Lo screening per il deficit di lipasi acida lisosomiale

Monica Gomaraschi
Centro Enrica Grossi Paoletti
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari
Università degli Studi di Milano

SCREENING PER LAL-D

- Caratteristiche cliniche e biochimiche
- Identificazione del probando
- Diagnosi

Caratteristiche cliniche e biochimiche

*Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in **135** reported patients with an underdiagnosed disease*

Age of onset	
<2y	19%
2-5y	39%
6-12y	25%
>13y	17%

Features	
Hepatomegaly	99%
Splenomegaly	74%
Elevated ALT/AST	100%
Elevated TC	100%
Elevated LDL-C	95%
Low HDL-C	89%

Bernstein DL et al. J Hepatol. 2013;58:1230

*Cholesteryl ester storage disease: protean presentations of lysosomal acid lipase deficiency (**71** cases)*

Age of onset	
<5y	63%
5-10y	22%
>11y	15%

Features	
Hepatomegaly	100%
Splenomegaly	86%
Elevated ALT/AST	83%
Elevated TC	90%
Elevated TG	48%
Low HDL-C	85%

Zhang B et al. JPGN 2013;56:682

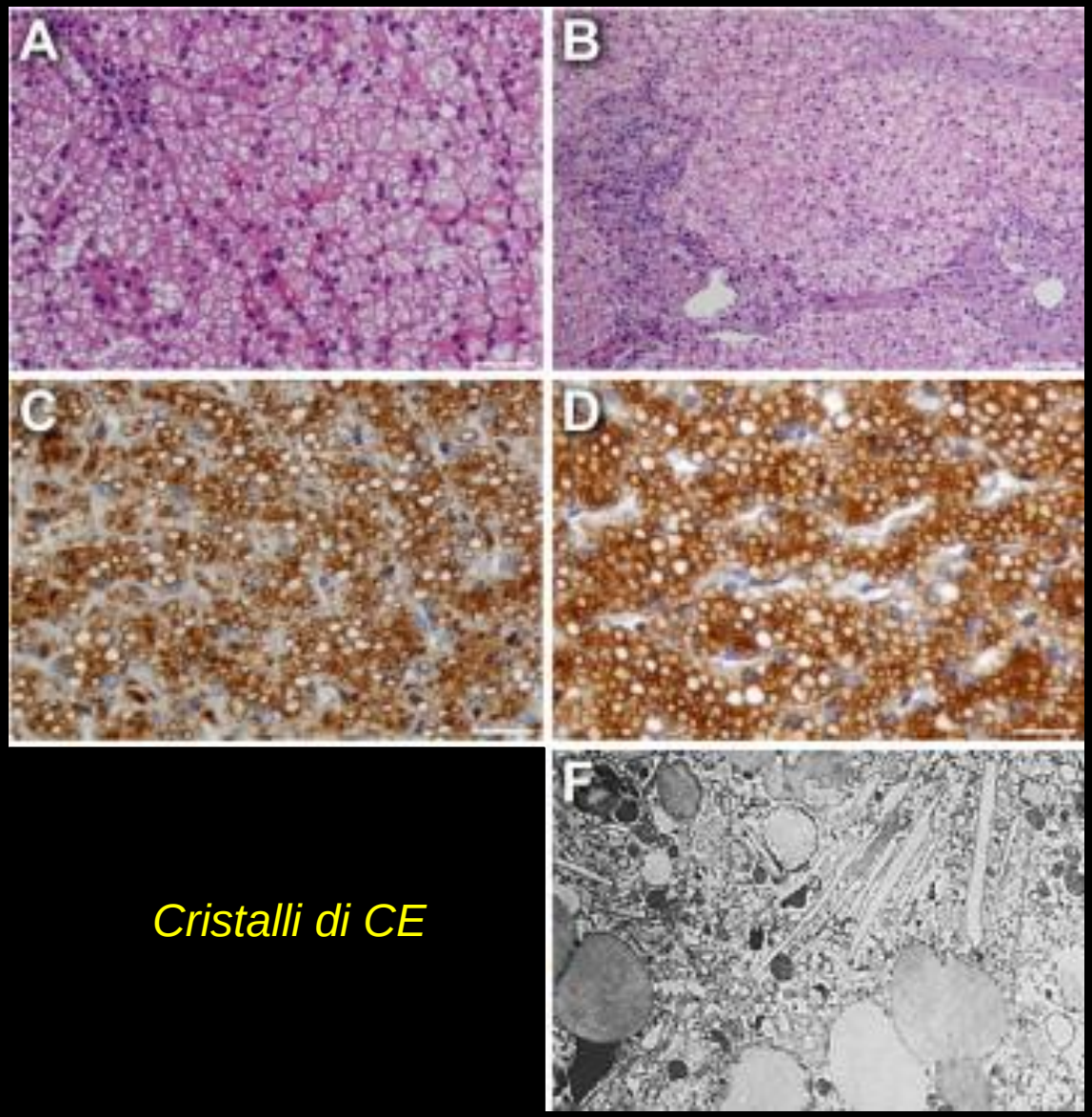
Caratteristiche cliniche e biochimiche

Steatosi microvescicolare con cellule schiumose

↓

Fibrosi portale e periportale, cirrosi micronodulare

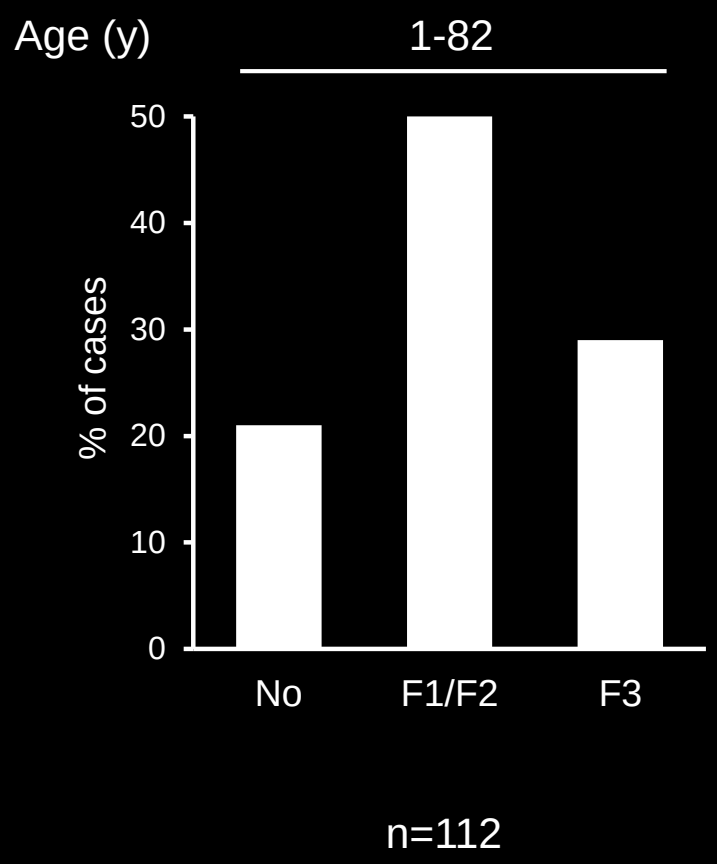
Immunostaining per marcatori lisosomiali

