



Kandidaatintutkielma

Alfa-D-Mannosidaasit ja Alfa-Mannosidoosi

Ville Mäkelä

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

1. Johdanto

1.1 Entsyymit

1.2 Lysosomit

1.3 Lysosomaaliset kertymäsairaudet

2. Alfa-mannosidaasit

2.1. Solulimakalvoston alfa-mannosidaasit

2.2. Golgin alfa-mannosidaasit

2.3. Sytosolin alfa-mannosidaasit

2.4 Lysosomaaliset alfa-mannosidaasit

2.5 Lysosomaalisten alfa-mannosidaasien rakenne ja toiminta

2.5.1 Inhibitio

3. Alfa-mannosidoosi

3.1 Mekanismi

3.2 Oireet

3.3 Patologia

3.3.1 Kalsium-homeostasia

3.3.2 Oksidatiivinen stressi

3.4 Alfa-mannosidaasin geeni ja mutaatiot

4. Hoito

4.1 Diagnoosi ja prognoosi

4.2 Hoitomuodot

Käytetyt lyhenteet

AMo

Alfa-mannosidoosi

Laman

Lysosomien alfa-D-mannosidaasi-entsyymi

AAV1

Adeno-Associated Virus 1

1. Johdanto

1.1 Entsyymit

Entsyymit ovat biologisia katalyyttejä, jotka ovat elintärkeitä kaikille eläville olennoille, myös ihmisille. Niitä tarvitaan eliön rakennekappaleiden muodostamiseen ja ravinnon ja kuona-aineiden hajotukseen. Näitä reaktioita voi tapahtua ilman entsyymejäkin, mutta spontaanisti ne ovat liian hitaita korkeiden aktivaatioenergiavaatimusten takia. Ilman entsyymejä elimistön nämä reaktiot tapahtuisivat miljoonia kertoja hitaammin tai ei ollenkaan, ja eläminen olisi mahdotonta. Entsyymien solunsisäinen sijainti myös varmistaa, että reaktiot tapahtuvat oikeissa paikoissa. (Cooper & Hausman 2013)

Elävät olennot tuottavat entsyymit itse geenien ohjeiden perusteella. Monet geenien koodaamat proteiinit ovatkin entsyymejä. Entsyymit toimivat katalyyseinä elimistön reaktioissa alentamalla reaktioon vaadittavaa aktivaatioenergiaa. Ne sitovat yhden tai useamman substraatin aktiiviseen kohtaansa, samalla luoden niille optimaalisen reaktioympäristön. Substraateille varmistetaan oikea orientaatio toisiinsa, ja välivaiheet stabiloidaan, mahdollistaen vaihtoehtoiset reaktiotiet. Lopuksi valmiit reaktiotuote tai -tuotteet irtoavat entsyymistä. Substraatit joko hajotetaan, niihin liitetään uusia ryhmiä, tai niistä tehdään täysin uusia molekyyilejä. Entsyymit voivat usein tämän jälkeen katalysoida yhä uusia reaktioita, koska entsyymien katalysoima reaktio ei vaikuta niihin itseensä. (Cooper & Hausman 2013)

1.2 Lysosomit

Lysosomit ovat solun kierrätyskeskuksia. Niihin viedään solulle turhia ja haitallisia makromolekyyilejä, jotka hajotetaan että solu voi ottaa niiden reaktiotuotteet uusiokäyttöön tai viedä turvallisesti ulos solusta. Ne muodostuvat lipidi-kaksoiskerroksesta ja sen sisällä olevista katabolisista entsyymeistä. Sen sisällä on melko matala pH. Alhainen pH aktivoi lysosomaalisia entsyymejä: jos pH on liian korkea, lysosomin entsyymit inaktivoituvat. Koska solussa normaalisti on korkeampi pH kuin lysosomeissa, lysosomaaliset entsyymit eivät toimi muualla solussa ja siten eivät pysty vaurioittamaan solua. (Cooper & Hausman 2013)

Lysosomit saavat proteiinit ja vaurioituneet soluelimet sisäänsä autofagosytoosilla. Siinä hajotettavan molekyylin ympärille muodostetaan vesikkeli, autofagosomi, joka pystyy yhdistymään lysosomiin. Lysosomin entsyymit sitten pilkkovat autofagosomin sisällön. Autofagosytoosilla on

tärkeä rooli ohjelmoidussa solukuolemassa, sikiön kehityksessä ja muissa solun ja eliön normaalissa toiminnassa. (Cooper & Hausman 2013)

1.3 Lysosomaaliset kertymäsairaudet

Perinnöllisissä sairauksissa virhe geneissä aiheuttaa geenin koodaamisessa proteiineissa ongelmia. Virhe voi vaikuttaa proteiiniin monella tavalla: Proteiini saattaa olla vajaatoimintainen tai liian tehokas, tai jopa puuttua kokonaan. Perinnöllisen sairauden vakavuus riippuu siitä, kuinka tärkeä proteiini on kyseessä ja kuinka vakava mutaatio geenissä on. Perinnölliset sairaudet ovat usein, varsinkin vakavimpien sairauksien kohdalla, resessiivisesti periytyviä. Dominantti sairauden geeni yleensä karsiutuu pois nopeasti, kun taas resessiivisen kantajat voivat levittää geeniä eteenpäin. (Vitner *et al.* 2010)

Yksi periytyvien sairauksien kategoria on lysosomaaliset kertymäsairaudet. Nämä sairaudet aiheutuvat yleensä mutaatioista, mutta erilaisten inhibiittoreiden, kuten esimerkiksi swainsoniinin, yhden lysosomaalisen entsyymin inhibiittorin, nauttiminen voi myös aiheuttaa vastaavia oireita. Lysosomaalisissa sairauksissa lysosomien metabolia häiriintyy, ja jatkuvan hajottamisen sijaan lysosomeihin kertyy tietynlaisia molekyyilejä joiden hajotuksesta normaalisti vastaa yksi tietty entsyymi. Keho tuottaa jotain näistä katabolisista entsyymeistä väärin tai ei ollenkaan entsyymiä tuottavan geenin mutaation takia. On myös mahdollista että entsyymit ovat oikein tehtyjä, mutta eivät pääse lysosomiin saakka kuljetusproteiinien puutteen takia. (Alroy & Lyons 2014) (Malm & Nilssen 2008)

Yksi tämän tyyppinen sairaus on alfa-mannosidoosi, missä alfa-mannosidaasin puute kerryttää mannoosi-rikkaita sokeriketjuja lysosomeihin. Tästä aiheutuu vakavia oireita, muun muassa kehitysvammaisuutta, immuunipuutetta ja lopulta jopa kuolema. Lysosomeissa on noin 50 eri entsyymiä. Vastaavasti lysosomaalisia kertymäsairauksia on tunnistettu 51 erilaista. (Alroy & Lyons 2014)

2. Alfa-mannosidaasit

Glykosylaasit ovat ryhmä entsyymejä jotka hajottavat erilaisia sokeriketjuja hydrolyysillä. Mannosidaasit ovat yksi glykosylaasien alaryhmä, ja ne voidaan jaotella alfa-mannosidaaseihin ja beta-mannosidaaseihin, joilla on vielä erilaisia alaryhmiä. Alfa-mannosidaasit hydrolysoivat alfa-

mannoosia ja beta-mannosidaasit beta-mannoosia. Tällä tavalla ne hajottavat sidoksia mannoosien väliltä, joita löytyy pääasiassa glykoproteiineissa. Erityyppiset alfa-mannosidaasit osallistuvat eri tavoin glykoproteiinien sokereiden rakennukseen ja hajotukseen. (Winchester 1984)

Alfa-mannosidaasia on neljää eri päätyyppiä: lysosomien, Golgin, sytosolin ja solulimakalvoston alfa-D-mannosidaasi. Suurin ero näiden entsyymien välillä on sijainti, mutta pieniä rakenteellisia eroja löytyy myös, joista johtuen eri mannosidaaseilla on eri kinetiikka, aktivaattorit ja inhibiittorit (Winchester 1984). Näillä mannosidaaseilla on myös erilaisia muotoja, joihin ne jaotellaan niiden sijainnin mukaan.

