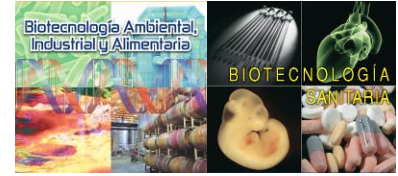


Revisión

Galactosemia tipo III



Ana M Brokate-Llanos y Manuel J. Muñoz*

¹Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide/CSIC/JA, Crta. Utrera Km1. 41013 Sevilla.

*mmunrui@upo.es

Palabras clave: galactosemia tipo III; galactosa-4-epimerasa; UDP-azúcares

RESUMEN

Un gran número de enfermedades metabólicas pertenecen al grupo de enfermedades clasificadas como enfermedades raras. Las mutaciones en cada una de las tres enzimas encargadas del correcto metabolismo de la galactosa producen un tipo de enfermedad rara conocida como galactosemias, clasificadas como tipo I, II y III, según la enzima afectada. Dentro de las galactosemias, la deficiencia de galactosa-4-epimerasa (GALE) responsable de la galactosemia tipo III es la más rara, la de más difícil diagnóstico, con la aparición de signos clínicos más severos y no cuenta con un tratamiento definido. Las investigaciones sobre la galactosemia tipo III en células de mamíferos, levaduras, moscas y *Caenorhabditis elegans* que se están realizando pretenden comprender mejor los mecanismos de la enfermedad, buscar nuevos métodos diagnósticos y dianas para su tratamiento.

REVISIÓN

1.1. El Metabolismo de la Galactosa

La galactosa es un monosacárido que junto con la glucosa dan lugar a la lactosa, primer alimento de todos los mamíferos. En la vida adulta, además la galactosa se consume con la ingestión de ciertas frutas (níspero, dátiles, papaya, higos), legumbres (garbanzos, habichuelas, lentejas) y verduras (espinacas), es uno de los 8 monosacáridos esenciales de la dieta y su metabolismo está destinado a convertirse en glucosa-1 fosfato, el metabolito más utilizado como recurso energético, y en la producción de UDP-galactosa como donador de azúcares en los procesos de glicosilación.

La ruta encargada del metabolismo de la galactosa se conoce como la ruta Leloir, descrita en 1947 por el premio Nobel de química en 1970, Luis Federico Leloir. En su metabolismo intervienen 4 enzimas, de las cuales la galactoquinasa (GALK), la galactosa 1P uridiltransferasa (GALT) y la UDP-galactosa-4-epimerasa (GALE) están conservadas desde bacterias hasta mamíferos (Fridovich-Keil, 2006) (Figura 1).

Las mutaciones en alguna de las tres enzimas en humanos dan origen a los desórdenes metabólicos hereditarios conocidos como galactosemia. Según la enzima deficiente la galactosemia ha sido clasificada como tipo II si está afectada la galactoquinasa, GALK, (OMIM 230200), tipo I si corresponde a galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, GALT, (OMIM 230400) y tipo III cuando es debido a fallos en la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa, GALE, (OMIM 230200).