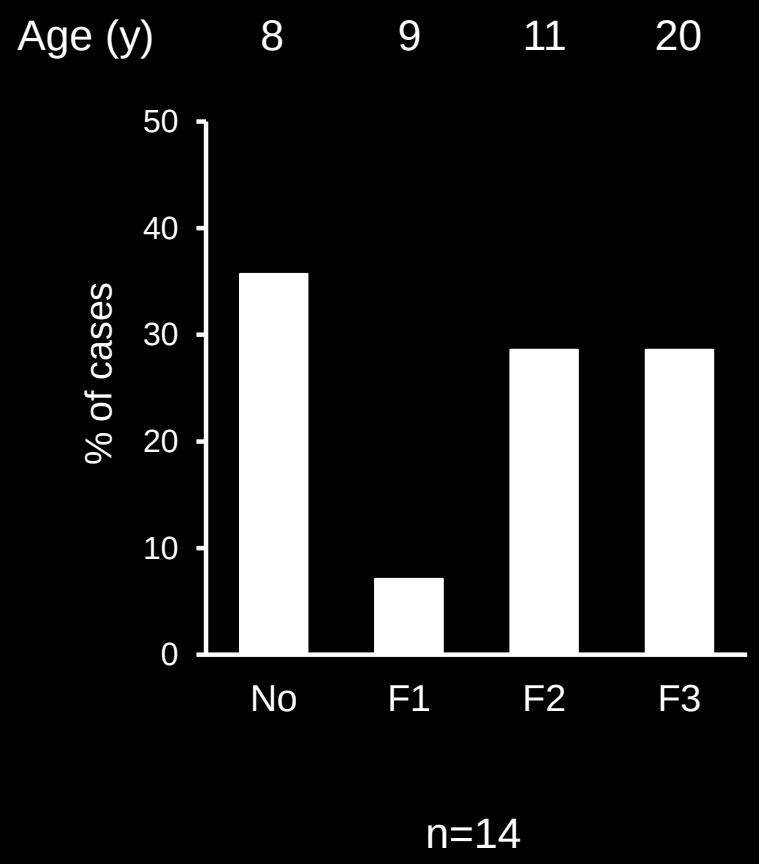


Cristalli di CE

Bernstein DL et al. J Hepatol. 2013;58:1230

Caratteristiche cliniche e biochimiche





Pisciotta L et al, Atherosclerosis 2017;265:124
Bernstein DL et al, J Hepatololgy 2013;58:1230

Caratteristiche cliniche e biochimiche

	CESD (n=66)
Age	16±11
Males/Females	33/33
Total cholesterol (mg/dl)	274.7±68.0
LDL-cholesterol (mg/dl)	209.7±63.6
HDL-C (mg/dl)	32.9±7.2
Triglycerides (mg/dl)	163.6±60.1
ALT (U/l)	102±43
AST (U/l)	82±34
GGT (U/l)	52±53

Burton BK, NEJM 2015;373:1010

SCREENING PER LAL-D

Epatologo

- Steatosi microvescicolare
- Epatomegalia
- Cirrosi criptogenetica
- NAFLD/NASH
  - con dislipidemia
  - senza normalizzazione ALT dopo perdita di peso
  - con BMI normale

SCREENING PER LAL-D

Lipidologo

- Ipercolesterolemia associata a valori di HDL-C ridotti

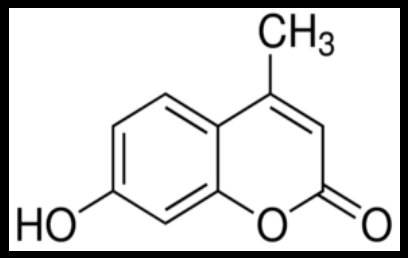
(LDL-C>160 mg/dl, HDL-C<40 mg/dl)

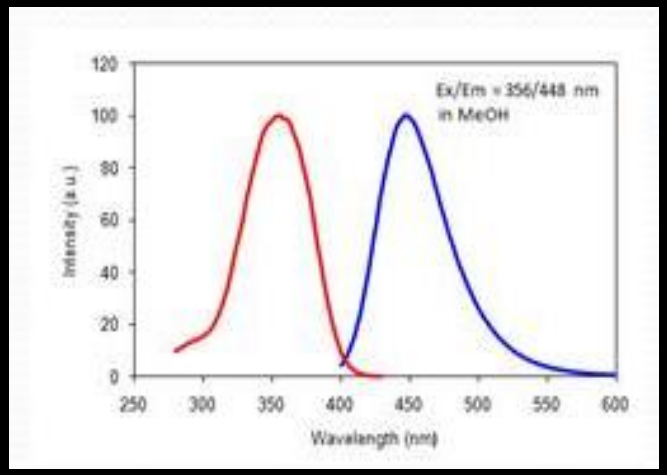
- Storia familiare di dislipidemia assente o incerta
- Aumento ALT e/o epatomegalia