2.1 Solulimakalvoston alfa-mannosidaasit

N-linkitetty glykosylaatio on yksi tärkeä tapa tehdä glykoproteiineja. Solulimakalvostossa glykoproteiineista jotka välitetään solun ulkopuolelle leikataan pois mannoosia, mistä huolehtii solulimakalvoston alfa-mannosidaasi. Se poistaa $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -molekyylistä, joka on kiinni proteiinin asparagiinissa, yhden mannoosin. Tämän jälkeen proteiini siirretään Golgin laitteeseen missä sitä muokataan lisää. (Tempel *et al.* 2004)

Solulimakalvoston alfa-mannosidaasit myös osallistuvat solulimakalvostolla tapahtuvaan väärin muodostuneiden glykoproteiinien kierrätykseen. Tarvitaan tietynlainen $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ isomeeri kiinni glykoproteiinissa aloittamaan hajotus, minkä solulimakalvoston alfa-mannosidaasi pystyy luomaan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$:sta. (Tempel *et al.* 2004)

2.2 Golgin alfa-mannosidaasit

Golgissa mannosidaasit osallistuvat glykoproteiinien valmistukseen. Niitä on kolmea eri muotoa: 1a, 1b ja 2. 1-muodon mannosidaasit rikkovat alfa-(1->2) mannoosisidoksia, 2-muodon alfa-(1->3) ja (1->6) mannoosisidoksia. (Winchester 1984)

Golgin 1-muodon mannosidaasi jatkaa solulimakalvoston alfa-mannosidaasin proteiinijalostusta. Se poistaa sokeriketjusta kolme mannoosia, jolloin jäljelle jää $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Sen jälkeen muut entsyymit jatkavat prosessia kunnes tuote valmistuu ja viedään oikeaan paikkaan. (Tempel *et al.* 2004)

2-Muodon Golgi-mannosidaasi osallistuu myös N-linkitettyyn glykosylaatioon poistamalla mannooseja glykoproteiinin glykaanista. Sen puuttuminen lisää tiettyjen syöpien riskiä. (Suzuki *et al.* 2006)

2.3 Sytosolin alfa-mannosidaasit

Sytosolista löytyy myös mannosidaasia. Se on aktiivinen vain alfa(1->2) sidoksien suhteen. Solulimakalvostolla PNGaasi-entsyymi poistaa sokeriosan väärin muodostuneista glykoproteiineista, minkä jälkeen sytosolin alfa-mannosidaasi osallistuu tämän sokeriosan hajottamiseen. (Suzuki *et al.* 2006)

Kuten solulimakalvoston alfa-mannosidaasit, sytosolin alfa-mannosidaasi leikkaa vain alfa(1->2) sidoksia (Gonzalez *et al.* 1999. Se on hyvin samanlainen myös muilla tavoin sytosolin alfa-mannosidaasin kanssa. Esimerkiksi inhibiittorit vaikuttavat niihin samanlaisesti (Winchester 1984). Golgin muodon 1, sytosolin ja solulimakalvoston mannosidaasit ovat hyvin samanlaisia, ja ne kuuluvatkin samaan luokkaan. (Tempel *et al.* 2004)

2.4 Lysosomaaliset alfa-mannosidaasit

Lysosomaaliset alfa-mannosidaasit (Laman) osallistuvat glykoproteiinien kataboliaan hajottamalla mannoosia sisältäviä sokeriketjuja. Nämä monimutkaisemmat sokerit ovat peräisin glykoproteiineista. Glykoproteiinien hajotuksen aloittavat muut entsyymit irrottamalla sokeriosan ja proteiiniosan toisistaan, ja jonka vie loppuun sokereita pilkkovat entsyymit, muun muassa alfa-mannosidaasi. Alfa-mannosidaasi pilkkoo oligosakkaridit monosakkarideiksi, jotka kierrätetään soluissa. (Winchester 1984)

Lysosomaalisia alfa-mannosidaaseja on kolmea muotoa: A, B ja M. A- ja B-muodon Laman:it katkaisevat kaikkia alfa-mannoosi-sidoksia, ja M vain yhdenlaista sidosta, alfa(1->6). A- ja B-Laman ovat ominaisuuksiltaan hyvin samanlaisia ja ovat peräisin samasta esiasteesta. Niissä on kuitenkin erilaiset post-translacionaaliset modifikaatiot, Laman:in pH optimi (pH4) on matalampi kuin muiden alfa-mannosidaasien, jotka pitävät neutraalimmasta pH6:sta. Laman:in puute aiheuttaa alfa-mannosidoosia, vakavaa perinnöllistä sairautta. (Winchester 1984)

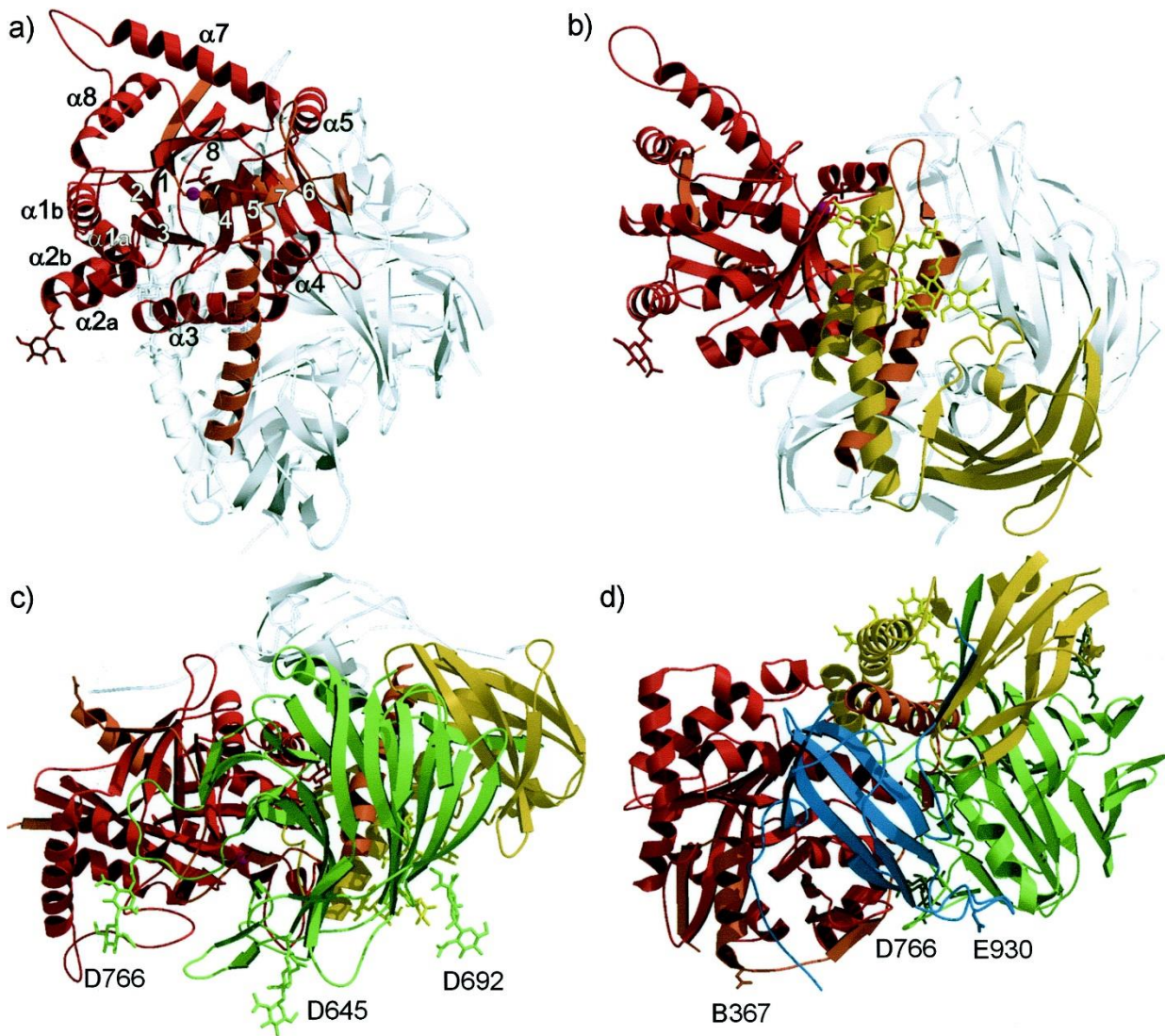
Tässä työssä tarkistellaan lysosomaalista alfa-mannosidaasin muotoa johtuen sen roolista alfa-mannosidoosissa.

