

# Sanfilippo Syndrome

Subjects: Pathology

Contributor: Noelia Benetó

Sanfilippo syndrome is caused by mutations in the enzymes responsible for the degradation of heparan sulfate (HS), a specific GAG, and patients are characterized by severe neurological pathology leading to childhood dementia.

Keywords: Sanfilippo syndrome ; mucopolysaccharidosis III ; lysosomal storage disorders ; heparan sulfate ; animal models ; induced pluripotent stem cells ; cellular models ; therapeutic approaches.

## 1. Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) comprise a heterogeneous group of rare inherited metabolic diseases that are characterized by the accumulation of macromolecules inside lysosomes. LSDs are caused by deficiencies in lysosomal enzymes, leading to lysosomal dysfunction, altered recycling of macromolecules, and impaired flux of the endolysosomal system. Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of LSDs accounting for approximately 30% of all LSD cases and arise from mutations in genes involved in glycosaminoglycans (GAGs) degradation, which accumulate inside the lysosomes<sup>[1]</sup>. Among MPS, Sanfilippo syndrome (also known as mucopolysaccharidosis III or MPS III) is the most frequent type and it was first described more than 50 years ago<sup>[2]</sup>.

## 2. Classification

There are four different subtypes of Sanfilippo syndrome based on the mutated gene and the consequent enzyme deficiency: type A (OMIM#252900), type B (OMIM#252920), type C (OMIM#252930), and type D (OMIM#252940), all of them presenting an autosomal recessive inheritance pattern<sup>[3]</sup>. Insufficient or complete loss of activity of any of the Sanfilippo syndrome causative enzymes leads to accumulation of partially degraded HS chains within lysosomes of cells in several organs and tissues<sup>[1][3][4]</sup>. In a recent study, a fifth subtype was identified in a mouse model<sup>[5]</sup> caused by mutations in the *ARSG* gene; however, to date, no human cases have been described. Moreover, human patients with a homozygous mutation in *ARSG* present Usher syndrome, leading to deaf blindness and a small increase in urinary GAGs, although not as dramatic as in Sanfilippo syndrome<sup>[6]</sup>.

### References

1. Muenzer, J., & Muenzer, J. The Mucopolysaccharidoses. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Eds., McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 3421–3452.
2. Sylvester, J. Sanfilippo, Robert Podosin, Leonard Langer, Robert A. Good: Mental retardation associated with acid severe, and progressive degeneration of the CNS with mild somatic symptoms<sup>[1]</sup>. Neurodegeneration starts during the first decade of life, with cortical atrophy, progressive dementia, motor deterioration, hyperactivity, learning difficulties, aggressive behavior, sleeping problems, and pronounced mental retardation<sup>[3]</sup>. Mild somatic manifestations include furrowed, deep-set eyes, and a large head<sup>[3]</sup>.
3. Furlan, R., & Furlan, R. Sanfilippo syndrome. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Eds., McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 3421–3452.
4. Furlan, R., & Furlan, R. Sanfilippo syndrome. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Eds., McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 3421–3452.
5. Björn Kowalewski, Peter Heimann, Theresa Ortkras, Renate Lüllmann-Rauch, Tomo Sawada, Steven L. Walkley, Thomas Dierks, Markus Damme, Ataxia is the major neuropathological finding in arylsulfatase G-deficient mice: similarities and dissimilarities to Sanfilippo disease (mucopolysaccharidosis type III). *Human Molecular Genetics* **2014**, *24*, 1856–1868, [10.1093/hmg/ddu603](https://doi.org/10.1093/hmg/ddu603).
6. Samer Khatib; Björn Kowalewski; Nicola Bedoni; Markus Damme; Netta Pollack; Ann Saada; Alexey Obolensky; Tamar Ben-Yosef; Menachem Gross; Thomas Dierks, et al. A homozygous founder missense variant in arylsulfatase G abolishes its enzymatic activity causing atypical Usher syndrome in humans. *Genetics in Medicine* **2018**, *20*, 1004–1012, [10.1038/gim.2017.227](https://doi.org/10.1038/gim.2017.227).
7. Coppa, G.V.; Galeotti, F.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Padella, L.; Santoro, L.; Maccari, F.; Gabrielli, O.; Volpi, N. Mild mental retardation and low levels of urinary heparan sulfate in a patient with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Clin. Biochem.* 2013, *46*, 688–690.

