Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Bc. Lucie Zdražilová

Analýza obsahu dolicholu v moči u pacientů s dědičnými poruchami glykosylace pomocí hmotnostní spektrometrie

Dolichol content analysis by mass spectrometry in urine from patients with congenital disorders of glycosylation

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

Konzultant: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2018

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze: Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za laskavé vedení, vstřícnost, pomoc a cenné rady při psaní diplomové práce. Následně patří dík panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za přínosnou konzultaci a umožnění vytvořit tuto práci v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Ladislavu Kuchařovi, PhD. za spolupráci a cenné rady, RNDr. Václavu Čapkovi, PhD. za pomoc při statistickém zpracování dat a Mgr. Janě Křížové za spolupráci a pomoc při vyhodnocování dat. Poděkování patří i celému kolektivu laboratoře za ochotu a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě patří můj dík také mé rodině a přátelům, kteří mě celou dobu při psaní diplomové práce podporovali.

Diplomová práce vznikla za podpory následujících projektů:

AZV-16-31932A

RVO-VFN64165

SVV-UK 260367/2017

Abstrakt

Dolichol je membránový lipid, který se podílí na glykosylaci proteinů a biosyntéze glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Jeho struktura je složená z isoprenových jednotek a je přítomen ve všech tkáních a většině membránových organel eukaryotických buněk. Nedávno byly některé typy dědičných poruch glykosylace popsány jako důsledek poruchy biosyntézy a metabolismu dolicholu, které však nejsou zachytitelné běžnými metodami.

Cílem bylo zavést analýzu obsahu dolicholu v moči a tkáních pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, analyzovat obsah dolicholu v souboru pacientů s vybranými typy dědičných poruch glykosylace a studovat dopad poruchy biosyntézy dolicholu na energetický metabolismus.

Biologický materiál pro analýzu obsahu dolicholu tvořil kontrolní soubor močí od 76 zdravých kontrol ve věku od 1 měsíce do 81 let, 6 pacientů s dědičnými poruchami glykosylace, 43 pacientů s podezřením na toto onemocnění; a vzorky tkání: frontálního kortexu, jater, kosterního svalu a srdce od dvou pacientů s poruchou v genu *NUS1* a kontrol. Pro funkční studie energetického metabolismu byly použity linie kultivovaných kožních fibroblastů. Lipidová složka byla po extrakci separována na kapalinovém chromatografu a dolicholy byly analyzovány na tandemovém hmotnostním spektrometru. Byly detekovány dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami a následně byl vypočten poměr dolicholu 18 ku dolicholu 19. Respirace fibroblastů byla měřena na přístrojích oxygraf a Seahorse, na kterém byla taktéž měřena glykolytická funkce buněk.

V kontrolním souboru byla v moči zjištěna významná závislost poměru dolicholu 18 ku dolicholu 19 na věku a pro tento poměr bylo stanoveno kontrolní rozmezí. Rozdíly mezi pohlavími v moči nalezeny nebyly. V moči a tkáních u pacientů s poruchou v genu *NUS1* byl potvrzen významně zvýšený poměr ve srovnání s kontrolami. Linie fibroblastů u těchto pacientů ukázaly změny v glykolytické funkci a respiraci ve srovnání s kontrolami.

Výsledky předkládané diplomové práce poukazují na novou možnost diagnostiky pacientů se vzácnými typy dědičných poruch glykosylace, kteří nemohou být nalezeni běžnými diagnostickými metodami.

Klíčová slova: dolichol, diagnostika, hmotnostní spektrometrie, dědičné poruchy glykosylace

Abstract

Dolichol is a membrane lipid, which carries monnosaccharides and glycans for *N*-linked protein glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis occuring in endoplasmic reticulum. Its structure is composed of isoprenoid units. Dolichol is present in all tissues and in most of the membrane organelles of eukaryotic cells. Recently some types of congenital disorders of glycosylation have been described as a consequence of dolichol biosynthesis and metabolism defects, which are not detectable by standard methods.

The aim of this diploma thesis was to analyze dolichol content in urine and in different tissues from patients with deficiency in dolichol biosynthesis by mass spectrometry and to study the impact of these defects on energetic metabolism.

Biological material for this study consisted of urine samples from 76 controls with age ranging from 1 months to 81 years, 6 patients with congenital disorders of glycosylation and 43 patients with suspicion of congenital disorder of glycosylation; samples of frontal cortex, liver, muscle and heart tissues from 2 patients with mutation in *NUS1* gene and controls. Urine samples were stored at -20 °C and tissue homogenates were stored in -80 °C until analysis. Lipid fraction after extraction was separated by liquid chromatography. Dolichols were analyzed by tandem mass spectrometry. Peaks of dolichols with 17, 18, 19 and 20 isoprenoid units were detected and the ratio of dolichol 18 and dolichol 19 was calculated. Respiration of fibroblasts was analysed on Oxygraph and Seahorse which was also used to analyze glycolytic function.

In the control group, significant correlation between dolichol 18 and dolichol 19 ratio and age was found in urine. Reference range in urine was evaluated. No differences between genders were detected. Ratio of dolichol 18 and dolichol 19 was significantly increased in urine from patients with mutation in *NUS1* and tissues in comparison with controls. Fibroblast line from these patients showed changes in glycolytic function and respiratory in comparison with controls.

Our results show a novel diagnostics option for patients with rare congenital disorders of glycosylation, who cannot be detected by usual screening methods. (*In Czech)*

Key words:dolichol, diagnostics, mass spectrometry, congenital disorders of glycosylation

Obsah

1 Úvod ..... - 1 -
1.1 Dolichol ..... - 1 -
1.1.1 Výskyt a funkce dolicholu ..... - 2 -
1.1.1.1 Výskyt ..... - 2 -
1.1.1.2 Funkce ..... - 4 -
1.1.2 Biosyntéza ..... - 6 -
1.2 Dědičné poruchy glykosylace ..... - 11 -
1.3 NogoB-receptor ..... - 13 -
1.4 Poruchy biosyntézy dolicholu vedoucí k dědičným poruchám glykosylace ... - 14 -
1.4.1 Známé typy dědičných poruch glykosylace spojených s poruchou biosyntézy a metabolismu dolicholu ..... - 15 -
1.4.1.1 DHDDS-CDG ..... - 15 -
1.4.1.2 NUS1-CDG ..... - 16 -
1.4.1.3 SRD5A3-CDG ..... - 16 -
1.4.1.4 DOLK-CDG ..... - 17 -
1.4.1.5 DPM-CDG ..... - 17 -
1.4.1.6 MPDU1-CDG ..... - 18 -
1.4.1.7 DPAGT1-CDG ..... - 18 -
1.4.2 Možnosti laboratorního stanovení obsahu dolicholu ..... - 18 -
1.5 Defekty v biosyntéze dolicholů a terapeutické možnosti ..... - 19 -
2 Cíle práce ..... - 21 -
3 Materiál a metodika ..... - 22 -
3.1 Materiál ..... - 22 -
3.1.1 Biologický materiál ..... - 22 -
3.1.2 Chemikálie ..... - 24 -
3.1.2.1 Komerčně dodávané roztoky ..... - 26 -
3.1.2.2 Roztoky připravené v laboratoři ..... - 27 -
3.1.3 Přístroje a vybavení ..... - 27 -
3.1.3.1 Komerčně dodávané kazety, destičky a kolony ..... - 27 -
3.1.3.2 Přístroje ..... - 28 -
3.1.3.3 Počítačové programy použité pro analýzu: ..... - 29 -

3.2 Metody ..... - 29 -
3.2.1 Analýza pomocí tandemového hmotnostního spektrometru ..... - 29 -
3.2.1.1 Příprava vzorků pro analýzu stability moči ..... - 29 -
3.2.1.2 Příprava vzorků moči pro analýzu na tandemovém hmotnostním spektrometru [83] ..... - 29 -
3.2.1.3 Příprava vzorků homogenátů tkání pro analýzu na tandemovém hmotnostním spektrometru ..... - 30 -
3.2.1.4 Analýza vzorků pomocí kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) ..... - 30 -
3.2.1.5 Statistické zpracování dat získaných z hmotnostního spektrometru . - 31 -
3.2.2 Kultivace buněk ..... - 32 -
3.2.2.1 Rozmrazování buněk ..... - 32 -
3.2.2.2 Pasážování buněk ..... - 32 -
3.2.2.3 Zmrazování buněk ..... - 33 -
3.2.3 Analýza na *Oxygraph-2k* ..... - 33 -
3.2.3.1 Příprava buněk ..... - 33 -
3.2.3.2 Měření na *Oxygraph-2k* ..... - 33 -
3.2.3.3 Měření koncentrace proteinu podle Lowryho ..... - 34 -
3.2.3.4 Analýza křivky získané respirometrií ..... - 35 -
3.2.4 Analýza na přístroji *Seahorse XFe24* ..... - 36 -
3.2.4.1 Příprava destičky ..... - 36 -
3.2.4.2 Příprava buněk ..... - 36 -
3.2.4.3 Příprava buněk pro měření na přístroji *Seahorse XFe24* ..... - 37 -
3.2.4.4 Hydratace kazety ..... - 37 -
3.2.4.5 Příprava média DMEM 5030 ..... - 37 -
3.2.4.6 Příprava média, substrátů a inhibitorů pro analýzu glykolýzy na *Seahorse XFe24* ..... - 38 -
3.2.4.7 Příprava média, substrátů a ihnhibitorů pro analýzu oxidační fosforylace na *Seahorse XFe24* ..... - 38 -
3.2.4.8 Příprava kazety pro měření oxidační fosforylace na přístroji *SeahorseXFe24* ..... - 39 -
3.2.4.9 Příprava kazety pro měření glykolýzy na přístroji *Seahorse XFe24* . - 39 -
3.2.4.10 Analýza na přístroji *Seahorse XFe24* ..... - 39 -

3.2.4.11 Dokumentace destičky a její úschova pro měření koncentrace proteinu ..... - 40 -
3.2.4.12 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové ..... - 40 -
3.2.4.13 Analýza dat z měření na *Seahorse XFe24* získaných z programu *Seahorse Wave 2.4 Software* ..... - 40 -
4 Výsledky ..... - 44 -
4.1 Obsah dolicholu v moči pomocí analýzy na tandemovém hmotnostním spektrometru ..... - 44 -
4.1.1 Testování stability moči pro účely analýzy dolicholů ..... - 45 -
4.1.2 Závislost poměru D18/D19 na pohlaví ..... - 46 -
4.1.3 Závislost poměru D18/D19 na věku ..... - 48 -
4.1.4 Kontrolní rozmezí pro poměr D18/D19 dle věku ..... - 49 -
4.1.5 Hodnoty poměrů u různých analyzovaných skupin ..... - 50 -
4.2 Analýza obsahu dolicholu v tkáních ..... - 52 -
4.3 Analýza respirace buněk pomocí Oxygrafu ..... - 53 -
4.4 Analýza aktivity buněk pomocí přístroje *Seahorse XFe24* ..... - 56 -
4.4.1 Oxidační fosforylace ..... - 58 -
4.4.2 Glykolytická funkce buněk ..... - 60 -
5 Diskuze ..... - 62 -
6 Souhrn a závěr ..... - 69 -
7 Použitá literatura ..... - 70 -
8 Přílohy ..... - 80 -
8.1 Naměřené hodnoty dolicholů pomocí metody LC-MS/MS ..... - 80 -
8.2 Hodnoty získané z analýzy na oxygrafu ..... - 89 -
8.3 Získané hodnoty analýzy na přístroji Seahorse ..... - 91 -
8.4 Prezentace výsledků diplomové práce na mezinárodních konferencích ..... - 93 -

Seznam zkratek

ALG8-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *ALG8*
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ADP	adenosindifosfát
ALG5/*ALG5*	dolicholfosfát-β-glukosyltransferasa a příslušný gen
Ama	antimycin A
AMK	aminokyselina
Asc	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
ATP6A1P-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *ATP6AP1*
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD31	vaskulární endotheliální protein (z angl. „cluster of differentiation 31“)
CDG	dědičné poruchy glykosylace (z angl. „cogenital disorders of glycosylation“)
CDG IIx	pacient s profilem CDG typu II získaným pomocí isoelektrické fokusace sialovaných forem transferinu
CPT/DHDDS; *CPT/DHDDS*	cis-prenyltransferasa/dehdrodolicholsynthasa a příslušný gen
CTP	cytidintrifosfát
Cyc	cytochrom c
D17, D18, D19, D20	dolichol se 17-20 isoprenovými jednotkami
Dg	digitonin
DHDDS-CDG	dědičná porucha glykosylace způsobená mutací v genu *DHDDS*
DMAPP	dimethylallyldifosfát
Dol	dolichol
Dol-P	dolicholfosfát
DolP18, DolP19, DolP20	dolicholfosfát s 18,19 a 20 isoprenovými jednotkami
Dol-P-Glc	dolicholfosfoglukosa
Dol-P-Man	dolicholfofsfomannosa

dolichyl-MK	mastné kyseliny navázané na dolichol esterovou vazbou
DOLPP1, *DOLPP1*	dolicholdifosfátfosfatasa a příslušný gen
DPM1,DPM2,DMP3	3 podjednotky dolicholfosfomannosasynthasy
DPM1,DPM2,DMP3	geny pro 3 podjednotky dolicholfosfomannosasynthasy
DPM1-3-CDG	dědičné poruchy glykosylace způsobené mutací v genech pro podjednotky dolicholfosfomannosasynthasy
DPTAGT1/ *DPTAG1*	dolicholfosfát-*N*-acetylglukosaminfosfotransferasa a příslušný gen
DPTAGT1-CDG	dědičné poruchy glykosylace způsobené mutací v genu pro dolicholfosfát-*N*-acetylgluksaminfosfotransferasu 1
ECAR	extracelulární míra acidifikace prostředí buňkami (z angl. „extracellular cell acidification rate“)
ER	endoplasmatické retikulum
ERGIC	přechodný prostor ER-GA (z angl. „ER-Golgi intermediate compartment“)
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon
FPP	farnesyldifosfát
G	glutamát
GA	Golgiho aparát
GDP-man	guanosyldifosfomannosa
GGPP	geranylgeranyldifosfát
Glc	glukosa
GlcNAc	*N*-acetylglukosamin
$GlcNAc_2Man_9Glc_3$	oligosacharid složený z dvou *N*-acetylglukosaminů, devíti mannos a tří glukos
GPI-kotva	glykosylfosfatidylinositolová kotva
GPP	geranyldifosfát
HDL	lipoprotein (z angl. „high density lipoprotein“)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A

HMGR	3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktasa
IPP	isopentenyldifosfát
LLO	oligosacharid vázaný na lipid (z angl. „lipid linked oligosaccharide“)
LC-MS/MS	analýza pomocí kapalinové chromatografie kombinovaná s tandemovou hmotnostní spetkrometrií
M	malát
Man	mannosa
Man1B1-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *Man1B1*
$Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol	dicholdifosfát s navázaným oligosacharidovým řetězcem složeným z pěti mannos a dvou *N*-acetylglukosaminů
methylglutaryl-CoA	methylglutarylkoenzym A
MiliQ-UV	ultračistá voda
MPDU1/ *MPDU1*	protein MPDU1 (z angl. „mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 protein“) a příslušný gen
MPDU1-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *MPDU1*
MRM	z angl. „multiple reaction monitoring“
NgBR; *NUS1*	Nogo-B receptor a příslušný gen
Nogo-B	retikulon 4b
NPC2	protein z angl. „Niemann Pick type C2 protein“
NUS1-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *NUS1*
OCR	spotřeba kyslíku buňkami (z angl. „oxidation consumption rate“)
Omy	oligomycin
P	pyruvát
PGM1-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *PGM1*
PKA1	proteinkinasa typu 1
PMM2-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *PMM2*
RFT1	protein translokující oligosacharid (z angl. „oligosaccharide translocation protein RFT1“)

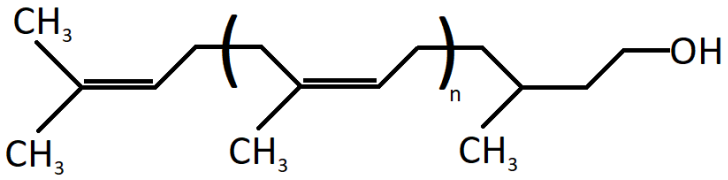
RFT1-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *RFT1*
Rot	rotenon
SRD5A3; *SRD5A3*	polyprenolreduktasa a příslušný gen
SRD5A3-CDG	CDG onemocnění způsobené poruchou v genu *SRD5A3*
Su	sukcinát
TMPD	tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid
UDP-GlcNAc	uridindifosfat-*N*-acetylglukosamin
VE-kadherin	vaskulární endotheliální kadherin (z angl. „vascular endothelial cadherin“)
VEGF	vaskulární endothelialní růstový faktor (z angl. „vascular endothelial growth factor“)
VEGRF	receptor vaskulárního endotheliálního růstového faktoru (z angl. „vascular endothelial growth factor receptor 2“)
1st Qu.	první kvartil
2-DG	2-deoxy-D-glukosa
3rd Qu.	třetí kvartil

1 Úvod

1.1 Dolichol

Mezi membránové lipidy patří polyisoprenoidní alkoholy, které se vyskytují v každé buňce od archea po eukaryota [1]. Nejznámější forma, alfa-nasycený polyisoprenoidní alkohol neboli dolichol, se vyskytuje ve všech tkáních a většině membránových organel eukaryotických buněk. Dolichol (Dol) se skládá z dlouhého řetězce složeného z isoprenových jednotek a je zakončen alfa-nasycenou isoprenoidní skupinou obsahující alkoholovou skupinu na svém konci (Obr. 1.1 na straně 2). Zatímco délka těchto lipidů je variabilní, konfigurace dvojitých vazeb polyisoprenoidů je fixní. Alfa-terminální isoprenová jednotka v polyprenolu (dehydrodolicholu) není nasycena, narozdíl od dolicholu. Tato struktura je velice zajímavá, neboť není přítomná v bakteriích, ale pouze v eukaryotických buňkách [2]. Zatímco délka řetězce je variabilní, konfigurace dvojných vazeb je přesně daná a fixovaná. Tyto polyisoprenoidy se v lidském organismu nacházejí hlavně ve složení ze 17, 18, 19 a 20 isoprenových jednotek a dominantním je dolichol s 19 jednotkami [3]. Terminální hydroxylová skupina existuje volná, fosforylovaná či esterifikovaná mastnými kyselinami.

Dolichol má významnou roli lipidového přenašeče oligosacharidových řetězců v prvních fázích *N*-glykosylace proteinů probíhajících v endoplazmatickém retikulu (ER) všech eukaryotických buněk. Ostatní glykosylační procesy zahrnující *C*- a *O*-mannosylaci, biosyntézu glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI-kotvy) a *O*-glukosylaci [1] také závisí na biosyntéze dolicholu, a to konkrétně na dostupnosti dolicholfosfát-mannosy (Dol-P-Man) a dolicholfosfát-glukosy (Dol-P-Glc) v ER. Všudypřítomnost dolicholu v buněčných kompartmentech, které nejsou zahrnuty do glykosylačního procesu, ukazuje možnou důležitosti dolicholu i v jiných buněčných dějích.



Obr. 1.1: Chemická struktura dolicholu: *Dolichol je složen v lidském těle hlavně ze 17-20 isoprenových jednotek a na svém konci má alfa-nenasycenou isoprenovou jednotku, na jejímž konci je navázána hydroxylová funkční skupina,* ***n*** *– počet isoprenových jednotek.*

1.1.1 Výskyt a funkce dolicholu

1.1.1.1 Výskyt

Všechny tkáně a téměř všechny membrány eukaryotických buněk obsahují dolichol a jeho metabolity [4]. Obecně jsou přítomné v malé koncentraci v porovnání s glycerofosfolipidy [5]. Jeho množství je vysoce variabilní a závisí na tkáni a věku jedince [6]. Důvod, proč je dolicholu v některých tkáních více a v některých méně, je zatím neznámý, ale nezdá se být v korelaci s mírou glykosylace v dané tkáni či orgánu [1].

Fosforylovaný dolichol (Dol-P) je lokalizovaný hlavně v ER, ale také spolu s volným a esterifikovaným alkoholem dolicholu a dolicholovou kyselinou [7] jsou přítomny i v peroxisomech a ve velkém množství se vyskytují v lysozomech, plazmatické membráně a Golgiho aparátu (GA) [8, 4].

Je velice zajímavé, že lidské tkáně mají hladinu dolicholu 5-10x vyšší v porovnání s tkáněmi z myší či krys [6]. Nejvyšší obsah dolicholu je v hypofýze (7 mg/g) [3], dále i nadledviny, varlata, štítná žláza a slinivka břišní mají vysoký obsah (v rozmezí 1-2 mg/g) [3]. Většina dalších orgánů ho obsahuje okolo 100-500 µg/g. Avšak některé orgány ho mají buďto velice málo (placenta) či málo (tlusté střevo, prostata) viz Tab. 1.1 na straně 3. Dolichol je taktéž detekován v nízké koncentraci v séru, kde je asociován s HDL (z angl. „high density lipoprotein“) frakcí [9].

Tab. 1.1: Obsah dolicholu a dolicholfosfátu v různých tkáních a orgánech, *data získaná z analýzy* [3].

orgán/tkáň	***Dol (µg/g)***	***Dol-P (µg/g)***
játra	452 ± 38	18,8 ± 2,3
srdce	185 ± 22	13,1 ± 1,0
hypofýza	7168 ± 592	283,1 ± 22,2
svaly	393 ± 40	16,4 ± 1,6
frontální kortex	111 ± 35	21,2 ± 4,1
nadledviny	1598 ± 168	51,1 ± 4,1
ledviny	192 ± 25	12,7 ± 1,5
placenta	15 ± 3	-
prostata	79 ± 15	8,2 ± 1,2
děloha	481 ± 58	-
štítná žláza	1960 ± 198	13,8 ± 1,2

**data získaná po provedení kyselé hydrolýzy*

Dolichol je v hypofýze největší lipidovou komponentou [3]. Dominantní formou dolicholu je volný alkohol, ale jeho obsah je přítomen ve značně odlišných hladinách v různých částech mozku [3].

Dol-P je přítomen v různých orgánech ve vysoce variabilním množství, a to v rozmezí mezi 1 až 9% obsahu celkového Dol a je ve všech případech mnohem nižší než volný alkohol [3]. Vysoká koncentrace Dol a Dol-P v lidském těle ukazuje, že tyto lipidy mohou hrát důležitou roli ve fyziologických i patologických procesech buňky [3]. Variace hladiny Dol-P v různých tkáních naznačuje, že volný alkohol a fosforylovaná forma nejsou nezbytně biosynteticky spojeny [3].

Estery dolicholu reprezentují 10-60 % celkového obsahu Dol, a to v závislosti na typu tkáně či membrány [3].

Největší zastoupení Dol je tvořeno dolicholy s 19 isoprenovými jednotkami (D19), které tvoří asi 41-55 % celkového dolicholu [3]. Další část je nejvíce složena z dolicholu obsahujícího 18 a 20 isoprenových jednotek (D18, D20) a hladina D18 může být stejná, větší či menší než D20 [3]. Dolichol-fosfáty s 18 a 20 jednotkami (DolP18 a DolP20) jsou přítomny ve velkém množství ve všech tkáních, ale dolichol-fosfát s 19 jednotkami (DolP19) je opět zastoupen nejvíce. Jejich distribuce se však určitým způsobem liší od distribuce volných alkoholů [3].

Vysoký obsah neutrálních lipidů je obsažen v lidském mozku, kde tvoří okolo 1/3 celkového obsahu lipidů. V této frakci dominuje cholesterol, ale také Dol, Dol-P a ubichinon jsou přítomné v nezanedbatelném množství ve všech částech mozku [10]. Bylo prokázáno, že obsah dolicholu v lidském mozku s věkem až 100x vzroste [11, 12]. Podobný vzrůst obsahu dolicholu byl pozorován i v jiných tkáních.

V předchozích studiích byly v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními prokázány abnormality ve struktuře a obsahu lipidů v mozku [13]. Je překvapující, že u těchto onemocnění je množství dolicholu plošně sníženo ve všech částech mozku, ale míra tohoto poklesu se mezi různými částmi mozku liší. Vliv snížení dolicholu na fyziologické funkce jedince je těžké odhadnout, neboť dopady a mechanizmy zatím nebyly plně objasněny. U pacientů s neurodegenerativním onemocněním může dojít ke změnám v lipidové kompozici, což ovlivní biofyzikální funkce membrán.

1.1.1.2 Funkce

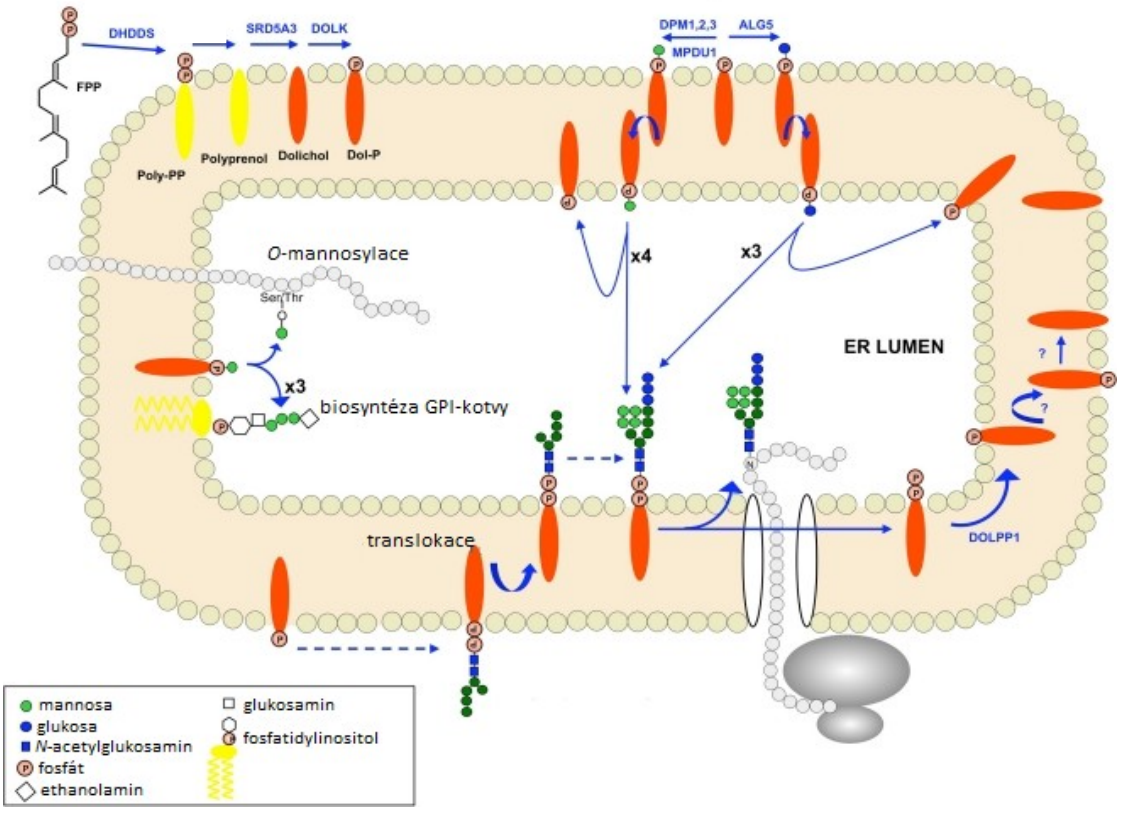
Zatímco Dol-P hraje důležitou roli při *N*-glykosylaci, úloha Dol samotného je zatím málo známá. Stále máme velmi omezené znalosti o funkci metabolitů dolicholu v organelách, jeho vlivu na fyzikálně-chemické vlastnosti lipidové dvojvrstvy a protektivního krytí buněčných lipidů proti oxidačnímu poškození reaktivními formami kyslíku [4].

Dol zvyšuje fluiditu mastných kyselin a permeabilitu buněčné membrány [14]. Je známo, že zvýšené hladiny reakčních forem kyslíku tvořící oxidační stres snižují hladinu dolicholu, a taktéž že nižší hladiny Dol jsou asociovány se zvýšenou peroxidací lipidů, což svědčí pro protektivní roli Dol v antioxidačním procesu buněčných membrán [15].

Dolichol podporuje organizaci specifické struktury, tzv. hexagonální fáze II, která nejspíše usnadňuje přenos mezi dvěma vrstvami membrány a může tak usnadnit transmembránový přenos lipidů s navázanými oligosacharidy [16]. Dolichol je dále určitým způsobem zapojen do vesikulárního přenosu, což nám vysvětluje zvýšený výskyt tohoto lipidu v GA [17].

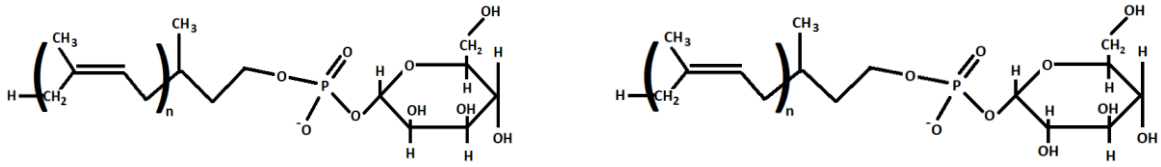
Fosforylovaný dolichol je dobře popsán jako lipidový nosič oligosacharidů v prvních fázích *N*-glykosylace a pro tento proces je v některých tkáních limitujícím faktorem [18]. V průběhu *N*-glykosylace je nejprve Dol-P použit *N*-acetylglukosamino-

1-fosfotransferasou pro začátek sestavování oligosacharidu vázaného na lipid na cytoplazmatické straně ER. Produkt této reakce je prodloužen na dolicholdifosfát s navázaným oligosacharidovým řetězcem složeným z pěti mannos a dvou *N*-acetylglukosaminů ($Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol) a poté překlopen za účasti proteinu translokující oligosacharid (RFT1, z angl. „oligosaccharide translocation protein RFT1“) [19] dovnitř ER. Následně další 4 Dol-P, původně nesoucí mannosu jsou taktéž překlopeny dovnitř lumenu ER a použity jako donory sacharidů pro syntézu oligosacharidového řetězce vázaného na tento lipid. Nakonec tři Dol-P vázané na glukosu jsou použity jako donory sacharidů pro dokončení biosyntézy oligosacharidového řetězce. Plně formovaná oligosacharidová struktura složená z dvou *N*-acetylglukosaminů, devíti mannos a tří glukos ($GlcNAc_2Man_9Glc_3$) je kotranslačně přenesena na asparaginový zbytek rostoucího polypeptidu za uvolnění Dol-PP, který je dále recyklován [20]. Celý proces je zobrazen na Obr. 1.2.



Obr. 1.2: Cyklus dolicholu v endoplazmatickém retikulu: *Zobrazení biosyntézy Dol-P a následné navázání monosacharidů. Ty dále slouží pro O-mannosylaci, biosyntézu GPI-kotvy či vytvoří na Dol-P oligosacharid, který je následně přenesen na vznikající protein. Dol-P je následně recyklován.* ***DHDDS*** *- dehydrodolicholsynthasa,* ***SRD5A3*** *- polyprenolreduktasa,* ***FPP*** *- farnesyldifosfát,* ***DOLK*** *- dolicholkinasa,* ***MDPU1*** *- protein MPDU1 (z angl. „mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 protein“),* ***DPM1-3*** *- dolicholfosfátmannosyltransferasový polypeptid 1-3,* ***ALG5*** *- dolicholfosfát-glukosa-β-glukosyltransferasa 5,* ***DOLPP1*** *- dolicholdifosfátfosfatasa, Převzato a upraveno podle* [21].