2.5 Lysosomaalisten alfa-mannosidaasien rakenne ja toiminta

Lysosomaalinen alfa-mannosidaasi hajottaa lysosomiin tuodut mannoosirikkaat sokeriketjut. Näissä sokeriketjuissa on yleensä runsaasti alfa-D-mannoosia liitettyinä 1-2, 1-3 ja 1-6 sidoksilla ja asparagiinitähde, mistä hajotettava sokeri tunnustetaan, sekä mahdollisia beta-D-mannoseja, joista huolehtivat beta-D-mannosidaasit. Ensin hajotettava glykoproteiini tuodaan lysosomiin autofagosytoosilla. Hajotus etenee sokerista riippuen yhtä spesifistä reaktiotietä pitkin, eli entsyymit eivät hajota niitä satunnaisesti, vaikka useat reaktiotiet ovat mahdollisia. Ensin alfa-fukosidaasi, sialidaasi, beta-galaktosidaasi ja beta-hexoaminidaasi tekevät omat reaktionsa, minkä jälkeen glykosyyliasparaginaasi ja endo-N-asetyyli-beta-glukosaminidaasi hajottavat sokeriketjua pelkistävästä päästä ja alfa-mannosidaasit toisesta päästä (De Gasperi *et al.* 1992). Laman hydrolysoi mannoosi-monosakkarideja irti mannoosi-oligosakkaridin päästä, pienentäen ketjua kunnes vain monosakkarideja on jäljellä. Kun glykaani on hajotettu tarpeeksi pieniin osiin, sen tuotteita voidaan siirtää lysosomista solun ulkopuolelle tai solun käyttöön (Malm & Nilssen 2008).

Laman:in rakenteet ovat hieman erilaisia tyyppistä riippuen. A ja B ovat hyvin samankaltaisia: A painaa 260 000 kDa ja B 300 000 kDa, kun taas M-tyypin Laman painaa vain 180 000 kDa. Lysosomaalisena entsyymeinä niiden pH-vaatimus on matala. Kun muut alfa-mannosidaasit pitävät neutraalimmasta pH:sta, Laman eivät toimi ollenkaan yli 7 pH:ssa, vaan niiden optimi on pH 4 (De Gasperi *et al.* 1992). Laman:illa on yksi aktiivinen kohta, johon se tarvitsee Zn^{2+} -ionin ligandiksi. Sinkki mahdollistaa 1-3 ja 1-6 -reaktiot, mutta sitä ei kuitenkaan tarvita 1-2-reaktioihin. (Malm & Nilssen 2008)

Laman:illa on neljä domeenia (kuva 1). Aktiivinen kohta löytyy N-terminaalisesta domeenista, jossa on seitsensäikeinen beta-tyynnyri, johon liittyy kymmenen alfa-kierrettä. Muut domeenit ovat beta-levyjä, joista kahdesta löytyy glykosylaatiokohdat, kuten ensimmäisestä domeenit. Reaktion tapahtuessa tarvitaan karboksyyliiryhmää, joka on nukleofiili ja sitoo substraatin, ja toista samanlaista ryhmää, joka toimii haponä tai emäksenä. Tämä ryhmä protonoi substraatin ja vapauttaa sen nukleofiilistä. Laman:in nukleofiili on D196. (Heikinheimo *et al.* 2003)

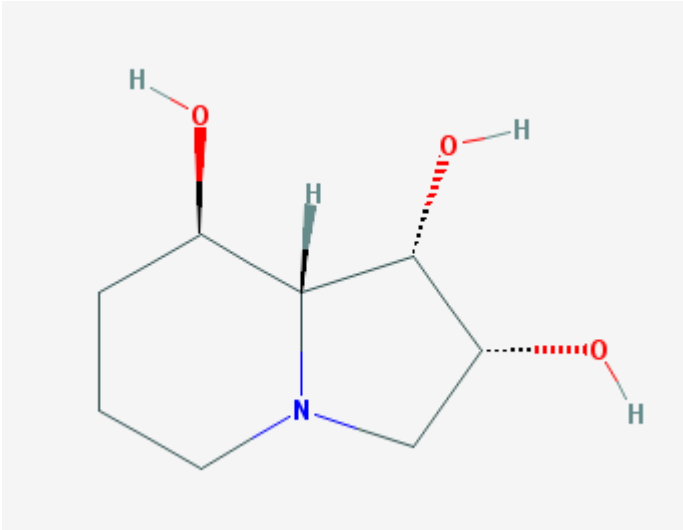


Kuva 1. Lysosomaalisen alfa-mannosidaasin rakenne. Proteolyysillä se voidaan jakaa viiteen rakenteeseen, jotka on kuvassa osoitettu eri väreillä. Punainen ja oranssi muodostavat yhdessä aktiivisen domeeni. Kohdassa d) näkyvät kolme glykosylaatiokohtaa.

Kuvan lähde: Heikinheimo *et al.* (2003). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

2.5.1 Inhibitio

Mannosidaasien luonnolliset inhibiittorit ovat erilaisia alkaloideja. Swainsoniini on yksi näistä, ja sitä löytyy *Swainsona*-suvun kasveista. Sen rakenne muistuttaa mannosidaasin hydrolyysireaktion aikaisen välituotteen rakennetta, minkä takia se pystyy liittymään entsyymin aktiiviseen kohtaan ennen oikeaa substraattia ja inaktivoimaan sen pysyvästi. Tämä alkaloidi pystyy liikkumaan solukalvon läpi. (Mendonça *et al.* 2011)



Kuva 2. Swainsoniinin rakenne. Swainsoniinin rakenne on syklinen ja siinä on –OH ryhmiä. Näistä syistä sillä on mannoosia muistuttava kationinen rakenne. Kuvan lähde: Pubchem.

