

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDEČKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Bakalářská práce

Dědičné poruchy glykosylace: alfa-dystroglykanopatie

Congenital disorders of glycosylation:
alpha-dystroglycanopathies

Lucie Zdražilová

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.
a prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

bakalářský studijní program Biochemie

pracoviště: Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch,
KDDL 1.LF UK a VFN

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:.....

Poděkování

Velice děkuji RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za vedení mé bakalářské práce, za neocenitelné rady při psaní a za ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho konstruktivní poznámky k této práci. Za pomoc při provádění práce v laboratoři a za poskytování rad bych chtěla poděkovat Mgr. Nině Ondruškové. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mně při psaní bakalářské práce pomáhali a byli mi oporou.

Práce vznikla za podpory projektu AZV 16-31932A.

Abstrakt

Alfa-dystroglykanopatie jsou autosomálně recesivně dědičná onemocnění patřící zároveň do skupiny dědičných svalových dystrofií a dědičných poruch glykosylace. V současné době je známo 20 genů, jejichž mutace vedou k tomuto onemocnění.

Alfa-dystroglykan je membránový protein, který je posttranslačně modifikován pomocí oligosacharidových řetězců *O*-glykosidově vázaných přes mannosu. Porucha biosyntézy těchto oligosacharidových řetězců vede k hypoglykosylaci alfa-dystroglykanu, který tak ztrácí schopnost vázat se na lamininové *G*-domény ligandů extracelulárního matrixu. Tato hypoglykosylace pak vede přímo k nemocím nazývaným alfa-dystroglykanopatie.

Nejvážnější formy alfa-dystroglykanopatií se projevují svalovou dystrofií, oční malformací a poškozením centrální nervové soustavy. Mírnější formy poruchy se mohou projevovat pouze svalovou dystrofií bez dalších klinických příznaků.

Diagnostika alfa-dystroglykanopatií je obtížná z důvodu nedostatečné palety biochemických metod, které by usnadnily zacílení vyšetřovacího procesu před molekulárně-genetickou analýzou.

Cílem předkládané práce bylo podat přehled o alfa-dystroglykanopatiích se zaměřením na strukturu, úpravu a patologii alfa-dystroglykanu. V experimentální části této práce bylo otestováno použití imunoelektroforetických technik k diagnostické rozvaze u dvou pacientů (P1, P2) s klinickým podezřením na alfa-dystroglykanopatii. U obou pacientů byla potvrzena hypoglykosylace alfa-dystroglykanu, která byla u P2 zapříčiněna mutací v genu *LAMA2* důležitém pro syntézu lamininu a u P1 s největší pravděpodobností některým z genů způsobujících alfa-dystroglykanopatii, jehož identifikace je otázkou dalších analýz.

Klíčová slova: Alfa-dystroglykanopatie, alfa-dystroglykan, imunodetekce, diagnostika, Dědičné poruchy glykosylace

Abstract

Alpha-dystroglycanopathies are inherited autosomal recessive diseases belonging both to the group of hereditary muscular dystrophies and the congenital disorders of glycosylation. Currently there are 20 genes of which are known to lead to this disease.

Alpha-dystroglycan is a membrane protein which is at its mucin domain posttranslationally modified with oligosaccharide chains *O*-glycosidically bound via mannose. Defective biosynthesis of oligosaccharide chains leads to hypoglycosylation of alpha-dystroglycan, which loses its ability to bind to the laminin *G*-domain of ligands in extracellular matrix. This hypoglycosylation leads to the group of diseases called alpha-dystroglycanopathies.

The most severe forms of alpha-dystroglycanopathies manifest with muscular dystrophy, ocular malformations and defects of central nervous system. Milder forms of this disorder may manifest only with muscular dystrophy without other clinical symptoms.

Diagnosis of alpha-dystroglycanopathy is difficult due to the lack of standardly available biochemical methods, which would facilitate the targeting of the investigation process before molecular genetic analysis.

The aim of the present study was to provide an overview of alpha-dystroglycanopathies focusing on the structure, alteration and pathology of alpha-dystroglycan. In the experimental part of this thesis, immunoelectroforetic techniques were experimentally used to facilitate diagnosis in two patients (P1, P2) with clinical suspicion of alpha-dystroglycanopathy. Hypoglycosylation of alpha-dystroglycan was confirmed in both patients. In P2 the defect was caused by mutations in the gene *LAMA2* important for the synthesis of laminin and in P1 most likely by one of the genes causing alpha-dystroglycanopathy whose identification is a matter for further analysis.