Dol-P-Man (struktura viz Obr. 1.3) je využívána jako substrát pro *N*-glykosylaci, *O*-mannosylaci proteinů [22, 23] a biosyntézu proteinů vázaných na GPI-kotvu. Protein MPDU1 (z angl. „mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 protein“, MPDU1), membránový protein lokalizovaný v ER, je esenciální pro využití Dol-P-Man a Dol-P-Glc v biosyntéze GPI-kotvy, *N*-glykosylaci a proteinové *O*-a *C*-mannosylaci, i když zatím je jeho přesná funkce neznámá [24]. Dol-P-Man je generována z Dol-P a GDP-mannosy pomocí Dol-P-Man-synthasy, která je v lidském těle tvořena enzymatickým komplexem obsahujícím DPM1, DPM2 a DPM3 podjednotky [25]. Strukturní charakteristika komplexu potřebného pro syntézu savčí Dol-P-Man a role individuálních podjednotek byly popsány v článku [26].



Obr. 1.3: Struktura dolicholfosfát-mannosy a dolicholfosfát-glukosy: *Monosacharid se váže přes fosfátovou skupinu na dolichol.*

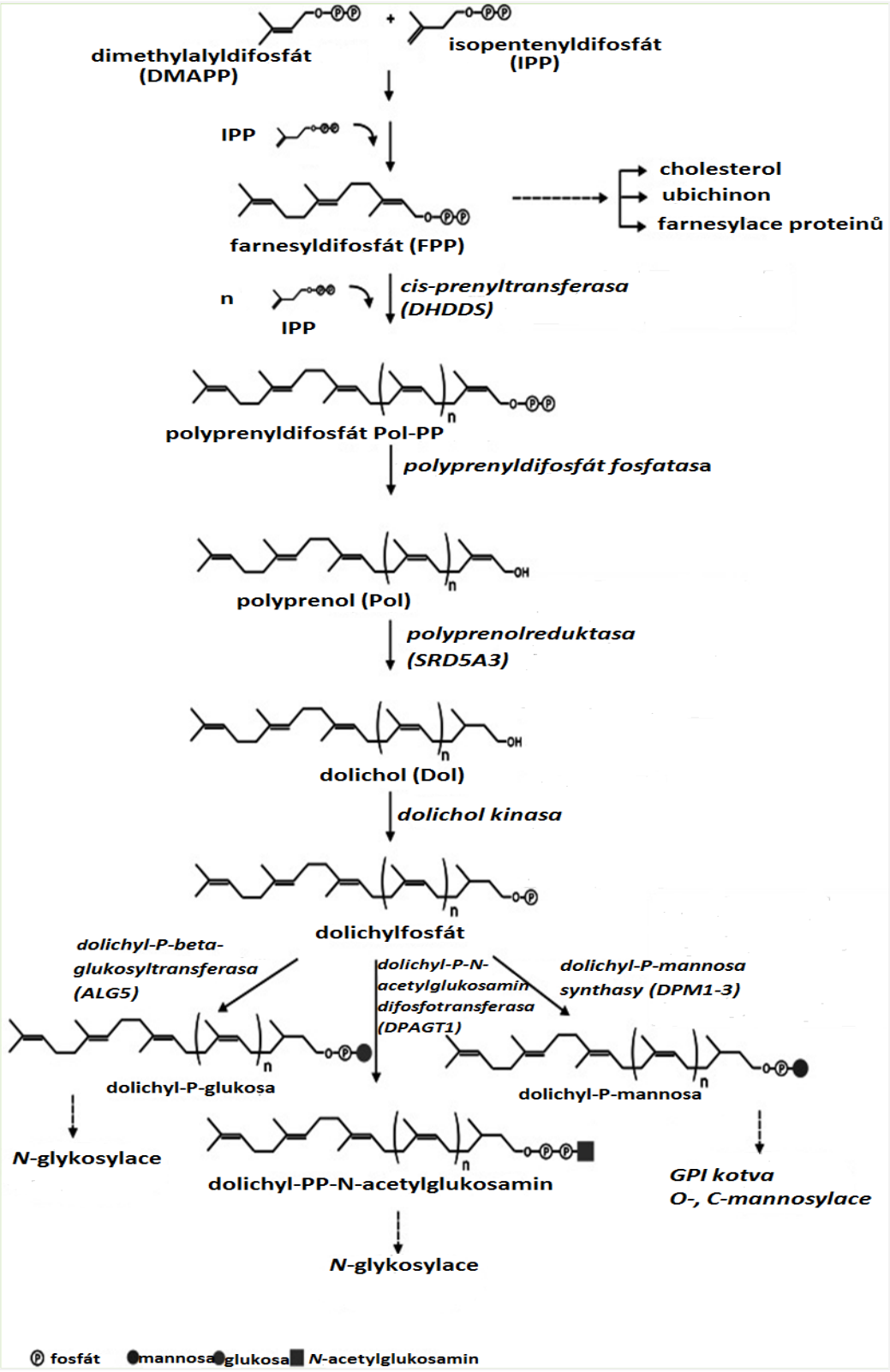
Specifická role pro estery dolicholů nebyla zatím objasněna. Spekuluje se, že kromě vlivu na fyzikální vlastnosti membrán, je esterifikovaná forma Dol důležitá pro intracelulární transport dolicholů [3].

1.1.2 Biosyntéza

Dolichol je konečným produktem mevalonátové dráhy, která je společná pro cholesterol i ubichinon. Biosyntéza dolicholu (zobrazena na Obr. 1.4 na straně 8) probíhá hlavně na cytoplazmatické straně ER, kde je taktéž situována *N*-glykosylace. Ze tří molekul acetyl-CoA vznikne 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A (HMG-CoA), který je pomocí HMG-CoA-reduktasy [27] (redukčního enzymu) dále přeměněn na mevalonát. Kombinací tří po sobě následujících enzymatických reakcí dojde k syntéze isopentenyldifosfátu (IPP), což je stavební jednotka pro isoprenoidy, který vytváří lineární polymery. Tři molekuly IPP vedou ke vzniku farnesyldifosfátu (FPP), který je považován za důležitý zlom této biosyntetické dráhy. Slouží totiž jako substrát pro 4 různé dráhy: skvalensynthasa

katalyzuje první krok vedoucí k tvorbě cholesterolu, transprenyltransferasa je zapojena v syntéze postranního řetězce ubichinonu (solanesyldifosfátu), proteinfarnesyltransferasa je zodpovědná za posttranslační farnesylaci proteinů a cis-prenyltransferasa je prvním specifickým enzymem v biosyntéze dolicholu [1].

Cis-prenyltransferasa neboli dehydrodolicholsynthasa (DHDDS) používá FPP jako substrát a katalyzuje několik dalších reakcí s IPP molekulami a formuje polyprenyldifosfát sekvenčně „hlava k ocasu“ cis-adicí mnoha molekul IPP na požadovanou délku řetězce [1]. Počet přidaných IPP záleží na druhu organismu, savčí organismy syntetizují delší řetězce hlavně se 17-20 přidanými IPP [6]. Tato reakce je považována za první krok přiřazovaný pouze k syntéze dolicholu a děje se na cytoplazmatické straně ER [1]. Strukturní analýza tohoto enzymu, stejně tak i jeho funkce, naznačuje, že DHDDS sama determinuje délku řetězce jejich produktů. Analýza ukázala, že DHDDS je kódována jedním genem *CPT* neboli *DHDDS* [28, 29], který se vyskytuje na chromosomu 1p36, má 8 exonů [29] a vzniklý protein je složen z 334 AMK [29]. Zvláštní aspekt tohoto enzymu je absence původně předpokládané transmembránové domény v jeho sekvenci navzdory jeho lokalizaci v ER. Předpokládá se, že v tomto procesu mohou být zapojeny i nějaké další enzymy a proteiny. Například lidský Nogo-B receptor (NgBR) sdílí značnou homologii s cis-prenyltansferasou [1] a byl nazván jako komponenta modulující aktivitu DHDDS a regulující biosyntézu dolicholu v savčích buňkách [30]. Dříve byl NgBR popisován jako NPC2-vázající protein (z angl. „Nieman-Pick type C2 protein“), který podporuje NPC2 stabilitu v lumen ER. Bylo prokázáno, že NgBR existuje ve dvou topologických konformacích. Minoritní frakce s *C*-terminálním koncem na lumenální straně ER pomáhá regulaci NPC2 stability [31], zatímco majoritní frakce s *C*-terminálním koncem orientovaným do cytosolu reguluje aktivitu a váže DHDDS [30]. Nadměrná exprese DHDDS vede v savčích buňkách pouze k mírnému nárůstu enzymatické aktivity. Je tedy možné, že existuje regulační protein zodpovědný za celkovou aktivitu cis-prenyltransferasy [29]. Ztráta exprese NgBR genu *NUS1* vede oproti tomu k významnému deficitu aktivity DHDDS a také k nedetekovatelné hladině dolicholu. Dále bylo potvrzeno, že *C*-terminální doména NgBR je potřebná pro jeho interakci s DHDDS [31] (podrobněji kapitola 1.3 na straně 13).



Obr. 1.4: Biosyntetická dráha dolicholu a další kroky jeho metabolismu: *Přidáváním IPP jednotek na FPP vzniká polyprenoldifosfát, který je následně několika kroky přeměněn na dolichol. Na jeho fosforylovanou formu se pak dále váží různé monosacharidy.* ***IPP*** *- isopentenyldifosfát,* ***FPP*** *- farnesyldifosfát, Převzato a upraveno podle* [4].

Následuje defosforylační krok, kdy polyprenoldifosfátfosfatasa defosforyluje polyprenoldifosfát [32]. Žádné detailní informace o struktuře či funkci polyprenoldifosfátfosfatasy v lidském organismu zatím nejsou známé [33]. Tento enzym je také zapojen v recyklaci dolicholu po odevzdání oligosacharidového řetězce proteinu, a to přenesením jednoho fosfátu z Dol-PP v ER. Tato recyklace dolicholfosfátfosfatasou hraje důležitou roli v regulaci aktuálních zásob Dol-P a tedy i jeho dostupnosti pro různé glykosylační procesy [34].

Dále dochází k redukci dvojné vazby nejbližší k hydroxylové skupině. Nedávno byl identifikován první enzym spojovaný s tímto redukčním krokem. Polyprenolreduktasa (SRD5A3), která ukazuje homologii se steroid-5-alfa-reduktasou [35], produkuje dolichol redukcí alfa-terminálního isoprenového zbytku polyprenolu [35]. Byly popsány mutantní buněčné linie s defektem v tomto kroku [36], u kterých dochází k akumulaci polyprenolů s délkou řetězce identickou s dolicholy, ale bez saturace alfa-isoprenové jednotky. Polyprenoly jsou obligatorními intermediáty pro syntézu dolicholů a jsou detekovány ve velkém množství při *in vitro* biosyntéze dolicholu, avšak *in vivo* hladina polyprenolu je většinou velice nízká, často nedetekovatelná [37, 38], a to nejspíše díky rychlé konverzi na dolichol. V lidském těle je gen *SRD5A3* kódující polyprenolreduktasu lokalizován na chromosomu na 4p12 a má 5 exonů kódujících protein s 318 AMK. Enzym SRD5A3 má 6 transmembránových domén a je lokalizován v ER a přechodném prostoru ER-GA (ERGIC, z angl. „ER-Golgi intermediate compartment“) a je exprimován v téměř všech lidských tkáních [39]. Jeho *N*-terminální hydrofóbní doména je pravděpodobně zodpovědná za interakci se substrátem [39].

Dolichol je následně fosforylován dolicholkinasou (DOLK) [40] a může dále sloužit jako nosič mannosy a glukosy, které jsou dále použity pro *N*-glykosylaci, *O*- a *C*-mannosylaci a syntézu GPI-kotvy. Hlavně však Dol-P slouží jako nosič $GlcNac_2Man_9Glc_3$ oligosacharidového řetězce důležitého pro *N*-glykosylaci proteinů. Dol-P-man je syntetizována Dol-P-Man-synthasou přes dolicholfosfát-mannosyltransferasový proteinový komplex (DPM1-3) [26].

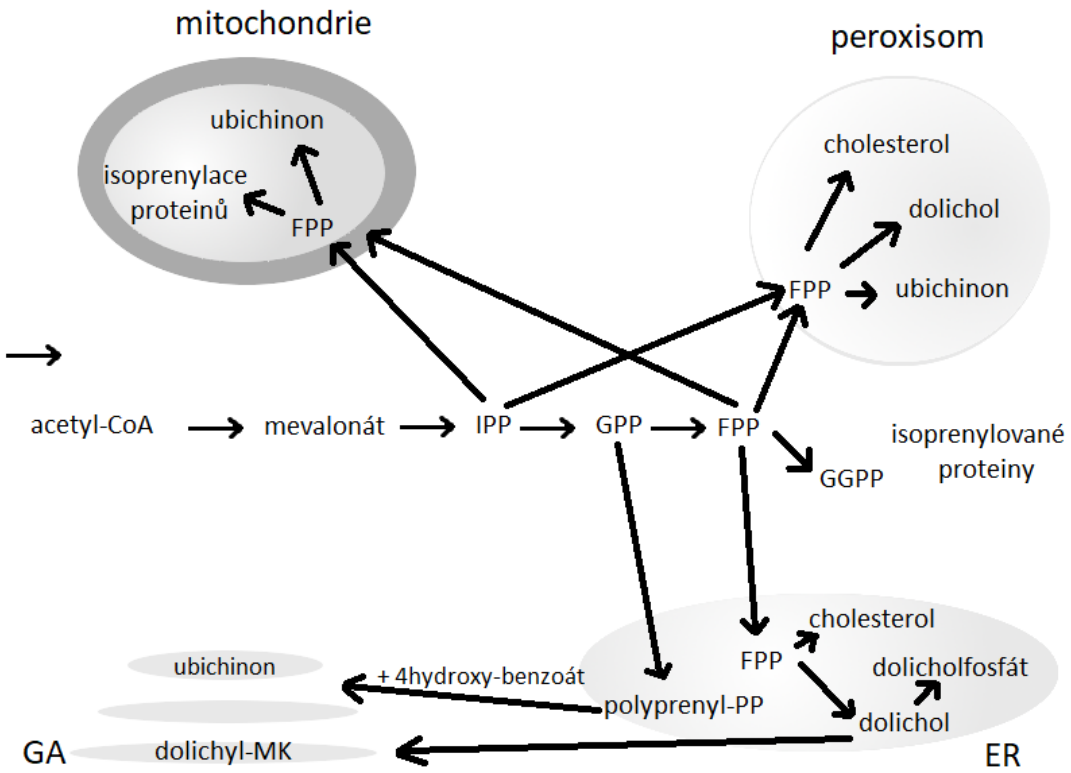
Dostupnost Dol-P je jedním z limitujících faktorů kontrolujících biosyntézu tzv. oligosacharidů navázaných na lipidy (LLO z angl. „lipid linked oligosaccharides“) v eukaryotických buňkách [41]. LLO jsou prekurzory *N*-vázaných oligosacharidů. Dolichol kinasa je CTP-dependentní enzym lokalizovaný v ER s katalytickým jádrem orientovaným

na cytoplazmatickou stranu ER [40]. Snížená dostupnost Dol-P vede ke snížené glykosylaci sekrečních proteinů a zejména silně ovlivňuje *O*-mannosylaci a syntézu GPI-kotvy [42].

Dol-P-glukosa je produkována dolicholfosfát-glukosa-β-glukosyltransferasou (ALG5) [43].

Monosacharidy a oligosacharidy vázané na Dol-P jsou nezbytné pro různé glykosylační dráhy. Sacharidy pro tento proces vyžadují určitou hladinu Dol-P. Pro zajištění dostatečného množství v buňce je tento lipid také recyklován, a to pomocí konverze Dol-PP vzniklého odebráním oligosacharidového řetězce oligosacharyltransferasou na Dol-P difosfatasou, která je účinná na lumenální straně ER. Tato reakce je u člověka katalyzována dolicholdifosfátfosfatasou 1 (DOLPP1), která také defosforyluje polyprenyldifosfat při syntéze polyprenolu. Dol-P se vrací zpět na cytoplazmatickou stranu, kde může být znovu použit pro LLO biosyntézu [44]. Tato recyklace Dol-PP přispívá značně k dostupnosti Dol-P pro glykosylační reakci.

Jak již bylo popsáno dolichol je konečným produktem mevalonátové dráhy, která je společná pro cholesterol i ubichinon. Kvantitativně hlavním produktem této dráhy je cholesterol, který velmi přispívá k organizaci membrán ve všech částech mozku [10]. U této dráhy je výsledným produktem farnesyldifosfát (FPP). Ten může následně kondensovat s 4-hydroxybenzoátem za vzniku dekaprenyl-4-hydroxybenzoátu, který je několika následnými kroky přeměněn na ubichinon [45]. Většina enzymů mevalonátové dráhy je nejspíše lokalizována na více částech buňky [46]. Bylo prokázáno, že ubichinon je přítomen v mitochondriích, ER, GA, lysozomech, peroxisomech a plasmatické membráně [47]. Narozdíl od cholesterolu a dolicholu se zdá, že nepodléhá recyklaci a je většinou syntetizován *de novo* [45]. Na Obr. 1.5 na následující straně je schematicky zobrazeno propojení biosyntézy dolicholu, ubichinonu a cholesterolu v různých kompartmentech buňky.



***Obr. 1.5: Schematické znázornění lokalizace a biosyntézy ubichinonu, cholesterolu a dolicholu v organelách buňky: IPP** - isopentenyldifosfát, **FPP** - farnesyldifosfát, **DMAPP** - dimethylallyldifosfát, **GGPP** - geranylgeranyldifosfát, **Dol-P** - dolicholfosfát, polyprenyl-PP - polyprenyldifosfát, **acetyl-CoA** - acetylkoenzym A, **GPP** - geranyldifosfát, **dolichyl-MK** - mastné kyseliny navázané na dolichol esterovou vazbou, **ER** – Endoplazmatické retikulum, **GA** – Golgiho aparát. Převzato a upraveno podle* [48].

1.2 Dědičné poruchy glykosylace

Glykosylace je modifikace proteinů a lipidů. Poruchy glykosylace byly objeveny až v posledních pár desetiletích, a to i přes nezbytnost glykokonjugátů pro životaschopnost žijících organizmů. Momentální seznam více než 130 druhů dědičných poruch glykosylace (CDG, z angl. „congenital disorders of glycosylation“) [49] ukazuje důležitost glykosylace v lidském vývoji a fyziologii [50]. Poruchy glykosylace jsou vzácná dědičná onemocnění, která jsou často popisována jako dědičné poruchy glykosylace. Zahrnují poruchy nukleotidových sacharidů, jejich transportérů, glykosyltransferas/glykosidas, a dalších proteinů ovlivňujících správnou funkci příslušných organel. Většina typů je asociována s neurologickými poruchami ve škále od psychomotorické retardace až po mírné intelektuální indispozice. Bylo také popsáno několik onemocnění spojených s poruchami *O*-glykosylace, glykolipidů a biosyntézy glykosaminoglykanů [51]. Vzrůstající aplikace

celogenomového sekvenování pomáhá v dnešní době rozluštit a najít nové defekty glykosylace, které jsou asociované s mírnějšími formami mentálních indispozic [51].

Díky heterogenitě oligosacharidů je klinická šíře příznaků u CDG velice rozmanitá, a to od mírných příznaků po vážné multiorgánové dysfunkce způsobující lethalitu novorozenců a malých dětí. CDG jsou vzácná onemocnění, kde je prevalence velice různorodá v závislosti na typu CDG a je většinou neznámá [50].

CDG byly původně rozděleny do dvou skupin podle profilu detekovaného pomocí metody analýzy *N*-glykosylace sérového transferinu. CDG typu I, zahrnující defekty biosyntézy oligosacharidu vázaného na lipid: od skládání z formace dolicholdifosfat-*N*-acetylglukosamin (GlcNAc) po sestavování $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ oligosacharidu navázaného na dolichol a jejich transportu na asparaginový zbytek na vznikající protein. Také mezi ně patří defekty v biosyntéze na nukleotid vázaných monosacharidů. Defekty vedou k absenci celkového oligosacharidu na proteinu. Tyto defekty nazývané CDG-I jsou lokalizovány v ER či cytoplazmě. CDG typu II, oproti tomu zahrnují defekty *N*-glykokonjugátů, kde je oligosacharidový řetězec navázaný na protein dále upravován a také defekty v dalších typech glykosylace (*O*-glykosylace a biosyntézy glykolipidů) [52]. Zapojené enzymy jsou většinou lokalizovány v GA.

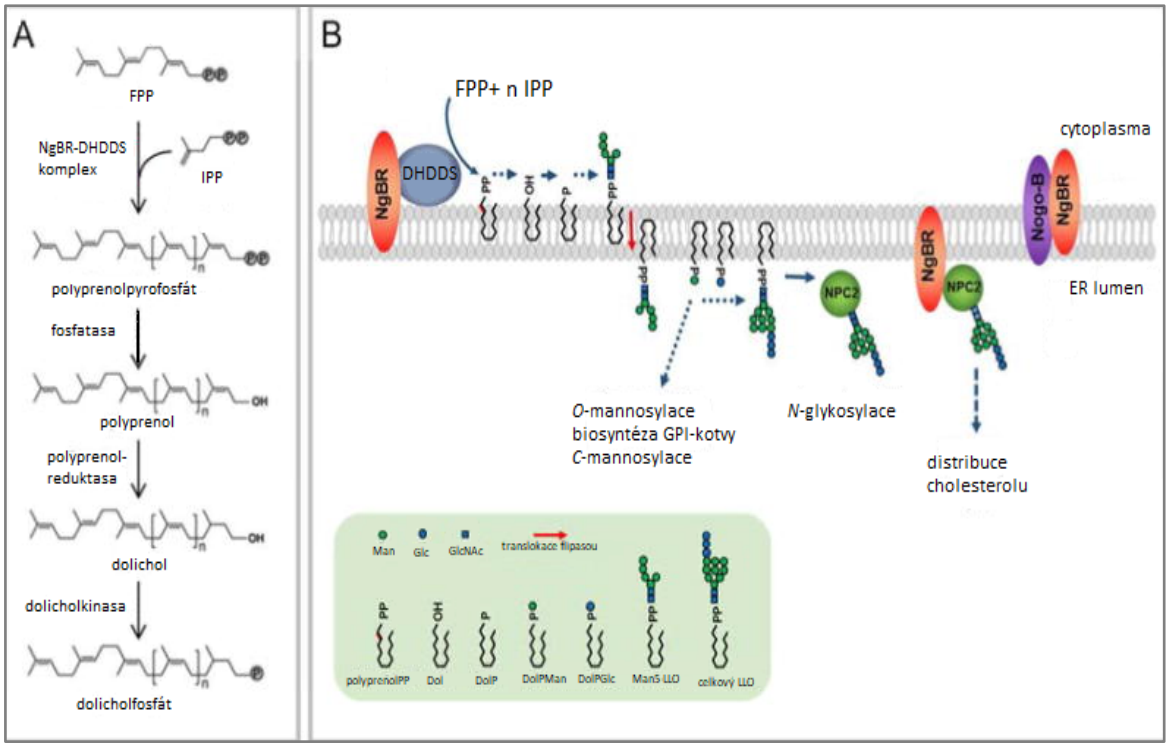
Postupem času bylo toto označení nahrazeno jednoduchou nomenklaturou s použitím názvu genu, jehož mutace vede k defektu, a přidáním přípony CDG [51], např. DHDDS-CDG.

Standardní metodou pro detekci CDG je analýza vybraného *N*-glykoproteinu: séroveho transferinu pomocí isoelektrické fokusace [53, 54]. Pro zachycení poruch O-glykosylace je používána metoda isoelektrické fokusace Apolipoproteinu CIII [55].

Je nutné poznamenat, že většina z těchto nemocí byla identifikována genetickou analýzou v postižených rodinách. I přes velký progres ve výzkumu těchto onemocnění, vztah mezi fenotypem a genotypem těchto pacientů zůstává zatím často nejasný a nespecifický.

1.3 NogoB-receptor

NogoB-receptor (NgBR) je transmembránový protein (Obr. 1.6) původně identifikovaný jako interagující protein nezbytný pro protein Nogo-B (retikulon-4b). Stimuluje chemotaxi a tubulární formaci v buňkách *(in vitro)* [56] a slouží jako protein regulující cholesterol a glykosylaci proteinů.



Obr. 1.6: Schematické zobrazení funkcí Nogo-B receptoru: *Nogo-B receptor ovlivňuje aktivitu dehydrodolicholsynthasy, dále ovlivňuje funkci Nogo-B a proteinu NPC2.* ***NgBR*** *- Nogo-B receptor,* ***DHDDS*** *- dehydrodolicholsynthasa,* ***NPC2*** *- protein Niemann-Pick typu C2,* ***Nogo-B*** *– retikulon-4b,* ***FPP*** *- farnesyldifosfát,* ***IPP*** *- isopentenyldifosfát,* ***man*** *- mannosa,* ***glc*** *- glukosa,* ***GlcNAc*** *- N-acetylglukosamin, polyprenolPP - polyprenololdifosfát,* ***Dol*** *- dolichol,* ***DolP*** *- dolicholfosfát,* ***DolPMan*** *- dolicholfosfát-mannosa,* ***DolPGlc*** *- dolicholfosfát-glukosa,* ***Man5 LLO*** *- oligochosacharid složený ze dvou N-acetylglukosaminů a pěti mannos navázaný na dolicholdifosfát,* ***celkový LLO*** *- oligosacharid složený ze dvou N-acetylglukosaminů, pěti mannos a tří glukos navázaný na dolicholdifosfát. Převzato a upraveno podle* [57].

NogoB je protein detekovaný v ER a cytoplazmě Schwannových buněk a oligodendrocytech. Deficience NgBR, který je na senzorových neuronech a interaguje s NogoB exprimovaným ve Schwannových buňkách, vede ke stejnému fenotypu jako delece NogoB [58]. NogoB je tedy funkčně závislý na NgBR, ale funkce NgBR v endotheliálních buňkách při embryogenezi jsou Nogo-B independentní [59]. Nedávno byl NgBR také popsán jako podjednotka zodpovědná za cis-prenyltransferasovou aktivitu [30, 57].

Ztráta NgBR v endotheliálních buňkách snižuje proliferaci a způsobuje apoptosu buněk, a to hlavně kvůli defektní glykosylaci klíčových embryonálních proteinů. Celková absence NgBR vede k embryonální lethalitě, což ukazuje důležitost jeho role v embryogenezi [57].

Ztráta NgBR se projevuje sníženou glykosylací VEGF (z angl. „vascular endothelial growth factor"), který je významný pro vaskulární vývoj. NgBR má důležitou úlohu, nezávislou na NogoB, ve vaskulárním vývoji, a to v regulaci *N*-glykosylace klíčových endotheliálních buněčných proteinů jako jsou VEGFR2 (z angl. „vascular endothelial growth factor receptor 2"), VE-kadherin (z angl. „vascular endothelial cadherin") a CD31 (z angl. „cluster of differentiation 31") [59].

VEGF působí přes VEGRF2, jehož glykosylace je důležitá pro jeho funkci [60]. Celková hladina dolicholu byla snížená u buněk s deficientním NgBR oproti kontrolám. Ztráta funkce NgBR tedy vede k hypoglykosylaci endotheliálích proteinů. Tyto informace ukazují důležitost NgBR a glykosylace proteinů při vaskulárním vývoji [59].

Narušená glykosylace může být obnovena dodáním konečného produktu cis-prenyltransferasové aktivity: Dol-P [59]. Přidání Dol-P do média deficientních buněk zvyšuje hladinu glykosylace endotheliálních proteinů a snižuje hladinu neglykosylovaných forem. Léčba pomocí Dol-P může napravit glykosylační defekt v buňkách s deficientním NgBR.

Pacienti s poruchou v *C*-terminální doméně NgBR trpěli skoliózou, závažnou epilepsií, svalovou hypotonií, mikrocefalií, a poruchou zraku [61].

1.4 Poruchy biosyntézy dolicholu vedoucí k dědičným poruchám glykosylace

V nedávných letech byly identifikovány defekty v biosyntéze a metabolismu dolicholu patřící do skupiny CDG typu I [4]. Některé nemoci byly popsány jako důsledek defektu biosyntézy dolicholu [62] (DHDDS-CDG, SRD5A3-CDG, NUS1-CDG, DOLK-CDG), zatímco jiné jako blízce asociované s jeho metabolismem (MPDU1-CDG, DPM1-3-CDG,

DPAGT1-CDG). Byla tak objevena nová skupina metabolických poruch, což dává unikátní možnost studovat jejich funkci a roli v buněčném procesu.

Dolichol a jeho metabolity mají významné postavení v buněčném metabolismu a klinické symptomy, které vznikají v důsledku genetických poruch v jeho biosyntéze, nejsou snadno predikovatelné. Identifikace defektů biosyntézy dolicholu ve skupině CDG-I pacientů umožnilo začít hledat korelaci mezi klinickými symptomy a biochemickými drahami.

CDG typu I jsou popisovány jako multiorgánová onemocnění s defektním neurologickým vývojem, avšak několik typů je i bez neurologických příznaků, jako například MPI-CDG [4]. Poruchy biosyntézy a metabolismu dolicholů taktéž vyúsťují v multisystémová onemocnění.

1.4.1 Známé typy dědičných poruch glykosylace spojených s poruchou biosyntézy a metabolismu dolicholu

1.4.1.1 DHDDS-CDG

Cis-prenyltransferasa neboli dehydrodolicholsynthasa je enzym patřící k syntéze výhradně Dol-P. Poruchy genu tohoto enzymu vedou k autozomální recesivní *retinitis pigmentose* [63]. U amišských židů byla poprvé popsána jednonukleotidová záměna, vedoucí k záměně glutaminu za konzervativní lysin42 a způsobující DHDDS-CDG [64].

Pomocí hmotnostní spektrometrie byly v plazmě a moči pacientů objeveny charakteristické kratší formy dolicholů [65], kde místo hlavního D19 byl dominantní D18. Je zajímavé, že klasickými diagnostickými metodami nebyly objeveny žádné znatelné abnormality v glykosylaci sérového transferinu pacientů. Na základě výzkumu na organismu *Danio rerio* byla vytvořena teorie, že nedostatek funkce DHDDS vede k degradaci sítnice [64]. Bohužel však stále není objasněn buněčný mechanismus, který by vysvětlil, zda a jak zkrácené profily dolicholů k degradaci sítnice přispívají [4].

1.4.1.2 NUS1-CDG

NUS1 gen kóduje NogoB-receptor, který je esenciální pro cis-prenyltransferasovou aktivitu a váže NPC2 protein, který je zahrnut v metabolismu cholesterolu. Nedávno byla identifikována homozygotní mutace v *NUS1* u dvou sourozenců [57]. Pacienti trpěli skoliózou, závažnou epilepsií, svalovou hypotonií, mikrocefalií, a poruchou zraku. Cholesterol v plazmě byl v normálním rozmezí, ale mírně zvýšený ve fibroblastech. V plazmě a moči pacientů byly majoritní složkou řetězce dolicholu s kratší délkou a to D18. Nebyla popsána žádná zmínka o kardiomyopatii, zvýšení kreatin kinasy či kožních projevech, jak je časté u jiných typů CDG. Více viz kapitola 1.3 NogoB-receptor na straně 13.

1.4.1.3 SRD5A3-CDG

Polyprenolreduktasa (SRD5A3) je potřebná pro konverzi polyprenolu na dolichol. SRD5A3 deficience může mít nepřímý vliv na aktuální zásoby Dol-P. Dol-P je limitujícím faktorem syntézy oligosacharidu vázaného na lipid (*in vitro*) [35], jak již bylo zmíněno výše, avšak jen malé procento Dol je přeměňováno na Dol-P.

Některé homozygotní mutace v *SRD5A3* genu vedou k produkci zkrácených glykoproteinů nalezených u SRD5A3-CDG pacientů. Vedou k akumulaci polyprenolu a normální či zvýšené hladině dolicholu v plasmě a tkáních pacientů [35], což umožňuje diagnostiku pomocí analýzy hmotnostní spektrometrií [35].