Swainsoniini inhiboi pääasiassa lysosomien mannosidaasia. Se pystyy liittymään myös Golgin kakkostyyppin mannosidaasin kanssa, ja heikosti inhiboi muun tyyppisiä mannosidaaseja. Sen pitkäaikainen nauttiminen aiheuttaa alfa-mannosidoosia varsinkin karjaeläimissä, ja sitä onkin käytetty alfa-mannosidaasin patologian tutkimuksissa. (Winchester 1984) (Mendonça *et al.* 2011)

Kifunensiini on myös alkaloidi jota löytyy *Kitasatosporia kifunense*-bakteereista. Se inhiboi samalla mekaniikalla kuin swainsoniini, ja sen rakenne on hyvin samankaltainen. Kifunensiini inhiboi pääasiassa tyyppin 1 eli Golgin mannosidaaseja. (Winchester 1984)

Myös muut alkaloidit pystyvät estämään mannosidaaseja, mutta vähemmän hydrolyysin välituotetta muistuttavien rakenteidensa vuoksi ovat heikompia inhibiittoreita (Winchester 1984). Voimakkaampia synteettisiä inhibiittoreita on olemassa. (Siriwardena *et al.* 2005)

3. Alfa-mannosidoosi

Alfa-mannosidoosi (AMo) on autosomaalinen resessiivisesti periytyvä aineenvaihduntasairaus, missä Laman:in normaalitoiminta on estynyt. Normaalisti lysosomeissa Laman hajottaa oligosakkarideja niin pieniin osiin, että niitä voidaan kuljettaa ja hyödyntää solunsisäisesti. Kun entsyymi ei toimi, sokereita alkaa kerääntyä solun lysosomeihin. Lysosomit alkavat paisua, vieden tilaa muilta soluelimiltä ja häiriten solujen normaalia toimintaa ja jakaantumista. Tästä aiheutuu etenevä kehitysvammaisuus, luuston ja muiden elimien ongelmia ja lopulta kuolema. (Malm & Nilssen 2008)

Alfa-mannosidoosin aiheuttaa melkein aina mutaatio Laman:ia koodaavassa geenissä. Sairauden voi myös aiheuttaa alkaloidit, kuten swainsoniini, vaikkakin ihmiset harvoin syövät swainsoniinia sisältäviä ruohoja. Periytyvän taudin yleisyys on noin 1:500 000, ja se on yhtä yleinen kaikissa populaatioissa (Malm & Nilssen 2008). AMo:a on eri vaikeusasteista: osa mutaatioista vain vaikeuttaa Laman:in toimintaa, mutta jotkin mutaatiot tekevät sen täysin hyödyttömäksi (Gotoda *et al.* 1998).

Vaikeusasteesta riippuen tauti puhkeaa joko melko aikaisin elämässä, tai myöhemmin lapsuudessa. Täydellistä parannuskeinoa AMo:on ei ole, mutta taudin oireita voidaan lieventää. Vaikeamman sairauden omaavat henkilöt yleensä kuolevat nuoruudessa, mutta lievemmän sairauden omaavat voivat elää hoidon avulla vanhuuteen saakka. (Malm & Nilssen 2008)

Alfa-mannosidoosissa henkilöiltä puuttuu nimenomaan muodon A ja B lysosomaaliset alfa-mannosidaasit. M-muodon mannosidaasi toimii AMo:n aikana normaalisti (Malm & Nilssen 2008). Mutaatiot M-muodossa ovat myöskin toki mahdollisia, mutta sen puute ei aiheuta mannosidoosia, koska A- ja B-muodon mannosidaasit pystyvät leikkaamaan myös niitä sidoksia mihin M-muodon mannosidaasi on erikoistunut. (Winchester 1984)

3.1 Mekanismi

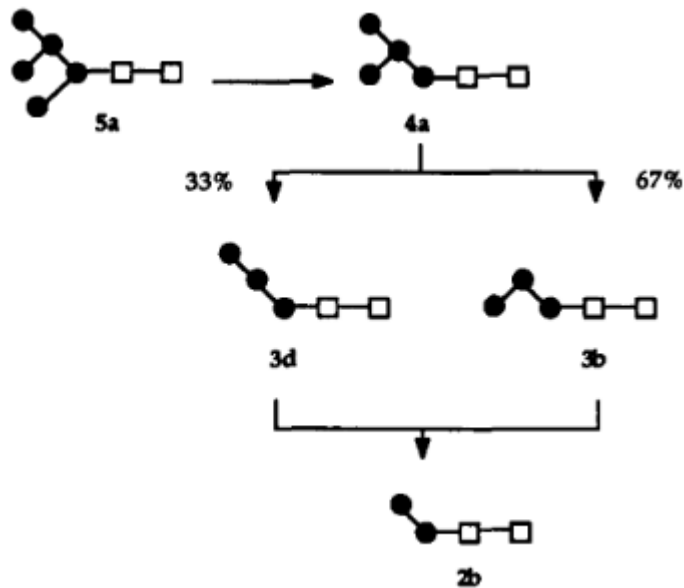
Alfa-mannosidaasin normaalitoiminta kuvailtiin aiemmassa kappaleessa. A- ja B-muodon Laman:it leikkaavat alfa-(1->2), (1->3), (1->6) sidoksia, ja M (1->6) sidoksia. AMo:ssa soluun kertyvissä soluissa on ehjät alfa-(1->2)- ja (1->3)- sidokset, mutta (1->6)- ovat yleensä hajotettuja. Tämä kertoo siitä, että AMo:ssa M-muodon Laman:it eivät ole poikkeuksellisia, koska ne pystyvät yhä toimimaan. Mutaatio on A- ja B-muodon Laman:issa. (Malm & Nilssen 2008) (Winchester 1984)

Taulukko 1. Lysosomaalisen alfa-mannosidaasin substraatteja. Taulukon lähde: De Gasperi *et al.* 1991.

Structure*	Abbreviation	Number
	Man ₂ GlcNAc ₂ f	2a
	Man ₂ GlcNAc ₂ t	2b
	Man ₃ GlcNAc ₂ f	3a
	Man ₃ GlcNAc ₂ t	3b
	Man ₃ GlcNAc ₂ t	3d
	Man ₄ GlcNAc ₂ t	4a
	Man ₄ GlcNAc ₂ f	4c
	Man ₅ GlcNAc ₂ t	5a
	Man ₆ GlcNAc ₂ f	6a
	Man ₈ GlcNAc ₂ f	8a
	Man ₉ GlcNAc ₂ f	9

●● Man α 1,2Man; ●● Man α 1,6Man; ●● Man α 1,3Man,
 ●□ Man β 1,4GlcNAc; □□ GlcNAc β 1,4GlcNAc

Yleisin Laman leikkaama molekyyli on tetrasakkaridi Man(α 1-6)Man(α 1-3)Man(β 1-4)GlcNAc, vaikka sokeriketjuja on monen pituisia ja muotoisia (taulukko 1). AMo:ssa yleisimpiä kertyviä sokereita ovat Man(α 1 \rightarrow 3)Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc, Man(α 1 \rightarrow 2)Man(α 1 \rightarrow 3)Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc ja Man(α 1 \rightarrow 2)Man(α 1 \rightarrow 2)Man(α 1 \rightarrow 3)Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc. Näissä tuotteissa voi nähdä (α 1 \rightarrow 6)-sidosten puutteen. Muut entsyymit eivät kykene hajottamaan näitä sidoksia, joten tällaiset sokerit kertyvät lysosomeihin. (De Gasperi *et al.* 1991)



Kuva 3. Yksi Laman:in reaktioteistä. Mannosidaasi pilkkoo seitsemän sokerin ketjun, jossa on 5 mannoosia (mustat ympyrät), kunnes siinä on vain 4 sokeria jäljellä. Reaktio alkaa $\alpha(1-3)$ -sidoksen purkamisella, minkä jälkeen joko $\alpha(1-3)$ -sidos tai $\alpha(1-6)$ -sidos rikotaan ensin. Kun molemmat on poistettu, jäljelle jää tetrasakkaridi. Viimeinen $\alpha(1-6)$ -sidos on vaikea rikkoa, ja sen reaktio tapahtuu hitaasti. Kuvan lähde: De Gasperi *et al.* 1991.