DOSAGGIO LAL SU LINFO/MONOCITI

SUBSTRATI

^{3}H or ^{14}C cholesteryl esters





4-methylumbelliferone

4-methylumbelliferyl oleate → 4-methylumbelliferone + oleic acid

SVANTAGGI

7-10 ml di sangue intero per separazione linfociti
Tempo e strumentazione per separazione linfociti
Conservazione e spedizione delle cellule
Substrati non specifici per LAL

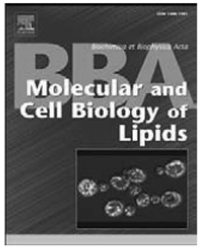
LALISTAT 2

Biochimica et Biophysica Acta 1791 (2009) 1155–1165

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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



Chemical screen to reduce sterol accumulation in Niemann–Pick C disease cells identifies novel lysosomal acid lipase inhibitors

Anton I. Rosenbaum [a,1], Madalina Rujoi [a,1], Amy Y. Huang [a], Hong Du [b], Gregory A. Grabowski [b], Frederick R. Maxfield [a,*]

[a] *Department of Biochemistry, Weill Cornell Medical College, 1300 York Avenue, New York, NY 10065, USA*
[b] *Division of Human Genetics, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229, USA*

LALISTAT 2

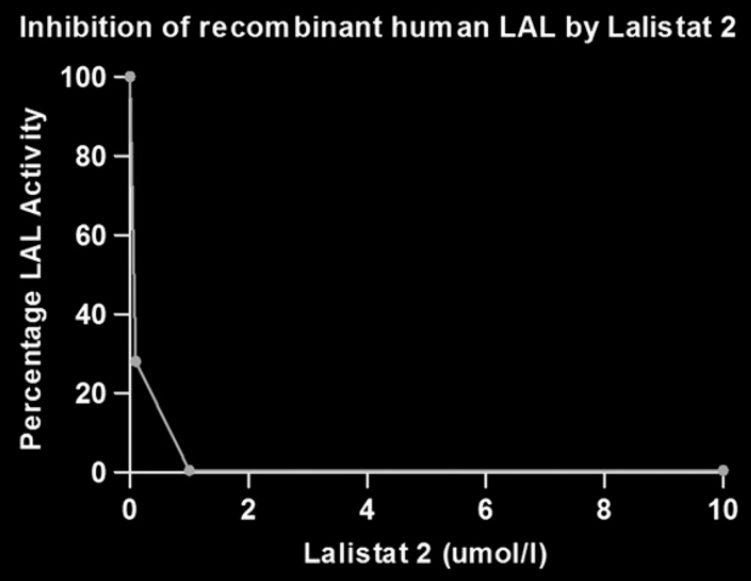


Fig. 1. Inhibitory effect of Lalistat 2 on rhLAL. Final concentration of rhLAL 0.002 U/L. Enzyme pre-incubated with inhibitor for 10 min. Incubation time 10 min.