Hladina polyprenolu a dolicholu byla v séru pacientů zvýšená. Abnormální hodnoty těchto lipidů mají za následek blokaci konverze polyprenolu na dolichol [35, 66]. Tyto sérové polyisoprenoidy nejsou pak dostupné pro glykosylaci proteinů, což může být důsledkem regulace dolicholové homeostaze v buňkách [35]. Mutace vedou výhradně k neurologickým projevům s opožděným vývojem, ataxií a časným vizuálním defektem s optickou atrofií [35]. U pacientů byly dále identifikovány variabilní oční malformace, cerebelární hypoplasie, anémie, abnormality kůže, dysfunkce jater a koagulační abnormality [35]. Nebyl popsán žádný pacient s postižením kosterního anebo srdečního svalu. Nejspíše existuje i další protein, který je zapojen v redukci polyprenolu [35]. Isoelektrická fokusace transferinu

ukazuje profil CDG typu I se zvýšenou hladinou asialo- a disialotransferinem. Pacienti jsou tak diagnostikováni na základě standardního testu [67].

1.4.1.4 DOLK-CDG

Dolichol kinasa (DOLK) katalyzuje fosforylaci dolicholu pomocí cytidintrifosfátu (CTP). První záznam o jejím defektu popsal velice vážný fenotyp vyúsťující v brzké úmrtí [68]. Charakteristickými symptomy byly kardiomyopatie, svalová hypotonie a abnormality kůže. Lidská dolichol kinasa byla charakterizována na molekulární úrovni [40] a bylo zjištěno, že její gen je lokalizován na chromozomu 9 [69]. DOLK je hydrofobní protein se 13 membránovými doménami [40]. Strukturně-funkční studie ukázaly, že *C*-terminální doména je na cytoplasmatické straně a obsahuje tzv. CTP-vázající doménu. Delece tohoto regionu či mutace těchto zbytků v tomto motivu vedou k částečné či úplné ztrátě aktivity a pozmění afinitu k CTP [40]. Nejvyšší exprese její mRNA byla zaznamenána v mozku, následována fetálním kosterním svalstvem a srdcem a dospělou srdeční tkání [70].

1.4.1.5 DPM-CDG

Dol-P-Man-synthasa je zodpovědná za syntézu Dol-P-Man a je složena ze tří podjednotek DPM1-3. Fatální onemocnění bylo prvně popsáno pro katalytickou podjednotku DPM1 [71], způsobené mutací v jejím genu. Pacienti trpěli vážnou ztrátou zraku, optickou atrofií a záchvaty. Mírnější onemocnění byla ukázána u 9letého pacienta s mírně opožděným vývojem, mikrocefalií, optickou atrofií, buněčnou dysfunkcí a zvýšenou kreatin kinasou [72]. Obecně se DPM1-CDG projevuje charakteristickým multisystémovým fenotypem typu CDG I.

DPM2-CDG [73] bylo popsáno u tří dětských pacientů s opožděným vývojem, epilepsií a vážnou hypotonií se zvýšenou hladinou kreatinkinasy. Ve svalové biopsii byla prokázána defektní *O*-mannosylace [73]. Současná data naznačují, že klinické symptomy v defektu Dol-P-Man-synthasy korelují s abnormální *N*-glykosylací a *O*-mannosylací.

V roce 2009 byla objevena homozygotní mutace v *DPM3* s klinickými příznaky svalové únavy, způsobené svalovou dystrofií a vážnou kardiomyopatií [74]. Tyto symptomy nebyly původně pro *N*-glykosylační defekty typu CDG I známé. Pozdější studie ukázaly abnormální *O*-mannosylaci alfa-dystroglykanu ve svalové biopsii, která vede k CDG zvaným alfa-dystroglykanopatie, což je podskupina dědičných svalových dystrofií.

1.4.1.6 MPDU1-CDG

Protein MPDU1 (z angl. „mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 protein“) kódovaný genem *MPDU1* je zodpovědný za využití Dol-P-Man a Dol-P-Glc donorů v ER při glykosylaci, ale přesný mechanismus reakce zůstává nevyřešený. Zatím bylo diagnostikováno jen několik pacientů s tímto onemocněním [75], a ti se vyznačovali psychomotorickou retardací, epilepsií a kožními onemocněními [75].

1.4.1.7 DPAGT1-CDG

Enzym dolichol-fosfát-*N*-acetylglukosaminfosfotransferasa kódovaný genem *DPAGT1* je ukotven v ER [76] a jedná se o transmembránový protein katalyzující přenos *N*-acetylglukosaminu na Dol-P, který je také lokalizovaný v membráně ER. Výsledným produktem je dolichol-difosfát-*N*-acetylglukosamin.

Defekty v *DPAGT1* vyúsťují ve vážné klinické příznaky a multisystémové onemocnění s výskytem psychomotorické retardace, mikrocefalie, hypotonie, epilepsie a svalové slabosti [77].

Pacienti s defekty v genech ALG5 a DOLPP1 zatím nebyli popsáni.

1.4.2 Možnosti laboratorního stanovení obsahu dolicholu

Pacienty s narušenou *N*-glykosylací proteinů je možné ve většině případů detekovat tzv. rutinním metabolickým „screeningem“ díky analýze glykosylace sérového

transferinu [4]. Bohužel tímto vyšetřením nejsou zachytitelné všechny poruchy spojené s biosyntézou a metabolismem dolicholu.

Úspěšnou se ukázala analytická metoda vytvořená za účelem zachytit poruchy biosyntézy dolicholu, a to kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií [65], a to díky schopnosti rozlišit zastoupení různých molekul dolicholů lišících se délkou polyisoprenového řetězce. Tento profil dolicholů se liší u kontrol a pacientů s NUS1-CDG. Tato metoda byla původně použita v moči a v séru pacientů s DHDDS-CDG a také u diagnostiky pacientů s NUS1-CDG [57].

1.5 Defekty v biosyntéze dolicholů a terapeutické možnosti

Hlavní výzkum se nejspíše bude do budoucna zabývat terapeutickou strategií v cyklu dolicholu, kde cílem bude doplnit chybějící substráty Dol či Dol-P [78]. Nicméně z několika provedených experimentů vyplývá, že příspěvek těchto metabolitů Dol do aktuálních buněčných zásob je velice omezený [1]. Budoucí strategie by se měly zabývat tím, jak dopravit dolichol do místa glykosylace v ER. Účinnost příjmu záleží na formě podávání dolicholu a jeho inkorporace do liposomu byla zatím vyhodnocena za nejúčinnější [79]. Studie subcelulární inkorporace odhalila, že mikrosomy obsahovaly pouze několik procent značených externě dodávaných dolicholů. Zapojení větší části exogenního dolicholu do biochemických reakcí v organismu bude klíčovým krokem pro rozšíření terapeutických možností. Některé dřívější studie ukázaly, že frakce dodávaných dolicholů metabolizovaných játry byly schopné se fosforylovat a potenciálně hrát roli v glykosylaci proteinů [79, 80]. I přes fakt, že většina biosyntetických kroků byla charakterizována na molekulární úrovni, znalosti o regulaci některých enzymů stále zůstávají neobjasněny.

Zatím žádná publikace nenavrhuje či nepopisuje síť regulací cis-prenyltransferasy (CPT, DHDDS). Je však známo, že cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) zvyšuje aktivitu lidské DHDDS. Tato stimulace dráhy Dol pomocí cAMP se zdá být specifická, neboť biosyntéza cholesterolu za stejných podmínek stimulována nebyla [81]. Nedávná studie také prokázala,

že proteinkinasa typu I (PKAI) je zapojena v regulaci *N*-glykosylace proteinů pomocí cAMP [82].

Akumulace dolicholu závislá na věku je na druhou stranu nejspíše důvodem závislosti na vyšší dostupnosti mevalonátu, který je výsledkem zvýšené aktivity 3-hydroxy-3-methyl-koenzym A reduktasy (HMGR) způsobené ztrátou enzymatické regulace [11].

NogoB-receptor, který je znám vazbou na NPC2 protein [31], byl také navržen a později potvrzen jako modulátor DHDDS aktivity v savčích buňkách [30].

Ovlivnění aktivity těchto popsaných enzymů by taktéž mohlo být do budoucna zajímavým tématem studie pro terapeutické možnosti poruch biosyntézy a metabolismu dolicholu.

2 Cíle práce

Cílem této studie bylo analyzovat obsah dolicholu v moči a tkáních pacientů s deficiencí biosyntézy dolicholu pomocí kapalinové chromatografie kombinované s tandemovou hmotnostní spektrometrií za účelem rozšíření diagnostických metod pro dědičné poruchy glykosylace a u pacientů s poruchou v biosyntéze dolicholu studovat dopad defektu na energetický metabolismus pomocí funkčních metod.

Dílčími cíli analýzy obsahu dolicholu pomocí LC-MS/MS bylo:

- Zavést a optimalizovat metodu LC-MS/MS
- Analyzovat soubor vzorků močí od zdravých kontrol a vytvořit kontrolní rozmezí v závislosti na věku
- Studovat vzorky od pacientů s vybranými typy CDG a od pacientů, u kterých bylo vysloveno podezření pro CDG
- Analyzovat tkáně u pacientů s NUS1-CDG a kontrol a získat tak informace o obsahu dolicholu v různých tkáních

Dílčími cíli funkční analýzy dopadu poruchy dolicholu na energetický metabolismus bylo:

- Analyzovat respiraci a glykolytickou funkci v intaktních liniích fibroblastů s NUS1-CDG ve srovnání s vybranými typy CDG a liniemi kontrol pomocí analýzy spotřeby kyslíku v reálném čase.
- Studovat spotřebu kyslíku v permeabilizovaných liniích fibroblastů s NUS1-CDG ve srovnání s vybranými typy CDG a liniemi kontrol pomocí vysoce citlivé polarografie.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem byly vzorky moči, fibroblastů a homogenátů z kosterního svalu, mozkové kůry, jater a srdce. Všechny vzorky byly získány po informovaném souhlasu pro diagnostické účely z indikace v rámci vyšetřovacího programu při podezření na dědičnou poruchu metabolismu. 5% homogenát byl připraven pracovníky laboratoře homogenizací zamražené tkáně v KTEA pufru (150mM KCl, 2mM EDTA, 50mM TRIS/HCl, pH=7,5, aprotinin 2µg/ml (w/V)) pomocí ultrathoraxu a homogenizátoru teflon/sklo a byl skladován při -80 °C do doby použití. Kontrolní materiál z tkání byl získán od pacientů, u kterých nebylo prokázáno podezření na metabolické onemocnění.

Přehled vzorků:

Vzorky moči:

Analyzovaný soubor 75 kontrolních vzorků od zdravých jedinců ve věkovém rozmezí od 1 měsíce po 81 let, 43 vzorků od pacientů, u kterých vzniklo podezření na dědičné poruchy glykosylace, 1 zdravý jedinec s mutací v NogoB-receptoru v heterozygotním stavu, 6 pacientů s geneticky potvrzenou dědičnou poruchou glykosylace (Tab. 3.1 a 3.2 na straně 23):

Tab. 3.1 Celkový počet analyzovaných vzorků a jejich rozdělení do skupin.

	K	***PP***	***CDG1***	***PK***	***DPAGT1-CDG***	***SRD5A3-CDG***	***NUS1-CDG***	***celkem***
F	28	18	2	0	1	1	0	50
M	47	25	1	1	0	0	1	75
celkem	75	43	3	1	1	1	1	125

***M**-muži, **F**-ženy, **K** - kontrolní vzorky, **PP** – pacienti s podezřením na CDG, **CDG1** - pacienti CDG trpící poruchou v genech nesouvisejících s biosyntézou či metabolismem dolicholu (konkrétně 2x PMM2-CDG, PGM1-CDG, **PK** - heterozygotní přenašeč mutace v NogoB-receptoru, **DPAGT1-CDG** - pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru.*

Tab. 3.2: Seznam pacientů s vybranými typy CDG, jejichž vzorky moči byly použity pro analýzu.

Označení	*onemocnění*	*protein*	*věk*	*pohlaví*
P1	NUS1-CDG	NogoB-receptor	5	M
P2	SRD5A3-CDG	polyprenolreduktasa	12	F
P3	PMM2-CDG	fosfomannomutasa 2	6	F
P4	PMM2-CDG	fosfomannomutasa 2	7	F
P5	PGM1-CDG	fosfoglukomutasa 1	13	M
P6	DPAGT1-CDG	dolichol-fosfát-*N*-acetylglukosaminfosfotransferasa	1	F

***M-**muži, **F**-ženy, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **DPAGT1-CDG** - pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **PMM2-CDG a PGM1-CDG** - pacienti CDG trpící poruchou v genech nesouvisejících s biosyntézou či metabolismem dolicholu*

Vzorky homogenátů tkání:

Pro analýzu tkání byl použit soubor vzorků homogenátů tkání od kontrol a pacientů s CDG (Tab. 3.3):

Tab. 3.3: Přehled vzorků homogenátů tkání od pacientů s CDG a kontrol.

označení	*popis*	*tkáň*	*věk*	*pohlaví*
FKK1	kontrola	mozková kůra	3	M
FKK2	kontrola	mozková kůra	5	F
FKK3	kontrola	mozková kůra	<1	M
FKP1	NUS1-CDG	mozková kůra	3	M
MK1	kontrola	kosterní sval	<1	M
MK2	kontrola	kosterní sval	5	F
MP1	NUS1-CDG	kosterní sval	3	M
MP2	NUS1-CDG	kosterní sval	6	M
HK1	kontrola	srdce	<1	F
HK2	kontrola	srdce	5	M
HP1	NUS1-CDG	srdce	3	M
HP2	NUS1-CDG	srdce	6	M
LK1	kontrola	játra	5	F
LK2	kontrola	játra	<1	M
LP1	NUS1-CDG	játra	3	M
LP2	NUS1-CDG	játra	5	M

***M -** muž**, F –** žena, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru.*

Linie fibroblastů:

Pro analýzu na přístrojích *Seahorse XFe24 (Agilent)* a *Oxygraph-2k (Oroboros)* byly použity linie fibroblastů vybraných pacientů s CDG a kontrol (Tab. 3.4):

Tab. 3.4: Seznam linií fibroblastů použitých pro analýzu na přístrojích Seahorse XFe24 (Agilent) a Oxygraph-2k (Oroboros).

označení	*popis*	*Věk v době odběru*	*pohlaví*
1	kontrola	<1	M
2	kontrola	>18	M
3	kontrola	<1	M
4	NUS1-CDG	3	M
5	NUS1-CDG	6	M
6	PMM2-CDG	6	M
7	PGM1-CDG	24	M
8	Man1B1-CDG	<1	M
9	RFT-CDG	<1	M
10	ALG8-CDG	<1	F
11	CDG IIx	12	M
12	ATP6AP1-CDG	17	M

M-*muži,* ***F-****ženy,* ***NUS1-CDG*** *- pacient s poruchou v NogoB-receptoru,* ***ALG8-CDG*** *– pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase (typ I),* ***PGM1-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II),* ***PMM2-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfomannomustase 2 (typ I),* ***Man1B1-CDG*** *– pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II),* ***RFT1-CDG*** *– pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I),* ***CDG IIx*** *– pacient s CDG typu II,* ***ATP6AP1-CDG****- pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy.*

3.1.2 Chemikálie

Acetonitril	Sigma-Aldrich (USA)
Acetát amonný	Sigma-Aldrich (USA)
ADP	Sigma-Aldrich (USA)
Antimycin A	Sigma-Aldrich (USA)
Askorbát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Azid sodný	Penta (ČR)
BSA	Sigma-Aldrich (USA)

Cytochrom c	Sigma-Aldrich (USA)
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (USA)
Dodecylsulfát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Ethanol (96%)	Penta (ČR)
Ethanol pro HPLC	Sigma-Aldrich (USA)
FCCP	Sigma-Aldrich (USA)
Fenylmethylsulfonyl chlorid	Sigma-Aldrich (USA)
Fosforečnan draselný	Fluka (Švýcarkso)
Galaktosa	Sigma-Aldrich (USA)
Glukosa	Sigma-Aldrich (USA)
Glutamát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Hydroxid draselný	Penta (ČR)
Hydroxid sodný	Penta (ČR)
Chlorid draselný	Penta (ČR)
Chlorid hořečnatý	Penta (ČR)
Chlorid sodný	Penta (ČR)
Chloroform	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich (USA)
Malát	Sigma-Aldrich (USA)
Manganistan draselný	Penta (ČR)

Methanol pro HPLC	Sigma-Aldrich (USA)
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich (USA)
SDS	Sigma-Aldrich (USA)
Sukcinát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Síran měďnatý	Penta (ČR)
TMPD	Sigma-Aldrich (USA)
Tris	Sigma-Aldrich (USA)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (USA)
TritonX-100	Sigma-Aldrich (USA)
Uhličitan sodný	Penta (ČR)
Vinansodno-draselný	Sigma-Aldrich (USA)

3.1.2.1 Komerčně dodávané roztoky

Antibiotický a antimykotický roztok „Antibiotic-Antimycotic 100X“	Biosera (Francie)
DMEM bez D-glukosy a L-glutanimu5030	Biochrom (Německo)
DMEM s L-glutaminem	Biochrom (Německo)
FBS z angl. „fetal bovine serum“ fetální hovězí sérum	HyClone (USA)
Folinovo reagens	Penta (ČR)
Fosfátový pufr PBS (137mM NaCl, 0,027mM KCl (0,01 mM Na_2HPO_4, 0,0018 mM KH_2PO_4)	Lonza (Švýcarsko)

PIC „protease inhibitor coctail“	Sigma-Aldrich (USA)
T + E roztok (Trypsin + EDTA roztok) [10x koncentrovaný; 0,5% (w/v) trypsinu, 0,2% (w/v) EDTA v roztoku PBS]	Biosera (Francie)
Roztok na měření koncentrace proteinů podle Bradfordové „protein assay dye reagent concentrate“	Bio-Rad (USA)
XF Calibrant	Agilent (USA)

3.1.2.2 Roztoky připravené v laboratoři

KCl médium (80mM KCl,10mM Tris, 3mM $MgCl_3$, 1mM EDTA, 5mM $K_3PO_4.H_2O$, pH=7,4)

RIPAP pufr (50mM Tris-HCl pH7,4, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v)deoxycholát sodný, 0,1% SDS , 1% (v/v) PIC

KTEA pufr (150mM KCl, 2mM EDTA, 50mM TRIS/HCl, pH=7,5, aprotinin 2µg/ml (w/V)

Roztok Lowry A (0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/w) Na_2CO_3)

Roztok Lowry B (0,5% (w/v) $CuSO_4$)

Roztok Lowry C (1% (w/v) vinan sodnodraselný)

3.1.3 Přístroje a vybavení

3.1.3.1 Komerčně dodávané kazety, destičky a kolony

Kazety:„ extracelular flux assay kits“	Agilent (USA)
Kultivační destičky: „cell culture micropates“	Agilent(USA)
kolona Zorbax SB-C8 s reverzní fází (5µm, 2,1 x 50 mm)	Agilent (USA)

3.1.3.2 Přístroje

Analytické váhy ABT 220-50M	Kern (Německo)
Analytické váhy HA – 120M	Helago (Japonsko)
Autokláv MAC - 235EX	Sanyo (Japonsko)
Autokláv MLS – 3020U	Sanyo (Japonsko)
CCD kamera DP50	Olympus (Japonsko)
Centrifuga Mikro 200	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 320R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Laminární box Air Clean	AirClean Systems (USA)
Mikropipety (automatické pipety)	Eppendorf (Německo), Gilson (USA),ThermoScientific (USA)
Mikropipeta Handheld Cell Counter, Scepter	Millipore, Merck (USA)
Mikroskop Nikon Diaphot 200	Nikon (Japonsko)
Oxygraph-2k	Oroboros (Rakousko)
pH metr 774	Metrohm (Švýcarsko)
analyzátor Seahorse XFe24	Agilent (USA)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
Prep StationTermostat na Seahorse	Agilent (USA)
Termostat TCH100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Tandemový hmotnostní spektrometr AB/MDS SCIEX API4000	Applied Biosystem (USA)
Termostat Sanyo CO_2 incubator	Sanyo (Japonsko)

Termostat Heratherm IMC 18	ThermoScientific (USA)
UPLC systeme Agilent 1290 Infinity	Agilent (USA)
Ultrazvukový homogenizátor	LabMark (ČR)
Vortex-Genie 2	ScientificIndustries (USA)
Vortex $2x^3$	VelpScientifica (Itálie)

3.1.3.3 Počítačové programy použité pro analýzu:

Seahorse Wave 2.4 Software (Agilent)

Analyst 1.6 Software (Applied Biosystems)

DatLab (Oroboros)

Excel (Microsoft Office)

R Foundation for Statistical Computing, verze 3.4.2, (R Core Team Vienna)

3.2 Metody

3.2.1 Analýza pomocí tandemového hmotnostního spektrometru

3.2.1.1 Příprava vzorků pro analýzu stability moči

Vzorky moči byly ponechány při pokojové teplotě po odběru po dobu 1 hod, 5 hod a 24 hod a následně přeneseny a skladovány při -20 °C. Dále byl postup stejný jako v následující kapitole 3.2.1.2.

3.2.1.2 Příprava vzorků moči pro analýzu na tandemovém hmotnostním spektrometru [83]

Vzorky moči byly po odběru skladovány při -20 °C. Po rozmražení byly homogenizovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru. K 3 ml vzorku moči byly přidány 3 ml

methanolu (100%) a tento roztok byl vortexován po dobu 1 min. Poté bylo ke vzorku přidáno 1,5 ml chloroformu (99,8%) a opět 1 min vortexováno. Následně byly zkumavky se vzorky centrifugovány po dobu 10 min při 400xg a 25 °C na centrifuze *Hettich Rotanta 460R*. Dále byla skleněnou pasteurovou pipetou odebrána spodní chloroformová fáze a přepipetována do vialek. Vzorky byly poté vysušeny dusíkem.

3.2.1.3 Příprava vzorků homogenátů tkání pro analýzu na tandemovém hmotnostním spektrometru [84]

5% homogenát byl připraven pracovníky laboratoře homogenizací zamražené tkáně v KTEA pufru (150mM KCl, 2mM EDTA, 50mM TRIS/HCl, pH=7,5, aprotinin 2µg/ml(w/V)) pomocí ultrathoraxu a homogenizátoru teflon/sklo a byl skladován při -80 °C do doby použití. 250 µl homogenátu bylo následně doplněno roztokem PBS do 1 ml a přeneseno do skleněné zkumavky s teflonovým uzávěrem. K suspenzi bylo přidáno 1,25 ml chloroformu a 2,5 ml metanolu. Následně byl roztok vortexován po dvě min a homogenizován pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Dále byl roztok inkubován při 25 °C po dobu 15 min a následně centrifugován při 500xg po dobu 10 min. Supernatant byl následně přenesen do čisté zkumavky a bylo přidáno 1,25 ml chloroformu a 1,25 ml PBS. Po intenzivním promíchání byla suspenze centrifugována při 500xg po dobu 10 min při 25 °C. Následně byla spodní fáze promyta 4,75 ml neutrální čistou horní fází roztoku předem připraveného v poměru 2:2:1,8 chloroform : metanol : PBS, zvortexována a opět centrifugována při stejných podmínkách. Poté byla spodní fáze přenesena do vialky a vysušena pomocí dusíku. Následně byla skladována při -20 °C do doby analýzy na LC-MS/MS.

3.2.1.4 Analýza vzorků pomocí kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) [65, 84]

Dolicholy byly analyzovány pomocí kombinace kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Kapalinový chromatograf *Agilent 1290 Infinity LC System* byl

nastaven na průtok 200 µl/min s lineárním gradientem fází tak, že 100% mobilní fáze A (metanol/acetonitril/1mM roztok acetátu amonného v poměru 60/20/20, v/v/v) byla ponechána dvě min a poté postupně byla nahrazována mobilní fází B (100% ethanol, 1mM acetát amonný) až do 100% fáze B po dobu 14 min a následně isokraticky nechána po 4 min. K separaci isoforem dolicholů byla použita kolona *Zorbax SB-C8* s reverzní fází (5µm, 2,1 x 50 mm) firmy *Agilent.*

Pro hmotnostně spektrometrickou analýzu byl použit tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem *API 4000 LC-MS/MS System, Sciex*, vybavený ionizací elektrosprejem. Tandemový hmotnostní analyzátor pracoval v režimu MRM (z angl. „multiple reaction monitoring"). Přístroj pracoval v negativním iontovém módu. Elektrosprejová ionizace byla nastavena následovně: tlak clonového plynu = 20 psi, tlak plynu 1 = 20 psi, tlak plynu 2 = 30 psi, tlak kolizního plynu (použit dusík, N_2) = 12 psi, napětí elektrospreje bylo -4500 V, teplota sušícího plynu = 350 °C, ohřívač rozhraní zapnut. Iontová optika tandemového analyzátoru pracovala s tímto nastavením: napětí rozbíjející shluky iontů = -40V, vstupní potenciál = -10 V, kolizní napětí = -5V, napětí použité pro kolizní indukovanou disociaci tzv. kolizní energie byla -40 V. Jako MRM páry pro D17, D18, D19 a D20 byly použity hodnoty 1236,2/59 , 1304,2/59 , 1372.2/59 a 1440,3/59. Jako prekurzorový ion byl $[M+\text{acetát}]^-$ a jako produktový iont byl pro dolicholy použit jejich aduktový acetátový iont (m/z59). Výsledné spektrum bylo zobrazeno a zpracováno v programu *Analyst 1.6 Software (Applied Biosystems)* a následně exportováno do programu *Excel (Microsof Office)*, kde byla data vyhodnocena.

3.2.1.5 Statistické zpracování dat získaných z hmotnostního spektrometru

Byly odečteny hodnoty pro plochy jednotlivých chromatografických vrcholů isoforem dolicholů a následně pak pro každý vzorek vypočten poměr vrcholů D18/D19. Seznam vzorků a jejich rozložení do skupin je zobrazeno v příloze 8.1 na straně 80.

Vzhledem k opakovaným měřením byl pro analýzu rozdílu mezi skupinami použit lineární model se smíšenými efekty. Sledovaná veličina vstupovala do modelu v logaritmované podobě.

Uvažován byl plný model ve tvaru:

log(*y*)_ *sex*_ *age* _ *typ* + (1|*mereni*) + (1|*pacient/vzorek*).

Prezentován je model redukovaný, očištěný o statisticky nevýznamné parametry.

Data byla zpracována v programu *R Foundation for Statistical Computing, verze 3.4.2, (R Core Team Vienna)* ve spolupráci s RNDr. V. Čapkem, PhD.

3.2.2 Kultivace buněk

3.2.2.1 Rozmrazování buněk

Buňky skladované v dusíku byly rychle rozmraženy pod proudem vlažné vody a následně napipetovány do 25cm^2 lahve připravené s 5 ml vyhřátého DMEM média (*Sigma-Aldrich*) s 10% (v/v) hovězím sérem (FBS) a 1% (w/v) antibiotikem na 37 °C v laminárním boxu předem vysvíceném UV lampou. Další den bylo odsáto médium do odpadu a napipetováno 5 ml čerstvého.

3.2.2.2 Pasážování buněk

V laminárním boxu, předem vysvíceném UV lampou, bylo odsáto médium do odpadu a do lahví s buňkami napipetováno PBS (137mM NaCl, 0,027mM KCl 0,01mM Na_2HPO_4, 0,0018mM KH_2PO_4): 2 ml do 25cm^2 a 5 ml do 75cm^2 pro oplach a odsáto. Následně bylo napipetováno 750 µl T+E roztoku (0,05% trypsin + 0,02 % EDTA), do 25cm^2 lahví a 1500 µl do 75cm^2 lahví. Lahve s buňkami byly inkubovány 5 min při 37 °C a poté byly buňky resuspendovány v 5 ml média a následně bylo připipetováno 5 ml (do 25cm^2 lahví) nebo 20 ml (do 75cm^2 lahví) resuspendováno a rozděleno do dvou lahví. Lahve s buňkami byly dále kultivovány v 37 °C s CO_2 atmosférou.

3.2.2.3 Zmrazování buněk

V laminárním boxu, předem vysvíceném UV lampou, bylo odsáto médium do odpadu a do lahví s buňkami napipetováno PBS (137mM NaCl, 0,027mM KCl, 0,01mM Na_2HPO_4, 0,0018mM KH_2PO_4): 2ml do 25cm^2 a 5 ml do 75cm^2 pro oplach a odsáto. Následně bylo napipetováno 750 µl 1% (w/v) T+E roztoku (0,05% trypsin + 0,02 % EDTA), do 25cm^2 lahví a 1500 µl do 75cm^2 lahví. Lahve byly inkubovány 5 min při 37 °C a poté byly buňky resuspendovány v 5 ml (25cm^2 lahev) nebo v 13ml (75cm^2 lahev) média a následně byla přepipetována suspenze do 15ml zkumavky, centrifugována na centrifuze *Centrifuga Universal 32R* 5 min, při 300xg, při 25 °C. Následně byl odsát supernatant a peleta s buňkami byla rozsuspendována v 1,8 ml DMEM média s 10% DMSO a přenesena do zmrazovací zkumavky, ta dána do mrazicího boxu a následně dána do -80 °C. Následující den byly buňky přeneseny do dusíku, kde byly dále skladovány.

3.2.3 Analýza na *Oxygraph-2k*

3.2.3.1 Příprava buněk

Fibroblasty pacientů a kontrol byly skladovány v dusíku. Pro analýzu byly rozmraženy a pěstovány v kultivačních lahvích s médiem při 37 °C. Tři 75cm^2 lahve s buňkami byly použity pro jednu komoru pro měření na oxygrafu. Buňky byly inkubovány s 1% (w/v) T+E roztokem a po 5min inkubaci v 37 °C byly rozsuspendovány v kultivačním médiu a stočeny (4 °C, 300xg, 5 min). Dále 2x na ledu rozsuspendovány v roztoku PBS a opět centrifugovány za stejných podmínek. Peleta byla rozsuspendována v 60 -100 µl PBS. Následně bylo odebráno 10 µl této suspenze pro měření koncentrace proteinu. Zbylé množství bylo použito na analýzu na oxygrafu.

3.2.3.2 Měření na *Oxygraph-2k*

Po důkladném vymytí přístroje (*Oxygraph-2k, Oroboros*) vodou a ethanolem bylo do obou komor přesně napipetováno 2100 µl KCl média (37 °C). Dále byl zapnut program *DatLab* (*Oroboros)* a provedena kalibrace. Následně bylo pipetou odebráno médium o známém

objemu (okolo 40-60 µl) a napipetováno stejné množství buněčné suspenze (koncentrace proteinu v komoře se pohybovala přibližně od 0,6 do 1,3 mg/ml), aby byl zachován přesný objem v komorách oxygrafu. Následně byly do komor postupně přidány substráty a inhibitory komplexů citrátového cyklu a dýchacího řetězce pomocí Hamiltonovy stříkačky a to v pořadí zobrazeném v Tab. 3.5.

Tab. 3.5: Pořadí přidávaných substrátů, inhibitorů v průběhu měření respirace lidských kožních fibroblastů na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros).

Pořadí	*Substrát/ inhibitor*	*Koncentrace zásobního roztoku (rozpouštědlo)*	*Přidávané množství*	*teplota skladování zásobních roztoků*
1.	digitonin	8mM(H_2O)	1-3 µl	-20 °C
2.	pyruvát	1M (H_2O)	20 µl	-20 °C
3.	malát	1M (H_2O)	6 µl	-20 °C
4.	glutamát	1M (H_2O)	20 µl	-20° C
5.	ADP+Mg^{2+}	0,5M (H_2O)	4 µl	-80° C
6.	sukcinát	1M (H_2O)	20 µl	-20° C
7.	cytochrom c	2mM (H_2O)	5 µl	-20° C
8.	rotenon	0,5mM (EtOH)	1 µl	-20° C
9.	oligomycin	2,5mM (EtOH)	0,2-0,6 µl	-20° C
10.	FCCP	1mM (EtOH)	0,2-0,6 µl	-20° C
11.	antimycin A	1mM (EtOH)	1 µl	-20° C
12.	askorbát	0,2M (H_2O)	25 µl	-20° C
13.	TMPD	40mM (H_2O)	45 µl	-20° C
14.	azid sodný	4M (H_2O)	5 µl	-20° C

***ADP** – adenosin-5'-difosfát, **TMPD** - tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid, **FCCP** - karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon.*

Výsledná křivka byla dále analyzována v programu *DatLab (Oroboros)*.