3.2 Oireet

Alfa-mannosidoosissa oireet ovat lukuisia ja usein vakavia. Sairaus vaikuttaa kaikkiin elimiin missä on lysosomeja, varsinkin keskushermostoon, missä solujen uusiutuminen on rajallista. Koska elimistö ei pysty sairaudessa hajottamaan mannoosisidoksia, suurin osa siitä kertyy elimistöön. Osa siitä poistuu myös virtsan mukana, minkä takia korkeat mannoosi-rikkaat oligosakkaridit virtsassa voivat viitata kyseiseen sairauteen, vaikkakaan ei täysin varmasti. Vaikeusasteen mukaan mannosidoosi on jaettu kolmeen tyyppiin: Tyyppi 1, joka on miedoin ja etenee hitaiten, tyyppi 2 jossa oireet ovat keskivaikeita, ja tyyppi 3 eli vakavin, mikä johtaa aikaiseen kuolemaan. (Malm & Nilssen 2008)

Sairauden omaavan lapsen syntyessä kehitys alkaa usein normaalisti, vaikka kehitysongelmia saattaa vakavimmissa tapauksissa tulla jo ensimmäisen vuoden aikana ja joskus jo ennen syntymää. Tutkimusten mukaan sairaudesta on kuitenkin jo havaittavia merkkejä mikrotasolla ennen kuin oireet ovat näkyviä. (Crawley & Walkley 2007)

Sairauden vaikeimmat oireet löytyvät aivoista. Alfa-mannosidoosi aiheuttaa kehitysvammaisuutta ja monia muita oireita. Puheen ja kävelyn oppiminen viivästyy jopa teini-ikään, ja motoriikka on vaikeaa läpi elämän ja jopa vaikeutuu vanhetessa. Puhuminen on vaikeaa ja kognitiiviset kyvyt ovat rajallisia. Potilaat menestyvät paremmin luetun ymmärtämisessä, mikä johtune kuulon

heikentymisestä sairauden edetessä. Kuulon heikentyminen johtuu normaaliin mikro-tason oireiden lisäksi nesteen kertymisestä korvien sisälle, mistä johtuen kuulo-oireet ovat yksi yleisimpiä AMo:n oireista. Vaikka sairauden omaava henkilö voikin elää pitkään, kehitysvammaisuuden takia he eivät voi elää itsenäisesti ja vaativat jatkuvaa hoitoa. (Malm & Nilssen 2008)

Kasvoin ja luustoon AMo aiheuttaa hyvin samanlaisia oireita kuin Hurlerin syndrooma. Potilailla on suuri pää ja leveä otsa, lyhyt kaula ja lattea nenä. Skolioosi ja rintalastan väärinkasvu ovat mahdollisia, ja ne ilmaantuvat ennen syntymää. Myöhemmin elämässä niveltulehdukset ovat yleisiä. Taudin eteneminen aiheuttaa sen että suurin osa sairastuneista joutuu käyttämään pyörätuolia riippuen oireiden kehitysnopeudesta. (Malm & Nilssen 2008)

Immuunipuute on AMo:ssa usein tappavin oire. Ensimmäinen henkilö, jossa sairaus havaittiin, kuoli keuhkokuumeeseen, luultavasti heikentyneen immuunisysteemin takia. Alfa-mannosidoosia sairastavissa on havaittu vasta-aineiden puutetta ja valkosolujen kemotaksiksen ja fagosytoosin heikentymistä. Näissäkin soluissa lysosomien paisuminen vaikuttaa niiden normaaliin toimintaan. Toinen selitys immuunipuutteelle on runsas oligosakkaridien määrä veressä. Nämä oligosakkaridit pystyvät liittymään interleukiini-2 reseptoreihin ja siten estämään niiden toimintaa. Interleukiinit aktivoivat immuunipuolustuksen soluja, mikä vaikeuttaa niiden toimintaa entisestään (Cooper & Hausman 2013). Autoimmuunisairaudet ovat myös yleisiä AMo:ta sairastavien parissa. (Malm & Nilssen 2008) (Crawley & Walkley 2007)

3.3 Patologia

Laman normaalisti pilkkoo glykaaneja pienempiin osiin niin että elimistö voi hyödyntää niitä. Kun entsyymi ei toimi, mikään ei hajota näitä glykaaneja ja makromolekyyleinä ne eivät pääse pois lysosomeista. Lysosomeihin tuodaan vielä lisää glykaaneja, ja ne alkavat kasvaa, vieden tilaa muilta soluelimiltä, mikä vaikuttaa niiden toimintaan. Lopulta liiallinen kertyminen aiheuttaa solun kuoleman (Malm & Nilssen 2008). Kissoissa alfa-mannosidoosi aiheuttaa aivojen Purkinje-solujen katoamista, ja niiden tilalle on tullut vakuoloituneita valkosoluja. Selkärangan aksonit eivät kasva, ja neuroneissa yleensä laajentuneet lysosomit ovat kiinnittyneet soluissa eri paikkoihin ja laajentuneet eri tavoilla. Tästä johtuen solut ovat eri muotoisia kuin normaalit solut. Solujen kasvu ja proliferaatio vaikeutuu tilan puutteen takia, ja solujen väärä muoto vaikuttaa elinten muodostumiseen. Koska ihmisen ja kissojen alfa-mannosidoosissa on samanlaiset makrotason oireet ja sairauden mekanismi, ihmisillä oireet ovat luultavasti samanlaisia. (Walkley *et al.* 1988)

Miten vakuolaatio vaikuttaa alfa-mannosidoosiksessa muihin soluorganelleihin on yksi nykyisen tutkimuksen kohde. Lysosomaalisissa kertymäsairauksissa on yleisesti tutkittu vakuolaation

vaikutuksia, ja koska näistä vaikutuksista johtuvat oireet ovat samankaltaisia, alfa-mannosidoosissa nämä vaikutukset ovat luultavasti samanlaisia. (Vitner *et al.* 2010)

3.3.1 Kalsium-homeostasia

Kalsiumin tasapaino on tärkeä soluille. Sitä käytetään monissa solun toiminnoissa, muun muassa signaalinvälityksessä. Vakuolit voivat aiheuttaa useita muutoksia kalsium-homeostasiaan. Tämä mekanismi vaihtelee eri lysosomaalisissa kertymäsairauksissa, ja alfa-mannosidoosille sitä ei ole vielä selvitetty. Tasapainon häiriintyminen voi johtaa oksidatiiviseen stressiin ja solukuolemaan. (Vitner *et al.* 2010)

Yksi tapa millä lysosomaalisissa kertymäsairauksissa kalsium-tasapaino ajautuu epätasapainoon on kun kalsium-kanavia yliaktivoidaan (Vitner *et al.* 2010). Tämä johtaa Ca^{2+} -ionien ottamiseen soluihin, mikä lisää kalsiumin vapautumista solulimakalvostolta ja muista varastoista. Koska kalsiumia ei ole enää vapautettavaksi solulimakalvostolta, signaaliketjut joissa solulimakalvoston kalsium on osallisena eivät enää toimi tai toimivat huonosti. Sen lisäksi kalsiumia vaaditaan ilmeisesti kaperonien kuten Hsp40 toimintaan. Alfa-mannosidoosissa mekaniikka on luultavasti sama, koska kalsiumkanavasalpaajien kuten diltiatseemin on havaittu parantavan oireita. Osassa mutaatioita entsyymien toiminta on vain heikentynyt, ja salpaajien on havaittu lisäävän kaperonien toimintaa ja siten tehostamaan alfa-mannosidaasin oikeaa laskostumista. (Mu *et al.* 2008)