8. Meyer, A.; Kossow, K.; Gal, A.; Steglich, C.; Muhlhausen, C.; Ullrich, K.; Bräulke, T.; Muschel, N. The mutation p.Ser298Pro in the sulphamidase gene (GNSH) is associated with a slowly progressive clinical phenotype in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome). *Hum. Mutat.* 2008, 29, 770. Gross  
Total  
Missense/Nonense  
Small  
Small  
Small  
Slicing  
Gross  
Insertions  
Complex  
Deletions  
and  
Rearrangements
9. Moog, U.; van Mierlo, I.; van Schrojenstein Lantman-de Valk, H.M.; Spaapen, L.; Maaskant, M.A.; Curfs, L.M. Is Sanfilippo type B in your mind when you see adults with mental retardation and behavioral problems? *Am. J. Med. A (GNSH)* 155, 118. Duplications
10. Ruijter, G.J.; Valstar, M.J.; van de Kamp, J.M.; van der Helm, R.M.; Durand, S.; van Diggelen, O.P.; Wevers, R.A.; Poorthuis, B.; Pshezhetsky, A.V.; Wijburg, F.A. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol. Genet. Metab.* 2008, 93, 104–111. 1  
3  
3  
1  
0
11. Valstar, M.J.; Marchal, J.P.; Grootenhuys, M.; Colland, V.; Wijburg, F.A. Cognitive development in patients with mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Orphanet J. Rare Dis.* 2011, 6, 43. 1  
1
12. Shaukat A. Khan; Hira Peracha; Diana Ballhausen; Alfred Wiesbauer; Marianne Rohrbach; Matthias Gautschi; Robert W. Mason; Roberto Giugliani; Yasuyuki Suzuki; Kenji E. Orii; et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism* **2017**, 121, 227-240, [10.1016/j.ymgme.2017.05.016](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.05.016).
13. Tamás Zelei; Kata Csetneki; Zoltán Vokó; Csaba Siffel; Epidemiology of Sanfilippo syndrome: results of a systematic literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2018**, 13, 1-11, [10.1186/s13023-018-0796-4](https://doi.org/10.1186/s13023-018-0796-4).
- 12.1 Subtype A**

Sutherland; C. Phillip Morris; John J. Hopwood; Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in MPS IIIC or Sanfilippo syndrome type A. *Gene* **1995**, 171, 185-189, [10.1016/S0378-5962\(95\)00465-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5962(95)00465-5).  
The gene maps to 17q25.3<sup>[14]</sup> with an approximated length of 11 Kb and contains eight exons. It codes for a protein of 502 amino acids with five possible glycosylation sites and a total of 155 identified mutations (Table 1). Sanfilippo syndrome type A is considered the most aggressive form, with patients surviving until 15–18 years old on average<sup>[13]</sup>.
- 12.2 Subtype B**

Frederick M.; Mrazova, L.; Seyrantepe, V.; Durand, S.; Roslin, N.M.; Noskova, L.; Hartmannova, H.; Ivanek, R.; Cizkova, A.; Poupetova, H.; et al. Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *MPS IIIB or Sanfilippo syndrome type B* is caused by mutations in the *NAGLU* gene, which encodes N-acetyl-α-glucosaminidase (EC 3.2.1.50), a lysosomal enzyme of 720 amino acids with six possible glycosylation sites. The function of the enzyme is the hydrolysis of the linkage between N-acetylglucosamine (GlcNAc) and the uronic acid, the two saccharides that conform HS. The gene maps to 17q21.2<sup>[15]</sup>, spans 8.3 Kb, contains six exons; and, to date, 229 mutations have been identified as shown in Table 1. Sanfilippo syndrome type B patients die on average between 17–19 years old, this subtype being slightly less aggressive than subtype A<sup>[13]</sup>.
- 12.3 Subtype C**