3.2.3.3 Měření koncentrace proteinu podle Lowryho [85]

K 10 µl buněčné suspenze bylo přidánu 90 µl roztoku RIPAP (RIPA + 1% PIC). Pro měření bylo použito 2x 5 µl a 2x7 µl této naředěné suspenze a doplněno do 200 µl destilovanou vodou. Dále byly připraveny do mikrozkumavek 2 kalibrační řady s BSA o koncentracích 5, 10, 15, 20 a 25 µl/ml. Do takto připravených vzorků byl napipetován 1 ml MIX roztoku připravený z roztoků B (0,5 % (w/v) $CuSO_4$. 1 H_2O) a C (1 % (w/v) vinansodno-draselný) a následným přidáním roztoku A (0,1 M NaOH, 2 % (w/v) Na_2CO_3)

v poměru A:B:C = 48:1:1. Vzorky byly poté zamíchány na vortexu a 15 min ponechány stát při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 100 µl Folinova reagens zředěného destilovanou vodou (1:1) a následně ihned zvortexováno. Po 30 min inkubaci byly vzorky znovu vortexovány a změřena absorbance na UV/Vis spektrofotometru *Schimadzu* při 700 nm. Pomocí kalibrační řady byly vypočítány koncentrace proteinu v buněčných suspenzích.

3.2.3.4 Analýza křivky získané respirometrií

Byly odečteny ustálené hodnoty spotřeby kyslíku po přidání určitých substrátů a inhibitorů. Získané hodnoty křivky spotřeby kyslíku byly vztaženy na celkové množství proteinu v komoře. Z těchto hodnot byly vypočteny parametry, tj. rozdíly mezi hodnotami změn spotřeb kyslíku po přidání určitých látek. Tyto parametry byly definovány na základě dat získaných z křivek kontrolních a modelových linií (s inhibovaným právě jedním komplexem dýchacího řetězce) dostupných v laboratoři a také na základě porovnávání s jinými protokoly. Tyto parametry a jejich poměry zjednodušují následné vyhodnocování.

PGM-Ama: je rozdíl hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu a hodnoty po přidání inhibitoru antimycinu A (a všech předchozích substrátů a inhibitorů). Substráty PGM stimulují komplex I. Antimycin A je inhibitorem komplexu III, a po jeho přidání je inhibován celý dýchací řetězec. Tato hodnota udává ***bazální respiraci po přidání substrátů komplexu I.***

ADP stim.: je rozdíl hodnoty respirace po přidání PGM-Ama s přídavkem ADP s Mg^{2+}. Udává nám, jak jsou buňky schopné zvýšit ***spotřebu kyslíku po přidání substrátu ATPasy*** (komplex V).

Su-rot: je rozdíl hodnot respirace po přidání sukcinátu a rotenonu. Sukcinát je substrátem komplexu II a rotenon je inhibitorem komplexu I. Hodnota tohoto rozdílu závisí na ***komplexu I*** (ADP je přítomno v respiračním médiu).

Rot-Ama: je rozdíl hodnot respirace po přidání rotenonu a po přidání antimycinu A. Je to rozdíl po inhibici komplexu I a po celkové inhibici dýchacího řetězce a tento parametr je závislý na ***komplexu II***.

Omy-Ama: je rozdíl mezi hodnotami respirace po přidání oligomycinu a po přidání antimycinu A. Jeho hodnota udává ***tzv. protonový únik***, tedy respiraci nesouvisející s produkcí ATP a může informovat o mitochondriálním poškození.

Su-Ama: je rozdíl hodnot respirace po přidání sukcinátu a po přidání antimycinu A a ukazuje celkovou hodnotu respirace funkčního systému ***oxidační fosforylace***.

aTF-Z: je rozdíl hodnot respirace po přidání askorbátu a TMPD (umělé substráty komplexu IV) a po přidání azidu (inhibitor komplexu IV). Tento parametr udává izolovanou hodnotu závislou na ***komplexu IV*** respirace s účinkem tzv. „rozpřahovače".

Fc-Ama: je rozdíl mezi hodnotami respirace po přidání tzv. „rozpřahovače" a po přidání antimycinu A (a všech předchozích látek). Tato hodnota nám tak dává informaci o celkové respiraci ***elektronového transportního řetězce***.

3.2.4 Analýza na přístroji *Seahorse XFe24*

3.2.4.1 Příprava destičky

Do 24 jamek kultivační destičky na měření na přístroji *Seahorse XFe24 (Agilent)* bylo napipetováno 100 µl roztoku poly-L-lysinu (0,01% w/v) naředěného ultračistou vodou (MilliQ-UV). Po 10min inkubaci byl roztok vysát a jamky poté 2x promyty 100 µl MilliQ-UV a vysušeny do sucha. Do takto připravené destičky byla pipetována suspenze buněk nebo média jako blank.

3.2.4.2 Příprava buněk

Buňky byly kultivovány v lahvi o ploše 75 cm^2 do konfluence 70-80 % v médiu při 37 °C v termostatu. Následně jim bylo odsáto médium, byly lehce promyty 5 ml PBS, ten byl odsát a na buňky bylo napipetováno 1,5 ml 1% (w/v) T+E roztoku. Buňky byly ponechány 5 min v 37 °C a poté rozsuspendovány v médiu (13 ml na 75cm^2 lahev). Tato suspenze byla přepipetována do zkumavky a 0,5 ml této suspenze bylo přepipetováno do mikrozkumavky. Zkumavka se suspenzí byla centrifugována na centrifuze *Centrifuga*

Universal 32R 5 min při 300xg a 25 °C. V mikrozkumavce byl vypočítán počet buněk pomocí mikropipety *Handheld Cell Counter (Scepter)*. Následně byl supernatant odebrán ze zkumavky a peleta buněk byla rozsuspendována v takovém množství média, aby výsledná koncentrace buněk byla 35 000 buněk na ml.

Do jamek destičky bylo pipetováno 100 µl připravené suspenze buněk a do 4 jamek bylo napipetováno 100 µl média jako blank. Destička byla půl hodiny inkubována při laboratorní teplotě a poté přenesena do termostatu o teplotě 37 °C, kde byla ponechána hodinu. Následně bylo již k přisedlým buňkám na dno jamek napipetováno 150 µl média. Destička byla dále ponechána přes noc v 37 °C.

3.2.4.3 Příprava buněk pro měření na přístroji *Seahorse XFe24*

Buňkám nasetým v jamkách destičky bylo odebráno médium a jamky byly 2x propláchnuty 1 ml DMEM 5030 média a poté bylo do jamek nepipetováno přesně 450 µl DMEM 5030 média. Následně byla destička s buňkami vložena do termoregulátoru do 37 °C bez CO_2 atmosféry a ponechána hodinu inkubovat.

3.2.4.4 Hydratace kazety

Kazeta byla hydratována roztokem XF Calibrant Solution, *Seahorse XFe24 (Agilent)*, a to tak, že do spodní části byl do všech jamek napipetován 1 ml tohoto roztoku a celá kazeta byla ponechána v 37 °C v termoregulátoru bez CO_2 atmosféry přes noc hydratovat.

3.2.4.5 Příprava média DMEM 5030

Alikvot práškového média (DMEM 5030, D5030-10X1L, (*Sigma-Aldrich)*) byl rozpuštěn za stálého míchání v 900 ml MilliQ-UV vody, dále bylo upraveno pH na cca 7,5, přidáno 333 µl Phenol Red solution (Sigma-Aldrich, 0,5% roztok) a objem upraven na 1 l média. Toto médium bylo ihned přefiltrováno v laminárním boxu do sterilní lahve a uchováváno při 4 °C.

3.2.4.6 Příprava média, substrátů a inhibitorů pro analýzu glykolýzy na *Seahorse XFe24*

Bylo připraveno médium DMEM 5030 s 3,9mM L-glutamátem o pH 7,4 při 37 °C. Dále bylo do mikrozkumavek připraveno několik roztoků pro analýzu, jejichž složení je zobrazeno v Tab. 3.6.

Tab. 3.6: Roztoky substrátů a inhibitorů pro analýzu glykolytické funkce.

objem média DMEM 5030	*substrát/ inhibitor*	*objem substrátu/ inhibitoru*	*koncentrace zásobního substrátu/ inhibitoru*	*výsledná koncentrace substrátu/ inhibitoru v jamce*
1488 µl	oligomycin	12 µl	2,5mM	2 µM
2880 µl	glukosa	120 µl	2,5M	10mM
3000 µl	2-deoxy-D-glukosa	1,969 g v 10 ml média	1M	100mM

3.2.4.7 Příprava média, substrátů a inhibitorů pro analýzu oxidační fosforylace na *Seahorse XFe24*

Bylo připraveno médium DMEM 5030 s 3,9mM L-glutamátem, 5mM glukosou a 2mM pyruvátem o pH 7,35. Dále bylo do mikrozkumavek připraveno několik roztoků pro analýzu, jejichž složení je zobrazeno v Tab. 3.7.

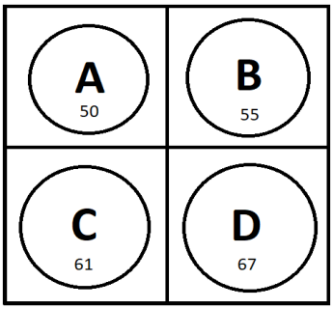
Tab. 3.7: Roztoky substrátů a inhibitorů pro analýzu oxidační respirace.

objem média DMEM 5030	*substrát/ inhibitor*	*objem substrátu/ inhibitoru*	*koncentrace zásobního substrátu/ inhibitoru*	*výsledná koncentrace substrátu/ inhibitoru v jamce*
1488 µl	oligomycin	12 µl	2,5mM	2µM
3999 µl	FCCP	1 µl	20mM	0,5µM
1500 µl	FCCP	1000 µl	0,5µM	0,2µM
2475 µl	antimycin A	5 µl	5mM	1µM
	rotenon	20 µl	2,5mM	2µM

FCCP *- karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon.*

3.2.4.8 Příprava kazety pro měření oxidační fosforylace na přístroji *Seahorse XFe24*

Připravené substráty byly zvortexovány. Do jamek A bylo napipetováno 50 µl 20µM oligomycinu, do jamek B 55 µl 5µM FCCP, do jamek C 61 µl 2µM FCCP a do jamek D 67 µl roztoku s 10µM antimycinem A a 20µM rotenonem. Schema jamek je zobrazeno na Obr. 3.1. Kazeta byla inkubována při 37 °C v termoregulátoru bez CO_2 atmosféry půl hodiny.



Obr. 3.1: Schema jamek kazety: *do jamky A bylo napipetováno 50 µl 20µM oligomycinu, do jamek B 55 µl 5µM FCCP, do jamek C 61 µl 2µM FCCP a do jamek D 67 µl roztoku s 10µM antimycinem A a 20µM rotenonem.*

3.2.4.9 Příprava kazety pro měření glykolýzy na přístroji *Seahorse XFe24*

Připravené substráty byly zvortexovány. Do jamek A bylo napipetováno 50 µl 100mM glukosy, do jamek B 55 µl 20µM oligomycinu a do jamek C bylo napipetováno 61 µl 1M 2-deoxy-D-glukosy (příprava substrátů viz kapitola 3.2.4.6). Kazeta byla inkubována při 37 °C v termostatu bez CO_2 atmosféry půl hodiny.

3.2.4.10 Analýza na přístroji *Seahorse XFe24*

Kazeta byla vložena do analyzátoru *Seahorse XFe24 (Agilent)* a po kalibraci vložena destička s buňkami. Analýza dat byla prováděna v programu *Seahorse Wave 2.4 Software (Agilent)*, kde byl vytvářen i protokol.

3.2.4.11 Dokumentace destičky a její úschova pro měření koncentrace proteinu

Destička byla vyjmuta z analyzátoru a jamky byly zdokumentovány na mikroskopu *Mikroskop Nikon Diaphot 200* pomocí CCD kamery *DP50 (Olympus)* Následně bylo odsáto médium z jamek, které byly poté jemně propláchnuty 1 ml 1x PBS pufru. Po odsátí 1x PBS pufru bylo do jamek napipetováno 30 µl roztoku RIPAP. Destička byla zabalena do alobalu a skladována při -20 °C.

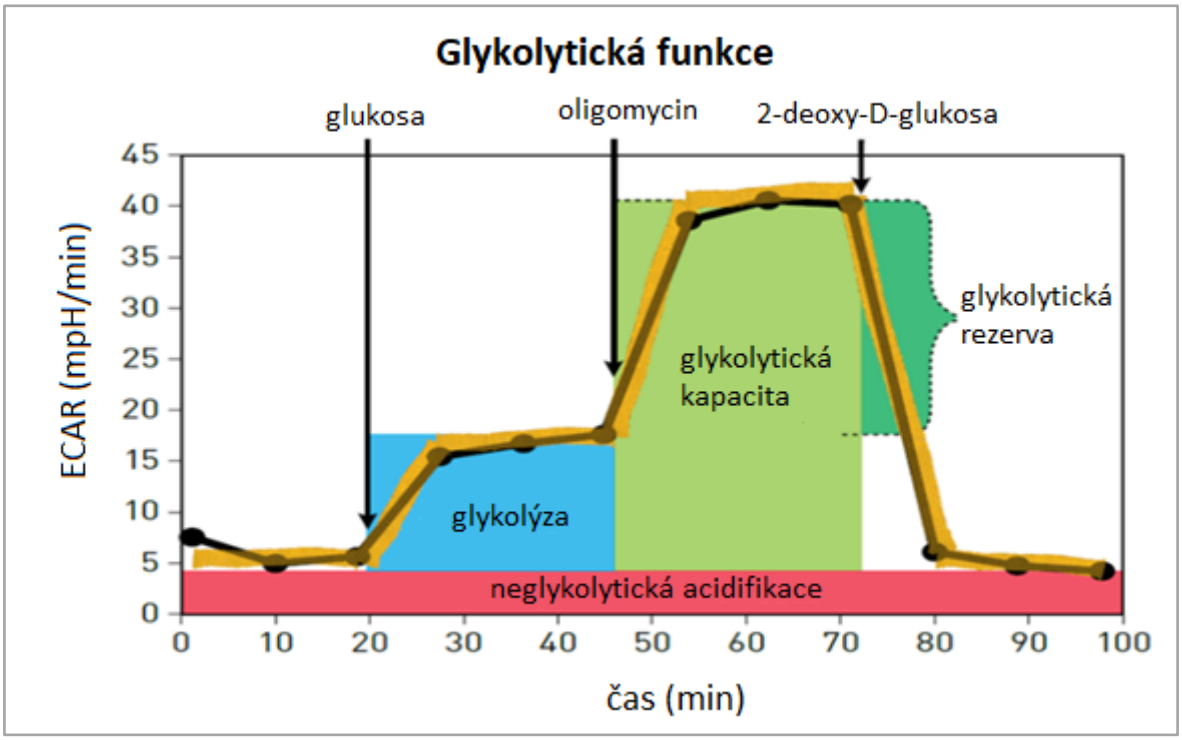
3.2.4.12 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové [86]

Destička byla 2x rozmražena a zamražena a poté byly z každé jamky napipetovány 3 µl roztoku do dvou mikrozkumavek s 797 µl destilované vody. Dále byla připravena kalibrační řada o koncentracích BSA 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7 µg/µl naředěné destilovanou vodou na výsledný objem 800 µl. Po napipetování byly vzorky promíchány na vortexu. K takto připravené kalibrační řadě standardů a vzorků bylo přidáno 200 µl činidla Bradford a vortexováno. Následně byly vzorky inkubovány 5 min za laboratorní teploty. Intenzita modrého zabarvení byla měřena na spektrofotometru *Schimadzu* při 595 nm proti blanku. Z lineární závislosti kalibrace byly následně vypočítány koncentrace proteinů v jednotlivých jamkách.

3.2.4.13 Analýza dat z měření na *Seahorse XFe24* získaných z programu *Seahorse Wave 2.4 Software*

Analýza měření glykolýzy buněk na *Seahorse XFe24* [87]

Při této analýze, kde se měří míra extracelulární acidifikace prostředí buňkami (ECAR, z angl. „extracellular cell acidification rate“), je získán graf závislosti právě této acidifikace na čase. Pro získání hodnot glykolýzy, glykolytické kapacity, glykolytické rezervy a neglykolytické kapacity byly odečítány různé parametry mezi sebou, viz Obr. 3.2 na následující straně.



Obr. 3.2: Glykolytická funkce: *graf závislosti míry extracelulární acidifikace prostředí vytvořené buňkami na čase.* ***ECAR*** *- míra extracelulární acidifikace prostředí vytvořená buňkami. Převzato a upraveno podle* [87].

Glykolýza: Tento proces přeměňování glukosy na pyruvát byl měřen jako hodnota ECAR (z angl. „extracellular acidification rate“), získaná po přidání glukosy.

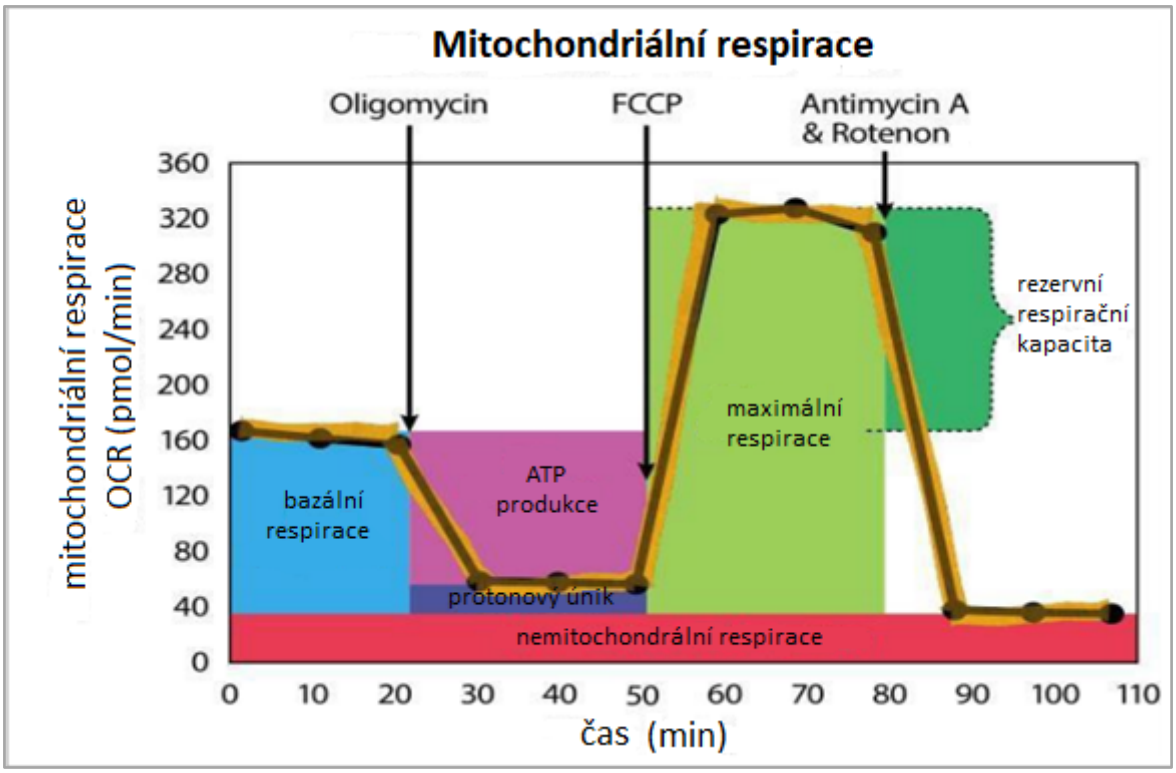
Glykolytická kapacita: Tato hodnota je maximální ECAR získané po přidání oligomycinu, který efektivně zastaví oxidační fosforylaci. Tedy v situaci nutící buňky použít glykolýzu do jejich maximální kapacity.

Glykolytická rezerva: Tato hodnota ukazuje schopnost buněk reagovat na energetické požadavky, tedy schopnost zvýšit jakož i schopnost snížit glykolytickou funkci.

Neglykolytická acidifikace: Tento parametr nám ukazuje hodnotu extracelulární acidifikace způsobené jinými zdroji, které nejsou připisovány glykolýze.

Analýza měření oxidační fosforylace buněk na Seahorse *XFe24* [88]

Tato metoda založená na měření spotřeby kyslíku buňkami (OCR, z angl. „oxidation consumption rate“) nám ukazuje mitochondriální funkci buněk (Obr. 3.3). Jsou k tomu využívány modulátory respirace, které jsou cíleny na komponenty elektronového transportního řetězce pro zjištění klíčových parametrů metabolické funkce v mitochondrii. Oligomycin, FCCP, a mix rotenonu a antimycinu A jsou injikovány postupně při měření a) respirace spojené s produkcí ATP, b) maximální respirace a c) nemitochondriální respirace. Protonový únik, rezervní respirační kapacita jsou dále vypočítány použitím těchto parametrů a bazální respirace.



Obr. 3.3: Mitochondriální respirace: *graf závislosti míry spotřeby kyslíku buňkami na čase,* ***OCR*** *- míra spotřeby kyslíku buňkami.* ***FCCP*** *- karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon. Převzato a upraveno podle* [88].

Bazální respirace: Spotřeba kyslíku nezbytná na získání potřebného ATP. Ukazuje energetický požadavek buněk za normálních podmínek.

Produkce ATP: Pokles spotřeby kyslíku po přidání inhibitoru ATP-synthasy oligomycinu ukazuje míru bazální respirace, která byla použita pro produkci ATP.

Protonový únik: Zbývající respirace nesouvisející s ATP produkcí. Tato hodnota může být i známkou mitochondriálního poškození či může být použita jako mechanismus regulující produkci ATP v mitochondriích.

Maximální respirace: Maximální spotřeba kyslíku způsobená rozpřažením oxidační fosforylace po přidání tzv. „rozpřahovače“ karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazonu (FCCP). FCCP simuluje zvýšenou disipaci protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně, což vede ke stimulaci respiračního řetězce. Ten pak pracuje na maximální možnou kapacitu a způsobuje rapidní oxidaci substrátů (sacharidů, lipidů, AMK), aby se vyhovělo uměle vytvořenému metabolickému požadavku. Ukazuje maximální hodnoty respirace, kterých buňka může dosáhnout.

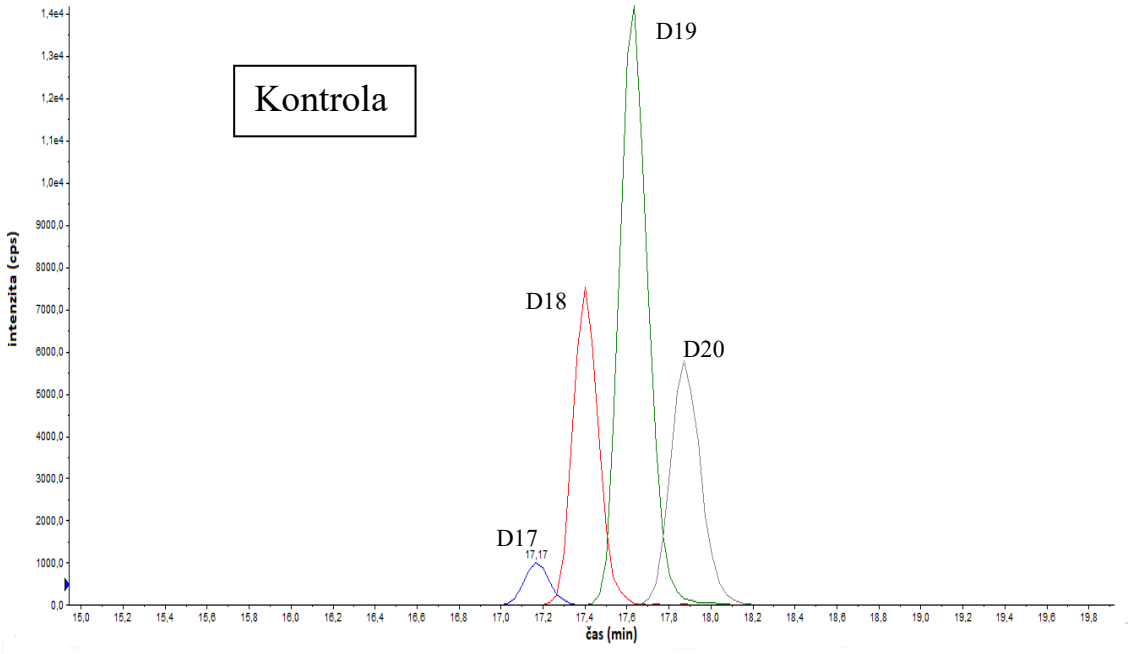
Rezervní respirační kapacita: Tato hodnota udává schopnost buňky odpovídat na energetickou potřebu. Také nám ukazuje, jak blízko je buňka při respiraci za normálních podmínek u jejího teoretického maxima.

Nemitochondriální respirace (=pozadí): Spotřeba kyslíku, která je způsobena skupinou buněčných enzymů, které pokračují ve spotřebě kyslíku po přidání rotenonu a antimycinu A. Toto je důležité pro získávání přesného měření mitochondriální respirace.

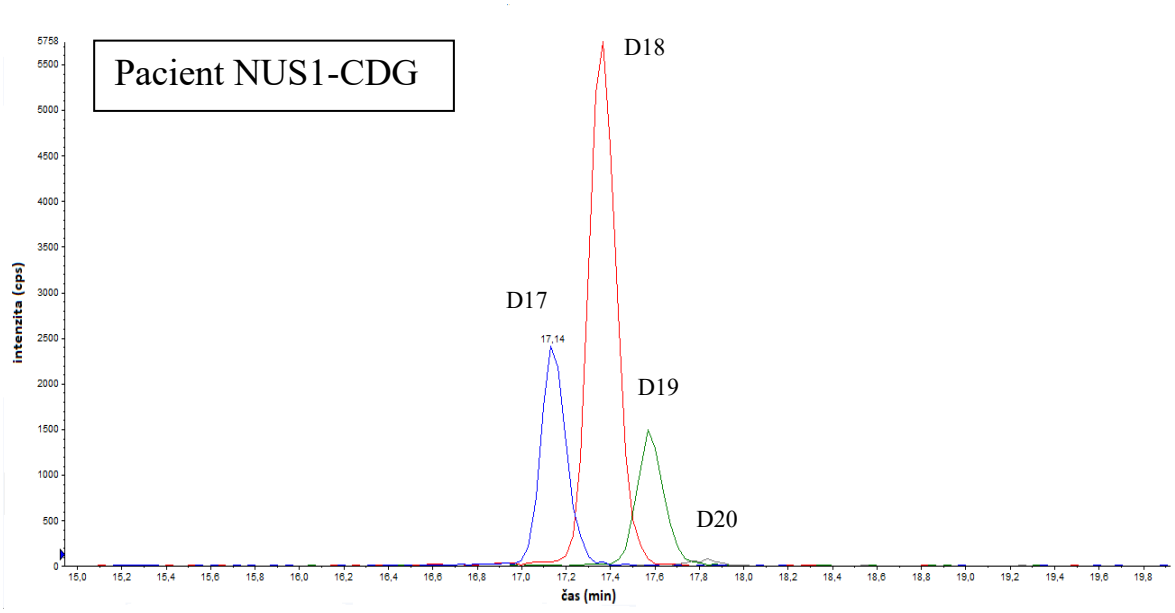
4 Výsledky

4.1 Obsah dolicholu v moči pomocí analýzy na tandemovém hmotnostním spektrometru

Pro analýzu obsahu dolicholu v moči byl použit soubor kontrol a pacientů čítající celkem 125 vzorků, které byly měřeny v párech, pokud bylo dostatečné množství materiálu. Pro každý vzorek byl v programu *Analyst 1.6 Software* získán chromatografický záznam extrahovaných iontových produktů s vrcholy zobrazujícími D17-D20 isoformy. Chromatogram kontrolního vzorku je zobrazen na Obr. 4.1 a chromatogram vzorku od NUS1-CDG pacienta je zobrazen na Obr. 4.2 na následující straně. Veškeré naměřené hodnoty obsahu vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů jsou zobrazeny v příloze 8.1 na stranách 80-88.



Obr. 4.1: LC-MS/MS analýza obsahu dolicholu v moči kontrolního vzorku, UPLC Agilent 1290 Infinity LC System a tandemový hmotnostní spektrometr SCIEX API 4000 LC-MS/MS System AB/MDS (Applied Biosystem) zobrazené v programu Analyst 1.6 Software (Applied Biosystems): D17-D20 *- dolicholy s 17-20 isoprenovými jednotkami,* ***cps****- jednotky intenzity iontového proudu v chromatografickém záznamu z angl. „counts per second“.*



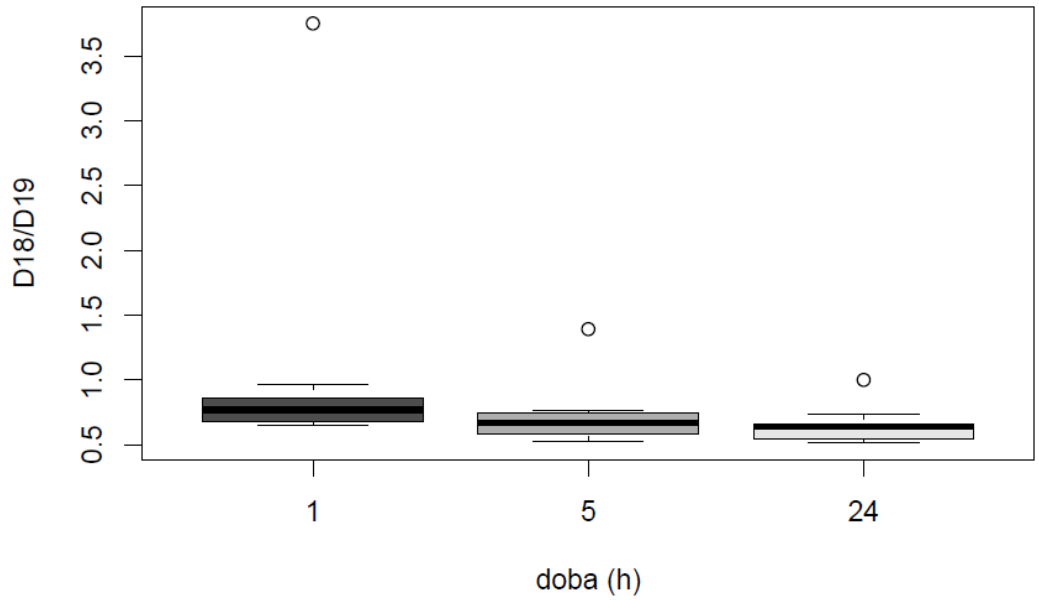
Obr. 4.2: LC-MS/MS analýza obsahu dolicholu v moči u pacienta s NUS1-CDG, UPLC Agilent 1290 Infinity LC System a tandemový hmotnostní spektrometr SCIEX API 4000 LC-MS/MS System AB/MDS (Applied Biosystem) zobrazené v programu Analyst 1.6 Software (Applied Biosystems): D17-D20 *- dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami,* ***cps*** *- jednotky intenzity iontového proudu v chromatografickém záznamu z angl. „counts per second".*

Z Obr. 4.1 (str. 44) a Obr. 4.2 je vidět znatelný rozdíl mezi spektrem kontrolního vzorku a pacienta NUS1-CDG. U kontrol je dominantním D19, zatímco u pacienta je největší množství D18, D17 je zvýšený, D19 naopak významně snížený a D20 prakticky nezaznamenatelný.

4.1.1 Testování stability moči pro účely analýzy dolicholů

Z dat naměřených pomocí kapalinové chromatografie kombinované s tandemovou hmotnostní spektrometrií byl vypočten pro každý vzorek (5 jedinců, tři doby zmražení, vše v dubletu) poměr dolicholu s 18 isoprenovými jednotkami (D18) ku dolicholu s 19 isoprenovými jednotkami (D19). Následné vypočtení rozmezí poměru D18/D19 pro určitou dobu zamražení moči od odběru je zobrazeno na Obr. 4.3 a statistické hodnoty v Tab. 4.1 na následující straně. Metoda statistického zpracování je popsána v kapitole: 3.2.1.5 na straně 31.