3.3.2 Oksidatiivinen stressi

Alfa-mannosidoosissa aivoihin kertyy runsaasti Gm2 ja GM3 gangliosideja ja kolesterolia. Näiden aineiden kertyminen ei johdu suoraan oligosakkaridien kertymisestä, vaan ovat luultavasti vaihtoehtoisten reaktioiden tuotteita. Kertyminen kuitenkin vaikeuttaa solun toimintaa ja aiheuttaa oksidatiivista stressiä (Crawley & Walkley 2007). GM2 saattaa esimerkiksi lisätä kalsiumin vapautumista solulimakalvostolta. (Vitner *et al.* 2010)

Lisääntyvä hapettavien aineiden määrä aiheuttaa muutoksia solun DNA:han. Ne pystyvät reagoimaan DNA:n emästen kanssa ja siten aiheuttamaan mutaatioita. Kun mutaatioita tulee liikaa korjausmekanismeille korjattavaksi, solussa alkavat valmistelut solukuolemaa varten. Oksidatiivinen stressi siis aktivoi apoptoosia, mikä vaikuttaa elimiin missä solukuolemat tapahtuvat. Tämä vaikutus nähdään elinten rakenteiden puutteena ja kroonisena tulehduksena. (Vitner *et al.* 2010)

Oksidatiivisen stressin on osoitettu vaikuttavan elinten sisäisten rakenteiden muodostumiseen, varsinkin aivoissa. Havaittuja muutoksia ovat ektooppinen dendriittien muodostuminen, aksonien

pullistumien muodostuminen ja myelinaation virheet (Walkley *et al.* 1988). Tämä muun muassa pienentää aivojen valkean aineen määrää ja lisää mikroglia-tyyppisten solujen määrää. (Crawley & Walkley 2007)

Alfa-mannosidoosi vaikuttaa myös valkosoluihin, joissa se ilmeisesti vaikuttaa niiden signaalinvälitykseen ja aktivoi niitä liikaa (Vitner *et al.* 2010). Tämän uskotaan johtuvan Toll-like reseptori 4:stä ja gangliosiideista (Crawley & Walkley 2007). Koska alfa-mannosidoosi ei tästä parane, valkosolujen aktivaatio jatkuu ja lisääntyy itsestään. Tätä mekanismia on eniten tutkittu Sandhoffin taudissa, mutta alfa-mannosidoosissa mikroglia-solut ovat morfologisesti hyvin samanlaisia, mikä osoittaa että AMo:ssa mekanismi on samankaltainen. (Vitner *et al.* 2010)

3.4 Alfa-mannosidaasin geeni ja mutaatiot

Vaikka mannosidaasit ovat hyvin samanlaisia proteiineja, ne tehdään eri geeneistä, jotka ovat jopa eri kromosomeissa (Winchester 1984). Lysosomaalisen alfa-mannosidaasin geeni on MAN2B1. Se sijaitsee kromosomi 19 sentromeerin lähetyvillä. Sillä on 21500 emäsparia 24 erissä eksonissa, joista tuotetaan kahta eripituista polypeptidiä riippuen geeninluennan aloituskohdasta (Berg *et al.* 1999). Polypeptidistä muokataan myöhemmin kolme erilaista glykopeptidiä, joista pisin vielä rikotaan kolmeen osaan jotka liitetään toisiinsa disulfidisilloilla. Entsyymiin vielä glykosyloidaan runsaasti N-linkitettyjä asparagiineja (Malm & Nilssen 2008) (Chen *et al.* 2009). Mannoosi-6-fosfaattilisäyksellä se merkataan, ja Golgin M-6-P reseptorit tunnistavat entsyymin ja siirtävät sen endosomeihin joista kehittyy lysosomi. Siellä se dimerisoituu (Heikinheimo *et al.* 2003) (Campbell *et al.* 1983). Geeni on aktiivisin keuhkoissa, ja hyvin aktiivinen myös munuaisissa, haimassa, maksassa ja valkosoluissa. (Nilssen *et al.* 1997)

A- ja B- tyyppin alfa-mannosidaasit ovat peräisin samasta geenistä, ja ne ovat hyvin samanlaisia kaikilla tavoillaan ja molemmat puuttuvat mannosidoosissa (Winchester 1984). Alfa-mannosidoosin mutaatiot ovat autosomaalisen resessiivisesti periytyviä. Vanhemmilta perittyjen mutaatioiden ei tarvitse olla identtisiä, ja harvoin ovatkaan (Stensland *et al.* 2012). Vaikka sairauden puhkeamiseen tarvitaan viallinen alleeli molemmissa kromosomeissa, sairauden kantajillakin on heikentynyt alfa-mannosidaasin aktiivisuus 40-60 prosenttia. Tämä on kuitenkin tarpeeksi estämään sokereiden kertymistä lysosomeihin. (Malm & Nilssen 2008)

Alfa-mannosidoosia aiheuttavia mutaatioita on monenlaisia (taulukko 2). Missense-mutaatioissa proteiinia tehdään normaalisti, mutta muodostuva proteiini ei toimi. Tämä voi johtua siitä että aktiivinen kohta on vahingoittunut, mikä vähentää tai estää kokonaan katalysoinnin, tai sen laskostuminen estyy ja proteiini ei koskaan pääse lysosomiin saakka (Kuokkanen *et al.* 2011).

Nonsense-mutaatiot muodostavat stop-kodoneita keskelle DNA:ta ja aiheuttavat proteiinin transkription enneaikaisen lopetuksen, ja muodostuvasta RNA:sta ei saada tehtyä proteiinia. Insertioiden ja deleetioiden frameshift aiheuttaa sen, että transkriptio-koneisto lukee väärin paikkoihin stop-kodoneita. Joissain mutaatioissa tällä on sama vaikutus kuin nonsense-mutaatioissa, mutta joskus myös vain yksi tietty eksoni puuttuu. (Berg *et al.* 1999)

Taulukko 2: Mahdollisia alfa-mannosidaasi-geenin mutaatioita.

Mutaatiotyyppi	Mutaatiopaikka	Mutaation vaikutus
Missense	eksonit 2, 8, 9, 17, 18, 20	yhden aminohapon muuttuminen
Insertio	eksonit 8 ja 9	eksoni 8: stop-kodoni heti perään eksoni 9: frameshift ja stop-kodoni myöhemmin
Deleetio	eksonit 7 ja 14	sama kuin insertioissa
Nonsense	eksonit 2, 8, 14	stop-kodoni
Polymorfismi	eksonit 6, 7, 10, 18	yhden aminohapon muuttuminen tai ei mitään

Toisessa tutkimuksessa löydettiin vastaavia mutaatioita. Tutkimuksessa myös selvisi, että kaikki nonsense-mutaatiot ja frameshift-deleetiot johtivat täysin toimimattomaan proteiiniin. Joissakin missense-mutaatioissa proteiini toimi mutta sitä ei viety lysosomeihin, ja muissa mutaatioissa entsyymi vietiin lysosomiin mutta oli heikosti aktiivinen. Henkilöillä, joilla entsyymi vietiin lysosomiin, oli lievemmät oireet kuin henkilöillä, joilla entsyymiä ei muodostunut tai joilla entsyymi jäi solulimakalvostolle. (Borgwardt *et al.* 2015)

4. Alfa-mannosidoosin hoito

Alfa-mannosidoosin havaitseminen aikaisin on haastavaa ja perustuu osittain oireiden ilmaantumiseen. Johtuen sen harvinaisuudesta oireettomia henkilöitä ei yleensä tarkisteta monimutkaisemmilla tavoilla, ja yksittäisten oireiden ilmaannuttua kyseessä on luultavammin jokin toinen sairaus. Epäiltäessä alfa-mannosidoosia varmuuden voi saada usealla eri tavalla. (Malm & Nilssen 2008)