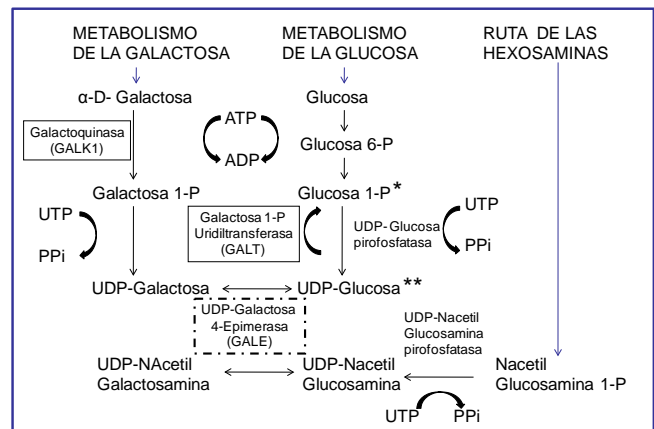


Figura 1. Ruta Leloir. En el primer paso β-D-galactosa es epimerizada a α-D-galactosa por la galactosa mutarotasa (GALM, EC 5.1.3.3), el siguiente paso involucra una fosforilación dependiente de ATP de la α-D-galactosa por la galactoquinasa (GALK1, EC 2.7.1.6) para convertirla en galactosa-1-fosfato. En el tercer paso, la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT, EC 2.7.1.6) cataliza la transferencia de un grupo UMP, de la UDP-glucosa a la galactosa-1-fosfato generando glucosa 1 fosfato y UDP-galactosa y por último la UDP-galactosa es convertida a UDP-glucosa por acción de la UDP-galactosa-4-epimerasa (GALE, EC 5.1.3.2) (Holden et al., 2003; Timson, 2006). GALE también realiza la conversión de UDP-glucosa a UDP-galactosa y la interconversión de UDP-Nacetilglucosamina a UDP-Nacetilgalactosamina, * Entrada en glicolisis. ** Formación de glucógeno. Las enzimas en recuadros son de la ruta Leloir.

1.2. Galactosa-4-epimerasa (GALE)

La UDP-galactosa-4-epimerasa (GALE) fue descrita en un principio como la última enzima de la Ruta Leloir encargada de convertir la UDP-galactosa (UDP-gal) a UDP-glucosa (UDP-glu), con capa-

cidad de realizar la reacción en dirección inversa, UDP-glu a UDP-gal (Holden et al., 2003). Además se ha descrito otra función para GALE presente en prácticamente todos los organismos con la excepción de algunos microorganismos. Esta actividad se encuadra dentro del paso final de la Ruta de las Hexosaminas realizando la interconversión de UDP-N-Acetil glucosamina (UDP-NAglu) a UDP-N-Acetilgalactosamina (UDP-NAgal). La UDP-NAglu, al igual que la UDP-glu, se generan además por otras rutas metabólicas (Kingsley et al., 1986a; Maley and Maley, 1959; Piller et al., 1983; Wohlers et al., 1999; Wohlers and Fridovich-Keil, 2000) (Figura 1). En la actualidad, se le reconoce a GALE no sólo su papel como enzima metabólica de la galactosa sino también un papel esencial en la síntesis y control de los niveles de UDP-glu, UDP-gal, UDP-NAglu y UDP-NAgal (Schulz et al., 2005), los cuales son necesarios para el proceso de glicosilación.

A nivel estructural, GALE es la enzima de la ruta Leloir más estudiada. Es una enzima dimerica que pertenece, junto con las dehidrogenasas, isomerasas, oxidoreductasas y liasas, a la super-familia de proteínas de cadena corta dehidrogenasa/reductasa (sdrs) (Thoden and Holden, 1998) implicadas en muchos procesos biológicos y caracterizadas por contener un residuo conservado de Tyr-X-X-X-Lys localizado en el sitio catalítico, siendo la Tyr-157 el aminoácido que interactúa directamente con el grupo 4'-hidroxil del azúcar sustrato y sirve de base del sitio activo. Además del sitio catalítico están localizados en la proteína los sitios de interacción de cada uno de los azúcares y del cofactor NADH (Thoden et al., 2001).

1.3. Galactosemia tipo III

La galactosemia tipo III es una enfermedad rara producida por mutaciones en el gen GALE que se caracteriza por la imposibilidad de metabolizar galactosa. Los pacientes con esta deficiencia no metabolizan la galactosa al no ser capaces de transformar la UDP-gal a UDP-glu produciéndose la acumulación de UDP-gal y galactosa 1-P (gal-1P), un metabolito anterior en la ruta (Figura 1). A la acumulación de estos compuestos y otros metabolitos derivados de metabolismos alternativos de la galactosa como galactitol, inositol y galactonato, cuya acumulación resulta ser tóxica, se les atribuye los signos clínicos de la enfermedad. Los síntomas pueden incluir cataratas tempranas, daño hepático, daño renal, sordera, retardo mental y en el desarrollo (Walter et al., 1999). Sin embargo, al tener GALE dos papeles distintos en la epimerización de la UDP-gal a UDP-glu y de UDP-NAglu a UDP-NAgal, y ser estos azúcares necesarios para la glicosilación, se ha postulado que los síntomas de las personas con galactosemia tipo III también puedan ser debidos a defectos en glicosilación (Tyfield and Walter, 2002). De hecho, se ha descrito defectos en la glicosilación tipo O y N en células de ratón mutantes para este gen (Kingsley et al., 1986b).