Vliv času zamražení moči na stabilitu poměru D18/D19



***Obr. 4.3: Analýza obsahu dolicholu v moči - Stabilita poměru D18/D19 v moči dle různého časového intervalu zamražení moči od odběru: D18** – dolichol s 18 isoprenovými jednotkami, **D19** – dolichol s 19 isoprenovými jednotkami, pro tuto analýzu byly použity vzorky moči od 5 jedinců, P=0,07*

Tab. 4.1: Statistické hodnoty stability moči dle různého časového intervalu zamražení moči od odběru získané při zpracování dat.

h	*Min.*	*1st Qu.*	*medián*	*průměr*	*3rd Qu.*	*Max.*	*SD*	*N*	*2,5%*	*97,5%*	*95%*
1	0,65	0,70	0,77	1,07	0,85	3,75	0,95	10	0,65	3,12	2,50
5	0,52	0,59	0,67	0,71	0,73	1,39	0,25	10	0,52	1,25	1,11
24	0,51	0,55	0,64	0,65	0,66	1,00	0,14	10	0,52	0,94	0,88

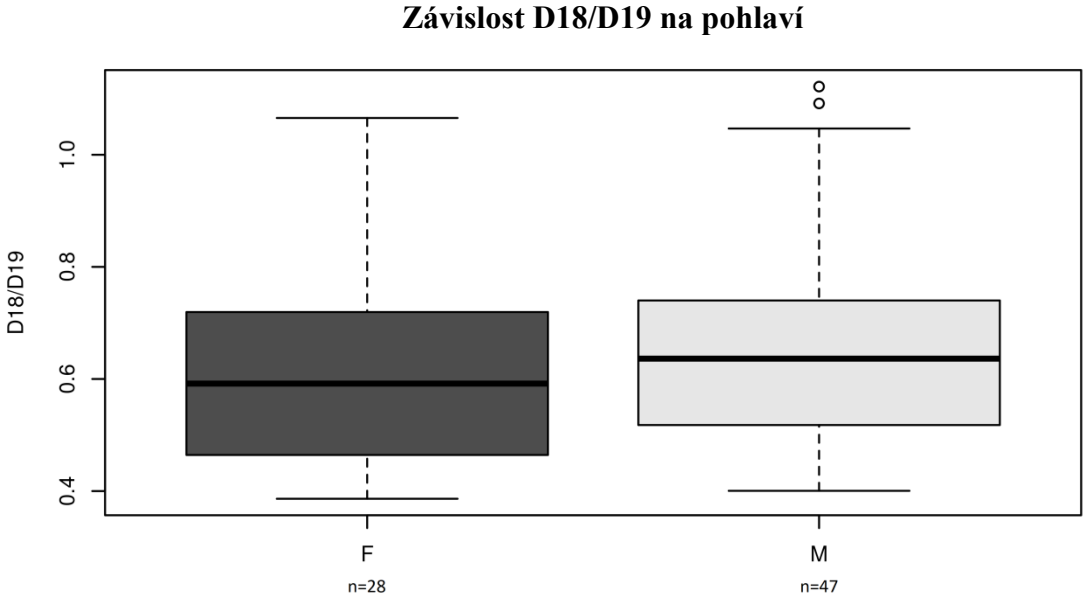
***h** – počet hodin, **Min.** - minimální hodnota,**1st Qu.** - 1. kvartil, **3rd Qu.** - 3. kvartil, **Max.** – maximální hodnota., **SD** - směrodatná odchylka, **N** - počet měření, **2,5%** - 2,5%ní kvantil, **97,5%** - 97,5%ní kvantil, **95%** - 95%ní kvantil,*

Z Obr. 4.3 a výsledných statistických hodnot zobrazených v Tab. 4.1 plyne, že nebyla prokázána významná závislost poměru D18/D19 na době zamražení od odběru.

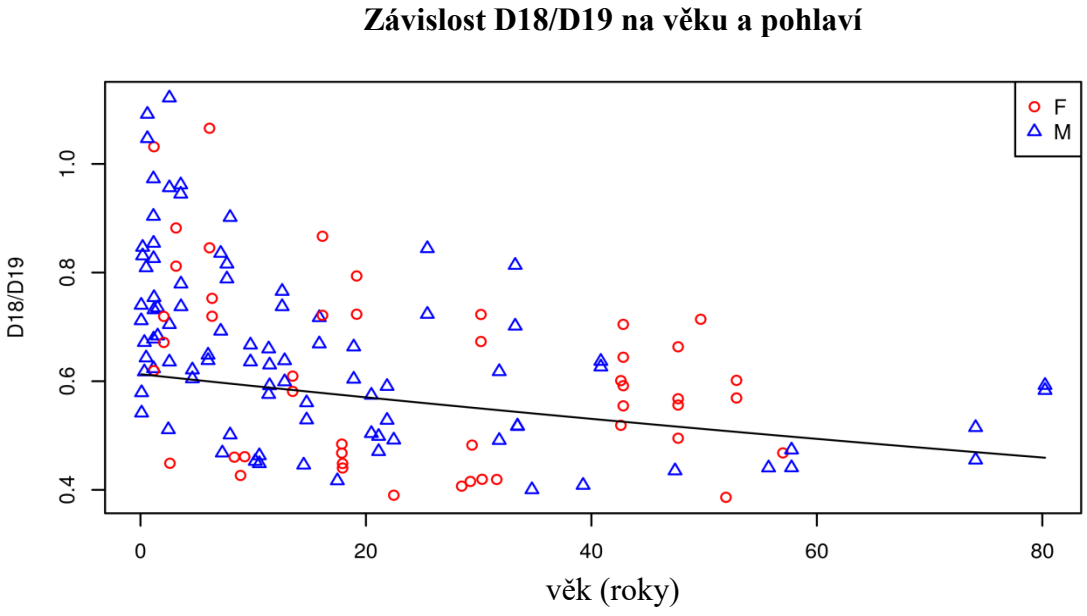
4.1.2 Závislost poměru D18/D19 na pohlaví

Získané hodnoty poměrů D18/D19 u kontrol byly statisticky zpracovány a byla hledána závislost tohoto poměru na pohlaví. Výsledný graf je zobrazen na straně 47 na Obr. 4.4 a se statistickými hodnotami zobrazenými v Tab. 4. (str. 48). Pro zahrnutí v potaz i závislosti na věku, která je popisována v následující kapitole, byl vytvořen graf závislosti

poměru D18/D19 na věku a pohlaví zobrazený na Obr. 4.5. Ze získaných a zpracovaných dat nebyla prokázána závislost poměru D18/D19 na pohlaví.



Obr. 4.4: Analýza obsahu dolicholu v moči - Závislost poměru D18/D19 na pohlaví: *F – ženy (vzorky od 28 jedinců), M – muži (vzorky moči od 47 jedinců),* ***D18*** *– dolichol s 18 isoprenovými jednotkami,* ***D19*** *– dolichol s 19 isoprenovými jednotkami*



Obr. 4.5: Analýza obsahu dolicholu v moči - Závislost poměru D18/D19 na věku a pohlaví: ***F*** *- ženy,* ***M*** *- muži,* ***D18*** *– dolichol s 18 isoprenovými jednotkami,* ***D19*** *– dolichol s 19 isoprenovými jednotkami, závislost na věku:P=0,0002.*

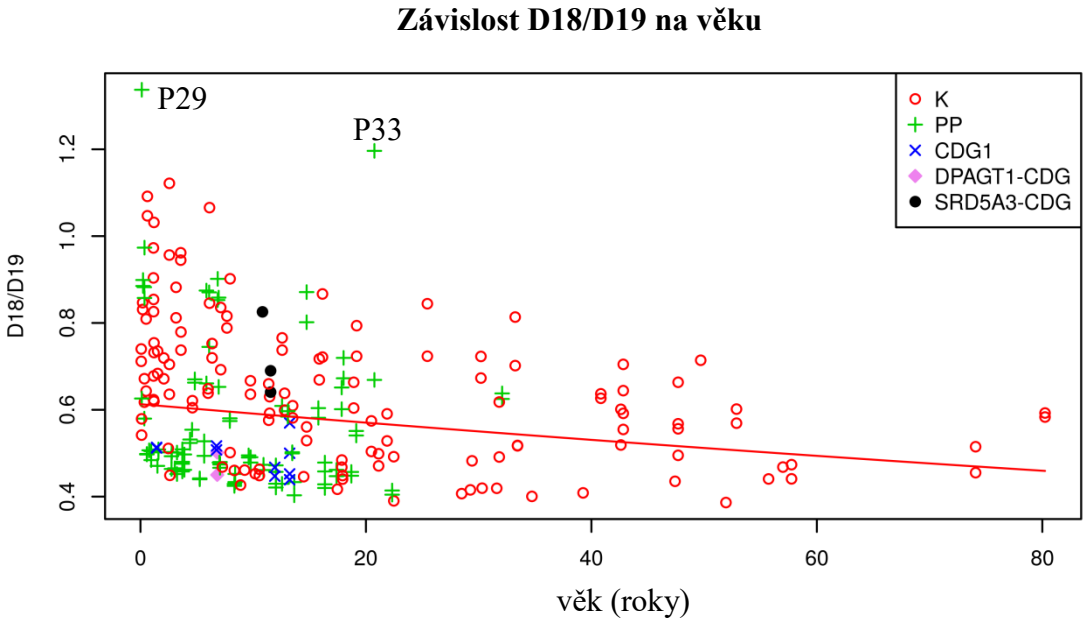
Tab. 4.2 Statistické hodnoty závislosti D18/D19 na pohlaví.

pohlaví	*Min.*	*1st Qu.*	*medián*	*průměr*	*3rd Qu.*	*Max.*	*SD*	*N*	*2,5%*	*97,5%*	*95%*
F	0,39	0,47	0,59	0,61	0,72	1,07	0,17	47	0,39	1,01	0,88
M	0,4	0,52	0,64	0,66	0,74	1,12	0,16	90	0,42	1,03	0,96

Min. *- minimální hodnota,* ***1st Qu.*** *- 1. kvartil,* ***3rd Qu.*** *- 3. kvartil,* ***Max.*** *- maximální hodnota.,* ***SD*** *- směrodatná odchylka,* ***N*** *- počet měření,* ***2,5%*** *- 2,5%ní kvantil,* ***97,5%*** *- 97,5%ní kvantil,* ***95%*** *- 95%ní kvantil*

4.1.3 Závislost poměru D18/D19 na věku

Z vypočtených hodnot poměru D18/D19 kontrol byla hledána závislost na věku. Byl použit lineární model se smíšenými efekty popsaný již v kapitole 3.2.1.5 na straně 31. Výsledný graf závislosti poměru D18/D19 na věku je zobrazen na Obr. 4.6.

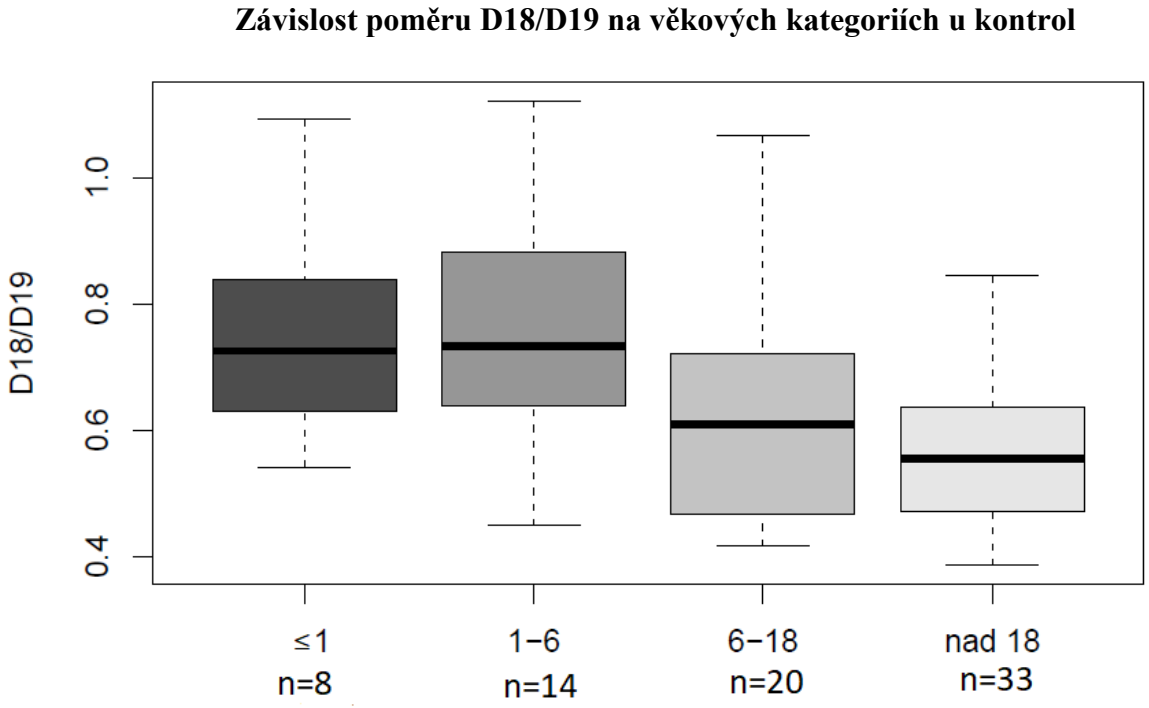


Obr. 4.6: Analýza obsahu dolicholu v moči - Graf závislosti D18/D19 na věku: ***K*** *- kontrolní vzorky,* ***PP*** *– pacient s podezřením na CDG,* ***CDG1*** *- pacienti CDG trpící poruchou v genech nezávislých na biosyntéze či metabolismu dolicholu,* ***DPAGT1-CDG*** *- pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu,* ***SRD5A3-CDG*** *- pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu,* ***D18*** *– dolichol s 18 isoprenovými jednotkami,* ***D19*** *– dolichol s 19 isoprenovými jednotkami.*

Z Obr. 4.6 i z výpočtů je vidět, že je zde statisticky významná závislost hodnoty poměru D18/D19 na věku. Taktéž zde byli zachyceni dva pacienti P29 a P33s podezřením na CDG s odlehlými hodnotami.

4.1.4 Kontrolní rozmezí pro poměr D18/D19 dle věku

Vzhledem k potvrzené závislosti poměru D18/D19 na věku, byly vytvořeny věkové skupiny: 0-1 rok, 1-6 let, 6-18 let a nad 18 let, pro které byla vypočtena určitá rozmezí s průměrem a mediánem a dalšími statistickými hodnotami pro daný poměr. Hodnoty poměrů pro věkové kategorie jsou zobrazeny na Obr. 4.7 spolu se statistickými hodnotami zobrazenými v Tab. 4.3.



Obr. 4.7: Analýza obsahu dolicholu v moči - Závislost poměru D18/D19 na věkových kategoriích u kontrol; ≤1 *– věkové rozhraní od narození do 1 roku, 1-6 – věkové rozhraní od 1 až po 6 let, 6-18 – věkové rozhraní od 6 po 18 let, nad 18 – věkové rozhraní od 18 let., n – počet jedinců, jejichž vzorky moči byly analyzovány,* ***D18*** *– dolichol s 18 isoprenovými jednotkami,* ***D19*** *– dolichol s 19 isoprenovými jednotkami.*

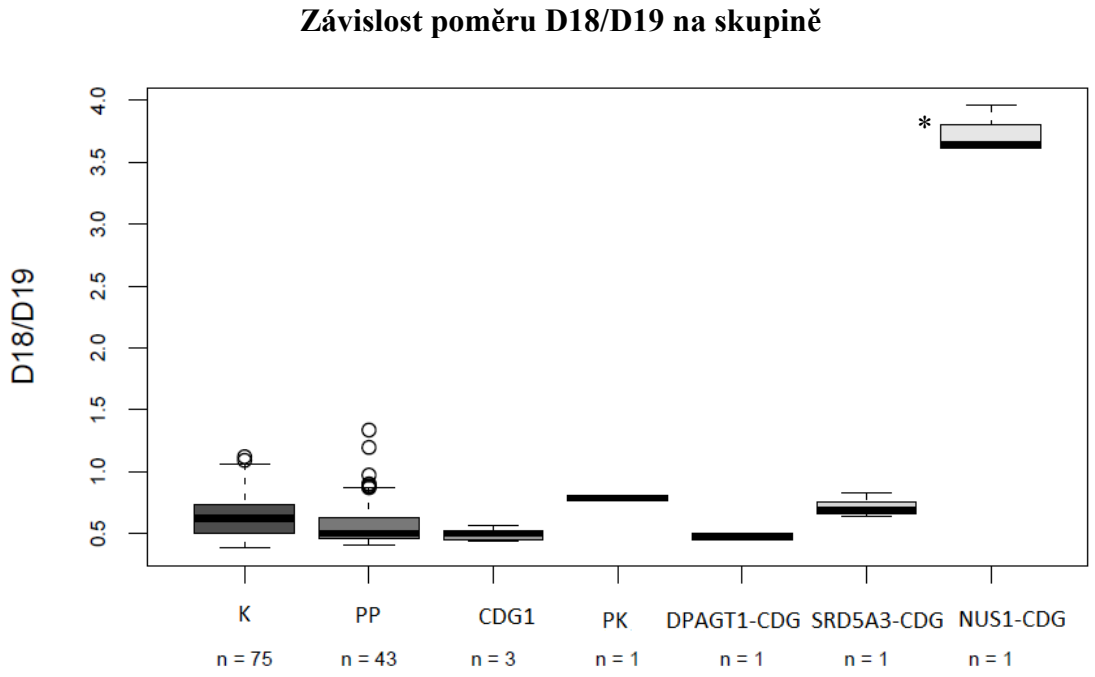
Tab. 4.3: Statistické hodnoty závislosti poměru D18/D19 na věkových kategoriích u kontrol.

věk (roky)	*Min*	*1st Qu.*	*medián*	*průměr*	*3rd Qu.*	*Max.*	*SD*	*N*	*2,5%*	*97,5%*	*95%*
≤1	0,54	0,64	0,73	0,76	0,83	1,09	0,17	12	0,55	1,08	1,07
1-6	0,45	0,64	0,73	0,76	0,88	1,12	0,16	30	0,49	1,06	1,01
6-18	0,42	0,47	0,61	0,62	0,72	1,07	0,16	41	0,42	0,9	0,87
nad 18	0,39	0,47	0,56	0,56	0,63	0,84	0,12	54	0,39	0,81	0,75

Min. *- minimální hodnota,* ***1st Qu.*** *- 1. kvartil,* ***3rd Qu.*** *- 3. kvartil,* ***Max.*** *- maximální hodnota.,* ***SD*** *- směrodatná odchylka,* ***N*** *- počet měření*, ***2,5%*** *- 2,5%ní kvantil,* ***97,5%*** *- 97,5%ní kvantil,* ***95%*** *- 95%ní kvantil.*

4.1.5 Hodnoty poměrů u různých analyzovaných skupin

Z důvodu porovnání jednotlivých testovaných typů onemocnění byl pro získaná data ze vzorků moči vypočten poměr D18/D19 a následně za použití stejného modelu analýzy jako v předchozí kapitole byl vytvořen graf zobrazený na Obr. 4.8 se statistickými údaji v Tab. 4.4 na straně 51.



***Obr. 4.8: Analýza obsahu dolicholu v moči - Závislost poměru D18/D19 na skupině: K** - kontrolní vzorky, **PP** - potencionální CDG pacienti, **CDG1** - pacienti CDG trpící poruchou v genech nezávislých na biosyntéze či metabolismu dolicholu, **PK** - heterozygotní přenašeč mutace v NogoB-receptoru, **DPAGT1-CDG** - pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **D18** – dolichol s 18 isoprenovými jednotkami, **D19** – dolichol s 19 isoprenovými jednotkami, n=počet jedinců, * P< 0,0005.*

V grafu zobrazeném na Obr. 4.8 jsou vypočtené poměry rozděleny do skupin: kontrola, potenciální CDG pacienti, CDG pacienti s poruchou v genu nepodílejícím se na syntéze či metabolismu dolicholu, heterozygotní přenašeč mutace v genu pro NogoB-receptor, pacienti s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, pacienti s poruchou v genu (*SRD5A3*) pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, pacienti s poruchou v NogoB-receptoru podílejícím se na biosyntéze dolicholu. Z Obr. 4.8 je vidět znatelný rozdíl hodnot mezi NUS1-CDG a kontrolami. Hodnota u SRD5A3-CDG pacienta byla mírně zvýšená a u dvou pacientů P29 a P33 s podezřením na CDG byly hodnoty poměrů D18/D19 odlehlé. Taktéž hodnota heterozygotního přenašeče mutace v *NUS1* genu

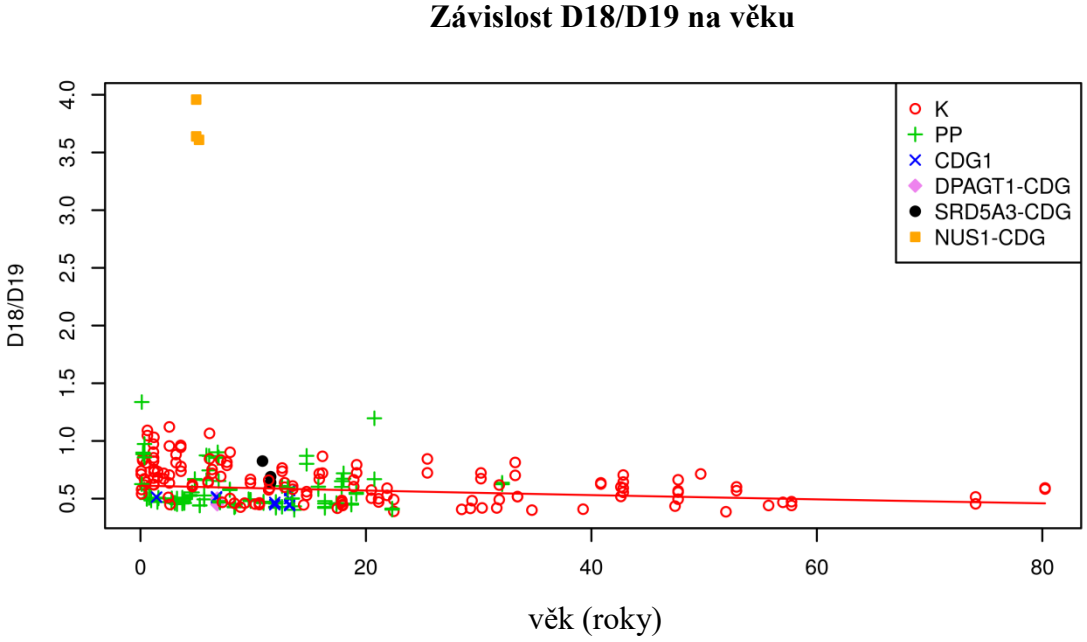
byla mírně zvýšená oproti průměrné hodnotě kontrol. Získané statistické hodnoty jsou zobrazeny v Tab. 4.4.

Tab. 4.4: Závislost poměru D18/D19 na skupině.

označení	*Min.*	*1st Qu.*	*medián*	*průměr*	*3rd Qu.*	*Max.*	*SD*	*N*	*2,5%*	*97,5%*	*95%*
K	0,39	0,50	0,62	0,64	0,73	1,12	0,17	137	0,41	1,04	0,96
PP	0,40	0,46	0,50	0,57	0,63	1,34	0,17	99	0,42	0,94	0,89
CDG1	0,44	0,46	0,50	0,49	0,51	0,57	0,04	10	0,44	0,56	0,55
PK	0,77	0,78	0,79	0,79	0,80	0,81	0,03	2	0,77	0,81	0,81
DPAGT1-CDG	0,45	0,46	0,48	0,48	0,49	0,50	0,04	2	0,45	0,50	0,50
SRD5A3-CDG	0,64	0,67	0,69	0,72	0,76	0,83	0,10	3	0,64	0,82	0,81
NUS1-CDG	3,61	3,62	3,64	3,74	3,80	3,96	0,19	3	3,61	3,94	3,93

***K** - kontrolní vzorky, **PP** - potencionální CDG pacienti, **CDG1** - pacienti CDG trpící poruchou v genech nezávislých na biosyntéze či metabolismu dolicholu, **PK** - heterozygotní přenašeč mutace v NogoB-receptoru, **DPAGT1-CDG** - pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **Min.** - minimální hodnota, **1st Qu.** - 1. kvartil, **3rd Qu.** - 3. kvartil, **Max.** - maximální hodnota., **SD** - směrodatná odchylka, **N** - počet měření, **2,5%** - 2,5%ní kvantil, **97,5%** - 97,5%ní kvantil, **95%** - 95%ní kvantil*

Na Obr. 4.9 na následující straně je zobrazena závislost poměru na věku a je zde přidána i pozitivní kontrola s defektem v NogoB-receptoru pro získání přesnějšího pohledu na rozdíl v poměru mezi kontrolami a NUS1-CDG. Zde je také vidět významný rozdíl tohoto poměru oproti zbylým měřeným skupinám, a to i s ohledem na závislost hodnoty poměru na věku.

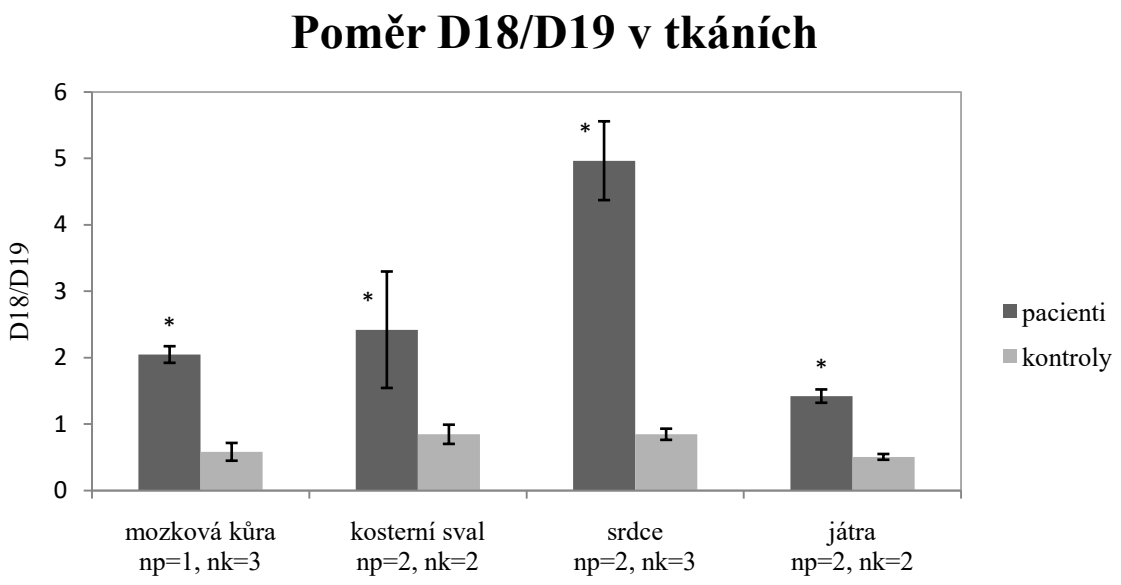


***Obr. 4.9: Analýza obsahu dolicholu v moči - Závislost D18/D19 na věku: K** - kontrolní vzorky, **PP** - potencionální CDG pacienti, **CDG1** - pacienti CDG trpící poruchou v genech nezávislých na biosyntéze či metabolismu dolicholu, **DPAGT1-CDG** - pacient s DPAGT1-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s SRD5A3-CDG, tedy s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **D18** - dolichol s 18 isoprenovými jednotkami, **D19** - dolichol s 19 isoprenovými jednotkami*

4.2 Analýza obsahu dolicholu v tkáních

Pro homogenáty byly získány stejné chromatogramy jako pro vzorky moči zobrazené na Obr. 4.1 a Obr. 4.2 na straně 44 a 45. Pro D17-D20 byly vypočteny plochy pod křivkou pomocí programu *Analyst 1.6 Software (Applied Biosystems)* a následně vypočten poměr D18/D19 pro každý homogenát tkáně. Získané hodnoty jsou zobrazeny na Obr. 4.10 na následující straně.

Z grafu na Obr. 4.10 (str. 53) je vidět, že i v tkáních je významný rozdíl mezi poměrem D18/D19 u kontrol a NUS1-CDG pacientů, kde je významně zvýšený ($P<0,0005$). Hodnota poměru se však liší u různých typů tkání. Taktéž množství dolicholu je v různých tkáních rozdílné.



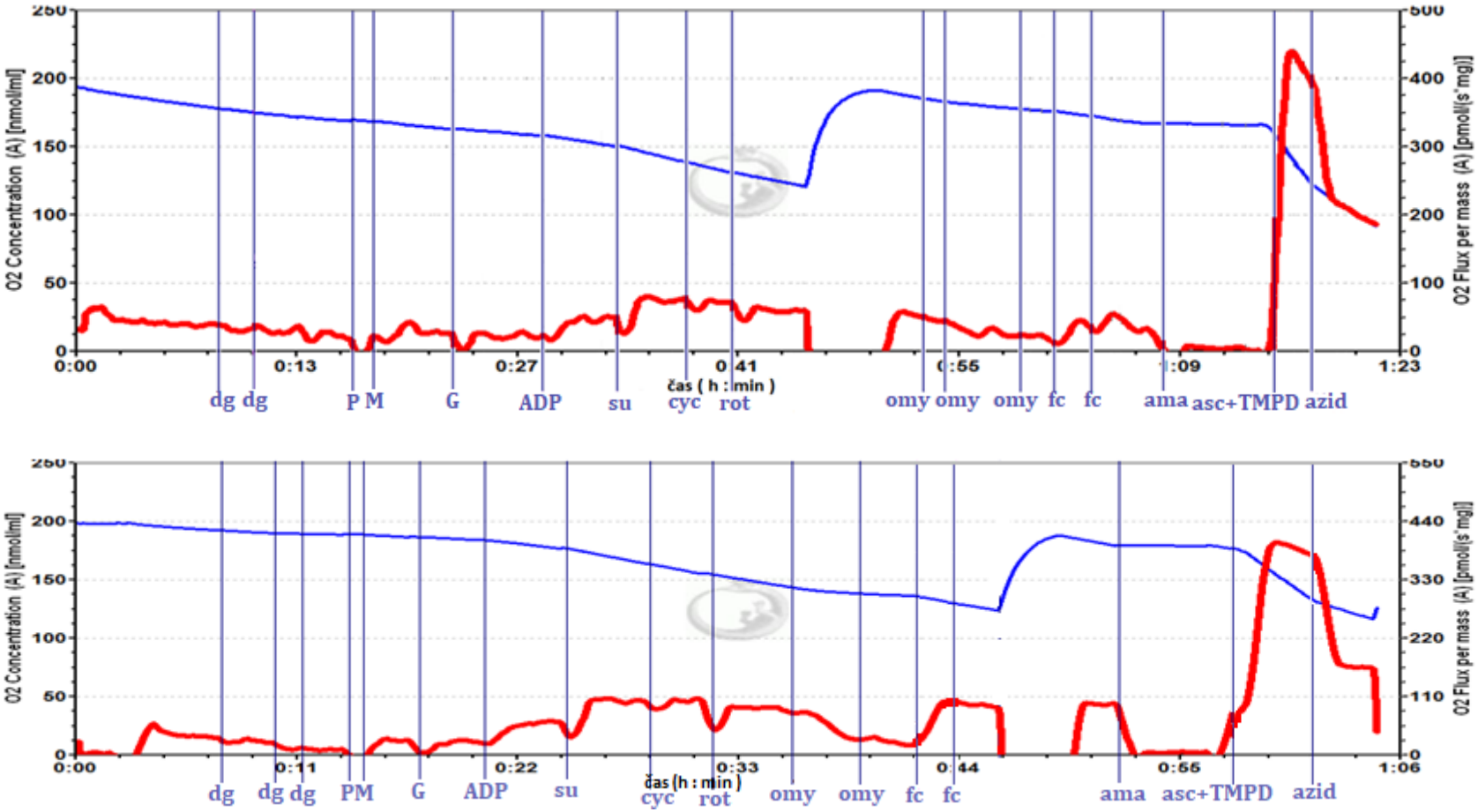
Obr. 4.10: Srovnání poměru dolicholu D18/D19 v různých tkáních u 2 pacientů s NUS1-CDG a kontrol: *Dolicholy byly analyzovány v tkáňových homogenátech pomocí LC-MS/MS,* ***np -*** *pacienti NUS1-CDG,* ***nk -*** *kontrolní vzorky,* ***D18*** *– dolichol s 18 isoprenovými jednotkami,* ***D19*** *– dolichol s 19 isoprenovými jednotkami,* * (P<0,0005).