Xiaolian Fan; Ilona Tkachyova; Ankit Sinha; Brigitte Rigat; N Mahuran; Characterization of the Biosynthesis, Processing and Mechanism of Action of the Enzyme Deficient in Mucopolysaccharidosis IIIC. *PLOS ONE* **2011**, 6, e24951, [10.1371/journal.pone.0024951](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024951).  
Mutations in the *HGSNAT* gene are responsible for MPS IIIC or Sanfilippo syndrome type C. This gene codes for the lysosomal membrane protein known as acetyl-CoA α-glucosaminide N-acetyltransferase (EC 2.3.1.78). It is located at chromosome 8p11.1, was identified by two independent groups in 2006<sup>[16]</sup>, spans about 62.5 Kb, containing 18 exons, and gives rise to a protein of 635 amino acids. For some time, there was controversy about the real initiation codon<sup>[18]</sup>, but a recent publication suggested that only one ATG codon worked as the initiation codon<sup>[19]</sup>. Until now, 77 mutations have been identified (Table 1). Subtype C is the less aggressive form of Sanfilippo syndrome, with a mean survival of 19–34 years depending on the study<sup>[2]</sup>.
- 12.4 Subtype D**

Parisa Lotfi; Dennis Y. Tse; Alberto Di Ronza; Michelle L. Seymour; Giuseppe Martano; Jonathan D. Cooper; Fred A. Perella; Maria Passafaro; Samuel M. Wu; Marco Sardiello; et al. Trehalose reduces retinal degeneration, neuroinflammation and storage burden caused by a lysosomal hydrolase deficiency. *Autophagy* **2018**, 14, 1419-1434, [10.1080/15548627.2018.1474313](https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474313).  
Mutations in the *GNS* gene, which encodes the lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-6-sulfatase (EC 3.1.6.14), are responsible for MPS IIID or Sanfilippo syndrome type D. The gene is located at 12q14.3, is 46 Kb-long, and contains 14 exons. The enzyme has 552 amino acids and 13 potential glycosylation sites. It catalyzes the sulfate removal in the N-acetylglucosamine residues. Until now, 25 mutations have been found (Table 1). Due to the rarity of this subtype, there is no national average survival of patients at a glance. *J. Cell Sci.* 2016, 129, 2475–2481.
25. Liliana Matos; Isaac Canals; Larbi Dridi; Yoo Choi; Maria João Prata; Peter Jordan; Lourdes R. Desviat; Belén Pérez; Alexey V. Pshezhetsky; and J. Hopwood; al. Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2014**, 9, 1-12, [10.1186/s13023-014-0180-y](https://doi.org/10.1186/s13023-014-0180-y).  
Currently, there is no treatment to effectively slow down or reverse Sanfilippo syndrome patients' neurodegeneration, and their management consists only of palliative measures to alleviate the symptomatology. Interestingly, different kinds of gene therapy approaches for lysosomal storage disorders, a good model for the treatment of mendelian diseases, have been tested during the last years in cellular and animal models of the disease, focused mainly on the treatment of the CNS involvement. The main approaches we will review here consist of enzyme replacement therapy

### 3. Therapeutic Approaches

27. Elia, S. Satellite Pathology in the Amyloid (SAP) in a Biallelic Autosomal Recessive Disease: Facs Pathophysiology of the Therapy (Figure 1). *Review of Medicine* **2015**, *6*, 471-486, [10.1146/annurev-med-022313-085916](https://doi.org/10.1146/annurev-med-022313-085916).  
 28. Hya S. Krishnan, Patricia Dickson, Laurie Muldowney, Jessica J. Lee, Amy S. Rosenberg, Rekha Abichandani, Jeffrey A. Bresnahan, Barbara R. Burton, Maureen Dewey, Alexandra Freitas, et al. Immune response to enzyme replacement therapies in lysosomal storage diseases and the role of immune tolerance induction. *Molecular Genetics and Metabolism* **2016**, *117*, 66-83, [10.1016/j.ymgme.2015.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.11.001).