Tradicionalmente se han reconocido dos formas de galactosemia tipo III: a) Una forma benigna o periférica, en la cual la deficiencia

está restringida a eritrocitos y leucocitos circulantes (Gitzelmann, 1972; Holton JB, 2000; Kalckar, 1965) con una frecuencia de 1/6200 a $\leq 1/64800$ dependiendo del grupo racial afroamericanos o caucásicos respectivamente (Alano et al., 1998) y b) Una forma severa o generalizada con actividad epimerasa casi nula en eritrocitos y linfoblastos (Holton et al., 1981) con una frecuencia muy baja. Posteriormente, esta condición binaria de la deficiencia de epimerasa se ha puesto en duda y se ha descrito como un desorden continuo, en la cual en algunos pacientes se combinan signos y síntomas de la forma benigna y de la forma severa (Openo et al., 2006).

El diagnóstico de las galactosemias está basado en la detección de niveles elevados de galactosa en sangre y orina. Para el caso de la galactosemia tipo III se debe corresponder un nivel elevado de galactosa-1-fosfato con niveles normales de actividad de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT).

Los estudios realizados del gen GALE en pacientes con galactosemia tipo III muestran que estos enfermos portan mutaciones puntuales a lo largo de todo el gen y no deleciones o reorganizaciones del mismo (Daude et al., 1995). La naturaleza de las mutaciones específicas en diferentes puntos del gen afectan de manera diversa a la actividad de la proteína GALE, pudiendo afectar de forma independiente a cada una de las cuatro reacciones que lleva a cabo esta enzima (Wohlers et al., 1999). La falta total de función de GALE en humanos ha sido hipotetizada como letal debido a su función esencial en la fabricación de los diferentes UDP-azúcares (Kalckar, 1965) esta letalidad ha sido demostrada con una deleción de gale en *D. melanogaster* como letal embrionario (Sanders et al., 2010) y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Brokate-Llanos et al. 2011).

Los pacientes que sufren cualquier tipo de galactosemia tienen indicada la restricción de galactosa y su precursor lactosa de la dieta ya que acumulan metabolitos derivados que afectan a su salud (Fridovich-Keil, 2006; Timson, 2006; Walter et al., 1999). Sin embargo, en galactosemia tipo III no es posible la eliminación total ya que es necesaria para la biosíntesis de UDP-gal. Para evitar en los enfermos una deficiencia de UDP-gal se recomienda una ingesta controlada de galactosa y de N-Acetil galactosamina (Kingsley et al., 1986a; Walter et al., 1999) ya que estos compuestos son necesarios para la síntesis de glicoproteínas y glicolípidos, cuyo desequilibrio puede ser un factor de patogénesis (Timson, 2006) y de un mal ensamblaje de complejos polisacáridos y otras macromoléculas glicosiladas, que son especialmente importantes en el cerebro (Wohlers et al., 1999). Los estudios de esta enfermedad en células de ovario de hamster chino (*IdID*), *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y *C. elegans* describen problemas de desarrollo y crecimiento cuando son sometidos al suministro de D-galactosa (Krieger et al., 1989; Ross et al., 2004; Sanders et al., 2010; Walter et al., 1999; Brokate-Llanos et al. 2011).

El papel regulador de GALE en los niveles de UDP-gal, UDP-glu, UDP-NAGal y UDP-NAGlu es clave en la glicosilación, la cual ocurre en más de la mitad de todas las proteínas en organismos eucarióticos y cerca del 90% de éstas son glicosilación tipo N (Apweiler et al., 1999). La función de las glicoproteínas tipo N son diversas y se han relacionado con multitud de procesos de reconocimiento entre los que se encuentran: Estabilizar la proteínas contra la desnaturalización y proteólisis, potenciar la solubilidad, modular la respuesta inmune, facilitar la orientación de proteínas relativa a la membrana, conferir rigidez estructural, regular el recambio (turnover) proteico, ajustar la carga y punto isoeléctrico de las proteínas y mediar interacciones con patógenos (Helenius and Aebi, 2004). Mientras, la glicosilación tipo O ha sido implicada en enfermedades neurodegenerativas y cardíacas (Clark et al., 2003; Dias and Hart, 2007; Liu et al., 2007), en envejecimiento (Fulop et al., 2008), remodelación de histonas, proliferación, apoptosis y degradación proteosomal (Berninsone, 2006) y específicamente la adición O-GluNAc ha sido implicada en mamíferos en resistencia a insulina y diabetes tipo II (Akimoto et al., 2005).

CONCLUSIÓN

La galactosemia tipo III es una enfermedad rara difícil de diagnosticar, muchos de los pacientes no son diagnosticados con prontitud debido a que esta prueba no pertenece al tamizaje de enfermedades metabólicas establecido en los países desarrollados. Una vez diagnosticados, no existe un protocolo consenso de tratamiento, el cual suele consistir en la eliminación de la dieta de alimentos con alto contenido en galactosa, el suministro de pequeñas dosis de galactosa y N-acetil galactosamina. Este tratamiento consigue mejorar los daños inmediatos pero no los daños a largo plazo, que principalmente afectan al desarrollo motor y cerebral. Por otra parte, los pacientes no sólo padecen los síntomas propios de los fallos en el metabolismo de la galactosa sino que además presentan los síntomas de enfermedades relacionadas con la glicosilación.

En la mayoría de los defectos congénitos de la N-glicosilación de proteínas se presentan daños en muchos órganos como ojo, músculo, riñón etc. pero el mayor compromiso está en el hígado y sistema nervioso (principalmente cerebro), quizás en estos órganos en los enfermos con galactosemia tipo III no solo se produzca acumulación de metabolitos tóxicos de la galactosa sino también los defectos propios de la N-glicosilación.

Esta enfermedad rara como tantas otras son las grandes olvidadas de las empresas farmacéuticas y son las instituciones públicas las que tienen la obligación moral de trabajar en ellas. Para la galactosemia tipo III, en el que la enfermedad no solo genera problemas a nivel celular sino también a nivel de desarrollo de órganos y tejidos, se hace necesario trabajar no solo con cultivos celulares sino con animales modelos. *Drosophila* (Sanders et al., 2010) y *C. elegans* (Brokate-Llanos et al., 2011) son dos animales modelos donde se han aislado mutaciones en el gen homólogo a

GALE humano y que podrían ser útil para ensayos de fármacos y estudios de complementación con alelos de pacientes que sufren la galactosemia tipo III.

AGRADECIMIENTOS

AMB está financiada por el proyecto BFU2011-14049-E del Ministerio de Economía y Competitividad.

BIBLIOGRAFIA

- Akimoto, Y., Hart, G., Hirano, H., and Kawakami, H. (2005). O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetes. *Med Mol Morphol*, 84-91.
- Alano, A., Almashanu, S., Chinsky, J. M., Costeas, P., Blitzer, M. G., Wulfsberg, E. A., and Cowan, T. M. (1998). Molecular characterization of a unique patient with epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inher Metab Dis* 21, 341-350.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473, 4-8.
- Berninsone, P. M. (2006). Carbohydrates and glycosylation. *WormBook*, 1-22.
- Brokate-Llanos A. M. (2011) Implicaciones de gale-1 en el desarrollo y la longevidad de *Caenorhabditis elegans*.: Un modelo animal de galactosemia tipo III. Tesis Doctoral. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla-España.
- Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. (2004). srf-3, a mutant of *Caenorhabditis elegans*, resistant to bacterial infection and to biofilm binding, is deficient in glycoconjugates. *J Biol Chem* 279, 52893-52903.
- Clark, R., McDonough, P., Sawson, E., Trost, S., Suzuki, M., Fukuda, M., and al., e. (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*, 44230-44237.
- Daude, N., Gallaher, T. K., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., Petry, K. G., Haworth, I. S., and Reichardt, J. K. (1995). Molecular cloning, characterization, and mapping of a full-length cDNA encoding human UDP-galactose 4'-epimerase. *Biochem Mol Med* 56, 1-7.
- Dias, W., and Hart, G. (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst*, 766-772.
- Fridovich-Keil, J. L. (2006). Galactosemia: the good, the bad, and the unknown. *J Cell Physiol* 209, 701-705.
- Fulop, N., Feng, W., Xing, D., He, K., Not, L., Brocks, C., and al., e. (2008). Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology*.
- Gitzelmann, R. (1972). Deficiency of uridine diphosphate galactose 4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. *Helv Paediatr Acta* 27, 125-130.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.
- Holden, H. M., Rayment, I., and Thoden, J. B. (2003). Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 278, 43885-43888.
- Holton, J. B., Gillett, M. G., MacFaul, R., and Young, R. (1981). Galactosaemia: a new severe variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* 56, 885-887.
- Holton JB, W. J., Tyfield LA (2000). Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease., In Galactosemia, B. A. Scriver C, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B., ed. (New York: McGraw Hill), pp. 1553-1587.
- Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Takahashi, N., and Isobe, T. (2007). Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 6, 2100-2109.

- Kalckar, H. M. (1965). Galactose metabolism and cell "sociology". *Science* 150, 305-313.
- Karlsson, K. A. (2001). Pathogen-host protein-carbohydrate interactions as the basis of important infections. *Adv Exp Med Biol* 491, 431-443.
- Kingsley, D. M., Kozarsky, K. F., Hobbie, L., and Krieger, M. (1986a). Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell* 44, 749-759.
- Kingsley, D. M., Krieger, M., and Holton, J. B. (1986b). Structure and function of low-density-lipoprotein receptors in epimerase-deficient galactosemia. *N Engl J Med* 314, 1257-1258.
- Krieger, M., Reddy, P., Kozarsky, K., Kingsley, D., Hobbie, L., and Penman, M. (1989). Analysis of the synthesis, intracellular sorting, and function of glycoproteins using a mammalian cell mutant with reversible glycosylation defects. *Methods Cell Biol* 32, 57-84.
- Liu, J., Marchase, R., and Chatham, J. (2007). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J Mol Cell Cardiol*, 177-185.
- Maley, F., and Maley, G. F. (1959). The enzymic conversion of glucosamine to galactosamine. *Biochim Biophys Acta* 31, 577-578.
- Openo, K. K., Schulz, J. M., Vargas, C. A., Orton, C. S., Epstein, M. P., Schnur, R. E., Scaglia, F., Berry, G. T., Gottesman, G. S., Ficicioglu, C., *et al.* (2006). Epimerase-deficiency galactosemia is not a binary condition. *Am J Hum Genet* 78, 89-102.
- Piller, F., Hanlon, M. H., and Hill, R. L. (1983). Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem* 258, 10774-10778.
- Ross, K. L., Davis, C. N., and Fridovich-Keil, J. L. (2004). Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol Genet Metab* 83, 103-116.
- Sanders, R. D., Sefton, J. M., Moberg, K. H., and Fridovich-Keil, J. L. (2010). UDP-galactose 4' epimerase (GALE) is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech* 3, 628-638.
- Schulz, J. M., Ross, K. L., Malmstrom, K., Krieger, M., and Fridovich-Keil, J. L. (2005). Mediators of galactose sensitivity in UDP-galactose 4'-epimerase-impaired mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 13493-13502.
- Schulz, J. M., Watson, A. L., Sanders, R., Ross, K. L., Thoden, J. B., Holden, H. M., and Fridovich-Keil, J. L. (2004). Determinants of function and substrate specificity in human UDP-galactose 4'-epimerase. *J Biol Chem* 279, 32796-32803.
- Thoden, J. B., and Holden, H. M. (1998). Dramatic differences in the binding of UDP-galactose and UDP-glucose to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 11469-11477.
- Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil, J. L., and Holden, H. M. (2000). Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose 4-epimerase. *Biochemistry* 39, 5691-5701.
- Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil, J. L., and Holden, H. M. (2001). Human UDP-galactose 4-epimerase. Accommodation of UDP-N-acetylglucosamine within the active site. *J Biol Chem* 276, 15131-15136.
- Timson, D. J. (2006). The structural and molecular biology of type III galactosemia. *IUBMB Life* 58, 83-89.
- Tyfield, L., and Walter, J. (2002). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease., In Galactosemia, B. A. Scriver C, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B., ed. (New York: McGraw-Hill).
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 97-130.
- Walter, J. H., Roberts, R. E., Besley, G. T., Wraith, J. E., Cleary, M. A., Holton, J. B., and MacFaul, R. (1999). Generalised uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* 80, 374-376.
- Wohlers, T. M., Christacos, N. C., Harreman, M. T., and Fridovich-Keil, J. L. (1999). Identification and characterization of a mutation, in the human UDP-galactose-4-epimerase gene, associated with generalized epimerase-deficiency galactosemia. *Am J Hum Genet* 64, 462-470.
- Wohlers, T. M., and Fridovich-Keil, J. L. (2000). Studies of the V94M-substituted human UDPgalactose-4-epimerase enzyme associated with generalized epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inher Metab Dis* 23, 713-729.