Key words: Alpha-dystroglycanopathy, alpha-dystroglycan, immunodetection, diagnosis, Congenital disorders of glycosylation

Obsah

1	Literární úvod.....	12
1.1	Dědičné poruchy glykosylace	12
1.1.1	Obecný úvod	12
1.1.2	Poruchy glykosylace <i>N</i> -vázaných glykoproteinů	13
1.1.3	Poruchy glykosylace <i>O</i> -vázaných glykoproteinů	14
1.1.4	Další typy poruch glykosylace.....	14
1.2	Dystroglykan	15
1.2.1	Struktura.....	15
1.2.2	Alfa-dystroglykan	17
1.2.3	Beta-dystroglykan	18
1.3	Posttranslační modifikace dystroglykanu	18
1.3.1	<i>N</i> -vázaná glykosylace alfa-dystroglykanu	19
1.3.2	<i>O</i> -vázaná glykosylace alfa-dystroglykanu.....	20
1.4	Alfa-dystroglykanopatie.....	23
1.4.1	Alfa-dystroglykanopatie	23
1.4.2	Diagnostika alfa-dystroglykanopatií.....	25
1.5	Laboratorní metody diagnostiky dědičných poruch glykosylace.....	26
1.5.1	Laboratorní metody diagnostiky alfa-dystroglykanopatií.....	27
2	Cíl bakalářské práce.....	29
3	Materiál a metody.....	30
3.1	Materiál	30
3.1.1	Biologický materiál.....	30
3.1.2	Chemikálie	30
3.1.3	Přístroje a pomůcky	33
3.2	Metody	33
3.2.1	Příprava vzorků.....	33
3.2.2	Stanovení proteinů Lowryho metodou	34
3.2.3	Příprava gelu pro SDS-PAGE elektroforézu	35
3.2.4	Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu	36
3.2.5	Aplikace vzorků na gel	36
3.2.6	SDS-PAGE elektroforéza	37

3.2.7	Přenos proteinů na PVDF membránu	38
3.2.8	Imunodetekce.....	38
3.2.9	Detekce signálu a dokumentace.....	39
4	Výsledky.....	40
4.1	Stanovení koncentrace proteinů	40
4.2	Imunodetekce proteinů a kvantifikace signálu.....	42
5	Diskuze.....	45
6	Závěr.....	48
7	Citovaná literatura.....	49

Seznam obrázků

1.1.4	Obr.č. 1. Struktury glykokonjugátů vznikajících glykosylací v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu	15
1.2.1	Obr.č. 2. Dystrofin-glykoproteinový komplex ve svalu a jeho ligandy	16
1.2.1	Obr.č. 3. Struktura dystroglykanu v kosterním svalu	18
1.3.1	Obr.č. 4. Glykosylace <i>N</i>-vázaných glykoproteinů	19
1.3.2	Obr.č. 5. <i>O</i>-glykosylační řetězce na alfa-dystroglykanu	20
1.3.2	Obr.č. 6. Schéma <i>O</i>-glykosylace alfa-dystroglykanu	21
1.3.2	Obr.č. 7. Schematické zobrazení prvních kroků biosyntézy oligosacharidového řetězce vázaného <i>O</i>-vazbou na serin nebo threonin	22
3.2.5	Obr.č. 8. Marker molekulové hmotnosti „See Blue Plus2 prestained standard”	37
4.1	Obr.č. 9. Kalibrační přímka standardu BSA	41
4.2	Obr.č. 10. Fotografie membrány se signálem alfa-dystroglykanu a beta-dystroglykanu	42
4.2	Obr.č. 11 Analýza množství plně glykosylovaného alfa-dystroglykanu pomocí metody „Western Blot” v kosterním svalu u pacientů s podezřením na CDG syndrom a kontrol	44
4.2	Obr.č. 12. Analýza množství plně glykosylovaného beta-dystroglykanu pomocí metody „Western Blot” v kosterním svalu u pacientů s podezřením na CDG syndrom a kontrol	44
5.2	Obr.č. 13. Imunohistochemický průkaz alfa-dystroglykanu v kosterním svalu u pacienta P1 a kontroly	46

Seznam tabulek

1.4.1	Tab.č. 1. Přehled genů, jejichž mutace způsobují alfa-dystroglykanopatie	24
3.2.2	Tab.č. 2. Rozpis pipetování pro přípravu kalibrační řady	34
3.2.3	Tab.č. 3. Složení 8% separačního gelu	35
3.2.3	Tab.č. 4. Složení 4% zaostřovacího gelu	35
3.2.4	Tab.č. 5. Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu	36
3.2.5	Tab.č. 6. Rozmístění vzorků v jamkách gelu	36
4.1	Tab.č. 7. Absorbance standardu BSA o různé koncentraci pro účely sestavení kalibrační přímky	40
4.1	Tab.č. 8. Absorbance lyzátů při vlnové délce 700 nm a jejich vypočítané koncentrace	41
4.2	Tab.č. 9. Odečtení intenzity signálu pro alfa-dystroglykan pomocí programu <i>Quantity One</i> na přístroji <i>G:BOX Imaging System (SYNGENE)</i>	43
4.2	Tab.č. 10. Odečtení intenzity signálu pro beta-dystroglykan pomocí programu <i>Quantity One</i> na přístroji <i>G:BOX Imaging System (SYNGENE)</i>	43
4.2	Tab.č. 11. Procentuální zastoupení signálů glykosylovaného alfa-dystroglykanu a signálu beta-dystroglykanu u pacientů s podezřením na alfa-dystroglykanopatii	44

Seznam zkratek

Apo CIII	apolipoprotein CIII
BSA	hovězí sérový albumin
CDG	dědičné poruchy glykosylace z angl. „Congenital disorders of glycosylation”
CDGS	původní název dědičných poruch glykosylace z angl. „Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes”
CDP	cytidindifosfát
CMP	cytidinmonofosfát
CTP	cytidintrifosfát
DGC	dystrofin-glykoproteinový komplex
DMPK	komplex dolicholmannosa-6-fosfáttransferasa
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FCMD	Fukuyamova kongenitální svalová dystrofie z angl. „Fucuyama congenital muscular dystrophy”
GA	Golgiho aparát
LGMD	Pletencová svalová dystrofie z angl. „Limb-girdle muscular dystrophy”
NGS	sekvenování nové generace z angl. „next-generation sequencing”
MEB	„Muscle-Eye-Brain” syndrom z angl. „Muscle-Eye-Brain syndrome”
MDDG	svalová dystrofie-dystroglykanopatie z angl. „muscle dystrophy-dystroglycanopathy”
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin

GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
PVDF	druh hydrofilní membrány z angl. „polyvinylidene difluorid”
PIC	směs inhibitorů proteas z angl. „protease inhibitor cocktail”
PMSF	fluorid fenylmethylsulfonylu z angl. „phenylmethylsulfonyl fluoride”
PUGNAc	<i>O</i> -(2-acetamido-2-deoxy- <i>D</i> -glukopyranosylidenamino)- <i>N</i> -fenylkarbamát
RIPA	lyzační roztok pro přípravu vzorků z angl. „radio-immunoprecipitation assay”
RIPAPP	pufr složený z RIPA, PIC a PUGNAc
SB	vzorkový pufr z angl. „sample buffer”
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného
TBS	pufr pro imunodetekci z angl. „Tris buffered saline”
TBST	pufr pro imunodetekci z angl. „Tris buffered saline with Tween”
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WWS	Walkerův-Warburgův syndrom z angl. „Walker-Warburg syndrome”
α-DG	alfa-dystroglykan
α-DGP	Alfa-dystroglykanopatie
β-DG	beta-dystroglykan

1 Literární úvod

1.1 Dědičné poruchy glykosylace

1.1.1 Obecný úvod

Dědičné poruchy glykosylace jsou vzácná dědičná onemocnění, pro která bylo obecně přijato označení „CDG”, což je zkratka z anglického názvu „Congenital disorders of glycosylation” (1). Většina těchto onemocnění byla popsána v posledních dvaceti letech (1). Tyto nemoci byly původně označovány jako „CDGS” z anglického „Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes” (2), ale v roce 1999 byly přejmenovány na CDG (3), aby název zahrnoval všechny typy glykokonjugátů. CDG zahrnuje poruchy biosyntézy nukleotidových sacharidů (tj. donorových substrátů) a jejich transportérů, glykosyltransferas a glykosidas, defekty proteinů zabezpečujících homeostázu Golgiho aparátu a vesikulární transport (1).

Nynější seznam čítá přes 100 známých dědičných poruch glykosylace (4) a zahrnuje téměř všechny glykosylační cesty, které ovlivňují odlišné molekulární procesy od substrátové biosyntézy po proteinový transport (4). CDG má incidenci mezi 1 : 20 000 a 1 : 100 000 (5).

CDG má u většiny případů autozomálně recesivní typ dědičnosti (6). Díky široké distribuci glykoproteinů v organismu mají onemocnění CDG velice široké spektrum klinických příznaků, jež zahrnují poruchy téměř všech orgánů. Typické příznaky zahrnují strukturní abnormality jako je atrofie mozečku, myopatie (zahrnující dědičné svalové dystrofie), mrtvice, epileptické záchvaty a různé neuropatie. Dále pacient může mít i problémy spojené s koagulací a poškozením imunitního systému (7).

Tato onemocnění mohou být rozdělena podle kauzálních genů s různým podílem na glykosylačních reakcích: geny kódující glykosyltransferasy nebo glykosidas, geny zahrnuté do biosyntézy donorových substrátů, geny ovlivňující translokaci donorových substrátů, geny regulující lokalizaci glykosyltransferas a geny ovlivňující homeostázu sekrečních organel (4).

Základní dělení CDG je standardně odvozeno od struktury a vazby oligosacharidů na proteiny či lipidy. Rozlišujeme poruchy ***N*-vázaných oligosacharidových řetězců**, (mající *N*-glykosidiovou vazbu přes amidovou ($-NH_2$) skupinu asparaginu), ***O*-vázaných oligosacharidových řetězců**, (mající *O*-glykosidovou vazbu přes hydroxylovou ($-OH$) skupinu serinu či threoninu), **poruchy glykosylfosfatidylinositolové kotvy**, **poruchy glykosfingolipidů** a **vícenásobné poruchy glykosylace** (zobrazeno na obr.č.1 na str.15).

1.1.2 Poruchy glykosylace *N*-vázaných glykoproteinů

U těchto glykoproteinů je oligosacharid navázán na amidovou ($-NH_2$) skupinu asparaginu a vzniká tak *N*-glykosidová vazba. Tyto poruchy byly rozděleny do dvou skupin: na CDG typu-I, které zahrnují glykosylační dráhy v cytoplasmě a endoplazmatickém retikulu (ER) týkající se syntézy *N*-glykoproteinu, a na CDG typu-II, týkající se syntézy oligosacharidového řetězce a jeho přenosu na asparagin vznikajícího proteinu, a na CDG typu-II, které zahrnují modifikaci oligosacharidových řetězců již navázaných na glykoproteiny v Golgiho aparátu (GA) (1).

Patří mezi nejčastěji se vyskytující poruchy glykosylace a je také známo nejvíce mutací genů způsobujících poruchy *N*-glykosylace.

Jedním z těchto onemocnění je porucha v syntéze enzymu fosfomannomutasy 2 (kódované genem *PMM2*) označované jako *PMM2*-CDG (8), které je nejfrekventovanějším typem CDG s odhadovanou incidencí 1 : 20 000 (1). Toto onemocnění je způsobeno mutacemi v genu *PMM2* pro fosfomannomutasu 2. Funkcí tohoto enzymu je katalýza reakce mannosy-6-fosfát na mannosu-1-fosfát. Typickými příznaky této poruchy jsou neurologické symptomy jako psychomotorická retardace, epilepsie, ataxie, strabismus, hypoplasie mozečku, ale také abnormální distribuce tuku, kardiomyopatie, hypotonie a koagulopatie (1; 8).

Dalším příkladem je MPI-CDG, kde je porušen enzym mannosafosfátisomerasa katalyzující přeměnu fruktosa-6-fosfátu na mannosu-6-fosfát. Projevuje se průjmem, zvracením, gastrointestinálním krvácením a hepatickou fibrosou (1). Zvláštností u této poruchy je, že se jako u jedné z mála léčitelných typů CDG její příznaky dají tlumit orálním podáváním mannosy (9).

Pro detekci poruch *N*-glykoproteinů se využívá analýzy glykosylace sérového transferinu (6).