29. Anita Grover; Danielle Crippen-Harmon; Lacey Nave; Jon Vincelette; Jill C. M. Wait; Andrew C. Melton; Roger Lawrence; Jillian R. Brown; Katherine A. Webster; Bryan K. Yip; et al. Translational studies of intravenous and intracerebroventricular routes of administration for CNS cellular biodistribution for BMN 250, an enzyme replacement therapy for the treatment of Sanfilippo type B. *Drug Delivery and Translational Research* **2020**, *10*, 425-439, [10.1007/s13346-019-00683-6](https://doi.org/10.1007/s13346-019-00683-6).

30. Jones, S.A.; Breen, C.; Heap, F.; Rust, S.; de Rujter, J.; Tump, E.; Marchat, J.P.; Pan, L.; Qiu, Y.; Chung, J.K.; et al. A phase 1/2 study of intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol. Genet. Metab.* **2016**, *118*, 198–205.

31. Wijburg, F.A.; Whitley, C.B.; Muenzer, J.; Gasperini, S.; Del Toro, M.; Muschol, N.; Cleary, M.; Sevin, C.; Shapiro, E.; Bhargava, P.; et al. Intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with Sanfilippo syndrome type A: A phase IIb randomized trial. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 121–130.

**Figure 1.** Potential therapeutic approaches to treat Sanfilippo syndrome. Schematic representation of the main therapeutic strategies currently being studied for the treatment of Sanfilippo syndrome. (A) Enzyme replacement therapy (ERT) provides intravenously administered BMN 250 (NAGAL-GF2) to patients and reduces heparan sulfate accumulation of undegraded molecules (B), with use of pharmacological chaperones to correct protein misfolding (C), stem cell therapy for generation and production of the correct form of the protein (D) and gene therapy to provide cells with the correct form of the mutated gene (E). In phase 1/2, open-label clinical study of intravenous recombinant human N-acetyl-alpha-d-glucosaminidase (SBC-103) in children with mucopolysaccharidosis IIIB. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 131–138.

### 3.1. Enzyme Replacement Therapy

34. Kazuki Sawamoto; Molly Stapleton; Carlos J. Alméciga-Díaz; Angela J. Espejo-Mojica; Juan Camilo Losada; Diego A. Suarez-Shimizu. *Therapeutic Options for Mucopolysaccharidoses: Current and Emerging Treatments*. *Drugs* **2019**, *79*, 1103-1124, [10.1007/s40265-019-01147-4](https://doi.org/10.1007/s40265-019-01147-4).  
 The fact that these proteins are tagged with mannose 6-phosphate (M6P) for correct trafficking towards the lysosome.

35. Vetter, R. E.; Gohara, S. A. Miglustat as a therapeutic agent: Prospects and caveats. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 591–597.  
 Considering that cells have M6P receptors in the membrane, lysosomal enzymes can be endocytosed and arrive to the lysosome to perform their function<sup>[26]</sup>. For non-neurological LSDs, exogenous administration of the correct form of the enzyme mutated in patients, known as ERT (Figure 1A), has been proven to be the most successful strategy<sup>[27]</sup>. However, for diseases affecting the CNS, the existence of the blood–brain barrier (BBB), which limits the availability of the enzyme in the brain, has to be taken into account. In addition, antibodies targeting the enzyme can be observed in treated LSD-