Alfa-mannosidoosia voidaan hoitaa oirekohtaisesti ja yleisesti. Oirekohtaisilla hoidoilla voidaan lievittää sairauden monia sivuoireita, kuten kuulon menetystä. Muutkin kuin mannosidoosia sairastavat henkilöt tarvitsevat näitä hoitoja, ja näitä hoitomuotoja onkin tutkittu ja kehitetty paremmin kuin yleisiä mannosidoosin parannuskeinoja. Yleiset hoitokeinot, kuten luuydinsiirto ja entsyymikorvaushoito, pyrkivät parantamaan sairauden kokonaan mikrotasolla. Vaikka nämä hoitomuodot toimivatkin muiden sairauksien kanssa, ne vaativat lisää kehitystä ollakseen oikeasti tehokkaita. Myös potilaiden ikä ja yleisesti huono terveys vaikeuttavat näiden hoitojen, varsinkin luuydinsiirron, käyttöä. (Malm & Nilssen 2008)

4.1 Diagnosointi ja prognoosi

Mannosidoosia voidaan diagnosoida useilla eri tavoilla. Usein ensimmäinen epäily saadaan korkeasta virtsan mannoositasoista. Vaikka tämä voi johtua useista eri syistä, mannosidoosia on syytä epäillä, varsinkin jos muitakin mannosidoosin oireita on ilmaantunut. Kuten virtsan mannoositasoissa, nämä oireet voivat kuitenkin johtua muista lysosomaalisista kertymäsairauksista. Toinen epävarmempi tapa diagnosoida on mikroskopointi. Mikroskoopeilla voidaan todeta vakuolaatiota veren eri soluissa, mikä voi tarkoittaa alfa-mannosidoosia tai mahdollisesti jotain muita harvinaisempia sairauksia. (Malm & Nilssen 2008)

Luuston epämuodostumia voidaan havaita jo ennen syntymää raskaudenaikaisella diagnoosilla. Tällainen diagnoosi on hyödyllistä myös jos molemmat vanhemmat tietävät olevansa mutaatioiden kantajia. Alfa-mannosidaasin tasot voidaan mitata suonikalvosta saaduista sikiön soluista jo kymmenennen viikon jälkeen. (Malm & Nilssen 2008)

Alfa-mannosidaasin aktiivisuutta voidaan mitata valkosoluista fluorometrisellä analyysillä. Yleensä testissä näkyy huomattavasti pienentynyttä aktiivisuutta. Vaikka testi tehdään alhaisessa pH:ssa, muiden soluorganellien mannosidaasit voivat näkyä näissä testeissä. Toinen varma tapa on suoraan tutkia mutaatioita geenissä monistamalla sitä PCR:n avulla ja sekvensoinnin jälkeen tutkia mutaatioiden mahdollisuutta (Malm & Nilssen 2008).

Prognoosi riippuu taudin vaikeustasosta. Vaikeammassa taudissa sairaus etenee nopeasti. Tyypin 2 ja 3 mannosidooseissa hoito voi lisätä elinvuosia huomattavasti, mutta keho rappeutuu kuitenkin hitaasti. Potilaat tulevat tarvitsemaan lisääntyvässä määrin hoitoa ja hoivaa. (Malm & Nilssen 2008)

4.2 Hoitomuodot

Johtuen oireiden moninaisuudesta ja vaihtelevuudesta niitä joudutaan usein hoitamaan erikseen. Nämä oireet ovat samanlaisia kuin monien muiden, tavanomaisempien sairauksien ja vammojen oireet, joten niitä pystytään hoitamaan normaaleilla toimenpiteillä. Kuuloa voidaan hoitaa esimerkiksi kuulolaitteilla, kuten normaalissa kuulon menetyksessä. Korviin kerääntyvää nestettä voidaan myös hoitaa asentamalla korviin painetta tasoittavat putket, mikä myös parantaa kuuloa osalle potilaista. Oireet voivat kuitenkin vaikeuttaa toistensa hoitoa, esimerkiksi kehitysvammaisuus voi usein saada potilaan vastustamaan epämiellyttäviä diagnoosimenetelmiä (Malm & Nilssen 2008). Lisäksi on toivoa, että tulevaisuudessa kehitetään spesifisiä hoitomuotoja jotka voivat hidastaa tai jopa estää taudin etenemistä, esimerkiksi entsyymikorvaushoito. (Winchester 1984)

Alfa-mannosidoosia on yritetty parantaa luuydinsiirrolla. Tällainen hoito perustuu siihen että alfa-mannosidaasia tuottavat solut voivat siirtää sitä muille soluille jotka eivät voi tuottaa kyseistä entsyymiä. Verenkierrosta kaikissa soluissa esiintyvät Mr 300 kDa mannoosi-6-fosfaatti/insuliininkaltainen-kasvutekijä II reseptorit tunnistavat entsyymin ja ottavat sen sisään (Roces *et al.* 2004). Viime vuosikymmenellä tehdyt testit osoittivat että tämä metodi voisi toimia, vaikkakin parannusta nähtiin ainoastaan aivojen ulkopuolella (Will *et al.* 1987). Myöhemmät testit ovat osoittaneet että luuydin voi hidastaa oireiden kehittymistä, varsinkin jos siirto on tehty nuorelle potilaalle. Luuydinsiirrossa on kuitenkin riskit, minkä takia tätä hoitomuotoa ei käytetä aina. (Wall *et al.* 1998)

Entsyymikorvaushoito on potentiaalinen hoitomuoto, joka on helppo ja suhteellisen riskivapaa. Sen on todettu toimivan muissa samankaltaisissa sairauksissa, kuten Gaucherin taudissa. Tässä hoitomuodossa synteettistä entsyymiä ruiskutetaan suoraan verenkiertoon. Kuten luuydinsiirrossa, ERT:n ongelma on se että virheetön entsyymi ei pääse aivoihin saakka aivoveriesteen takia. Keskushermostossa nähdään lähinnä pientä, epäsuoraa parannusta kun muu elimistö on yleisesti terveempi. Hoidolla on kuitenkin suuri vaikutus muihin elimiin, varsinkin maksaan. Vakuolit alkavat pienentyä ja oligosakkaridien määrä laskea. Entsyymillä on kuitenkin pieni puoliaika, ja sen vaikutukset kestivät vain joitakin päiviä. Entsyymin tuottaminen on vielä kallista, ja käytettäessä hoitona sitä tarvitaan koko elämän ajaksi. (Roces *et al.* 2004)

Geenihoito on yksi tutkittu tapa millä voidaan mahdollisesti hoitaa myös keskushermoston oireita. Geenihoidossa soluihin liitetään geeni jossa ei ole mutaatioita, mikä mahdollistaa entsyymin muodostumisen soluissa. Yhdessä tutkimuksessa käytettiin AAV1:tä (Adeno-associated virus 1), mikä pystyy läpäisemään aivoveriesteen. AAV1 on DNA-virus, joka pystyy liittämään oman geneettisen materiaalin kohdesolunsa kromosomiin. AA-virusten geeniliitokset pysyvät aktiivisina

pitkän aikaa, viruksille voidaan valita spesifinen kromosomi mihin se liittyy, ja ne eivät aiheuta ihmisissä sairauksia, mikä tekee AA-viruksista hyvän vektorin. Aivoissa oli geenihoidon jälkeen huomattavaa parannusta, vaikkakin kaikkea jo aiheutettua vahinkoa ei voida korjata. Aivovaurioiden estämiseksi hoito tulisi aloittaa hyvin aikaisin, mikä ei ole kuitenkaan usein mahdollista, koska diagnoosi aloitetaan vasta oireiden ilmaannuttua. (Xiao *et al.* 1999) (Yoon *et al.* 2016)

Tulehduslääkkeillä voisi olla mahdollisia vaikutuksia keskushermostoon. Kuten muissa LKS:ssa, aivojen mikroglia-solut ovat vakuoloituneet ja aiheuttavat tulehdusta. Alfa-mannosidoosin kanssa tätä hoitomuotoa ei ole todettu, mutta se on toiminut muiden vastaavien tautien kanssa. (Crawley & Walkley 2007)

Kirjallisuusviitteet

Alroy J & Lyons JA (2014) Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*. March 2014, Pages 1-20

Berg T, Riise HMF, Hansen GM, Malm D, Tranebjærg L, Tollersrud OK & Nilssen Ø (1999) Spectrum of Mutations in Alpha-Mannosidosis. *American Journal of Human Genetics*. 1999;64(1):77-88.

