na novorođenčad koja pri rođenju izgledaju potpuno normalno. Manje motoričke smetnje pojavljuju se između 3. i 6. mjeseca života, zajedno s mioklonusom. Od 6. do 10. mjeseca života, djeca ne uspijevaju usvojiti nove motoričke sposobnosti ili gube prije usvojene. Nakon 10. mjeseca života, bolest počinje brzo napredovati zbog povećanih oštećenja na mozgu. Djeca gube kontrolu nad pokretima te im se počinje gubiti vid, a napadaji postaju sve češći. Nakon 18. mjeseca života, djeca prelaze u vegetativno stanje te oboljevaju od akutne plućne infekcije od koje umiru do 4. godine života [66].

Juvenilni subakutni oblik započinje između 2. i 10. godine života, što se u početku prezentira ataksijom i nekoordiniranošću. Kognitivne funkcije počinju propadati ranije, dok se napadaji i gubitak vida pojavljuju puno kasnije nego kod infantilnog oblika. Također, karakteristična crvena točka na mrežnici ne pojavljuje se nužno kod svakog pacijenta. Do smrti oboljelih od juvenilnog oblika dolazi nakon 15. godine života, iako postoje slučajevi kod kojih smrt nastupa nakon samo par godina od pojave prvih simptoma [66, 67].

Kronični i kasni oblik karakterizirani su zakašnjelom pojavom simptoma te sporijim napredovanjem neurodegeneracije, što je posljedica niskih koncentracija enzima Hex A. Kod kroničnog oblika, oštećenja primarno pogađaju centralni živčani sustav, dok kod kasnog oblika više dominiraju psihijatrijski poremećaji. Oboljeli od ovih oblika mogu doživjeti odraslu dob, ali s velikim poteškoćama u svakodnevnom snalaženju [66, 67].

Dijagnoza Tay-Sachsove bolesti oslanja se na određivanje koncentracije enzima Hex A u serumu ili leukocitima uz postojanje normalne ili povišene koncentracije izozima Hex B. Genetičko testiranje se inače izvodi samo na pacijentima kod kojih je već utvrđeno postojanje ove bolesti u obitelji. S obzirom da ne postoji lijek za GM2-gangliozidoze,

oboljelima se pružaju jedino lijekovi za kontroliranje simptoma i eventualno poboljšanje kvalitete života [66, 67].

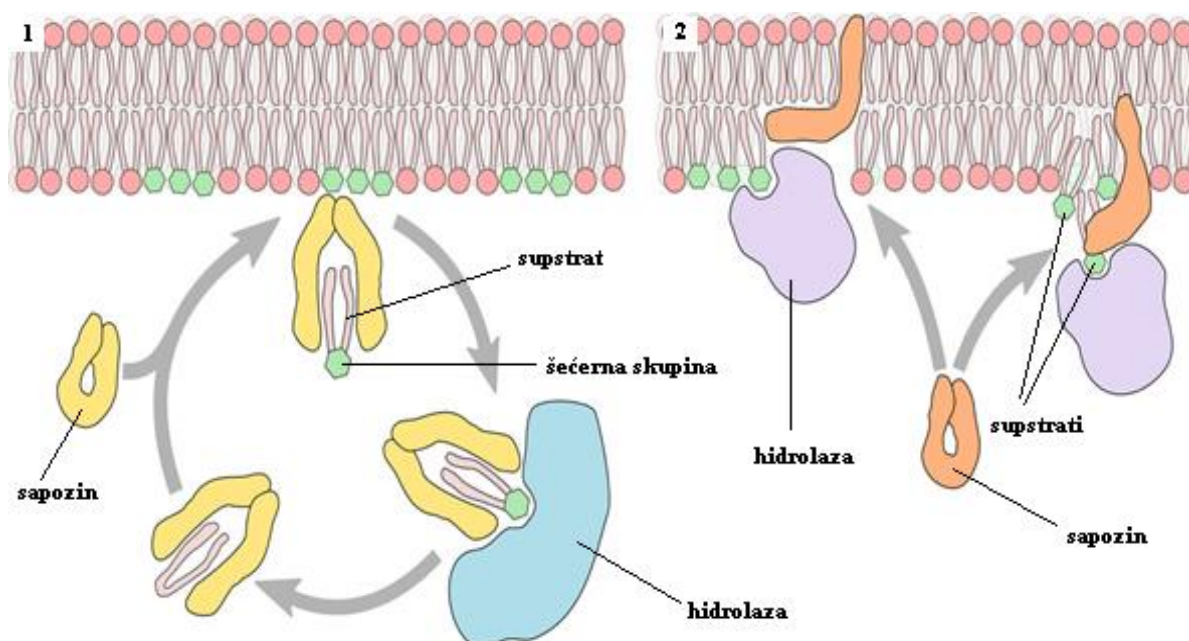
## 4.2. Uzroci disfunkcije metabolizma sfingolipida