37. Joanna Jakóbkiewicz-Banecka; Ewa Piotrowska; Magdalena Naraicz; Sylwia Barańska; Grzegorz Węgrzyn. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *Journal of Biomedical Science* **2009**, *16*, 26-26, [10.1186/1423-0127-16-26](https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-26).  
 continued injections. Nevertheless, clinical trials based on ERT for Sanfilippo syndrome type A and B have been carried

38. Marcelina Malinowska; Emma J. Wilkinson; Kia J. Langford-Smith; Alex Langford-Smith; Jillian R. Brown; Brett F. Crawford; Marie T. Vanier; Grzegorz Gryniewicz; Rob F. Wynn; J. Ed Wraith; et al. Genistein Improves Neuropathology and Corrects Behaviour in a Mouse Model of Neurodegenerative Metabolic Disease. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e014192.

### 3.2. Substrate Reduction Therapy

39. Delgadillo, V.; O'Callaghan Mdel, M.; Artuch, R.; Montero, R.; Pineda, M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J. Inher. Metab. Dis.* **2011**, *34*, 1039–1044.

40. De Bruijn, H.; Vastardis, M.; Naraicz, M.; Węgrzyn, G.; Kulk, W.; Lisk, J.; Waermans, T.; van der Wal, A.; Wijburg, F. A. Genistein in Sanfilippo disease: A randomized, controlled crossover trial. *Ann. Neurol.* **2012**, *71*, 110-120.  
 residual activity in order to achieve this restoration. ERT has been already approved to treat some LSDs, both with

41. Węgrzyn, G.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C.; Węgrzyn, D.; Węgrzyn, E.; Węgrzyn, F.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, H.; Węgrzyn, I.; Węgrzyn, J.; Węgrzyn, K.; Węgrzyn, L.; Węgrzyn, M.; Węgrzyn, N.; Węgrzyn, O.; Węgrzyn, P.; Węgrzyn, Q.; Węgrzyn, R.; Węgrzyn, S.; Węgrzyn, T.; Węgrzyn, U.; Węgrzyn, V.; Węgrzyn, W.; Węgrzyn, X.; Węgrzyn, Y.; Węgrzyn, Z.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, B.; Węgrzyn, C



expression of a particular gene by the specific degradation of the mRNA. Synthetic siRNAs and shRNAs have been

widely used to downregulate the expression of a large number of genes in several cell types in vitro and in vivo. In one

study, siRNAs were used to downregulate *XYLT1*, *XYLT2*, *GALT1*, and *GALT2* genes encoding enzymes responsible for the formation of the linkage region (Figure 2). This strategy was assessed in MPS I and MPS IIIA fibroblasts, resulting

in an important decrease in the mRNA and protein levels for all the genes and a consequent significant decrease in the GAG synthesis after three days of treatment. In another study performed in our lab, the use of siRNAs to downregulate *EXTL2* and *EXTL3* genes was found to reduce the GAG synthesis and storage in MPS IIIA fibroblasts. These results were

very encouraging. In a recent study, siRNAs were used to downregulate *XYLT1/2* genes in MPS IIIA fibroblasts, resulting in a decrease in HS storage after two weeks. However, these studies were performed on patients' fibroblasts, therefore, it

is important to study SRT in relevant human neural cells, which are the ones affected in patients. In a recent study, we demonstrate that the same siRNAs that were effective in Sanfilippo syndrome type C fibroblasts were not efficient in

decreasing storage in iPSC-derived neurons generated from the same fibroblasts assayed in the previous study. cell transplantation does not improve neurological deficits in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Experimental*

*Neurology* 2010, 225, 445-454, 10.1016/j.expneurol.2010.07.024.

51. Adeline A. Gao, N. Jannah Shamsani; Leanne K. Winner; Sofia Hassiotis; Barbara M. King; John J. Hopwood; Kim M. Hemsley; Neonatal Bone Marrow Transplantation in MPS IIIA Mice. *JIMD Reports* 2012, 8, 121-132, 10.1007/8904\_2012\_169.