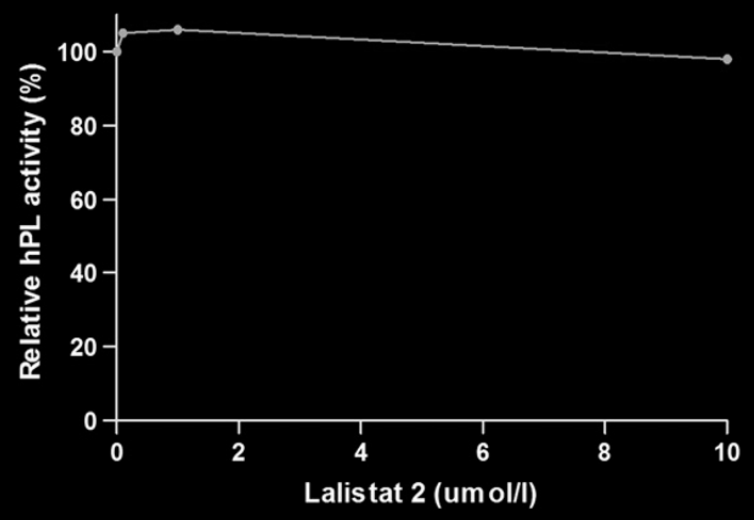


Fig. 2. Inhibitory effect of Lalistat 2 on human pancreatic lipase. Final concentration 6 U/ml. Enzyme pre-incubated with inhibitor for 10 min. Incubation time 2 h.

Hamilton et al, CCA 2012;413:1207

DOSAGGIO LAL SU DBS

Clinica Chimica Acta 413 (2012) 1207–1210

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

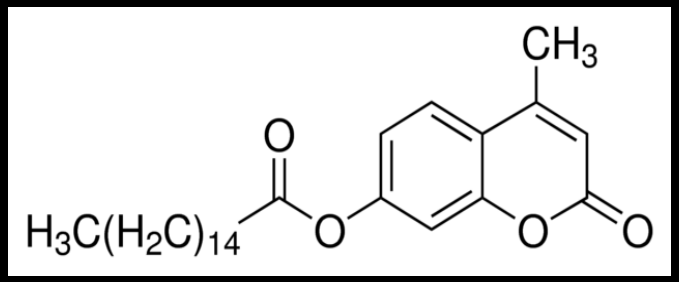
journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2

John Hamilton *, Iain Jones, Rajeev Srivastava, Peter Galloway

Biochemistry Department, Yorkhill Hospital, Yorkhill, Glasgow G3 8SJ, United Kingdom

DOSAGGIO LAL SU DBS



4-methylumbelliferyl palmitate

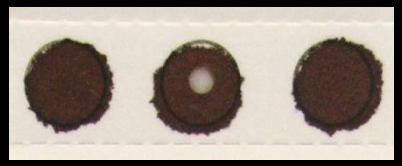
Lipasi → 4-methylumbelliferone + palmitic acid