4.3 Analýza respirace buněk pomocí Oxygrafu

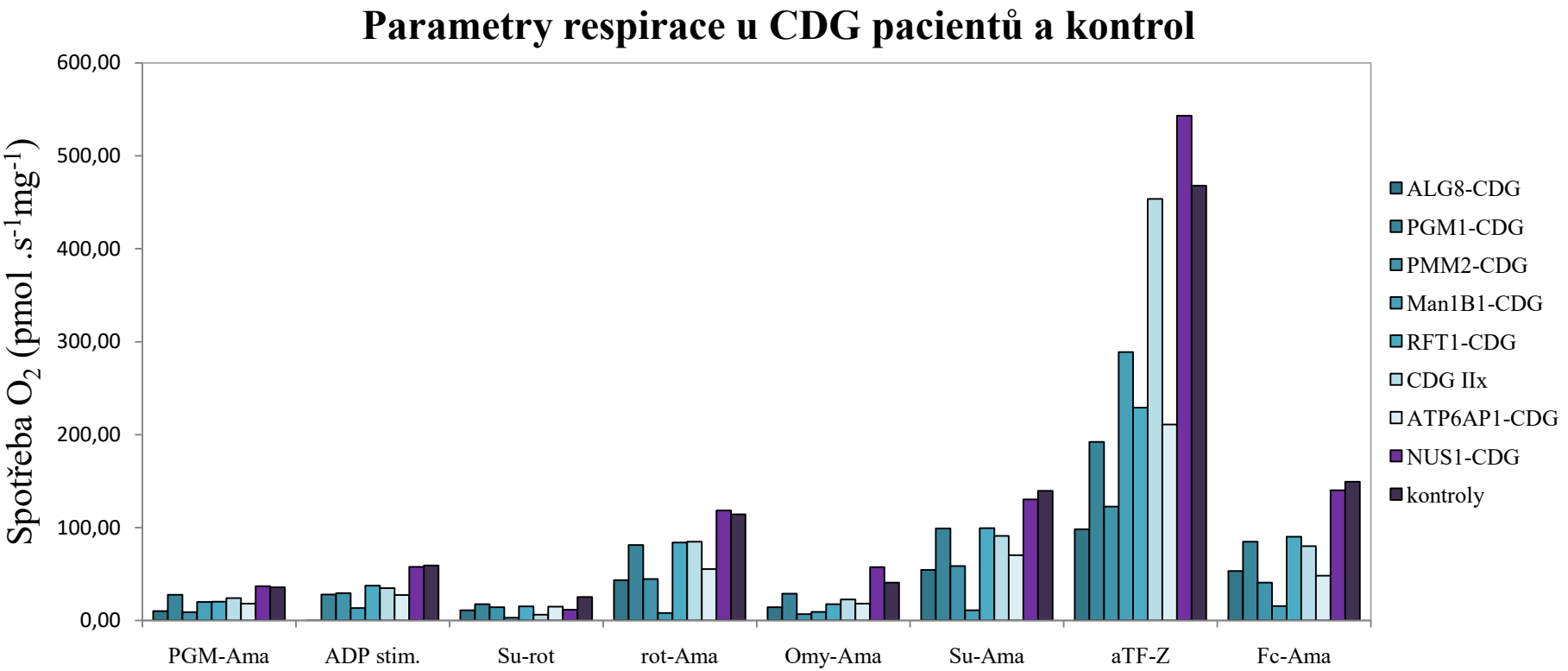
Získaná data naměřená ve spolupráci s pracovníkem laboratoře Mgr. Janou Křížovou, na *Oxygraph-2k (Oroboros)* byla zobrazena v programu *DatLab (Oroboros).* Výsledný záznam z měření spotřeby kyslíku je zobrazen na Obr. 4.11 na následující straně. Získané hodnoty byly následně statisticky zpracovány v programu *Excel (Microsoft Office)*.

Z výsledných hodnot byly získány parametry spotřeby kyslíku fibroblastů pacientů po jednotlivých substrátech či inhibitorech a následně byly porovnávány s naměřenými hodnotami u kontrolních linií fibroblastů.

Hodnoty spotřeby kyslíku pro jednotlivá měření jsou uvedeny v příloze 8.2, Tab. 8.7 na straně 89.



Obr. 4.11: Záznam měření spotřeby kyslíku kultivovanými lidskými kožními fibroblasty na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros) programu DatLab5 (Oroboros); *Modrá křivka zobrazuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře, červená křivka zobrazuje spotřebu kyslíku vztaženou na množství proteinu. Po narušení integrity vnější cytoplasmatické membrány přídavkem digitoninu (**dg**) byly v průběhu měření přidávány jednotlivé substráty, inhibitory a rozpřahovač v následujícím pořadí: pyruvát (**P**), malát (**M**), glutamát (G), ADP, sukcinát (**su**), cytochrom c (**cyc**), rotenon (**rot**), oligomycin (**omy**), karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon, FCCP (**fc**), antimycin A (**ama**), askorbát (**asc**), tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid (**TMPD**) a azid, **A** - kontrola, **B** - NUS1-CDG pacient, **„O2 Flux per mass (A)“** – proměnlivost obsahu kyslíku vztažená na množství proteinu v komoře A, **„O2 Concentration (A)“** – koncentrace kyslíku v komoře A*



***Obr. 4.12: Spotřeba kyslíku po jednotlivých substrátech ve fibroblastech pacientů s NUS1-CDG ve srovnání s vybranými typy CDG a kontrolními liniemi. Naměřeno na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros): PGM-Ama** - bazální respirace, stimulace komplexu I, **ADP stim.** - zvýšení spotřeby kyslíku po dodání ADP, **Su-rot** - Komplex I dependentní hodnota, **rot-Ama** - Komplex II dependentní hodnota, **Omy-Ama** - protonový únik, **Su-Ama** - oxidační fosforylace, **aTF-Z** - Komplex IV dependentní hodnota s účinkem rozpřahovače, **Fc-Ama** – elektronový transportní řetězec s účinkem rozpřahovače, **PGM** - hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu, **Su** – hodnoty po následném přidání sukcinátu, **rot** – hodnoty po následném přidání rotenonu, **omy** – hodnoty po následném přidání oligomycinu, **Fc** – hodnoty po následném přidání FCCP, **Ama** – hodnoty po následném přidání antimycinu A, **aTF** – hodnoty po následním přidání askorbátu a TMPD, **Z** – hodnoty po následním přidání azidu, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **ALG8-CDG** – pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase (typ I), **PGM1-CDG** – pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II), **PMM2-CDG** – pacient s poruchou ve fosfomannomustase (typ I), **Man1B1-CDG** – pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II), **RFT1-CDG** – pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I), **CDG IIx** – pacient s CDG typu II, **ATP6AP1-CDG**- pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy. Zobrazené hodnoty jsou průměrem ze tří hodnot, kde odchylka není větší než 20%.*

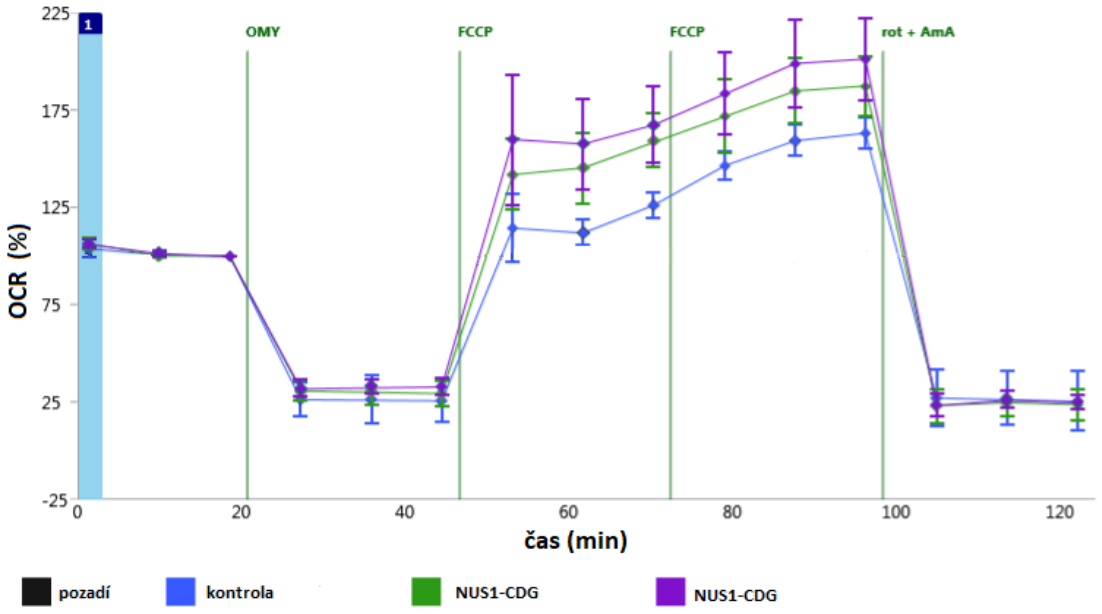
Z předchozího grafu (Obr. 4.12) vyplývá, že hodnoty získané z měření linie fibroblastů NUS1-CDG pacientů na oxygrafu jsou srovnatelné s hodnotami kontrolních linií. Jediná možná zaznamenatelná odchylka od kontrol je mírně zvýšený protonový únik, který pak snižuje poměry hodnot na něm závislých. U zbylých hodnot však není patrná významnější odchylka.

Záznamy křivek respirace různých CDG pacientů mají specifický profil a bude třeba je hodnotit individuálně v kontextu k typu glykosylačního defektu. Například pacient s ATP6AP1-CDG má většinu parametrů snížených oproti kontrolním liniím. Nejvíce je snížená respirace komplexu IV po přidání rozpřahovače.

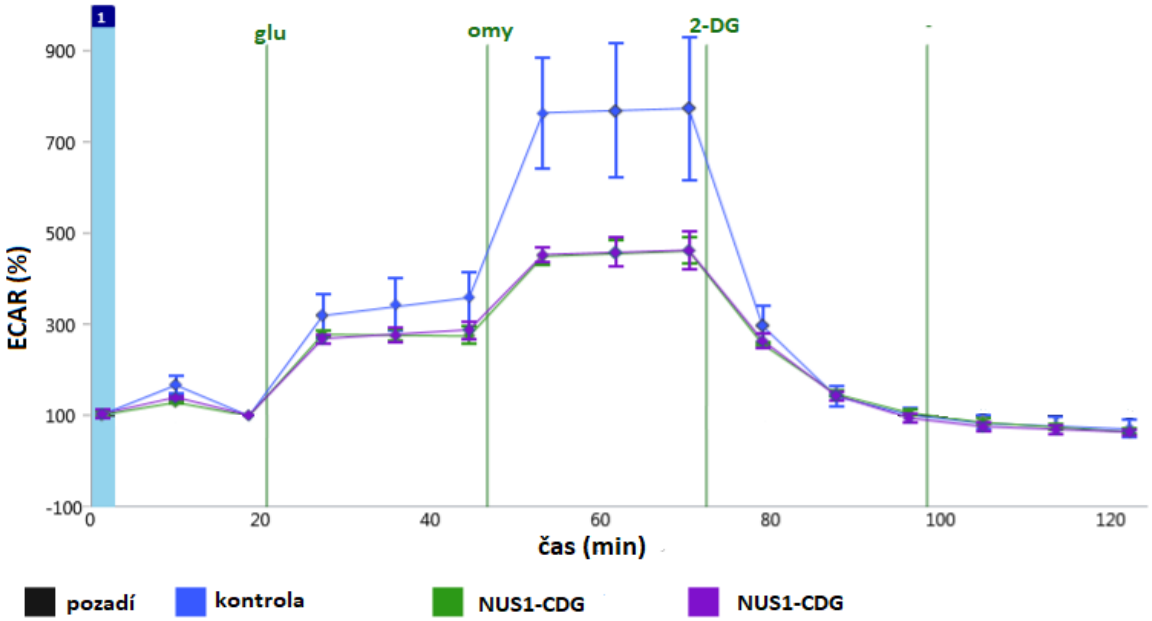
Podrobnější rozbor nalezených změn u pacientů s různými typy CDG nebyl předmětem této diplomové práce a jejich ověření dalšími metodami bude cílem dalších studií.

4.4 Analýza aktivity buněk pomocí přístroje *Seahorse XFe24*

Z analýzy respirace buněk, naměřené ve spolupráci s pracovníkem Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch, Mgr. Janou Křížovou, na přístroji *Seahorse XFe24(Agilent*) byly získány křivky závislosti OCR a ECAR na čase. Pro ukázku je na straně 57 na Obr. 4.13 znázorněn průběh OCR a na Obr. 4.14 průběh měření ECAR u pacientů s NUS1-CDG a jedné kontroly.



Obr. 4.13: Funkce mitochondriální respirace buněk kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů s NUS1-CDG a kontroly: *Tvar křivky získaný v programu Wave 2.4 při analýze mitochondriální respirace na přístroji Seahorse XFe24.* ***OCR*** *- míra spotřeby kyslíku buňkami.* ***OMY*** *– přídavek 2 µM oligomycinu,* ***FCCP*** *– přídavek 0,5µM karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazonu a následně 0,2µM karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazonu,* ***rot*** *+* ***AmA*** *přídavek 1µM antimycinu A a 2µM rotenonu.*



Obr. 4.14: Glykolytická funkce buněk kultivovaných kožních fibroblastů od 2 pacientů s NUS1-CDG a kontroly: *Tvar křivky získaný v programu Wave 2.4 při analýze glykolytické funkce na Seahorse XFe24. Graf závislosti míry spotřeby kyslíku buňkami na čase,* ***ECAR*** *– míra extracelulární acidifikace prostředí vytvořená buňkami.* ***glu*** *- přídavek 10mM glukosy,* ***omy*** *– přídavek 2µM oligomycinu,* ***2-DG*** *– přídavek 100mM 2deoxy-D-glukosy.*

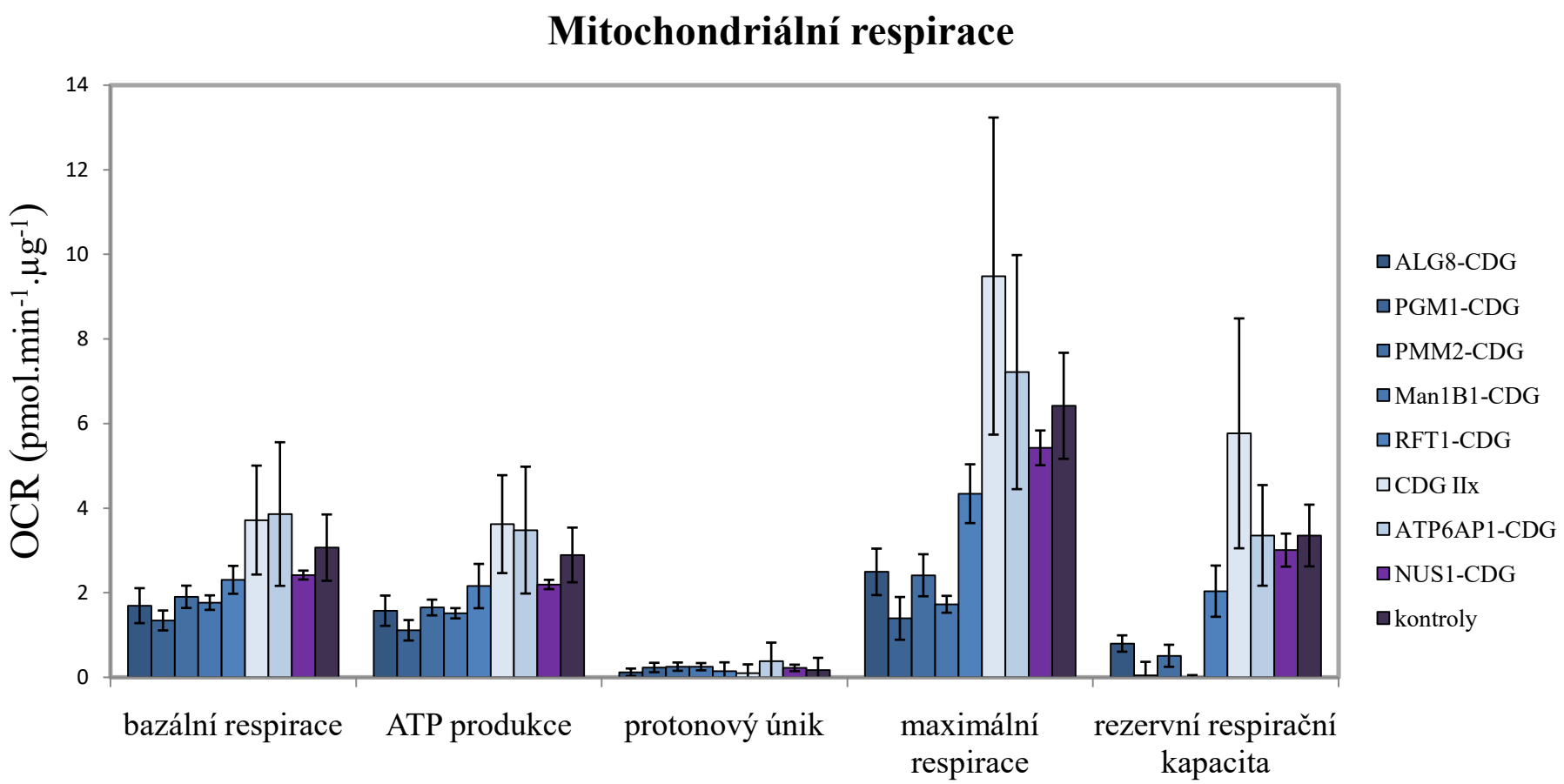
4.4.1 Oxidační fosforylace

Ze získaných dat naměřených na přístroji *Seahorse XFe24 (Agilent)* v programu *Wave 2.4 (Agilent)* byly vypočteny následující parametry: bazální respirace, ATP produkce, protonový únik, maximální respirace a rezervní respirační kapacita, a to pro 2 NUS1-CDG pacienty, 3 kontroly a pro porovnání i 7 dalších CDG pacientů s CDG typu I a typu II. Výsledné hodnoty jsou zobrazeny na Obr. 4.15. na straně 59. Základní data jsou uvedena v Tab. 8.10 v příloze 8.3 na straně 92.

Z grafu na Obr. 4.15 (str. 59) je vidět mírné snížení bazální respirace, ATP produkce, maximální respirace a rezervní respirační kapacity NUS1-CDG oproti kontrolám.

Porovnání výsledků pro NUS1-CDG s ostatními typy CDG je komplikované, neboť je vidět u každého typu CDG jiný celkový profil. Například u CDG IIx jsou zvýšené hodnoty bazální respirace, ATP produkce a výrazně zvýšené hodnoty maximální respirace a rezervní respirační kapacity. U ATP6AP1-CDG jsou všechny tyto hodnoty taktéž zvýšené, avšak maximální respirace a rezervní respirační kapacita nejsou zvýšené v tak velké míře. Také u ATP6AP1-CDG je zvýšený protonový únik oproti všem ostatním vzorkům.

PGM1-CDG a Man1B1-CDG nemají téměř žádnou rezervní respirační kapacitu.



***Obr. 4.15: Funkce mitochondriální respirace buněk měřená na přístroji Seahorse XFe24 (Agilent): OCR** - míra spotřeby kyslíku buňkami, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **ALG8-CDG** – pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase(typ I), **PGM1-CDG** – pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II), **PMM2-CDG** – pacient s poruchou ve fosfomannomustase (typ I), **Man1B1-CDG** – pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II), **RFT1-CDG** – pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I), **CDG IIx** – pacient s CDG typu II, **ATP6AP1-CDG**- pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 4 měření.*

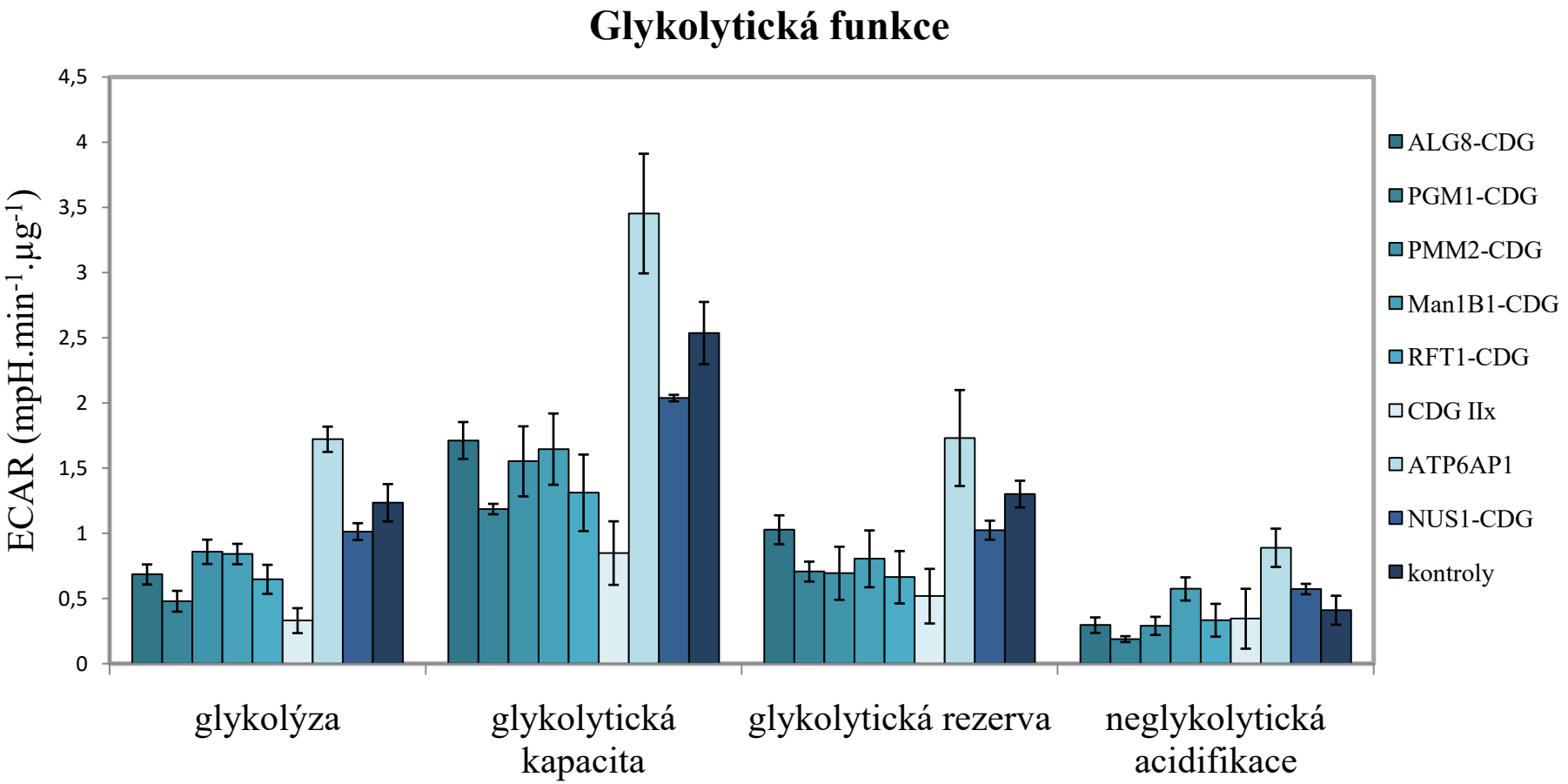
4.4.2 Glykolytická funkce buněk

Pro vyhodnocení glykolytické funkce buněk byly ze získaných naměřených hodnot vypočteny následující parametry: glykolýza, glykolytická kapacita, glykolytická rezerva a neglykolytická acidifikace fibroblastů z 2 NUS1-CDG pacientů, 3 kontrol a dalších vybraných typů CDG (ALG8-CDG, PGM1-CDG, PMM2-CDG, PMM2-CDG, RFT1-CDG, CDG IIx, ATP6AP1-CDG). Výsledné hodnoty jsou zobrazeny na Obr. 4.16 na následující straně. Základní data jsou uvedena v Tab. 8.9 v příloze 8.3 na straně 91.

Z grafu na Obr. 4.16 na straně 61 je viditelná odlišnost vypočtených parametrů u NUS1-CDG oproti kontrolám a i ostatním vzorkům CDG pacientů. Oproti kontrolám je viditelný pokles glykolýzy, glykolytické kapacity i glykolytické rezervy. Oproti většině CDG pacientů (kromě ATP6AP1-CDG) jsou všechny parametry zvýšené. Z grafu taktéž vyplývá, že u NUS1-CDG je zvýšená neglykolytická acidifikace oproti kontrolám i většině vzorků CDG.

Výrazně odlišný oproti všem ostatním je ATP6AP1-CDG, který má všechny hodnoty velmi zvýšené. Oproti tomu CDG IIx má výrazně sníženou glykolýzu, glykolytickou kapacitu i glykolytickou rezervu.

U všech ostatních typů CDG lze obecně říct, že mají sníženou glykolýzu, glykolytickou kapacitu i glykolytickou rezervu oproti kontrolám.



Obr. 4.16: Glykolytická funkce buněk analyzovaná na přístroji Seahorse XFe24,(Agilent)*: Graf závislosti míry extracelulární acidifikace prostředí vytvořené buňkami na čase.* ***ECAR*** *– míra extracelulární acidifikace prostředí vytvořená buňkami,* ***NUS1-CDG*** *- pacient s poruchou v NogoB-receptoru,* ***ALG8-CDG*** *– pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase(typ I),* ***PGM1-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II),* ***PMM2-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfomannomustase(typ I),* ***Man1B1-CDG*** *– pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II),* ***RFT1-CDG*** *– pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I),* ***CDG IIx*** *– pacient s CDG typu II,* ***ATP6AP1-CDG*** *- pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 4 měření.*

5 Diskuze

Cílem předkládaná práce bylo zavést novou diagnostickou metodu vzácných dědičných poruch glykosylace do laboratorní praxe. Důležitým parametrem pro diagnostiku určitého typu CDG byl zvolen poměr obsahu D18/D19 v moči, a jak se následně ukázalo, taktéž i v tkáních. Tuto metodu jsme se dále snažili zpřesnit různými parametry a vyšetřováním závislosti tohoto poměru u kontrol na věku či pohlaví.

Poměr S/N (signál/šum z angl. „signal/noise“) pro referenci D18 byl u všech vyhodnocených vzorků vyšší než 10. Kontrola kvantitativnosti získaných dat uvádí hodnotu S/N nad 10 a pro kvalitativní analýzu uvádí, že poměr S/N musí být nad hodnotu 3 [89]. Tato hodnota poměru S/N pro D18 nad 10 byla podmínkou pro použitelnost změřených dat k vyhodnocení.

Při analýze grafu na Obr. 4.3 na straně 46 si můžeme povšimnout mírného poklesu poměru v závislosti na prodlužující se době mezi odběrem a zamražením vzorku moči. Avšak po odborném statistickém zpracování bylo z dat jasné, že poměr D18/D19 v analyzovaném souboru není významně závislý na době zamražení. Dále je nutné podotknout, že výrazný vliv na měření této závislosti měla intenzita signálu. Ta se s narůstající dobou zamražení postupně zvyšovala. Nejspíše je to důsledek toho, že ponechání vzorku moči při laboratorní teplotě delší dobu má pozitivní vliv na následnou extrakci lipidů a tím i dolicholů. Pro zpřesnění by bylo však vhodné rozšířit soubor analyzovaných vzorků s rozdílnou dobou zamražení a taktéž se více zaměřit na ovlivnění poměru D18/D19 v závislosti na intenzitě získaného signálu.

Nebyla zjištěna významná závislost poměru D18/D19 na pohlaví (Obr. 4.4 a Obr. 4.5 na str. 47). Tento výsledek nám zjednodušuje práci do budoucna, neboť nebude muset být brán zřetel na pohlaví při diagnostickém vyšetření potencionálních pacientů.

Po statistickém zpracování dat pomocí lineární rovnice popsané v kapitole: 3.2.1.5 na straně 31 byla prokázána významná závislost poměru D18/D19 na věku.

Měření u dvou pacientů s podezřením na CDG vykázalo větší odchylku od věkově odpovídajících hodnot. Jedná se v prvním případě o dívku s autismem, poruchou řeči, poruchou psychomotorického vývoje, mikrocefalií, epilepsií a atrofií optického nervu.

V druhém případě jde o roční dívku s kardiomyopatií a s pozitivní rodinnou anamnézou. Tito pacienti byli navrženi pro další studii a vyšetření.

SRD5A3-CDG a DPATG1-CDG vzorky bohužel neprokázaly dostatečnou odlišnost od kontrol a proto nelze spoléhat na možnost diagnostiky těchto poruch v genech důležitých jak pro biosyntézu dolicholu (*SRD5A3*) tak i jeho metabolismus (*DPAGT1*) pomocí předkládané analýzy dolicholu na tandemovém hmotnostním spektrometru. Bude nutné rozšířit soubor pozitivních kontrol ve spolupráci se zahraničními výzkumnými laboratořemi.

U NUS1-CDG je vidět významný rozdíl hodnoty poměru D18/D19 oproti kontrolám i při započtení závislosti tohoto poměru na věku.

Pro zjednodušení této diagnostické metody a následného vyhodnocování byly získané hodnoty poměru D18/D19 rozděleny do věkových kategorií, a to do kategorie ve věku ≤1 roku, 1-6 let, 6-18 let a nad 18 let. Získaná rozmezí tak mohou posloužit pro budoucí diagnostické potřeby, ale taktéž mohou sloužit pro výzkum a hledání dalších možných genů, jejichž poruchy by se mohly projevit pozměněním poměru oproti kontrolám.

Graf zobrazený na Obr. 4.8 na straně 50 byl vytvořen hlavně pro znázornění významného rozdílu poměru D18/D19 u NUS1-CDG pacienta a všech ostatních naměřených vzorků a jeho hodnota je téměř desetkrát vyšší. Je však nutné podotknout, že zde není brán ohled na závislost poměru D18/D19 na věku a poměru dalších skupin, mohou tak být mírně zkreslené. Například je zde mírně zvýšen poměr D18/D19 u zdravého heterozygotního přenašeče mutace v *NUS1* genu, který nemá žádné klinické příznaky a je sourozencem dvou homozygotních pacientů se stejnou mutací v *NUS1* genu. Dále se může zdát mírně zvýšený poměr u SRD5A3-CDG pacienta. Avšak podíváme-li se na graf na Obr. 4.6 na straně 48, kde je uvedena i závislost na věku, je dobré zmínit, že hodnoty pro tyto poruchy spadají do rozmezí kontrolních hodnot a tito pacienti tedy touto metodou nejsou zachytitelní. Stejně tak i zanikne odlišnost hodnoty poměru u heterozygotního přenašeče mutace v *NUS1* genu.

Podíváme-li se na Obr. 4.10 na straně 53, můžeme potvrdit hypotézu, že poměry D18/D19 jsou u NUS1-CDG pacientů i v různých tkáních odlišné oproti kontrolám podobně, jak je tomu i u vzorků moči. Ve tkáních jsou však mezi těmito poměry rozdíly. Překvapujícím zjištěním je, že největší rozdíl těchto poměrů mezi NUS1-CDG a kontrolami je právě

v srdci, neboť podíváme-li se na klinické příznaky pacientů, není zde zaznamenáno žádné postižení srdce [57]. Je tedy otázkou do budoucna, jak důležitou roli hraje dolichol v srdeční tkáni.