52. W Krivit; Microglia: The effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Cell Transplantation* 1995, 4, 385-392, 10.1016/0963-6897(95)90011-0.

53. Emily Y. Jan; Jaap van Boelen; Simon A. Jones; Robert Wynn; Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Inborn Errors of Metabolism. *Frontiers in Pediatrics* 2019, 7, 433, 10.3389/fped.2019.00433.

54. Langford-Smith, A.; Wilkinson, F.L.; Langford-Smith, K.J.; Holley, R.J.; Sergiyenko, A.; Howe, S.J.; Bennett, W.R.; Jones, S.A.; Wraith, J.E.; Merry, C.L. et al. Hematopoietic Stem Cell and Gene Therapy Corrects Primary Neuropathology and Behavior in Mucopolysaccharidosis IIIA Mice. *Mol Ther.* 2013, 26, 1615–1621.

55. Holley, R.J.; Ellison, S.M.; Fil, D.; O'Leary, C.; McDermott, J.; Senivvel, N.; Langford-Smith, A.W.W.; Wilkinson, F.L.; D'Souza, Z.; Parkes, J. et al. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene correction of mucopolysaccharidosis IIIB by stem cell gene therapy. *Brain* 2018, 141, 99–116.

56. Sergiyenko, A.; Langford-Smith, A.; Liao, A.Y.; Pickford, C.E.; McDermott, J.; Nowinski, G.; Langford-Smith, K.J.; Merry, C.L.; Jones, S.A.; Wraith, J.E.; et al. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Mol. Ther.* 2013, 21, 1938–1949.

57. Ellison, S.M.; Liao, A.; Wood, S.; Taylor, J.; Youshani, A.S.; Rowston, S.; Park, H.; Almant, M.; Biffi, A.; Chan, L.; et al. Pre-clinical Safety and Efficacy of Lentiviral Vector-Mediated Ex Vivo Stem Cell Gene Therapy for the Treatment of

Figure 2. Biosynthesis and degradation of HS. The diagram illustrates the biosynthesis and degradation pathways of Heparan Sulfate (HS). Biosynthesis occurs in the Endoplasmic Reticulum (ER), Golgi Apparatus, and Extracellular Matrix. Key enzymes involved include GlcA-T1, GalT-1/2, and various sulfotransferases. Degradation occurs in the Lysosome, involving enzymes like GUSB (MPS VII), NAGLU (MPS IIB), HGSNAT (MPS IIIC), IDUA (MPS I), and IDS (MPS II). The diagram also shows the involvement of various cofactors and the final products of degradation, such as Glucosamine and Xylose.

3.3. Pharmacological Chaperones for Enzyme-Enhancement-Therapy

59. Many caveolin-1 gene mutations lead to the production of various proteins with a rapidly degraded, due to misfoldings. These caveolin-1 gene mutations lead to the production of various proteins with a rapidly degraded, due to misfoldings. These caveolin-1 gene mutations lead to the production of various proteins with a rapidly degraded, due to misfoldings.

60. In the case of LSDs, it has been proposed that achieving an enzyme activity around 5–15% can be sufficient to avoid the appearance of pathological symptoms. To date, several compounds with chaperone activity have been tested for

61. Tagan A. Griffin; Hayley C. Anderson; John H. Wolfe; Ex Vivo Gene Therapy Using Patient iPSC-Derived NSCs Reverses Pathology in the Brain of a Homologous Mouse Model. *Stem Cell Reports* 2015, 4, 835-846, 10.1016/j.stemcr.2015.02.022.

62. Don Clarke; Yewande Pearce; Shih-Hsin Kan; Steven O. Lee; Valentina Sanghez; Jonathan D. Cooper; Patricia I. Dickson; Michelina Iacovino; Genetically Corrected iPSC-Derived Neural Stem Cell Grafts Deliver Enzyme Replacement to Affect CNS Disease in Sanfilippo B Mice. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2018, 10, 113-127, 10.1016/j.omtm.2018.06.005.