Borgwardt L, Stensland HMFR, Olsen KJ, Wibrand F, Klenow HB, Beck M, Amraoui Y, Arash L, Fogh J, Nilssen Ø, Dali CI & Lund AM (2015) Alpha-mannosidosis: correlation between phenotype, genotype and mutant MAN2B1 subcellular localisation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015;10:70.

Campbell CH, Miller AL & Rome LH (1983) Incorporation of mannose 6-phosphate receptors into liposomes. Receptor topography and binding of alpha-mannosidase. *Biochemical Journal* 1983 Aug 15;214(2):413-9

Chen R, Jiang X, Sun D, Han G, Wang F, Ye M, Wang L & Zou H (2009) Glycoproteomics Analysis of Human Liver Tissue by Combination of Multiple Enzyme Digestion and Hydrazide Chemistry. *Journal of Proteome Research* 2009 8 (2), 651-661

Cooper GM & Hausman RE (2013) *The Cell: A Molecular Approach*, 6th edition. 9, 338-339, 401, 405, 412-414.

Crawley AC & Walkley SU (2007) Developmental analysis of CNS pathology in the lysosomal storage disease alpha-mannosidosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 66, Issue 8, 1 August 2007, Pages 687–697

De Gasperi R, Daherj S, Daniell PF, Winchester B, Jeanloz RW & Warren CD (1991) The Substrate Specificity of Bovine and Feline Lysosomal α -D-Mannosidases in Relation to Alpha-Mannosidosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991 266: 16556-.

De Gasperi R, Daniel PF & Warren CD (1992) A Human Lysosomal Alpha-Mannosidase Specific for the Core of Complex Glycans. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992 267: 9706-.

Gonzalez DS, Karaveg K, Vandersall-Nairn AS, Lal A & Moremen KW (1999) Identification, Expression and Characterization of a cDNA Encoding Human Endoplasmic Reticulum Mannosidase I, the Enzyme That Catalyzes the First Mannose Trimming Step in Mammalian Asn-linked Oligosaccharide Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999 274: 21375-.

Gotoda Y, Wakamatsu N, Kawai H, Nishida Y & Matsumoto T (1998) Missense and nonsense mutations in the lysosomal alpha-mannosidase gene (MANB) in severe and mild forms of alpha-mannosidosis. *American Journal of Human Genetics*. 1998;63(4):1015-1024.

Heikinheimo P, Helland R, Leiros HK, Leiros I, Karlsen S, Evjen G, Ravelli R, Schoehn G, Ruigrok R, Tollersrud OK, McSweeney S & Hough E (2003) The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *Journal of Molecular Biology*. 2003 Mar 28;327(3):631-44.

Kuokkanen E, Stensland HMFR, Smith W, Buvang EK, Nguyen LV, Nilssen Ø & Heikinheimo P (2011) Molecular and cellular characterization of novel α -mannosidosis mutations. *Human Molecular Genetics*, Volume 20, Issue 13, 1 July 2011, Pages 2651–2661.

Malm D & Nilssen Ø (2008) Alpha-mannosidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2008;3:21.

Mendonça F, Albuquerque RF, Evêncio-Neto J, Freitas SH, Dória RGS, Boabaid FM, Driemeier D, Gardner DR, Riet-Correa F & Colodel EM (2011) Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* Vol 24, Issue 1, pp. 90 – 95.

Mu TW, Fowler DM & Kelly JW (2008) Partial Restoration of Mutant Enzyme Homeostasis in Three Distinct Lysosomal Storage Disease Cell Lines by Altering Calcium Homeostasis. *PLoS Biology*. 2008 Feb;6(2):e26.

Nilssen Ø, Berg T, Riise HMF, Ramachandran U, Evjen G, Hansen GM, Malm D, Tranebjaerg L & Tollersrud OK (1997) α -Mannosidosis: Functional Cloning of the Lysosomal α -Mannosidase cDNA and Identification of a Mutation in Two Affected Siblings. *Human Molecular Genetics*, Volume 6, Issue 5, 1 May 1997, Pages 717–726.

Roces DP, Lüllmann-Rauch R, Peng J, Balducci C, Andersson C, Tollersrud O, Fogh J, Orlacchio A, Beccari T, Saftig P & von Figura K (2004) Efficacy of enzyme replacement therapy in α -mannosidosis mice: a preclinical animal study. *Human Molecular Genetics*, Volume 13, Issue 18, 15 September 2004, Pages 1979–1988

Siriwardena A, Strachan H, El-Daher S, Way G, Winchester B, Glushka J, Moremen K & Boons GJ (2005) Potent and selective inhibition of class II alpha-D-mannosidase activity by a bicyclic sulfonium salt. *Chembiochem*. 2005 May;6(5):845-8.

- Stensland HMFR, Klenow HB, Nguyen LV, Hansen GM, Malm D & Nilssen Ø (2012) Identification of 83 novel alpha-mannosidosis-associated sequence variants: Functional analysis of MAN2B1 missense mutations. *Human Mutation.*, 33: 511–520.
- Suzuki T, Hara I, Nakano M, Shigeta M, Nakagawa T, Kondo A, Funakoshi Y & Taniguchi N (2006) Man2C1, an alpha-mannosidase, is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochemical Journal.* 2006;400(Pt 1):33-41
- Tempel W, Karaveg K, Liu Z, Rose J, Wang B & Moremen KW (2004) Structure of Mouse Golgi alpha-mannosidase IA Reveals the Molecular Basis for Substrate Specificity among Class 1 (Family 47 Glycosylhydrolase) alpha1,2-Mannosidases. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004 279: 29774-.
- Vitner EB, Platt FM & Futerman AH (2010) Common and Uncommon Pathogenic Cascades in Lysosomal Storage Diseases. *The Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(27):20423-20427.
- Wall DA, Grange DK, Goulding P, Daines M, Luisiri A & Kotagal S (1998) Bone marrow transplantation for the treatment of alpha-mannosidosis. *Journal of Pediatrics.* 1998 Aug;133(2):282-5.
- Walkley SU, Siegel DA & Wurzelmann S (1988) Ectopic dendritogenesis and associated synapse formation in swainsonine-induced neuronal storage disease. *Journal of Neuroscience* 8.2 (1988): 445-457.
- Will A, Cooper A, Hatton C, Sardharwalla IB, Evans DI & Stevens RF (1987) Bone marrow transplantation in the treatment of alpha-mannosidosis. *Archives of Disease in Childhood.* 1987;62(10):1044-1049.
- Winchester B Role of alpha-D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins (1984) *Biochemical Society Transactions* 12 (3) 522-524.
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G & Wilson JM (1999) Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1. *Journal of Virology.* May 1999 73:5 3994-4003.
- Yoon SY, Bagel JH, O'Donnell PA, Vite CH & Wolfe JH (2016) Clinical Improvement of Alpha-mannosidosis Cat Following a Single Cisterna Magna Infusion of AAV1. *Molecular Therapy.* 2016;24(1):26-33.