U mozkové kůry naopak víme, že dolichol a celkově lipidy jsou zastoupeny ve velkém množství a hrají zde velice důležitou roli [10]. Je vidět ve srovnání se srdcem menší rozdíl mezi NUS1-CDG a kontrolami, avšak stále je velmi významný. To, že dolichol hraje v mozkové kůře důležitou roli, je i dokazatelné z klinických příznaků, kde porucha jeho biosyntézy vede k mikrocefalii a mentální retardaci [57]. U našich 2 pacientů s NUS1-CDG se rozvinula mikrocefalie a rezistentní epilepsie. Histologické nálezy v mozkové tkáni pacienta potvrdily nespecifickou ztrátu neuronů v mozkové kůře a mozečku [57].

U kosterního svalu byl rozdíl poměrů druhý největší v námi testovaných tkáních a z klinických příznaků NUS1-CDG pacientů, mezi které patří svalová hypotonie [57], můžeme soudit, že i ve svalech hraje dolichol významnou roli a je nezastupitelný.

V játrech byl rozdíl poměrů D18/D19 u kontrol a NUS1-CDG pacientů nejmenší, avšak stále výrazný. Role dolicholu v játrech je jistě také velice důležitá a to hlavně z důvodu potřeby glykosylace. Ve fibroblastech od NUS1-CDG pacientů byla zjištěna (kromě snížené hladiny dolicholu) i zvýšená akumulace volného cholesterolu [57].

Tato práce dokazuje, že předkládaná metoda může sloužit dále jako metoda diagnostická, avšak přesná diagnostika se dá s jistotou ukázat jen u pacientů NUS1-CDG. Další literatura ukazuje, že je tato metoda použitelná i pro diagnostiku pacientů s poruchou dehydrodolicholdifosfatsynthasy DHDDS-CDG [65, 90].

Bohužel však se tato metoda ukázala jako nespecifická pro diagnostiku pacientů trpících poruchou SRD5A3-CDG a DPAGT1-CDG. Oba enzymy, jejichž poruchy způsobují toto onemocnění, jsou sice zapojeny v metabolismu či biosyntéze dolicholu, ale ani jeden z nich není zapojen přímo do kroku prodlužování řetězce dolicholu navazováním IPP na FPP.

U SRD5A3-CDG bylo původně předpokládáno, že jeho dysfunkce bude mít vliv na celkovou enzymovou kinetiku, což nejspíše má, ale my tyto změny nejsme schopni zachytit metodou použitou v této práci.

Z výsledků plyne, že pacienti s onemocněním NUS1-CDG mají větší množství D18, velmi snížené množství D19 a téměř žádné množství D20 v porovnání s kontrolami. Je tedy otázkou, co může způsobit tak velkou změnu ve funkčnosti celkového dolicholu, kdy je pozměněn poměr různě dlouhých řetězců. Zatím nejpravděpodobnější hypotézou je návrh, že D18 je méně stabilní v membráně a neplní tak dobře funkci oligosacharidového přenašeče.

Velkou výhodou této metody je neinvazivnost, neboť potřebným materiálem pro diagnostiku pacienta je moč. Dále nám tato metoda umožňuje poměrně snadno a rychle změřit relativní obsah dolicholu. Nevýhodou je však finanční náročnost na přístrojové vybavení.

Analýza respirace na oxygrafu je založena na měření spotřeby kyslíku v suspenzi buněk a změnách spotřeby kyslíku po přidávání různých substrátů či inhibitorů. Výstupem jsou křivky, ze kterých jsou odečteny respirační parametry. Křivky u linií buněk pacientů jsou porovnávány s kontrolními křivkami.

U pacientů NUS1-CDG je možné říct, že mají funkci respirace kožních fibroblastů srovnatelnou s kontrolními liniemi. Jediný faktor odlišný od kontrol je mírně zvýšený protonový únik, který pak snižuje poměry hodnot závislých na něm. Může nám tedy podat zprávu o tom, že efektivita využívání protonů a protonového potenciálu těmito buňkami je mírně snížená, avšak celková respirace a tedy oxidační fosforylace je normální.

Původním plánem bylo změřit respiraci linií fibroblastů u dalších pacientů CDG pro porovnání pacientů NUS1-CDG jak s kontrolami, tak s ostatními druhy CDG. Z výsledků je však patrné, že každý typ CDG má úplně jiný profil samostatně rozsáhle diskutovatelný. Není tedy v „možnostech“ a ani není cílem této práce popsat respiraci linií fibroblastů všech zbylých CDG typů. Pro příklad však může být poukázáno na několik významných změn oproti kontrolám a tedy i oproti NUS1-CDG.

Například u ATP6A1-CDG je nutné poznamenat, že průběh křivky byl velice odlišný oproti kontrolním liniím, a to většinou s hodnotami mnohem nižšími. Jak již bylo zmíněno, nejvíce je viditelný nedostatek komplexu IV při přidání rozpřahovače FCCP, kdy buňky nebyly schopné zvýšit respiraci a tedy i spotřebu kyslíku tak dobře, jako většina ostatních

linií. Dále je zde výrazně snížená aktivita elektronového transportního řetězce. Aktivita cytochrom c oxidázy (komplexu IV) je pravděpodobně snížená bez ohledu na membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně nebo ATP6AP1-CDG fibroblasty mají snížené množství mitochondriální masy vztažené na celkový protein. Je tedy možné, že mitochondriální metabolismus není patologický, ale organel je v buňce méně. Pro potvrzení této hypotézy však bude potřeba udělat další analýzu.

Dále Man1B1-CDG je velice zajímavým příkladem. Z naměřených hodnot vyplývá, že má sníženou stimulaci respirace po přidání ADP, což může poukazovat na defekt ATP-synthasy. Taktéž většina dalších hodnot je velmi snížená oproti kontrolám, ale také i oproti většině CDG pacientů. Například hodnoty závislé na komplexu I a komplexu II jsou snížené. Z těchto dat souhrnně vyplývá, že Man1B1-CDG má celkově velmi sníženou oxidační fosforylaci v buňkách s nedostatečnou funkcí elektronového transportního řetězce. Ukazuje nám to však, že komplexy I a II a elektronový transportní řetězec jsou v závislosti na celkové oxidační fosforylaci poměrově srovnatelné.

Analýza na přístroji *Seahorse XFe24* nám posloužila dvojím způsobem. Pomocí měření oxidační fosforylace buněk bylo možné porovnávat výsledné křivky z oxygrafu s výsledky naměřenými analyzátorem *Seahorse XFe24*. Taktéž bylo možné zaznamenat případný rozdíl respirace u intaktních buněk a u buněk s permeabilizovanou cytoplazmatickou membránou po přídavku digitoninu (oxygraf). Pomocí analyzátoru *Seahorse XFe24* byla nepřímo získána i informace o schopnosti buněk přijímat substráty z vnějšího prostředí. Dále byla možnost zjistit glykolytickou funkci u pacientů s CDG, což nám dává nový pohled na tato onemocnění.

Z Obr. 4.15 na straně 59 vyplývá, že všechny měřené hodnoty u linií fibroblastů NUS1-CDG pacientů jsou oproti kontrolám snížené, kromě mírně zvýšeného protonového úniku (není tak výrazné jako je tomu u měření na oxygrafu). Maximální respirace je snížená nepatrně, což pak i snižuje rezervní respirační kapacitu, která je, podíváme-li se na procentuální zastoupení, srovnatelná s rezervní respirační kapacitou kontrolních linií. Můžeme říci, že bazální respirace buněk linie fibroblastů od NUS1-CDG pacientů je snížená a taktéž i produkce ATP není srovnatelná s kontrolami. Z toho vyplývá, že respirace vztažená na celkový protein je nižší. Rezervní respirační kapacita zůstává

u NUS1-CDG fibroblastů zachována, což může poukazovat na normální mitochondriální metabolismus, ale na sníženou mitochondriální masu v buňce, která tak zajistí menší produkci ATP na buňku.

Na Obr. 4.16 na straně 61 je graf, zobrazující glykolytickou funkci buněk za různých podmínek. NUS1-CDG pacienti mají mírně sníženou glykolýzu. Jejich celková glykolytická kapacita je taktéž snížena oproti kontrolním buňkám a to samé lze říci o glykolytické rezervě. Neglykolytická acidifikace je naopak mírné zvýšená, jejíž příčinou může být zvýšená glykogenolýza, která přispívá k acidifikaci média (vyjma glykolýzy) [91, 92]. Schopnost fibroblastů z NUS1-CDG pacientů provádět glykolýzu je tedy znatelně nižší oproti kontrolním liniím.

Podíváme-li se na ostatní pacienty CDG, můžeme říci, že pacienti CDG I mají podobný profil hodnot. Glykolýza, glykolytická kapacita i glykolytická rezerva jsou výrazně snížené oproti kontrolním vzorkům i NUS1-CDG pacientům. Schopnost glykolýzy a reakce na různé stresové situace jsou tedy u fibroblastů CDG pacientů omezené oproti kontrolním liniím.

CDG IIx má profil nejvíce snížené glykolýzy, glykolytické kapacity a tedy i glykolytické rezervy. Jeho schopnost glykolýzy by se dala popsat již jako kritická a rozhodně nedostačující.

Dále pak ATP6AP1-CDG má velice zajímavý a naprosto odlišný profil oproti všem ostatním CDG-pacientům. Můžeme si povšimnout zvýšené glykolýzy i oproti kontrolám a velké glykolytické kapacitě, ze které vyplývá i výrazná glykolytická rezerva buněk. Taktéž mají zvýšenou neglykolytickou acidifikaci, která je dána glykogenolýzou „vyžádanou“ buňkami pro získání glukosy pro glykolýzu. Tento profil pacienta je velice zajímavý a neobvyklý. Pro přesnější objasnění, proč je jeho profil tak odlišný od ostatních pacientů bude potřeba provést ještě několik analýz.

Výsledky analýzy energetického metabolismu na oxygrafu a na analyzátoru *Seahorse XFe24* nebyly u všech pacientů podobné. Je to dáno hlavně rozdílnými podmínkami, za kterých byla respirace buněk v obou přístrojích měřena. Například u NUS1-CDG nebyl při měření na oxygrafu se saturujícím množstvím substrátu zaznamenán jakýkoliv pokles či výrazný rozdíl respirace oproti kontrolám, ale u měření na přístroji *Seahorse XFe24* byla respirace intaktních buněk v médiu snížená. Nejspíše je to dáno celkovou sníženou

schopností buněk linií fibroblastů získávat potřebné substráty z vnějšího prostředí. Taktéž je nutné podotknout, že v případě měření na oxygrafu došlo k permeabilizaci cytoplazmatické membrány pomocí digitoninu. Pro analýzu na přístroji *Seahorse XFe24* se používají nativní intaktní buňky a tedy v mitochondriích pravděpodobně nebyly substráty dostupné v saturující koncentraci.

Zjištění snížené respirace je v souladu s dalšími patologickými nálezy v liniích obou pacientů s NUS1-CDG. Ve fibroblastech pacientů s NUS1-CDG byly detekován zvýšený výskyt tzv. „mega-mitochondrií“ (z angl. „giant mitochondria”) ve srovnání s kontrolou a dezintegrovaná mitochondriální síť [93].

Byly prokázány změny v expresi proteinů, které se účastní transportu vápníku, participují v kaskádě apoptosy a autofagie. Správná koncentrace vápníku je nezbytná pro správnou funkci řady mitochondriálních enzymů a navíc, její koncentrace může ovlivňovat ultrastrukturu mitochondrií v souvislosti se změnami ve funkci mitochondriálního permeabilního póru přechodné propustnosti [94]. Otázkou zůstává, zda nalezené změny jsou způsobeny sekundárně sníženou glykosylací nebo přímo nedostupností příslušných dolicholů.

Nutné je také upozornit na fakt, že ve fibroblastech se nemusí onemocnění vždy projevit. Jejich výsledné hodnoty se mohou lišit od hodnot respirace a glykolýzy buněk jiných tkání. Nicméně, fibroblasty jsou velmi snadno dostupné buňky a vzhledem k jejich snaze adherovat na povrch i dobře měřitelné na analyzátoru *Seahorse XFe24*. Výhodou je i možnost získat dostatečný počet buněk ke všem analýzám. Proto jsou stále nejčastějším používaným zdrojem buněk při diagnostice.

6 Souhrn a závěr

V této diplomové práci byla testována a zavedena do laboratoře nová diagnostická metoda pro pacienty s podezřením na dědičné poruchy glykosylace, které jsou způsobeny poruchou biosyntézy dolicholu. Analýza byla prováděna pomocí LC-MS/MS. Jedná se o neinvazivní přístup, neboť zkoumaným materiálem je snadno dostupná moč. Hlavním parametrem hodnocení byl poměr dolicholů D18/D19.

V kontrolním souboru 76 zdravých kontrol byla v moči zjištěna významná závislost poměru D18/D19 na věku a byly definovány kontrolní rozmezí pro různé věkové kategorie: ≤1 let: 0,76±0,17, 1-6 let: 0,76±16, 6-18 let: 0,62±0,16, nad 18 let: 0,56±0,12.

Závislost D18/D19 na pohlaví zjištěna nebyla.

U pacientů s NUS1-CDG byl v moči poměr D18/D19 8-10ti násobně zvýšen ve srovnání s kontrolami. Zvýšená hodnota poměru D18/D19 byla u pacientů s NUS1-CDG zjištěna i v srdci, kosterním svalu, mozkové kůře a játrech. Hodnoty těchto poměrů se lišily v závislosti na typu tkáně.

V předkládané práci byl v kultivovaných kožních fibroblastech zkoumán dopad narušené biosyntézy dolicholu na energetický metabolismus pomocí funkčních metod. Analýza spotřeby kyslíku pomocí vysoce citlivé polarografie neprokázala žádné významné změny ve srovnání s kontrolami a i dalšími typy CDG.

Analýza spotřeby kyslíku v reálném čase na přístroji *Seahorse XFe24* prokázala sníženou celkovou respiraci a glykolytickou funkci buněk s NUS1-DG ve srovnání s kontrolami a taktéž u většiny ostatních měřených typů CDG (kromě ATP6AP1-CDG).

Tato práce ukazuje na novou možnost diagnostiky pacientů se vzácnými CDG. Dává unikátní možnost zkoumat zatím ne příliš známé funkce dolicholu. Přináší nový pohled na patobiochemické souvislosti poruch glykosylace a energetického metabolismu u pacientů s CDG a to pomocí analýzy na přístrojích *Seahorse XFe24* a oxygrafu.

7 Použitá literatura

1. Cantagrel V, Lefeber DJ. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: A new class of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34:859-867.

2. Krag SS. The importance of being dolichol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243:1-5.

3. Tollbom Ö, Dallner G. Dolichol and dolichyl phosphate in human tissues. *Br J Exp Pathol*. 1986;67:757-764.

4. Buczkowska A, Swiezewska E, Lefeber DJ. Genetic defects in dolichol metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2014;38:157-169.

5. Chojnacki T, Dallner G. The biological role of dolichol. *Biochem J*. 1988;251:1-9.

6. Rip JW, Rupar CA, Ravi K, Carroll KK. Distribution, metabolism and function of dolichol and polyprenols. *Prog Lipid Res*. 1985;24:269-309.

7. Guan Z. Discovering novel brain lipids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2814-2821.

8. Rip JW, Rupar CA, Chaudhary N, Carroll KK. Localization of a dolichyl phosphate phosphatase in plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem*. 1981;256:1929-1934.

9. Elmberger PG, Engfeldt P, Dallner G. Presence of dolichol and its derivatives in human blood. *J Lipid Res*. 1988;29:1651-1662.

10. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem*. 1990;54:415-423.

11. Pallottini V, Marino M, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A. Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. *Biogerontol*. 2003;4:371-378.

12. Pullarkat RK, Reha H. Accumulation of dolichols in brains of elderly. *J Biol Chem*. 1982;257:5991-5993.

13. Kin NMKNY, Palo J, Haltia M, Wolfe LS. High levels of brain dolichols in

neuronal ceroid-lipofuscinosis and senescence. *J Neurochem*. 1983;40:1465-1473.

14. Lai CS, Schutzbach JS. Dolichol induces membrane leakage of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *FEBS Lett*. 1984;169:279-282.

15. Cavallini G, Sgarbossa A, Parentini I, Bizzarri R, Donati A, Lenci F, Bergamini E. Dolichol: A component of the cellular antioxidant machinery. *Lipids*. 2016;51:477-486.

16. Turner DC, Gruner SM. X-ray diffraction reconstruction of the inverted hexagonal (HII) phase in lipid-water systems. *Biochem*. 1992;31:1340-1355.

17. Sato M, Sato K, Nishikawa S, Hirata A, Kato J, Nakano A. The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol*. 1999;19:471-483.

18. Mills JT, Adamany AM. Impairment of dolichyl saccharide synthesis and dolichol-mediated glycoprotein assembly in the aortic smooth muscle cell in culture by inhibitors of cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem*. 1978;253:5270-5273.

19. Haeuptle MA, Pujol FM, Neupert C, Bryan Winchester B, Kastaniotis AJ, Aebi M, Hennet T. Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. *Am J Hum Genet*. 2008;82:600-606.

20. Kornfeld R. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:631-664.

21. Hennet T. From glycosylation disorders back to glycosylation: What have we learned? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792:921-924.

22. Lommel M, Strahl S. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiol*. 2009;19:816-828.

23. Rosenwald AG, Stoll J, Krag SS. Regulation of glycosylation. Three enzymes compete for a common pool of dolichyl phosphate in vivo. *J Biol Chem*. 1990;265:14544-14553.

24. Anand M, Rush JS, Ray S, Doucey MA, Weik J, Ware FE, Hofsteenge J, Waechter CJ, Lehrman MA. Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol Biol Cell*. 2001;12:487-501.

25. Maeda Y, Tanaka S, Hino J, Kangawa K, Kinoshita T. Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3. *EMBO J*. 2000;19:2475-2482.

26. Maeda Y, Kinoshita T. Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2008;1780:861-868.

27. Swiezewska E, Danikiewicz W. Polyisoprenoids: structure, biosynthesis and function. *Prog Lipid Res*. 2005;44:235-258.

28. Rush JS, Cho SK, Jiang S, Hofmann SL, Waechter CJ. Identification and characterization of a cDNA encoding a dolichyl pyrophosphate phosphatase located in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem*. 2002;277:45226-45234.

29. Shridas P, Rush JS, Waechter CJ. Identification and characterization of a cDNA encoding a long-chain cis-isoprenyltranferase involved in dolichyl monophosphate biosynthesis in the ER of brain cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:1349-1356.

30. Harrison KD, Park EJ, Gao N, Kuo A, Rush JS, Waechter CJ, Lehrman MA, Sessa WC. Nogo-B receptor is necessary for cellular dolichol biosynthesis and protein N-glycosylation. *EMBO J*. 2011;30:2490-2500.

31. Harrison KD, Miao RQ, Fernandez-Hernándo C, Suárez Y, Dávalos A, Sessa WC. Nogo-B receptor stabilizes Niemann-Pick type C2 protein and regulates Intracellular cholesterol trafficking. *Cell Metab*. 2009;10:208-218.

32. Wedgwood JF, Strominger JL. Enzymatic activities in cultured human lymphocytes that dephosphorylate dolichyl pyrophosphate and dolichyl phosphate. *J Biol Chem*. 1980;255:1120-1123.

33. Wolf MJ, Rush JS, Waechter CJ. Golgi-enriched membrane fractions from rat brain

and liver contain long-chain polyisoprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *Glycobiol*. 1991;1:405-410.

34. Schenk B, Fernandez F, Waechter CJ. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiol*. 2001;11:61-70.

35. Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Biels SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E, De Brouwer AP, Blümel P, Sykut-Cegielska J, Houliston S, Swistun D, Ali BR, Dobyns WB, Babovic-Vuksanovic D, van Bokhoven H, Wevers RA, Raetz CR, Freeze HH, Morava E, Al-Gazali L, Gleeson JG. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*. 2010;142:203-217.

36. Rosenwald a G, Krag SS. Lec9 CHO glycosylation mutants are defective in the synthesis of dolichol. *J Lipid Res*. 1990;31:523-533.

37. Ekström TJ, Chojnacki T, Dallner G. The alpha-saturation and terminal events in dolichol biosynthesis. *J Biol Chem*. 1987;262:4090-4097.

38. Sagami H, Kurisaki A, Ogura K. Formation of dolichol from dehydrodolichol is catalyzed by NADPH-dependent reductase localized in microsomes of rat liver. *J Biol Chem*. 1993;268:10109-10113.

39. Uemura M, Tamura K, Chung S, Honma S, Okuyama A, Nakamura Y, Nakagawa H. Novel 5α-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci*. 2008;99:81-86.

40. Shridas P, Waechter CJ. Human dolichol kinase, a polytopic endoplasmic reticulum membrane protein with a cytoplasmically oriented CTP-binding site. *J Biol Chem*. 2006;281:31696-31704.

41. Carson DD, Earles BJ, Lennarz WJ. Enhancement of protein glycosylation in tissue slices by dolichylphosphate. *J Biol Chem.* 1981;256:11552-11557.

42. Heller L, Orlean P, Adair WL. *Saccharomyces cerevisiae* sec59 cells are deficient in dolichol kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:7013-7016.

43. Heesen S te, Lehle L, Weissmann A, Aebi M. Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 1994;224:71-79.

44. Rush JS, Gao N, Lehrman MA, Waechter CJ. Recycling of dolichyl monophosphate to the cytoplasmic leaflet of the endoplasmic reticulum after the cleavage of dolichyl pyrophosphate on the lumenal monolayer. *J Biol Chem*. 2008;283:4087-4093.

45. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *BBA - Mol Basis Dis*. 1995;1271:195-204.

46. Grünler J, Ericsson J, Dallner G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1994;1212:259-277.

47. Jayaraman J, Ramasarma T. Intracellular distribution of coenzyme q in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1963;103:258-266.

48. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2004;1660:171-199.

49. Ferreira CR, Altassan R, Marques-Da-Silva D, Francisco R, Jaeken J, Morava E. Recognizable phenotypes in CDG. *J Inherit Metab Dis*. 2018;10:1-13

50. Hennet T, Cabalzar J. Congenital disorders of glycosylation: A concise chart of glycocalyx dysfunction. *Trends Biochem Sci*. 2015;40:377-384.

51. Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792:825-826.

52. Matthijs G. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation : an updated nomenclature for CDG. *Glycoconj J*. 1999;16:669-671.

53. Babovic-Vuksanovic D, O'Brien JF. Laboratory diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I by analysis of transferrin glycoforms. *Mol Diagn Ther*. 2007;11:303-311.

54. Stibler H, Jaeken J. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic

hereditary syndrome. *Arch Dis Child*. 1990;65:107-111.

55. Ondrušková N, Honzík T, Kytnarová J, Matoulek M, Zeman J, Hansíková H. Isoelectric focusing of serum apolipoprotein C-III as a sensitive screening method for the detection of O-glycosylation disturbances. *Prague Med Rep*. 2015;116:73-86.

56. Miao RQ, Gao Y, Harrison KD, Prendergast J, Acevedo LM, Yu J, Hu F, Strittmatter SM, Sessa WC. Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10997-11002.

57. Park EJ, Grabińska KA, Guan Z, Stránecký V, Hartmannová H, Hodaňová K, Barešová V, Sovová J, Jozsef L, Ondrušková N, Hansíková H, Honzík T, Zeman J, Hůlková H, Wen R, Kmoch S, Sessa WC. Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation. *Cell Metab*. 2014;20:448-457.

58. Eckharter C, Junker N, Winter L, Fischer I, Fogli B, Kistner S, Pfaller K, Zheng B, Wiche G, Klimaschewski L, Schweigreiter R. Schwann cell expressed Nogo-B modulates axonal branching of adult sensory neurons through the Nogo-B receptor NgBR. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:1-15

59. Park EJ, Grabinska KA, Guan Z, Sessa WC. NgBR is essential for endothelial cell glycosylation and vascular development. *EMBO Rep*. 2016;17:167-177.

60. Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1997;14:2079-2089.

61. Szafranski P, Von Allmen GK, Graham BH, Wilfong AA, Kang SH, Ferreira JA, Upton SJ, Moeschler JB, Bi W, Rosenfeld JA, Shaffer LG, Wai Cheung S, Stankiewicz P, Lalani SR. 6q22.1 microdeletion and susceptibility to pediatric epilepsy. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:173-179.

62. Denecke J, Kranz C. Hypoglycosylation due to dolichol metabolism defects. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792:888-895.

63. Zelinger L, Banin E, Obolensky A, Mizrahi-Meissonnier L, Beryozkin A, Bandah-Rozenfeld D, Frenkel S, Ben-Yosef T, Merin S, Schwartz SB, Cideciyan AV, Jacobson SG, Sharon D. A missense mutation in DHDDS, encoding dehydrodolichyl diphosphate synthase, is associated with autosomal-recessive retinitis pigmentosa in ashkenazi jews. *Am J Hum Genet*. 2011;88:207-215.

64. Wen R, Dallman JE, Li Y, Züchner SL, Vance JM, Peričak-Vance MA, Lam BL. Knock-down DHDDS expression induces photoreceptor degeneration in zebrafish. *Adv Exp Med Biol*. 2014;801:543-550.

65. Wen R, Lam BL, Guan Z. Aberrant dolichol chain lengths as biomarkers for retinitis pigmentosa caused by impaired dolichol biosynthesis. *J Lipid Res*. 2013;54:3516-3522.

66. Morava E, Wevers RA, Cantagrel V, Hoefsloot LH, Al-Gazali L, Schoots J, van Rooij A, Huijben K, van Ravenswaaij-Arts CM, Jongmans MC, Sykut-Cegielska J, Hoffmann GF, Bluemel P, Adamowicz M, van Reeuwijk J, Ng BG, Bergman JE, van Bokhoven H, Körner C, Babovic-Vuksanovic D, Willemsen MA, Gleeson JG, Lehle L, de Brouwer AP, Lefeber DJ. A novel cerebello-ocular syndrome with abnormal glycosylation due to abnormalities in dolichol metabolism. *Brain*. 2010;133:3210-3220.

67. Kahrizi K, Hu CH, Garshasbi M, Abedini SS, Ghadami S, Kariminejad R, Ullmann R, Chen W, Ropers HH, Kuss AW, Najmabadi H, Tzschach A. Next generation sequencing in a family with autosomal recessive Kahrizi syndrome (OMIM 612713) reveals a homozygous frameshift mutation in SRD5A3. *Eur J Hum Genet*. 2011;19:115-117.

68. Kranz C, Jungeblut C, Denecke J, Erlekotte A, Sohlbach C, Debus V, Kehl HG, Harms E, Reith A, Reichel S, Grobe H, Hammersen G, Schwarzer U, Marquardt T. A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy. *Am J Hum Genet*. 2007;80:433-440.

69. Kikuno R, Nagase T, Ishikawa KI, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which

code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 1999;6:197-205.

70. Lefeber DJ, de Brouwer APM, Morava E, Riemersma M, Schuurs-Hoeijmakers JH, Absmanner B, Verrijp K, van den Akker WM, Huijben K, Steenbergen G, van Reeuwijk J, Jozwiak A, Zucker N, Lorber A, Lammens M, Knopf C, van Bokhoven H, Grünewald S, Lehle L, Kapusta L, Mandel H, Wevers RA. Autosomal recessive dilated cardiomyopathy due to DOLK mutations results from abnormal dystroglycan O-mannosylation. *PLoS Genet*. 2011;7:1-10

71. Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grunewald S, Bailie NM, King MD, Jaeken J, Matthijs G, Berger EG, Aebi M, Hennet T. Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J Clin Invest*. 2000;105:233-239.

72. García-Silva MT, Matthijs G, Schollen E, Cabrera JC, Sanchez del Pozo J, Martí Herreros M, Simón R, Maties M, Martín Hernández E, Hennet T, Briones P. Congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ie. A new patient. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27:591-600.

73. Barone R, Aiello C, Race V, Morava E, Foulquier F, Riemersma M, Passarelli C, Concolino D, Carella M, Santorelli F, Vleugels W, Mercuri E, Garozzo D, Sturiale L, Messina S, Jaeken J, Fiumara A, Wevers RA, Bertini E, Matthijs G, Lefeber DJ. DPM2-CDG: A muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. *Ann Neurol*. 2012;72:550-558.

74. Lefeber DJ, Schönberger J, Morava E, Guillard M, Huyben KM, Verrijp K, Grafakou O, Evangeliou A, Preijers FW, Manta P, Yildiz J, Grünewald S, Spilioti M, van den Elzen C, Klein D, Hess D, Ashida H, Hofsteenge J, Maeda Y, van den Heuvel L, Lammens M, Lehle L, Wevers RA. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet*. 2009;85:76-86.

75. Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond GV, Hurvitz H, Korn-Lubetzki I, Revel-Vik S, Raas-Rotschild A, Luder AS, Jaeken J, Berger EG, Matthijs G, Hennet T, Aebi M. MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If. *J Clin Invest*.

2001;108:1687-1695.

76. Yuste-Checa P, Vega AI, Martin-Higueras C, Medrano C, Gámez A, Desviat LR, Ugarte M, Pérez-Cerdá C, Pérez B. DPAGT1-CDG: Functional analysis of diseasecausing pathogenic mutations and role of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 2017;12:1-13

77. Jaeken J, Lefeber D, Matthijs G. Clinical utility gene card for: DPAGT1 defective congenital disorder of glycosylation. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:1-3.

78. Kalén A, Söderberg M, Elmberger PG, Dallner G. Uptake and metabolism of dolichol and cholesterol in perfused rat liver. *Lipids*. 1990;25:93-99.

79. Jakobsson Å, Swiezewska E, Chojnacki T, Dallner G. Uptake and modification of dietary polyprenols and dolichols in rat liver. *FEBS Lett*. 1989;255:32-36.

80. Chojnacki T, Dallner G. The uptake of dietary polyprenols and their modification to active dolichols by the rat liver. *J Biol Chem*. 1983;258:916-922.

81. Konrad M, Merz WE. Long-term effect of cyclic AMP on N-glycosylation is caused by an increase in the activity of the cis-prenyltransferase. *Biochem J*. 1996;316:575-581.

82. Banerjee DK. Requirement of protein kinase type I for cAMP-mediated up-regulation of lipid-linked oligosaccharide for asparagine-linked protein glycosylation. *Cell Mol Biol*. 2007;53:55-63.

83. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-917.

84. Garrett TA, Guan Z, Raetz CRH. Analysis of ubiquinones, dolichols, and dolichol diphosphate-oligosaccharides by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 2007;432:117-143.

85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.

86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal*

Biochem. 1976;72:248-254.

87. Benoit B. Agilent Seahorse XF glycolysis stress test kit user guide. *Agilent*. 2017:1-24

88. Benoit B. Cell mito stress test kit user manual. *Agilent*. 2011:1-47

89. Mičová K, Friedecký D, Faber E, Polýnková A, Adam T. Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1957-1962.

90. Sabry S, Vuillaumier-Barrot S, Mintet E, Fasseu M, Valayannopoulos V, Héron D, Dorison N, Mignot C, Seta N, Chantret I, Dupré T, Moore SE. A case of fatal type i congenital disorders of glycosylation (CDG I) associated with low dehydrodolichol diphosphate synthase (DHDDS) activity. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:1-14

91. Pike Winer LS, Wu M. Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate. *PLoS One*. 2014;9:1-14

92. Araujo L, Khim P, Mkhikian H, Mortales CL, Demetriou M. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *Elife*. 2017;6:1-16

93. Hansikova H, Rodinova M, Ondruskova N, Krizova J, Zdrazilova L, Baresova V, Hulkova H, Kmoch S, Langer J, Honzik T, Tesarova M, Zeman J, Hansikova H. Mitochondrial impairment in Nogo-B receptor deficiency. *FEBS J*, 2017;284:137-137

94. Rodinova M, Ondruskova N, Krizova J, Zdrazilova L, Baresova V, Hulkova H, Kmoch S, Langer J, Honzik T, Tesarova M, Zeman J. Impact of Nogo-B receptor deficiency to mitochondrial ultrastructure and bioenergetics. *International Scientific CDG Symposium on Congenital Disorders of Glycosylation and related disorders*. 2017*, Leuven, Belgium*

8 Přílohy

8.1 Naměřené hodnoty dolicholů pomocí metody LC-MS/MS

Tab. 8. 1: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholu u kontrolních vzorků žen v bezrozměrných jednotkách.