### 4.2.1. Nedostatak sfingolipid aktivirajućih proteina

SAP su kofaktori potrebni hidrolazama za razgradnju glikosfingolipida s kratkim oligosaharidnim ostacima. Glikosfingolipidi s dugačkim oligosaharidnim lancima lako su dostupni hidrolazama jer je terminalna šećerna skupina dovoljno udaljena od lipidnog dvosloja. S obzirom da se supstrati nalaze uklopljeni u membrane, a hidrolaze djeluju samo u hidrofilnim područjima, potrebni su kofaktori koji bi omogućili hidrolizu i na glikosfingolipidima s kratkim šećernim ostacima [68, 69].

Sapozini na dva načina omogućuju djelovanje hidrolaza na supstratima koji su uklopljeni u hidroforobnu membranu (Slika 22.):

1. način: sapozini omogućuju ekstrakciju supstrata iz membrane nakon čega ga transportiraju do hidrolaze
2. način: sapozini se vežu direktno na površinu membrane, pritom ju mijenjaju i omogućuju slobodan prolazak hidrolaze do supstrata u membrani.



**Slika 22.** Mehanizmi djelovanja sapozina za aktivaciju hidrolaza, adaptirano iz [69].

Danas je poznato sveukupno 5 aktivirajućih proteina: SAP A, B, C i D, koji nastaju proteolitičkom razgradnjom proteina prosapozina (pSAP). Peti protein, GM2-aktivatorski protein (GM2AP), pomaže pri razgradnji gangliozida GM1 i GM2. Svaki sapozin djeluje na različite hidrolaze, pa samim time i njihove disfunkcije uzrokuju drukčije bolesti. U Tablici 1. prikazana je podjela sapozina, zajedno s enzimima te sfingolipidozama koje uzrokuju, od kojih jedino SAP A i D nisu specifični za pojedine bolesti [70].

**Tablica 1.** Podjela sapozina s obzirom na enzime, supstrate i bolesti koje uzrokuju.

<b>SAPOZINI</b>	<b>ENZIM</b>	<b>SUPSTRAT</b>	<b>SFINGOLIPIDOZA</b>
<b>SAP A</b>	<b>galaktozidaza B</b>	<b><math>\beta</math>-GalCer</b>	/
<b>SAP B</b>	<b>arilsulfataza-A <math>\alpha</math>-galaktozidaza A <math>\beta</math>-galaktozidaza</b>	<b>sulfatidi Gb3 LacCer</b>	<b>Metakromatska leukodistrofija</b>
<b>SAP C</b>	<b><math>\beta</math>-glukozidaza</b>	<b><math>\beta</math>-GlcCer</b>	<b>Gaucher</b>
<b>SAP D</b>	<b>ceramidaza</b>	<b>Cer</b>	/
<b>GM2AP</b>	<b><math>\beta</math>-heksozaminidaza A</b>	<b>GM2-gangliozidi</b>	<b>Tay-Sachs</b>

Također, genetičku osnovu za nastanak disfunkcije sapozina čine mutacije na samo jednom genu koji kodira pSAP, pri čemu samo jedna mutacija na tom genu može uzrokovati raznolike prezentacije navedenih sfingolipidoza [70, 71].



## 5. Zaključak

Sfingolipidi su najzastupljeniji lipidi koji izgrađuju stanične membrane u živčanom sustavu. Osim u izgradnji, oni također sudjeluju u staničnoj signalizaciji i pojedinim regulatornim procesima. Za sada ti mehanizmi još nisu u potpunosti razjašnjeni, no u posljednjih par godina je došlo do napretka u razmišljanju mehanizma ceramidom inducirane apoptoze. S obzirom da ceramid, zajedno s ostalim sfingolipidima, izgrađuje stanične membrane, svaka negativna promjena u njegovoj koncentraciji dovodi i do disregulacije u staničnoj signalizaciji. Disfunkcije metabolizma sfingolipida dovode do njihovog nakupljanja u pojedinim organelama. Zbog povećanja koncentracije tih lipida narušava se funkcionalnost membrana te dolazi do pojave neuroloških deficita, odnosno nastanka lizosomskih bolesti nakupljanja - sfingolipidoza. Do nastanka tih bolesti dolazi zbog nedostatka enzima za razgradnju u lizosomima ili zbog smanjenih koncentracija sfingolipid aktivirajućih proteina (SAP), što je uvjetovano mutacijama gena oboljelih. Terapije za većinu sfingolipidoza, osim Anderson-Fabryeve i Gaucherove bolesti, još uvijek nisu dostupne zbog neistraženosti njihove etiologije. U zadnjih par godina se, osim ERT-a, pokušavaju uvesti i terapije genskom supstitucijom te kemijskim šaperonima, s obzirom da ERT nije učinkovit u potpunosti jer nije u mogućnosti promijeniti primarni uzrok nastanka ovih bolesti.

## 6. Popis kratica

$\alpha$ -1,4-GalT -  $\alpha$ -1,4-galaktozil-transferaza

aSM-aza - kisela sfingomijelinaza

Casp 9 - kaspaza 9

Cer - ceramid

CerS - ceramid-sintaza

CERT - ceramid transportni proteini

Cit c - citokrom c

CRP (*eng. ceramide-rich platforms*) - platforme bogate ceramidom

DAG - diacilglicerol

ECM (*eng. extracellular matrix proteins*) - proteini iz ekstracelularnog matriksa

ER - endoplazmatski retikulum

ERT (*eng. enzyme replacement therapy*) - nadomjesna enzimaska terapija

FAD - flavin adenin dinukleotid

FADD (*eng. Fas-associated protein with death domain*)

FAPP2 (*eng. phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2*)

FASL (*eng. Fas ligand*)

GalT-III - galaktoziltransferaza III

Gb3 - globotriaozilceramid

Glc-aza - glukozilceramidaza

GlcCer - glukozilceramid

GlcCerS - glukozilceramid sintaza

GD - disialogangliozid

GM - monosialogangliozid

GM2AP - GM2-aktivatorski protein

GSL - glikosfingolipidi

GT - trisialogangliozid

Hex - heksozaminidaza

JNK - Jun N-terminalna kinaza

KDHR - 3-ketodihidrosfingoizin reduktaza

KDS - 3-ketodihidrosfingoizin

LacCer - laktozilceramid

LIMP-2 - lizosomski integralni membranski protein 2

lyso-Gb3 - globotriaozilsfingoizin

MAPK/ERK (*eng. mitogen activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase*)

MCRM (*eng. mitochondrial ceramide-rich macrodomains*) - mitohondrijske ceramidom bogate makro-domene

MOMP (*eng. mitochondrial outer membrane permeabilization*) - permeabilizacija vanjske mitohondrijske membrane

mTORC1 (*eng. mammalian target of rapamycin complex 1*)

nSM-aza - neutralna sfingomijelinaza

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NF- $\kappa$ B (*eng. nuclear factor kappa B*) - nuklearni transkripcijski faktor kapa B

NICD (*eng. Notch intracellular domain*)

NPC - Niemann-Pickova boleost tipa C

PLP - piridoksal-fosfat

PP2A - protein fosfataza 2A

pSAP - prosapozin

ROS (*eng. reactive oxygen species*) - reaktivni kisikovi spojevi

S1P - sfingozin-1-fosfat

SAP - sfingolipid aktivirajući proteini

SK - sfingozin kinaza

SM - sfingomijelin

smac (*eng. second mitochondria-derived activator of caspases*) - sekundarni mitohondrijski proizveden aktivator kaspaze

SMS - sfingomijelin sintaza

SPT - serin-palmitoil-transferaza

ssSPT (*eng. small SPT subunit*)

ST - sijaliltransferaza

TNF- $\alpha$  (*eng. tumor necrosis factor  $\alpha$* ) - tumorski faktor nekroze  $\alpha$

TRAIL (*eng. TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

XIAP (*eng. X-linked inhibitor of apoptosis protein*) - X-vezani antiapoptotski proteini

## 7. Literatura

- [1] M. Cao, C. Ji, Y. Zhou, W. Huang, W. Ni, X. Tong, J. F. Wei, Sphingosine kinase inhibitors: A patent review, *International Journal of Molecular Medicine*, **41** (2018), 2450-2460.
- [2] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [3] P. R. Raghavendra, N. Vaidyanathan, M. Rengasamy, A. M. Oommen, N. Somaiya, M. R. Jagannath, Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases, *Journal of Lipids*, (2013), 1-2.
- [4] <https://bit.ly/2zZYvx0> (18.7.2018.)
- [5] S. Potočki, Potential health benefits of sphingolipids in milk and dairy products, *Mljekarstvo*, **66** (2016), 251-261.
- [6] L. Arana, P. Gangoiti, A. Ouro, M. Trueba, A. Gómez-Muñoz, Ceramide and Ceramide 1-Phosphate in Health and Disease, *Lipids in Health and Disease*, **9** (2010), 1-4.
- [7] Z. B. Jones, R. Yi, Sphingolipids in Spinal Cord Injury, *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, **8** (2016), 52-69.
- [8] N. D'Avanzo, *Na Channels from Phyla to Function*, Elsevier Science Publishing Co Inc., United States: San Diego, 2016.
- [9] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, United States: New York, 2002.
- [10] D. K. Olson, F. Fröhlich, R. Farese, T. C. Walther, Taming the Sphinx: Mechanisms of Cellular Sphingolipid Homeostasis, *Biochimica et biophysica acta*, **8** (2016), 784-792.
- [11] C. Mencarelli, P. Martinez–Martinez, Ceramide Function in the Brain: When a Slight Tilt Is Enough, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70** (2013), 181-203.
- [12] R. C. Bollinger, V. Teichgräber, E. Gulbins, Ceramide-enriched membrane domains, *Biochimica et biophysica acta*, **1746** (2005), 284-294.
- [13] A. S. B. Olsen, J. N. Færgeman, Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases, *Open biology*, **7** (2017), 1-2.

- [14] Y. Li, S. Li, X. Qin, W. Hou, H. Dong, L. Yao, L. Xiong, The Pleiotropic Roles of Sphingolipid Signaling in Autophagy, *Cell Death & Disease*, **5** (2014), 5-8.
- [15] A. S. B. Harvald, N. J. Færgeman, Autophagy in the Light of Sphingolipid Metabolism, *Apoptosis*, **20** (2015), 658-670.
- [16] G. A. Patwardhan, L. J. Beverly, L. J. Siskind, Sphingolipids and Mitochondrial Apoptosis, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **48** (2016), 153-168.
- [17] H. Kalkavan, D. R. Green, MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business, *Cell Death and Differentiation*, **25** (2018), 45-55.
- [18] C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang, Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition, *Cell press*, **102** (2000), 33-42.
- [19] M. M. Young, M. Kester, H. Wang, Sphingolipids: Regulators of Crosstalk between Apoptosis and Autophagy, *Journal of Lipid Research*, **54** (2013), 5-19.
- [20] D. N. Dhanasekaran, R. E. Premkumar, JNK Signaling in Apoptosis, *Oncogene*, **27** (2008), 6245-6251.
- [21] C. R. Gault, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown, *Advances in experimental medicine and biology*, **688** (2010), 1-23.
- [22] Z. Wenjing, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J. C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M. C. Sullards, M. Cabot, A. H. Merrill, Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1758** (2006), 1864-1884.
- [23] <https://bit.ly/2MIZ1dG> (13.08.2018.)
- [24] Y. Chen, Y. Liu, M. C. Sullards, A. H. Merrill, An Introduction to Sphingolipid Metabolism and Analysis by New Technologies, *Neuromolecular Medicine*, **12** (2010), 306-319.

- [25] M. J. Hernández-Corbacho, M. F. Salama, D. Canals, C. E. Senkal, L. M. Obeid, Sphingolipids in Mitochondria, *Biochimica et biophysica acta*, **1862** (2017), 56-68.
- [26] G. H. Norris, C. N. Blesso, Dietary and Endogenous Sphingolipid Metabolism in Chronic Inflammation, *Nutrients*, **9** (2017), 1-24.
- [27] K. Sandhoff, T. Kolter, Biosynthesis and Degradation of Mammalian Glycosphingolipids, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **358** (2003), 847-861.
- [28] R. K. Yu, Y. Tsai, T. Ariga, M. Yanagisawa, Structures, Biosynthesis, and Functions of gangliosides—An Overview, *Journal of oleo science*, **60** (2011), 537-544.
- [29] T. Kolter, Ganglioside Biochemistry, *ISRN Biochemistry*, (2012), 1-36.
- [30] T. Yamaji, K. Hanada, Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport: Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins, *Traffic*, **16** (2015), 101-122.
- [31] A. Aguilera-Romero, C. Gehin, H. Riezman, Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1841** (2014), 647-656.
- [32] N. Bartke, Y. A. Hannun, Bioactive Sphingolipids: Metabolism and Function, *Journal of Lipid Research*, **50** (2009), 91-96.
- [33] K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, Y. A. Hannun, The Sphingolipid Salvage Pathway in Ceramide Metabolism and Signaling, *Cellular signalling*, **20** (2008), 1010-1018.
- [34] E. A. Beattie, S. D. Gupta, L. Frankova, A. Kazlauskaitė, J. M. Harmon, T. M. Dunn, D. J. Campopiano, The Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP)-Dependent Enzyme Serine Palmitoyltransferase (SPT): Effects of the Small Subunits and Insights from Bacterial Mimics of Human hLCB2a HSN1 Mutations, *BioMed Research International*, (2013), 1-13.
- [35] K. Hanada, T. Hara, M. Nishijima, D-Serine inhibits serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the initial step of sphingolipid biosynthesis, *FEBS letters*, **474** (2000), 63-65.

- [36] L. Cai, C. Oyeniran, D. D. Biswas, J. Allegood, S. Milstien, T. Kordula, M. Maceyka, S. Spiege, ORMDL Proteins Regulate Ceramide Levels during Sterile Inflammation, *Journal of Lipid Research*, **57** (2016), 1412-1422.
- [37] Y. H. I. Shiraiwa, H. Hideyuki, Multifunctional Role of His<sup>159</sup> in the Catalytic Reaction of Serine Palmitoyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, **284** (2009), 15487-15495.
- [38] K. Hanada, Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1632** (2003), 16-30.
- [39] M. C. C. Raman, K. A. Johnson, B. A. Yard, J. Lowther, L. G. Carter, J. H. Naismith, D. J. Campopiano, The External Aldimine Form of Serine Palmitoyltransferase: Structural, kinetic, and spectroscopic analysis of the wild-type enzyme and HSN1 mutant mimics, *The Journal of Biological Chemistry*, **284** (2009), 17328-17339.
- [40] J. Fernandes, J. Saudubray, G. van den Berghe, H. J. Walter, *Inborn Metabolic Diseases*, Springer, Berlin: Heidelberg, 2006.
- [41] <https://bit.ly/2MoSH5S> (18.08.2018.)
- [42] T. Kolter, K. Sandhoff, Sphingolipid metabolism diseases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1758** (2006), 2057-2079.
- [43] K. Sandhoff, Metabolic and cellular bases of sphingolipidoses, *Biochemical Society Transactions*, **41** (2013), 1562-1568.
- [44] R. El-Abassi, D. Singhal, D. J. England, Fabry's disease, *Journal of the Neurological Sciences*, **344** (2014), 5-19.
- [45] J. P. Nuñez, A. Ortiz, A. B. Sanz, M. D. Niño Sanchez, Fabry Disease: A Metabolic Proteinuric Nephropathy, *Advances in the Study of Genetic Disorders*, (2011), 255-276.
- [46] A. A. Daher, T. E. Jalkh, A. A. Eid, A. Fornoni, B. Marples, Y. H. Zeidan, Translational Aspects of Sphingolipid Metabolism in Renal Disorders, *International Journal of Molecular Sciences*, **18** (2017), 2528-2552.



- [47] D. Elstein, E. Schachamov, R. Beeri, G. Altarescu, X-inactivation in Fabry disease, *Gene*, **505** (2012), 266-268.
- [48] <https://bit.ly/2ogS6VA> (27.08.2018.)
- [49] G. M. Pastores, H. Y. Lien, Biochemical and Molecular Genetic Basis of Fabry Disease, *Journal of the American Society and Nephrology*, **13** (2002), 130-133.
- [50] T. Alegra, F. Vairo, M. V. de Souza, B. C. Krug, I. V. D. Schwartz, Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Genetics and Molecular Biology*, **35** (2012), 947-954.
- [51] J. Stirnemann, N. Belmatoug, F. Camou, C. Serratrice, R. Froissart, C. Caillaud, T. Levade, L. Astudillo, J. Serratrice, A. Brassier, C. Rose, T. B. de Villemeur, M. G. Berger, A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments, *International Journal of Molecular Sciences*, **18** (2017), 441-471.
- [52] B. N. Hagit, I. J. Cohen, P. K. Mistry, Gaucher Disease: The Metabolic Defect, Pathophysiology, Phenotypes And Natural History, *Pediatric endocrinology reviews : PER*, **12** (2014), 72-81.
- [53] <https://bit.ly/2PcS38G> (27.08.2018.)
- [54] V. Murugesan, W. Chuang, J. Liu, A. Lischuk, K. Kacena, H. Lin, G. M. Pastores, R. Yang, J. Keutzer, K. Zhang, P. K. Mistry, Glucosylsphingosine Is a Key Biomarker of Gaucher Disease, *American journal of hematology*, **91** (2016), 1082-1089.
- [55] J. K. Fink, Niemann-Pick Disease, *Encyclopedia of Neuroscience*, (2004), 1141-1144.
- [56] J. P. Desnick, J. Kim, X. He, M. P. Wasserstein, C. M. Simonaro, E. H. Schuchman, Identification and Characterization of Eight Novel SMPD1 Mutations Causing Types A and B Niemann-Pick Disease, *Molecular Medicine*, **16** (2010), 316-321.
- [57] <https://bit.ly/2wq3Icx> (27.08.2018.)
- [58] Y. Zhou, M. C. Metcalf, S. C. Garman, T. Edmunds, H. Qiu, R. R. Wei, Human Acid Sphingomyelinase Structures Provide Insight to Molecular Basis of Niemann–Pick Disease, *Nature Communications*, **7** (2016), 13082-13092.
- [59] <https://bit.ly/2O0s83W> (27.08.2018.)

- [60] H. J. Kwon, L. Abi-Mosleh, M. L. Wang, J. Deisenhofer, J. L. Goldstein, M. S. Brown, R. E. Infante, Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol, *Cell*, **137** (2009), 1213-1224.
- [61] C. D. Pacheco, A. P. Lieberman, The Pathogenesis of Niemann-Pick Type C Disease: A Role for Autophagy?, *Expert reviews in molecular medicine*, **10** (2008), e26.
- [62] M. C. Patterson, P. Clayton, P. Gissen, M. Anheim, P. Bauer, O. Bonnot, A. Dardis, C. Dionisi-Vici, H. Klünemann, P. Latour, C. M. Lourenço, D. S. Ory, A. Parker, M. Pocoví, M. Strupp, M. T. Vanier, M. Walterfang, T. Marquardt, Recommendations for the Detection and Diagnosis of Niemann-Pick Disease Type C: An Update, *Neurology: Clinical Practice*, **7** (2017), 499-511.
- [63] <https://bit.ly/2PJkmfQ> (27.08.2018.)
- [64] C. A. Lawson, D. R. Martin, Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitations, *The Application of Clinical Genetics*, **9** (2016), 111-120.
- [65] E. H. Kolodny, Tay-Sachs Disease, *Encyclopedia of Neuroscience*, (2009), 895-902.
- [66] M. M. Kaback, R. J. Desnick, Hexosaminidase A Deficiency, *Seattle (WA): University of Washington*, 1999.
- [67] A. Colaianni, C. Subhashini, R. Cook-Deegan, Impact of Gene Patents and Licensing Practices on Access to Genetic Testing and Carrier Screening for Tay-Sachs and Canavan Disease, *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, **12** (2010), 5-14.
- [68] G. C. Schuette, B. Pierstorff, S. Huettler, K. Sandhoff, Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis, *Glycobiology*, **11** (2001), 81-90.
- [69] C. H. Hill, G. M. Cook, S. J. Spratley, S. Fawke, S. C. Graham, J. E. Deane, The Mechanism of Glycosphingolipid Degradation Revealed by a GALC-SapA Complex Structure, *Nature Communications*, **9** (2018), 151.
- [70] A. Darموise, P. Maschmeyer, F. Winau, The Immunological Functions of Saposins, *Advances in immunology*, **105** (2010), 25-62.

[71] R. C. Meyer, M. M. Giddens, B. M. Coleman, R. A. Hall, The Protective Role of Prosaposin and Its Receptors in the Nervous System, *Brain research*, **1585** (2014), 1-12.