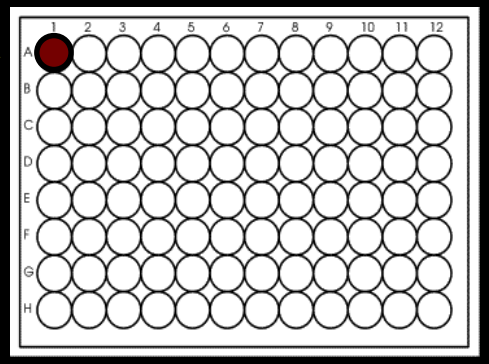
DBS → Attività lipasica totale

DBS → Lalistat 2 → Attività lipasica non LAL

Attività lipasica totale − Attività lipasica non LAL ↓ Attività LAL

DOSAGGIO LAL SU DBS



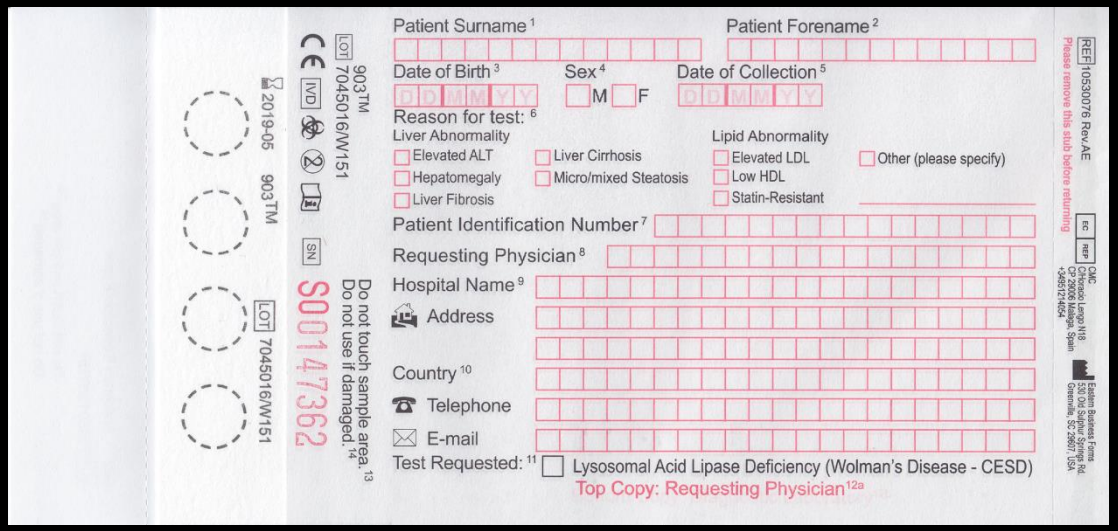


Eluizione in dH2O