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K1	F	9	913	5236	11357	4856	0,46
K2	F	57	3852	27761	59318	30409	0,47
K3A	F	29	13918	86450	208070	93535	0,42
K3B	F	29	1665	8670	12881	3331	0,67
K3C	F	29	1745	8577	11866	3119	0,72
K4A	F	3	2190	17611	21693	2034	0,81
K4B	F	3	2327	10767	12206	2147	0,88
K5	F	45	125	943	1321	335	0,71
K6	F	31	12958	82796	197530	85878	0,42
K7A	F	52	2281	13534	22497	5771	0,60
K7B	F	52	3711	22075	38786	11420	0,57
K8A	F	18	921	4408	9102	3729	0,48
K8B	F	18	2652	13030	27854	10173	0,47
K9A	F	14	3741	23054	39660	12999	0,58
K9B	F	14	7743	43929	72091	24998	0,61
K10A	F	19	1248	6597	9121	2307	0,72
K10B	F	19	832	4666	5879	1463	0,79
K11A	F	2	250	756	1050	380	0,72
K11B	F	2	198	578	861	194	0,67
K12A	F	16	1151	4808	5547	1366	0,87
K12B	F	16	1305	5144	7131	1968	0,72
K13	F	30	162	471	976	507	0,48
K14	F	28	2703	17429	42839	19695	0,41
K15A	F	1	232	869	1402	549	0,62
K15B	F	1	180	592	574	214	1,03
K16	F	51	10545	67872	175690	83349	0,39
K17A	F	18	347	1406	3135	1487	0,45
K17B	F	18	4375	25260	57375	24259	0,44
K18	F	9	1755	11535	27042	12145	0,43
K19	F	2	1966	12178	27125	10989	0,45
K20A	F	48	5597	32309	65262	25251	0,50

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K20B	F	48	5753	34319	60449	22802	0,57
K21A	F	43	1287	5383	7640	2406	0,70
K21B	F	43	1523	7135	11078	3091	0,64
K22A	F	7	3196	16669	23166	5656	0,72
K22B	F	7	2895	15203	20202	5067	0,75
K23	F	22	3176	16544	42403	22487	0,39
K24	F	8	1115	5991	13018	5854	0,46
K25A	F	43	3264	21673	36057	10406	0,60
K25B	F	43	8436	51295	98863	34138	0,52
K26	F	30	3307	24135	57544	26543	0,42
K27A	F	43	3050	16346	29470	8686	0,55
K27B	F	43	2794	14954	25270	8171	0,59
K27A	F	43	3050	16346	29470	8686	0,55
K27B	F	43	2794	14954	25270	8171	0,59
K28A	F	48	2141	9733	14673	4370	0,66
K28B	F	48	3050	16141	29023	8525	0,56

***D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami, **F** – ženy.*

Tab. 8. 2: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholu u kontrolních vzorků mužů v bezrozměrných jednotkách.

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K1A	M	4	7579	40301	64903	20568	0,62
K1B	M	4	6286	32922	54443	16829	0,60
K2A	M	15	3131	16638	24874	12546	0,67
K2B	M	15	2911	16332	22771	5984	0,72
K3A	M	32	4690	23701	48248	17586	0,49
K3B	M	32	3044	11009	17818	6178	0,62
K4A	M	81	2182	10993	18848	6844	0,58
K4B	M	81	2885	13628	22999	8598	0,59
K5	M	10	4917	31255	69040	29007	0,45
K6A	M	1měs	1883	8105	11389	3735	0,71
K6B	M	1měs	2287	10744	14518	4081	0,74
K7A	M	13	1172	6416	10708	3791	0,60
K7B	M	13	737	4501	7054	2723	0,64
K8A	M	7 měs	722	2747	2517	713	1,09
K8B	M	7měs	844	2804	2679	614	1,05
K9A	M	13	4184	22928	29947	8327	0,77
K9B	M	13	5052	23187	31442	8064	0,74
K10A	M	6	5654	31344	49108	14934	0,64
K10B	M	6	5995	34520	53248	16494	0,65
K11A	M	34	7486	36515	70636	21172	0,52
K11B	M	34	9260	49303	95212	37227	0,52
K12A	M	8	1580	10063	20071	8488	0,50

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K12B	M	8	5971	26640	29543	5446	0,90
K13A	M	33	671	3386	4162	1139	0,81
K13B	M	33	899	3640	5188	1002	0,70
K14A	M	15	7022	34291	64829	26391	0,53
K14B	M	15	7325	36745	65551	25460	0,56
K15	M	14	5688	30721	68899	28963	0,45
K16A	M	21	402	1947	4137	1657	0,47
K16B	M	21	351	2287	4586	2208	0,50
K17A	M	8	485	1988	2436	584	0,82
K17B	M	8	408	1507	1911	444	0,79
K18A	M	7	1428	6148	7357	2143	0,84
K18B	M	7	2523	15915	22988	6133	0,69
K19A	M	41	4691	17619	27669	8755	0,64
K19B	M	41	4576	18224	29090	8927	0,63
K20A	M	10	3317	21476	46382	20205	0,46
K20B	M	10	3830	24210	53983	23337	0,45
K21A	M	2měsíce	1362	5757	6799	1691	0,85
K21B	M	2měsíce	1204	5838	7026	1915	0,83
K22	M	40	53800	339790	848430	502270	0,40
K23A	M	58	1006	4889	10323	4064	0,47
K23B	M	58	1628	9321	21142	6969	0,44
K24A	M	19	2650	13697	22678	7373	0,60
K24B	M	19	2755	12066	18191	5319	0,66
K25A	M	7měsíců	129	574	709	263	0,81
K25B	M	7měsíců	1038	6487	10086	3757	0,64
K26A	M	20	1798	7382	12852	4567	0,57
K26B	M	20	2731	14238	28252	10683	0,50
K27A	M	10	16110	78191	122990	34018	0,64
K27B	M	10	16037	81290	121900	36695	0,67
K28A	M	7	7780	47660	101810	40709	0,47
K28B	M	11	5371	28960	48922	12682	0,59
K29A	M	11	2481	12440	19742	5315	0,63
K29B	M	11	3863	18370	27846	9506	0,66
K29C	M	11	2634	12250	21271	6828	0,58
K30A	M	25	1014	4646	5503	1366	0,84
K30B	M	25	1438	5664	7830	1895	0,72
K31A	M	6	314	885	1046	206	0,85
K31B	M	6	162	689	646	61	1,07
K32A	M	4	3442	14974	19219	4925	0,78
K32B	M	4	2660	12254	16618	4315	0,74
K33A	M	2	7559	41097	55898	16199	0,74
K33B	M	2	6638	37503	54867	14432	0,68
K34	M	17	489	2103	5044	2545	0,42
K35A	M	3	2571	8719	9116	1911	0,96

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K35B	M	3	2141	6925	6174	1414	1,12
K35C	M	3	3341	16610	23576	7864	0,70
K35D	M	3	2802	13970	21978	6523	0,64
K36A	M	2 měsíce	800	5028	8683	3648	0,58
K36B	M	2 měsíce	776	4438	8193	2753	0,54
K37A	M	1	4141	19380	22689	4141	0,85
K37B	M	1	4361	19039	23049	4170	0,83
K37C	M	1	4010	21728	32054	8747	0,68
K37D	M	1	4145	25105	40275	12546	0,62
K38A	M	22	5830	32078	54307	17919	0,59
K38B	M	22	6572	34201	64743	20319	0,53
K39A	M	3	3786	16128	16771	3002	0,96
K39B	M	3	2056	9591	10153	1523	0,94
K40A	M	1	564	2537	2608	594	0,97
K40B	M	1	749	3378	3737	719	0,90
K41A	M	1	1584	9217	13725	2453	0,67
K41B	M	1	1812	8782	14222	4020	0,62
K42A	M	47	83	529	1216	691	0,44
K42B	M	47	2426	15083	34228	17045	0,44
K43A	M	74	2032	10549	23180	9302	0,46
K43B	M	74	2961	17549	34081	13014	0,51
K44	M	2	850	3394	6642	3089	0,51
K45	M	39	1256	5858	14339	7458	0,41
K46A	M	2	3143	13809	18310	4761	0,75
K46B	M	2	4352	19521	26678	8126	0,73
K47	M	22	4323	24706	50226	24394	0,49

D17-D20 *- dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami,* ***M*** *- muži.*

Tab. 8.3: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů u vzorků pro analýzu stability moči v bezrozměrných jednotkách.

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K11A	F	23	400	2588	2687	622	0,96
K11B	F	23	412	1810	2679	659	0,68
K21A	F	23	1028	5733	7478	2089	0,77
K21B	F	23	1475	8626	10728	2598	0,80
K15A	F	23	1056	4842	8309	2986	0,58
K15B	F	23	990	4994	8189	2347	0,61
K25A	F	23	751	4665	6133	1246	0,76
K25B	F	23	978	5842	11122	2374	0,53
K124A	F	23	1479	7988	14704	4347	0,54
K124B	F	23	1903	11654	22204	7050	0,52
K224A	F	23	5086	36109	64287	17959	0,56
K24B	F	23	3149	20997	33379	9689	0,63
K31A	F	23	629	5462	1456	545	3,75

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
K31B	F	23	663	4917	5709	2266	0,86
K35A	F	23	1022	5739	4125	1521	1,39
K35B	F	23	11325	83053	158640	59538	0,52
K324A	F	23	11208	72159	140180	50064	0,51
K324B	F	23	675	4630	4633	1693	1,00
K41A	M	23	2695	12379	19004	6092	0,65
K41B	M	23	2794	13900	18149	5547	0,77
K45A	M	23	2497	13026	17550	4927	0,74
K45B	M	23	2671	15772	23584	7058	0,67
K424A	M	23	2418	12630	19606	5737	0,64
K424B	M	23	2262	11829	17849	4899	0,66
K51A	F	28	2503	13268	20390	5764	0,65
K51B	F	28	1923	8517	11074	3586	0,77
K55A	F	28	2331	11898	17847	5440	0,67
K55B	F	28	2293	10809	15200	4137	0,71
K524A	F	28	2186	10545	16307	4226	0,65
K524B	F	28	2069	9599	13018	3624	0,74

***D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami, **F** – ženy, **M** – muži.*

Tab. 8.4: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů u vzorků moči pacientů s podezřením na dědičné poruchy glykosylace v bezrozměrných jednotkách.

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
1A	M	6 měsíců	1192	4147	4836	1127	0,86
1B	M	6 měsíců	691	2226	2287	507	0,97
2A	M	16	4270	21773	29232	4400	0,74
2B	M	16	3979	11026	12666	3307	0,87
3A	M	2	1576	8362	16653	7264	0,50
3B	M	2	1190	6672	13276	5119	0,50
4A	M	9	1653	54140	126170	6838	0,43
4B	M	9	1729	42396	99826	7733	0,42
5A	M	13	9541	65610	131345	56334	0,50
5B	M	13	6131	35339	70366	30052	0,50
6A	M	5	11938	71600	162770	74808	0,44
6B	M	5	8739	54846	124100	56641	0,44
7A	M	7	222	1224	1426	444	0,86
7B	M	7	351	1321	2024	533	0,65
8A	F	1	8210	60657	120210	51188	0,50
8B	F	1	5781	48761	100730	41296	0,48
9A	M	15	865	3693	4606	1228	0,80
9B	M	15	725	2582	2964	711	0,87
10A	F	4	3552	28491	55993	22064	0,51
10B	F	4	4651	28557	59498	24804	0,48
10C	F	4	4610	31349	65910	28899	0,48
10D	F	4	2978	18387	40154	16590	0,46
11A	F	19	2759	8178	15122	5190	0,54
11B	F	19	323	958	1737	554	0,55
12A	M	13	4032	18661	31937	10076	0,58

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
12B	M	13	5991	28863	48363	16141	0,60
13A	M	18	4000	17511	24337	6911	0,72
13B	M	18	4117	18425	27395	8186	0,67
14A	M	2	8234	53240	104680	43104	0,51
14B	M	2	7963	47845	95323	38833	0,50
15A	M	17	935	5753	12869	5576	0,45
15B	M	17	1103	4921	10659	4622	0,46
16A	F	6 měsíců	2784	17081	33715	13878	0,51
16B	F	6 měsíců	11708	71014	150860	65845	0,47
17A	F	12	289	1273	2963	911	0,43
17B	F	12	489	2897	4758	1673	0,61
18A	F	22	10080	63799	154070	71851	0,41
18B	F	22	10019	64635	159810	73107	0,40
19A	F	1	4873	31601	63567	28937	0,50
19B	F	1	5017	31671	63561	28785	0,50
20A	F	3	158	4125	9127	3491	0,45
20B	F	3	1103	4008	7993	3103	0,50
21A	F	9	679	3828	7733	3535	0,49
21B	F	9	695	4242	8657	4351	0,49
22A	M	5	1653	8711	17639	6838	0,49
22B	M	5	1729	10112	19172	7733	0,53
43A	M	10	1766	8157	17237	6606	0,47
43B	M	10	5438	35916	77878	32595	0,46
23A	M	16	2735	14774	32260	16691	0,46
23B	M	16	1948	11215	26186	12803	0,43
23C	M	16	2256	15510	32421	16024	0,48
23D	M	16	178	14123	33639	16609	0,42
24A	F	14	3438	7668	17692	16981	0,43
24B	F	14	3442	7674	19042	18226	0,40
24C	F	16	2659	14673	25233	7652	0,58
24D	F	16	836	4674	7741	2529	0,60
25A	F	7	6058	44947	94835	41142	0,47
25B	F	7	8931	64614	134730	60138	0,48
25C	F	7	11839	71467	153230	70548	0,47
26A	F	6	226	2751	4164	1277	0,66
26B	F	6	582	2333	2668	933	0,87
26C	F	7	327	784	919	234	0,85
26D	F	7	291	889	986	335	0,90
27A	M	5	15383	80380	121320	3	0,66
27B	M	5	14855	75276	112340	29516	0,67
28A	F	3 měsíce	259	1513	2610	1109	0,58
28B	F	3 měsíce	166	471	533	218	0,88
29A	F	2 měsíce	440	1410	1054	135	1,34
29B	F	2 měsíce	459	1081	1727	194	0,63
30A	F	18	2081	11716	19482	6618	0,60
30B	F	18	1046	5252	8064	2444	0,65
31A	M	4	3673	20314	40865	18594	0,50
31B	M	4	3555	19637	42537	18081	0,46
31C	M	4	1220	7725	16766	7434	0,46
31D	M	4	1628	9664	20779	9478	0,47
32A	M	5	6058	5963	11390	41142	0,52
32B	M	5	8931	6418	12074	60138	0,53
33A	F	21	121	517	432	51	1,20

označení	*pohlaví*	*věk (roky)*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
33B	F	21	1113	5777	8638	2371	0,67
34A	F	4	16203	102980	185860	67277	0,55
34B	F	7	12723	81937	171280	67284	0,48
35A	M	9	3438	19916	40584	16981	0,49
35B	M	9	3442	20689	43240	18266	0,48
36A	M	9	978	40462	93351	3491	0,43
36B	M	9	1103	42681	94388	3103	0,45
37A	M	3	1656	15805	32060	9090	0,49
37B	M	3	1434	9322	20105	6339	0,46
38A	M	8	3874	27100	46699	16087	0,58
38B	M	8	5254	37234	64864	22180	0,57
39A	M	32	8759	48756	78020	22081	0,62
39B	M	32	8480	49898	78246	24365	0,64
40A	M	12	1576	114160	265690	7264	0,43
40B	M	12	1190	112340	266890	5119	0,42
40C	M	12	9891	71492	151470	63200	0,47
40D	M	12	10207	73272	160350	67663	0,46
41A	M	3 měsíce	287	1075	1214	182	0,89
41A	M	3 měsíce	267	683	760	141	0,90
42A	M	19	2442	11782	26297	11583	0,45
42B	M	19	2768	13938	30514	15342	0,46

***D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami, **F** – ženy, **M** - muži.*

Tab. 8.5: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů u vzorků moči pacientů s vybranými typy CDG v bezrozměrných jednotkách.

označení	pohlaví	věk (roky)	D17	D18	D19	D20	D18/D19
NUS1-CDG 1	M	5	20213	51971	13130	780	3,96
NUS1-CDG 2	M	5	8727	22313	6131	598	3,64
SRD5A3-CDG 1	F	12	1695	7224	8751	1693	0,83
SRD5A3-CDG 2	F	12	4513	22071	31993	8016	0,69
SRD5A3-CDG 3	F	12	5177	27986	43685	11375	0,64
PMM2-CDG 1A	F	6	1656	9211	20469	9090	0,45
PMM2-CDG 1B	F	6	1434	7180	14314	6339	0,50
PMM2-CDG 2A	F	7	12549	79104	153090	60858	0,52
PMM2-CDG 2B	F	7	13321	89080	175500	69723	0,51
PGM1-CDG 1	M	12	4232	23562	52695	22170	0,45
PGM1-CDG 2	M	12	3878	24936	53342	23420	0,47
PGM1-CDG 3	M	12	8680	51215	113240	52573	0,45
PGM1-CDG 4	M	12	7668	43980	100195	45158	0,44
PGM1-CDG 5	M	12	5636	39060	78138	29481	0,50
PGM1-CDG 6	M	12	2824	18368	32239	13040	0,57
DPAGT1-CDG 1	F	1	8343	57725	112760	44570	0,51
DPAGT1-CDG 2	F	1	8010	51318	99943	38514	0,51

***D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami, **NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **DPAGT1-CDG** - pacient s poruchou v genu pro enzym podílející se na metabolismu dolicholu, **SRD5A3-CDG** - pacient s poruchou v genu pro enzym podílející se na biosyntéze dolicholu, **PMM2-CDG** – pacient s poruchou fosfomannomutasy 2, **PGM1-CDG** – pacient s poruchou ve fosfoglukomutase 1 **F** – ženy, **M** – muži.*

Tab. 8.6: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů u vzorků tkání NUS1-CDG pacientů a kontrol uvedené v bezrozměrných jednotkách.

označení	věk	tkáň	D17	D18	D19	D20	D18/D19
LK1A	5	játra	17195	109870	246040	141890	0,45
LK1B	5	játra	83931	466510	860410	546530	0,54
LK2	<1	játra	11276	63931	119620	76279	0,53
LP1A	3	játra	1087	4168	3095	509	1,35
LP1B	3	játra	2523	10335	7943	1261	1,30
LP2A	6	játra	54372	233900	152350	20335	1,54
LP2B	6	játra	48243	207000	137360	18334	1,51
HK1A	<1	srdce	671	3951	4644	889	0,85
HK1B	<1	srdce	5793	41318	55580	12186	0,74
HK2	5	srdce	404	2360	2485	448	0,95
HP1A	3	srdce	23307	50456	9923	659	5,08
HP1B	3	srdce	19958	43284	8668	962	4,99
HP2A	6	srdce	25710	61586	15164	117	4,06
HP2B	6	srdce	6998	13041	2279	404	5,72

***NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami.*

Tab. 8.6: Získané hodnoty ploch vrcholů jednotlivých isoforem dolicholů u vzorků tkání NUS1-CDG pacientů a kontrol uvedené v bezrozměrných jednotkách.

označení	*věk*	*tkáň*	*D17*	*D18*	*D19*	*D20*	*D18/D19*
FK1A	3	mozková kůra	93	141	230	170	0,61
FKB1	3	mozková kůra	271	867	1103	404	0,79
FK3	<1	mozková kůra	554	3850	10489	9458	0,37
FK2A	5	mozková kůra	1487	9739	17441	7959	0,56
FK2B	5	mozková kůra	5454	33073	55730	25334	0,59
HP1A	3	mozková kůra	234	505	263	75	1,92
HP1B	3	mozková kůra	378	760	349	178	2,17
MK2	5	kosterní sval	3628	24200	24391	4004	0,99
MK1	<1	kosterní sval	2083	16277	23159	5551	0,70
MP1A	3	kosterní sval	2509	7547	1982	162	3,81
MP1B	3	kosterní sval	2586	5260	3774	697	1,39
MP2A	6	kosterní sval	2065	6258	2949	283	2,12
MP2B	6	kosterní sval	376	816	345	44	2,36

***NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **D17-D20** - dolicholy se 17-20 isoprenovými jednotkami.*

8.2 Hodnoty získané z analýzy na oxygrafu

Tab. 8. 7: Parametry respirace linie kožních fibroblastů vybraných typů CDG a kontrol po přidání určitého substrátu či inhibitoru.

označení	*jednotka*	*PGM*	*PGMD*	*Su*	*rot*	*omy*	*Fc*	*Ama*	*aTF*	*Z*
K1	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	34,5	89,7	123,3	111,6	53,2	129,9	4,4	610,2	130,5
K2	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	44,8	104,9	142,8	131,0	67,3	156,3	1,4	710,5	104,1
K3	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	22,7	50,0	74,7	59,9	22,7	52,6	4,5	424,8	213,8
PGM1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	31,3	66,0	98,2	92,1	29,9	87,4	7,4	705,2	251,6
ATP6A1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	22,7	35,9	13,8	10,8	11,8	18,2	2,7	491,6	202,9
CDG IIx	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	30,8	59,6	95,2	80,2	37,7	104,7	2,3	928,2	340,3
ALG8-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	32,4	64,4	105,3	93,4	30,9	89,9	3,6	533,8	167,0
PMM2-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	24,8	62,3	97,5	87,4	25,3	90,5	5,3	709,0	281,1
RFT1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	19,4	52,7	81,8	68,8	24,3	52,0	3,2	284,2	128,5
Man1B1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	11,6	42,4	57,8	36,8	11,1	18,3	4,9	122,9	78,1
NUS1-CDG 1	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	16,0	45,4	65,8	51,6	13,8	48,0	7,1	251,1	128,6
NUS1-CDG 2	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	25,3	62,7	104,2	89,0	22,4	95,2	5,0	395,4	166,2

PGM *- hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu,* ***PGMD*** *- hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu a ADP,* ***Su*** *– hodnoty po následném přidání sukcinátu,* ***rot*** *– hodnoty po následném přidání rotenonu,* ***omy*** *– hodnoty po následném přidání oligomycinu,* ***Fc*** *– hodnoty po následném přidání FCCP,* ***Ama*** *– hodnoty po následném přidání antimycinu A,* ***aTF*** *– hodnoty po následním přidání askorbátu a TMPD,* ***Z*** *– hodnoty po následním přidání azidu,* ***NUS1-CDG*** *- pacient s poruchou v NogoB-receptoru,* ***ALG8-CDG*** *– pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase (typ I),* ***PGM1-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II),* ***PMM2-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfomannomustase(typ I),* ***Man1B1-CDG*** *– pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II),* ***RFT1-CDG*** *– pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I),* ***CDG IIx*** *– pacient s CDG typu II,* ***ATP6A1-CDG-*** *pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy.*

Tab. 8. 8: Spotřeba kyslíku po jednotlivých substrátech ve fibroblastech pacientů s CDG a kontrolními liniemi. Naměřeno na přístroji Oxygraph-2k (Oroboros).

označení	*jednotka*	*PGM-Ama*	*ADP stim.*	*Su-rot*	*rot-Ama*	*Omy-Ama*	*Su-Ama*	*aTF-Z*	*Fc-Ama*
K1	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	33,7	102,3	45,9	167,6	44,7	213,5	781,6	166,9
K2	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	43,6	23,1	6,8	79,9	42,4	86,6	368,0	177,7
K3	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	30,0	52,3	23,5	94,8	35,2	118,3	254,0	103,3
PGM1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	27,5	28,0	17,7	81,2	28,8	98,9	192,0	84,7
ATP6A1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	18,2	27,3	14,9	55,3	18,1	70,2	211,0	48,1
CDG IIx	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	24,0	34,7	6,1	84,7	22,6	90,9	453,6	80,0
ALG8-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	10,1	-0,9	10,9	43,5	14,2	54,4	98,2	53,1
PMM2-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	8,8	29,4	14,2	44,5	6,7	58,7	122,6	40,9
RFT1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	20,3	37,4	15,3	84,0	17,4	99,2	229,2	90,2
Man1B1-CDG	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	20,0	13,3	3,0	8,1	9,1	11,1	288,7	15,5
NUS1-CDG 1	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	30,1	55,2	11,6	107,2	48,8	118,9	479,8	125,5
NUS1-CDG 2	pmol $O_2.s^{-1}.mg^{-1}$	43,4	60,1	11,8	129,6	65,9	141,4	606,4	154,9

PGM *- hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu,* ***PGMD*** *- hodnoty respirace po přidání pyruvátu, glutamátu a malátu a ADP,* ***Su*** *– hodnoty po následném přidání sukcinátu,* ***ADP stim*** *- zvýšení spotřeby kyslíku po dodání ADP,* ***rot*** *– hodnoty po následném přidání rotenonu,* ***omy*** *– hodnoty po následném přidání oligomycinu,* ***Fc*** *– hodnoty po následném přidání FCCP,* ***Ama*** *– hodnoty po následném přidání antimycinu A,* ***aTF*** *– hodnoty po následním přidání askorbátu a TMPD,* ***Z*** *– hodnoty po následním přidání azidu.* ***NUS1-CDG*** *- pacient s poruchou v NogoB-receptoru,* ***ALG8-CDG*** *– pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase (typ I),* ***PGM1-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II),* ***PMM2-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfomannomustase(typ I),* ***Man1B1-CDG*** *– pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II),* ***RFT1-CDG*** *– pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I),* ***CDG IIx*** *– pacient s CDG typu II,* ***ATP6A1-CDG-*** *pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy.*

8.3 Získané hodnoty analýzy na přístroji Seahorse

Tab. 8. 9: Hodnoty glykolytické funkce buněk ukázané v jednotkách vztažených na protein: mpH.min^{-1}.μg^{-1}.

měření č.	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	*15*
K1	0,34	0,35	0,37	1,37	1,54	1,65	2,27	2,26	2,22	0,94	0,56	0,41	0,35	0,32	0,30
K2	0,45	0,46	0,47	1,50	1,65	1,66	3,68	3,78	3,80	3,82	3,82	3,82	0,45	0,31	0,31
ALG8-CDG	0,28	0,28	0,30	0,82	0,90	0,98	2,02	2,00	2,01	0,81	0,50	0,31	0,24	0,20	0,19
PGM1-CDG	0,18	0,17	0,19	0,50	0,60	0,67	1,57	1,42	1,38	0,42	0,37	0,29	0,28	0,26	0,25
PMM2-CDG	0,30	0,30	0,29	1,00	1,09	1,15	1,79	1,82	1,84	0,53	0,35	0,25	0,21	0,20	0,19
Man1B1-CDG	0,64	0,59	0,57	1,33	1,42	1,42	2,08	2,13	2,22	0,89	0,59	0,46	0,44	0,44	0,44
RFT1-CDG	0,31	0,29	0,33	0,79	0,90	0,98	1,87	1,65	1,65	1,10	0,87	0,68	0,60	0,53	0,47
CDG IIx	0,35	0,35	0,35	0,51	0,55	0,68	1,21	1,17	1,19	1,29	0,74	0,50	0,39	0,33	0,29
ATP6A1-CDG	0,84	0,87	0,89	2,66	2,60	2,61	4,50	4,38	4,34	2,31	1,17	0,78	0,62	0,54	0,54
NUS1-CDG	0,63	0,63	0,63	1,75	1,75	1,75	2,96	2,96	2,96	2,96	2,96	2,96	0,44	0,44	0,44
NUS1-CDG	0,40	0,45	0,51	1,20	1,30	1,42	2,00	2,10	2,10	2,15	2,20	2,26	0,35	0,30	0,30

***K1-K3** – kontrolní vzorky**, NUS1-CDG** - pacient s poruchou v NogoB-receptoru, **ALG8-CDG** – pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase(typ I), **PGM1-CDG** – pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II), **PMM2-CDG** – pacient s poruchou ve fosfomannomustase (typ I), **Man1B1-CDG** – pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II), **RFT1-CDG** – pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I), **CDG IIx** – pacient s CDG typu II, **ATP6A1-CDG**- pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 4 měření.*

Tab. 8. 10: Hodnoty míry spotřeby kyslíku mitochondriemi buněk linií fibroblastů zobrazené v jednotkách vztažených na koncentraci proteinu: pmol O_2 .min^{-1}.μg^{-1}.

měření č.	***1***	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***	***13***	***14***	***15***
K1	5,50	5,44	5,40	1,04	1,14	1,16	5,45	6,19	6,51	7,78	8,51	8,96	0,64	0,76	0,72
K2	0,40	0,41	0,45	1,56	1,62	1,64	3,20	3,30	3,40	3,58	3,64	3,68	0,31	0,31	0,31
K3	3,37	3,44	3,45	1,02	1,09	1,11	3,04	3,28	3,61	4,07	4,36	4,44	0,91	0,93	0,81
ALG8-CDG	0,29	0,26	0,27	0,24	0,25	0,21	0,38	0,37	0,33	0,23	0,28	0,29	0,31	0,29	0,29
PGM1-CDG	1,84	1,95	1,97	0,79	0,83	0,85	1,25	1,42	1,60	1,68	1,89	2,01	0,66	0,70	0,62
PMM2-CDG	2,55	2,60	2,65	0,96	1,02	1,05	1,97	2,17	2,44	2,63	2,98	3,16	0,85	0,87	0,83
Man1B1-CDG	2,30	2,40	2,47	0,86	0,93	0,96	1,58	1,75	1,92	2,11	2,31	2,43	0,70	0,74	0,71
RFT1-CDG	1,15	3,08	3,33	1,03	1,15	1,18	3,08	3,22	3,53	4,26	4,94	5,37	0,88	1,07	1,03
CDG IIx	5,66	5,62	5,64	2,03	1,98	2,02	6,08	6,95	7,64	9,20	10,55	11,40	1,88	2,05	1,92
ATP6A1-CDG	4,74	4,48	4,46	1,23	1,14	0,98	5,29	5,86	5,97	6,95	7,37	7,82	0,61	0,65	0,60
NUS1-CDG	3,08	2,0	2,90	0,89	0,86	0,86	4,09	4,18	4,59	4,96	5,34	5,41	0,69	0,73	0,70
NUS1-CDG	3,73	3,56	3,51	1,13	1,18	1,16	5,56	5,49	5,83	6,40	6,93	7,01	0,84	0,93	0,88

K1-K3 *– kontrolní vzorky,* ***NUS1-CDG*** *- pacient s poruchou v NogoB-receptoru,* ***ALG8-CDG*** *– pacient s poruchou α1-3 glukosyltransferase (typ I),* ***PGM1-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfoglukomutase (typ I/II),* ***PMM2-CDG*** *– pacient s poruchou ve fosfomannomustase (typ I),* ***Man1B1-CDG*** *– pacient s poruchou v α1-2 mannosidase 1 (typ II),* ***RFT1-CDG*** *– pacient s poruchou v proteinu translokující oligosacharid (typ I),* ***CDG IIx*** *– pacient s CDG typu II,* ***ATP6A1-CDG-*** *pacient s poruchou v podjednotce vakuolární ATPasy. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 4 měření.*

8.4 Prezentace výsledků diplomové práce na mezinárodních konferencích

Zdražilová L, Ondrušková N, Kuchař L, Hansíková H. **Analýza obsahu dolicholu v moči u pacientů s podezřením na dědičnou poruchu glykosylace pomocí hmotnostní spektrometrie,** 32. Pracovní dny: Dědičné metabolické poruchy. 2017, *Hotel Lions, Nesuchyně, Česká republika*

Rodinova M. and Ondruskova N., Krizova J, Zdrazilova L, Baresova V, Hulkova H, Kmoch S, Honzik T, Tesarova M, Zeman J, Hansikova H**. Impact of Nogo-B receptor deficiency to mitochondrial ultrastructure and bioenergetics.** *International Scientific CDG Symposium on Congenital Disorders of Glycosylation and related disorders*. 2017*, Leuven, Belgium*

Hansikova H, Rodinova M, Ondruskova N, Krizova J, Zdrazilova L, Baresova V, Hulkova H, Kmoch S, Langer J, Honzik T, Tesarova M, Zeman J. **Mitochondrial impairment in Nogo-B receptor deficiency.** *FEBS J*, 2017; 284: 137-137

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka