

# Hypofosfatázia – biochemické, klinické prejavy a molekulovo-genetická podstata

Ján Chandoga, Ján Futas, Robert Petrovič

Centrum lekárskej genetiky FNSP Bratislava, oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky

## ÚVOD

Hypofosfatázia (hypofosfatázemia) je zriedkavá dedičná metabolická porucha s defektnou mineralizáciou skeletu a zubov a so zistenými nízkymi aktivitami sérovej tkanivovo-nešpecifickej alkalické fosfatázy (TNSALP). V európskej populácii sa odhaduje výskyt ochorenia s klinickou manifestáciou 1:100 000. Defektná skeletálna mineralizácia môže viesť k ťažkému intrauterinnému poškodeniu plodu s perinatálnym úmrtím. U detí môže spôsobiť porucha mineralizácie rachitídu a následné zmeny charakteru hyperkalcémie, hyperkalcériu môžu viesť k úmrtiu. U dospelých je hlavným prejavom osteomalácia, fraktúry metatarsov a artritída. U ťažkých foriem je dedičnosť autozómovo-recesívneho typu, u ľahších foriem môže byť dedičnosť dominantného i recesívneho charakteru.

## VLASTNOSTI A FUNKCIA TNSALP

Alkalická fosfatáza (ALP-ortofosfor-monoester fosforyláza, EC 3.1.3.1) je kódovaná minimálne štyrmi génmi. Tri izoenzýmy sú tkanivovo-špecifické – intestinálny, placentálny, enzým zárodočných buniek, zatiaľ čo štvrtý enzým je prítomný temer vo všetkých tkanivách, zvlášť v pečeni, kostnom tkanive a v obličkách – TNSALP. Existencia viacerých izoenzýmov je podmienená posttranslačnou modifikáciou proteínového reťazca glykozylovými zvyškami. Pre enzýmovú aktivitu je nevyhnutná N-glykozylácia a taktiež existencia enzýmu minimálne vo forme homodiméru, častejšie však v tetramérovej kvartérnej štruktúre. Enzým je metaloproteín a každý monomér obsahuje dva  $Zn^{2+}$  kationy potrebné k stabilizácii štruktúry a ióny  $Mg^{2+}$  ako aktivátory. Detailnejšie štúdium odhalilo, že proteín potrebuje zinok a vápnik pre aktivitu. Enzým sa viaže C koncom na plazmatickú membránu pomocou glykozyl-fosfatidylinositolovej jednotky, pričom aktívne miesto je orientované do extracelulárneho priestoru. Predpokladá sa, že v katalytickom mechanizme je zahnutá aktivácia serínu atómom zinku, tvorba kovalentného fosforylserinového intermediátu, jeho hydrolyza pomocou vody aktivovanej druhým atómom zinku a uvoľnenie, respektíve prenos fosfátu na iný akceptor. Úloha enzýmu by mohla byť vďaka transferázovej aktivite omnoho širšia a mohla by zahŕňať procesy fosforylácie a defosforylácie proteínov. Prírodnými substrátmi pre enzým sú fosfoetanolamín, pyridoxál-5-fosfát, pyrofosfát.

## MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ A BIOCHEMICKÁ PODSTATA OCHORENIA

Gén pre TNSALP je lokalizovaný na prvom chromozóme v oblasti 1p36.1-34. Je dlhý viac ako 50 kb, má 12 exónov a kóduje proteín s dĺžkou 507 aminokyselín. Doposiaľ bolo popísaných 204 mutácií génu (<http://www.sesep.uvsq.fr/Database.html>). Popísané mutácie a vplyv na klinickú formu ochorenia sú dokumentované v tabuľke (prevzaté Mornet a spol. 2001). Korelácia medzi fenotypom a genotypom sa nedá dobre určiť, pretože väčšina pacientov sú zložením heterozygoti pre missense mutácie. Medzi kaukazoidnými pacientmi je rozšírená mutácia E174K, ktorá má pôvod v severozápadnej Európe a mutácia A23V, ktorá má pravdepodobne germánsky pôvod. Predpokladajú sa minimálne dva závažné dôsledky deficiencie enzýmovej aktivity TNSALP. Pyrofosfát sa považuje za inhibítor mineralizácie, ktorý je efektívne štiepený enzýmom vďaka jeho pyrofosfátasej aktivite. Hodnoty pyrofosfátu v plazme a v moči sú zvýšené pri hypofosfatázii. ALP môže byť dôležitá pri mineralizácii tým, že pôsobí ako membránový transportér fosfátu, proteín viažuci extracelulárny vápnik. Oba minerály sú potrebné pre tvorbu hydroxyapatitu.