1h RT

4MUP ± Lalistat 2

3h 37ºC

Fluorescenza
Ex 320 nm Em 460 nm



DOSAGGIO LAL SU DBS

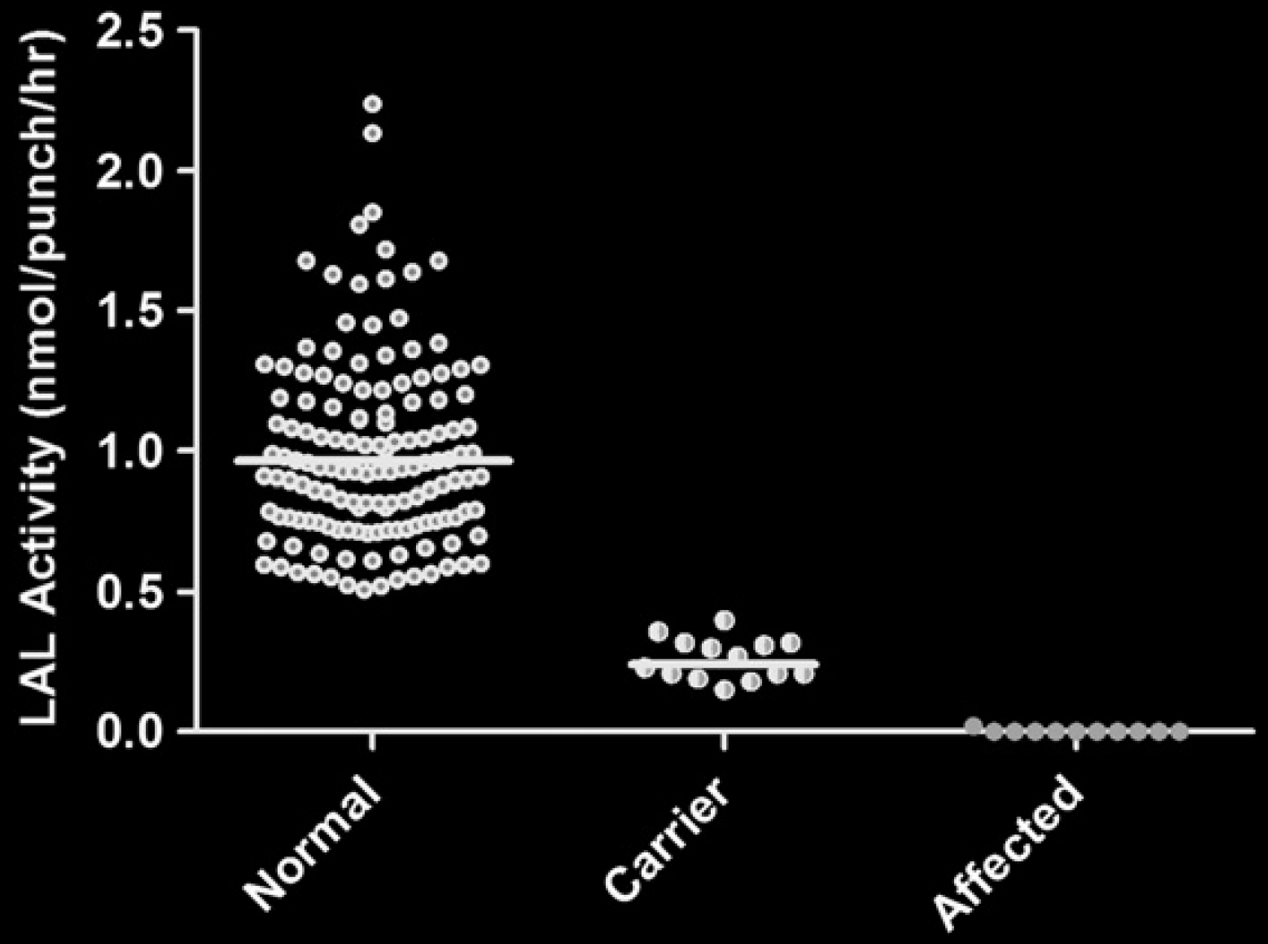


Fig. 6. LAL activity in 140 normal controls, 11 LAL deficient patients and 15 carriers. Limit of detection = 0.02 nmol/punch/h.

Hamilton et al, CCA 2012;413:1207

STABILITA' DBS

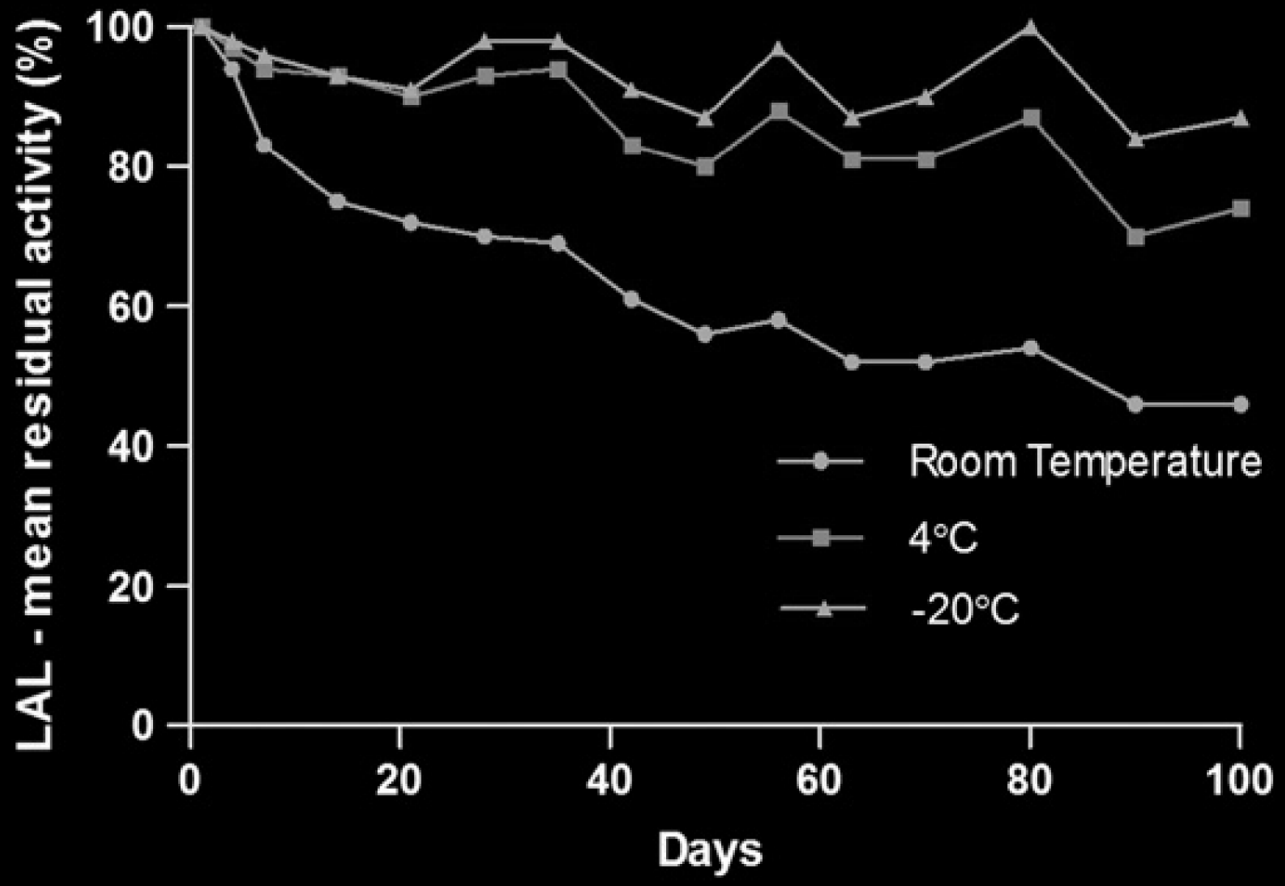


Fig. 5. LAL activity in DBS stored for up to 100 days at room temperature, 4 °C and –20 °C. Results are mean percentage residual activity from three controls.

Hamilton et al, CCA 2012;413:1207

VANTAGGI DBS

- ✓ Piccola quantità di sangue (~300 ul) contro i 7/10 ml dei linfociti
- ✓ Saggio rapido
- ✓ L'attività dell'enzima ha una buona stabilità: lo spot può essere conservato e spedito al laboratorio (in busta, no campione biologico)

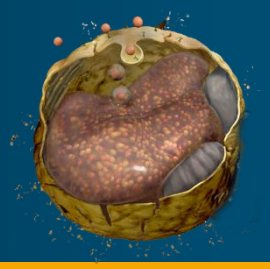
SVANTAGGI DBS

- ✓ Sensibile all'umidità
- ✓ L'attività della LAL si riduce del 15% dopo 7 giorni a temperatura ambiente e del 20% dopo 2 mesi a 4°C: conservazione a -20°C e analisi entro 60 giorni

⬇

Qualità del campione = attività β-galattosidasi

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO



Risultato	Significato
Attività dell'enzima LAL non rilevabile	Conferma la diagnosi di LAL-D (2 alleli mutati)
Attività dell'enzima LAL al di sotto del range di riferimento ma non compatibile con diagnosi di LAL-D	• Deficit secondario • Portatore di 1 solo allele mutato ⬇ sequenziamento del gene *LIPA*
L'attività dell'enzima LAL è normale (>0.80 nmol/punch/h)	Esclude LAL-D

SCREENING per LAL-D

LAL activity on DBS

Università degli Studi di Milano
Centro E. Grossi Paoletti c/o Ospedale Niguarda
Dr. Monica Gomaraschi

Fondazione Toscana, Pisa
Laboratorio Dislipidemie e aterosclerosi
Dr. Federico Bigazzi

Ospedale S. Orsola-Malpighi, Bologna
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche
Dr. Paola Paterini

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma
Unità di Epatologia e Gastroenterologia
Dr. Giulia Tozzi

Azienda Ospedaliera di Padova
Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino
Dr. Alberto Burlina

Policlinico Giaccone, Palermo
Laboratorio Lipidi
Dr. Davide Noto

LIPA sequencing

LIPIGEN network