## KLINICKÝ OBRAZ – MANIFESTÁCIA

Obvykle sa ochorenie člení do piatich klinických foriem hlavne podľa toho v akom veku sa ochorenie manifestuje.

### Perinatálna (letálna) hypofosfatázia

Je najťažšia forma s výraznou hypomineralizáciou plodu, so skrútením a deformitami končatín. Postihnutí jedinci prežívajú iba niekoľko dní, zlyhávajú respiračné funkcie z dôvodu rachitickeho hrudníka a hypoplázie pľúc.

### Infantilná hypofosfatázia

Prezentuje sa do šiestich mesiacov veku nízkym prírastkom na hmotnosť, znakmi rachitidy, fraktúrami rebier, hyperkalcémiou a hyperkalcériou, ktorá vedie k nefrokalcinóze a renálnemu zlyhaniu.

### Detská forma

Prejavuje sa predčasným vypadávaním mliečnych zubov a zníženou tvorbou dentálneho cementu. Rachitída spôsobí nízky vzrast, chôdza je oneskorená a na širokej báze. Pacienti trpia bolesťami, opuchmi kĺbov, svalovou slabosťou, môže sa vyskytovať kraniosynostóza napriek otvoreným fontanelám.

### Dospelá forma

Obvykle sa prejaví v strednom veku, pacienti uvádzajú predčasnú stratu zubov. Osteomalácia sa manifestuje bolesťami chodidiel, metatarzálnymi fraktúrami a diskomfortom v stehnách a bedrách, čo je spôsobené femorálnymi pseudofraktúrami. Vyžrázaný kalcium pyrofosfát môže vyvolať ataky artritídy a bolesti kĺbov.

### Odontohypofosfatázia

Nie sú prítomné známky rachitídy a osteomalácie. Prítomné sú iba dentálne prejavy a včasná periodontitis.

## LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Sérové aktivity NSALP sú značne ovplyvnené vekom a pohlavím, pričom sú nižšie u dospelých ako u detí. Zvlášť vysoké aktivity sa namerajú počas rastovej akcelerácie v puberte, ktorá nastupuje skôr u dievčat ako u chlapcov. Bežne sú akceptované u dospelých referenčné hodnoty 0,5 až 1,7  $\mu\text{kat/l}$  a u detí 1,3 až 5,8  $\mu\text{kat/l}$ . Pri hypofosfatázii platí, že čím nižšie sú sérové aktivity ALP, tým je klinická forma ťažšia. Diferenciálno-diagnosticky dôležitý je nálež zvýšených hodnôt ALP pri rachitidide a osteomalácie iného pôvodu. Znížené aktivity môžu byť sekundárne pri hypotyreoidizme, ťažkej anémii, celiakii, Wilsonovej chorobe, Zn-deficiencii, terapii glukokortikosteroidmi, fibrátmi a po chemoterapii. Hodnoty séroveho fosfátu a kalcia nemusia byť zmenené. U infantálnych foriem však hyperkalcémia a hyperkalcéria môže byť prítomná. Pri diagnostike neistote môže byť užitočné vyšetrenie fosfoetanolamínu, pyridoxál-fosfátu, pyrofosfátu v plazme a v moči. Molekulárno-genetické vyšetrenie vzhľadom na rozmanitosť mutácií vyžaduje sekvenčnú analýzu.

## ZÁVER

Zavedenie molekulovo-genetických metód pre gén ALPL v CLG FNSP Bratislava otvára možnosť kauzálnej diagnostiky u pacientov s vysloveným podozrením na hypofosfatáziu, čo dokumentujeme aj v prezentovanej kazuistike.

## KAZUISTIKA

Na našom pracovisku boli doposiaľ diagnostikovaní dvaja pacienti v príbuzenskom vzťahu (sestry) so zníženými aktivitami tkanivovo-nešpecifickej alkalické fosfatázy. U staršej zo sestier (r. n. 1969) sa objavili prvé známky ochorenia vo veku 32 mesiacov (kostné zmeny na dlhých kostiach a rebrách, predčasná strata mliečného chrupu, nízka aktivita ALP). Opakovane namerané nízke hodnoty ALP (posledné vyšetrenie 0,06  $\mu\text{kat/l}$ ), bez zmien v hodnotách vápnika a fosfátov v sére a v moči. Mladšej zo sestier (r. n. 1978) bola diagnostikovaná hypofosfatázia vo veku štyroch mesiacov na základe rodinnej anamnézy, zmien biochemických parametrov a klinických prejavov (pneumonia lobul. bilat., globálna hypotonia, mäkké zhlavie, naznačená Harrisonova ryha a zhrubnuté osteochondrálne spojenia rebier, kraniosynostosis s prejavmi intrakraniálnej hypertenzie). Opakovane boli namerané nízke aktivity ALP (posledné vyšetrenie 0,08  $\mu\text{kat/l}$ ). Molekulárno-genetické vyšetrenie, realizované v r. 2008 na našom pracovisku, odhalilo, že v oboch prípadoch sa jedná o identických zložených heterozygotov; jedna mutácia bola zistená v 5. exóne (c.299C>T), vedúca k zámene Thr83Met, druhá v 6. exóne (c.571G>A), spôsobujúca zámenu Glu174Lys.



### A - ľavé koleno bočná projekcia:

1. femoropatelárna artróza, 2. hypoplázia laterálneho kondylu, 3. gonartróza, nadmerný dorzálny sklon tibia 4. stav po stredovej zlomenine hlavičky fibuly 5. rozšírenie metafýz "kyjakovitého tvaru"

### B - členky AP projekcia:

1. rozšírenie metafýz tibia a fibuly 2. abnormálny sklon kĺbovej štrbiny talokrurálneho kĺbu, známky artrózy

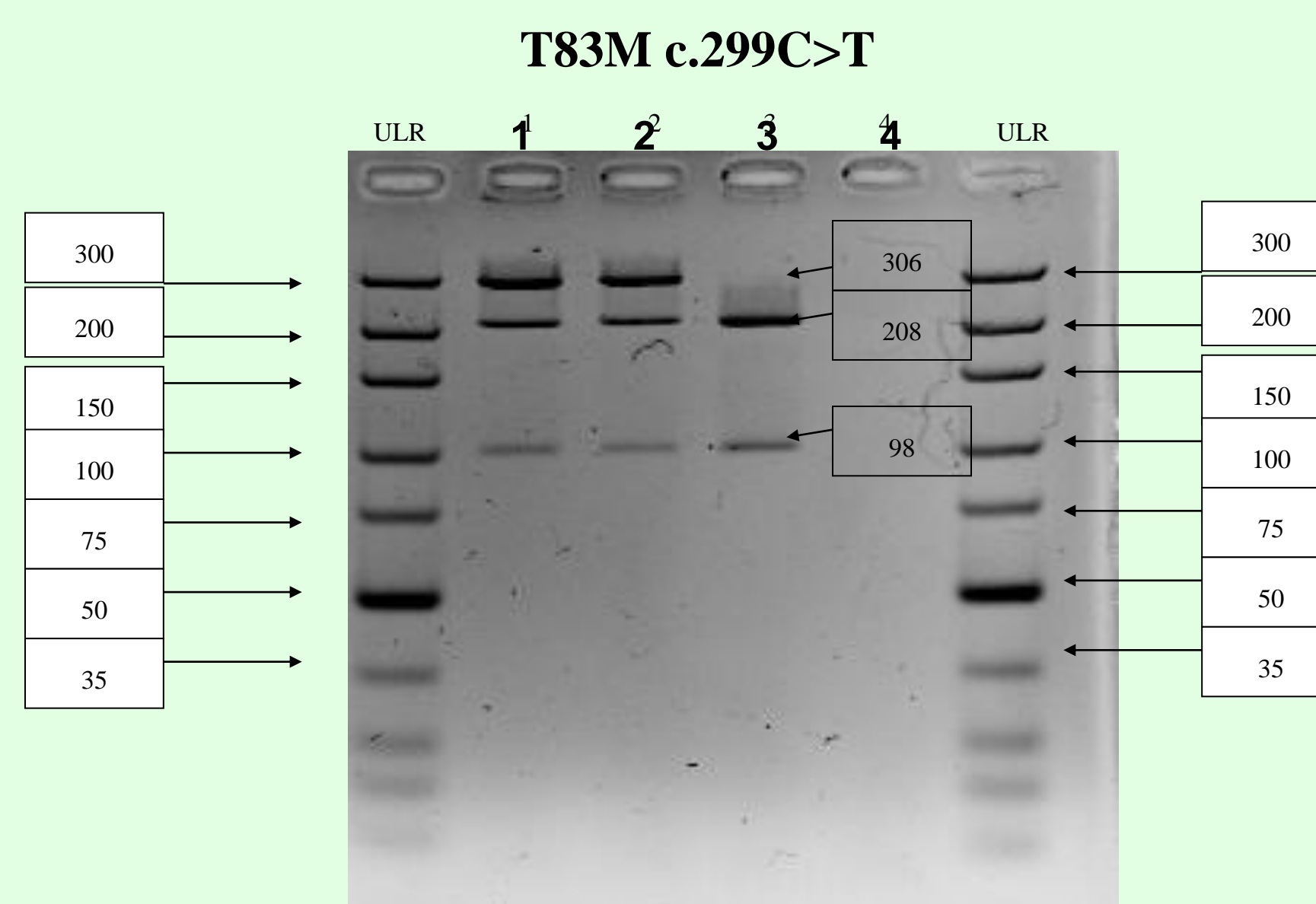
### C - kolena AP projekcia:

1. zahrotenie eminentia intercondylica ako príznak abnormálnej osifikácie ligament 2. artrotické zmeny kĺbných štrbín (osteofyty, nepravilnosti, zúženie štrbín) 3. rozšírenie metafýz "kyjakovitého tvaru" 4. hypoplázia laterálneho kondylu femuru

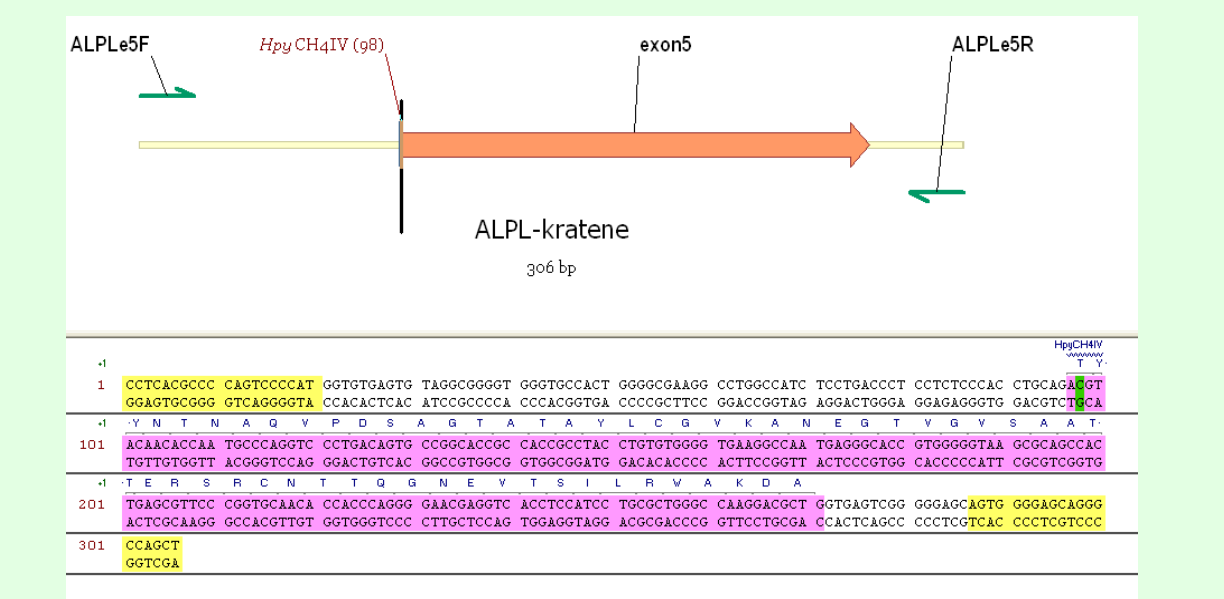
## MOLEKULOVO-GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

Molekulovo-genetická detekcia mutácií génu ALPL:

Z izolovanej genomickej DNA leukocytov, PCR metódou amplifikujeme sekvencie jednotlivých exónov (sekvencie primerov obr. vpravo). Ďalej sa pristupuje k sekvenčnej analýze všetkých 12 exónov génu ALPL. PCR-RFLP: Mutácia c.299C>T (T83M) bola verifikovaná aj restriktívnou analýzou, touto mutáciou v 5. exóne zaniká štiepne miesto pre HpyCH4IV.



Meno	sekvencia
ALPL#1	AGCGAGATATGTTTCAGGAA
ALPL#2	GCATCAATGTTTCAGGAA
ALPL#3	ATGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#4	CAAGCTTAAATGTTTCAGGAA
ALPL#5	CTGAGATAGAGAGGTTTCAGGAA
ALPL#6	CGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#7	AGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#8	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#9	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#10	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#11	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#12	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#13	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#14	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#15	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#16	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#17	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#18	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#19	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA
ALPL#20	CTGAGCTCTCTGTTTCAGGAA

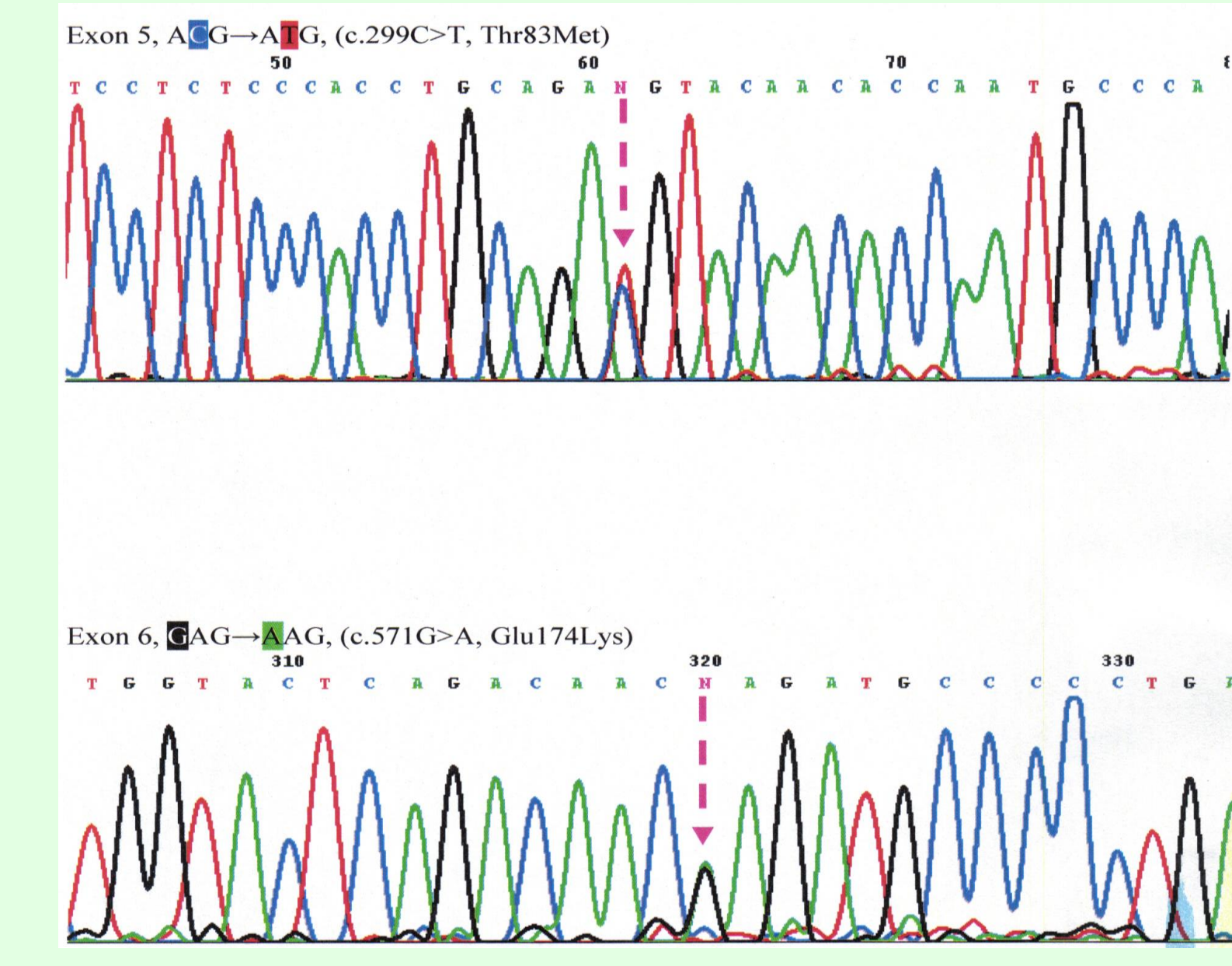


PCR-RFLP: PCR produkt 306bp, WT 208+98bp, MUT 306bp

1. Pacient č.1 (WT/MUT)
2. Pacient č.2 (WT/MUT)
3. Kontrola vzorka (WT/WT)
4. Negatívna kontrola

### Závažnosť klinickej manifestácie vo vzťahu k mutáciám

Závažnosť	Miesto
Altrénne miesto alebo miesta susediace s ním (G46V, T83M, A94T, A99T, G112R, N155D, H154Y, A159T, E167W, D377A, D377Y, G317D, A331T, A360V, D361V, H364R, B433C)	M45L, H154R, B433E
Väčšie aktívne miesto (B433C, T117N)	R119E, E174K, E174G, B433E
Homodimérove styčné miesto (A23V, R54C, R54P, R54E, G58S, G103R, R374C, N400S, S428P, V442M, G456S, E459K, E459G, N461I, G474E)	A167V, V365D, D389G, G439R, B473F
Korunková doména (R374C, N400S, V406A, G409C, S428P, B433C)	B433E, A382S, D389G, Y419E
Kalciové miesto alebo miesta susediace s ním (R206W, K207E, E218G, E274E, D277A, D277Y, E281E, D289V)	G203V, L272F, M278V
Ostatné (A34V, R135E, G145V, A162T, C184Y, Q190P, N194D, R229E, G232V, F310C, F310L, C472S)	Q59R, A160T, S164L, F310G



Sekvenčná analýza 5. a 6.exónu génu ALPL: mutácie c.299C>T (T83M) a c.571G>A (E174K) sú označené na obrázku šípkou (u oboch sestier zistené rovnaké mutácie).