1.1.3 Poruchy glykosylace *O*-vázaných glykoproteinů

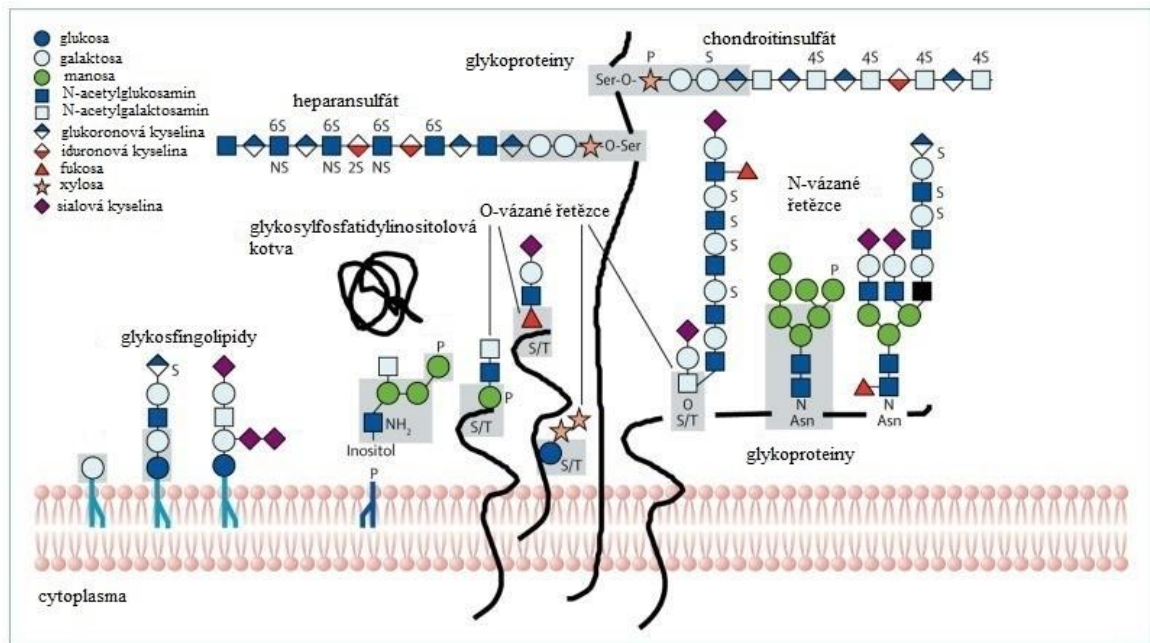
U těchto glykoproteinů dochází k vazbě oligosacharidových řetězců přes hydroxylovou skupinu (*-OH*) serinu nebo threoninu.

Tyto poruchy byly popsány u *O*-glykosylace s vazbou přes *N*-acetylgalaktosamin, *N*-acetylglukosamin, fukosu, galaktosu, glukosu, xylosu a mannosu (1; 5). Poruchy *O*-glykosylace vazbou přes mannosu vedou k alfa-dystroglykanopatiím a jsou více probírány v dalších kapitolách.

Mechanismus *O*-glykosylace probíhá složitěji než u *N*-glykosylace, a proto zjišťování *O*-glykosylačních poruch bylo dlouho velice obtížné. Jedním z významně zastoupených sérových glykoproteinů obsahující nejčastější typ *O*-glykosidové vazby u lidí (vazbu přes *N*-acetylgalaktosamin) je apolipoprotein CIII (Apo CIII). Proto byla zavedena isoelektrická fokusace Apo CIII jako „screeningová” metoda některých poruch zahrnujících *O*-glykosylaci.

1.1.4 Další typy poruch glykosylace

Do této skupiny patří např. porucha glykosylace glykosfingolipidů a glykosylfosfatidylinositolové kotvy (5). Dále se pak mohou vyskytovat vícenásobné poruchy glykosylace (10), jako například mutace genu *B4GALT1* kódujícího β -1,4 galaktosyltransferasu 1 (6).



Obr.č. 1. Struktury glykokonjugátů vznikajících glykosylací v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Šedivá pole zobrazují běžně se vyskytující řazení monosacharidů, zbytek oligosacharidového řetězce bývá velice variabilní. Přes asparagin je oligosacharidový řetězec navázán N-vazbou a přes serin a threonin O-vazbou. Upraveno podle (7).

1.2 Dystroglykan

1.2.1 Struktura

Dystroglykan (DG) je transmembránový protein, který je nejvíce zastoupen ve svalových buňkách a je součástí dystrofin-glykoproteinového komplexu (viz obr.č. 2 na str. 16) spojujícího cytoskelet buňky s extracelulárním matrixem (ECM) (11).

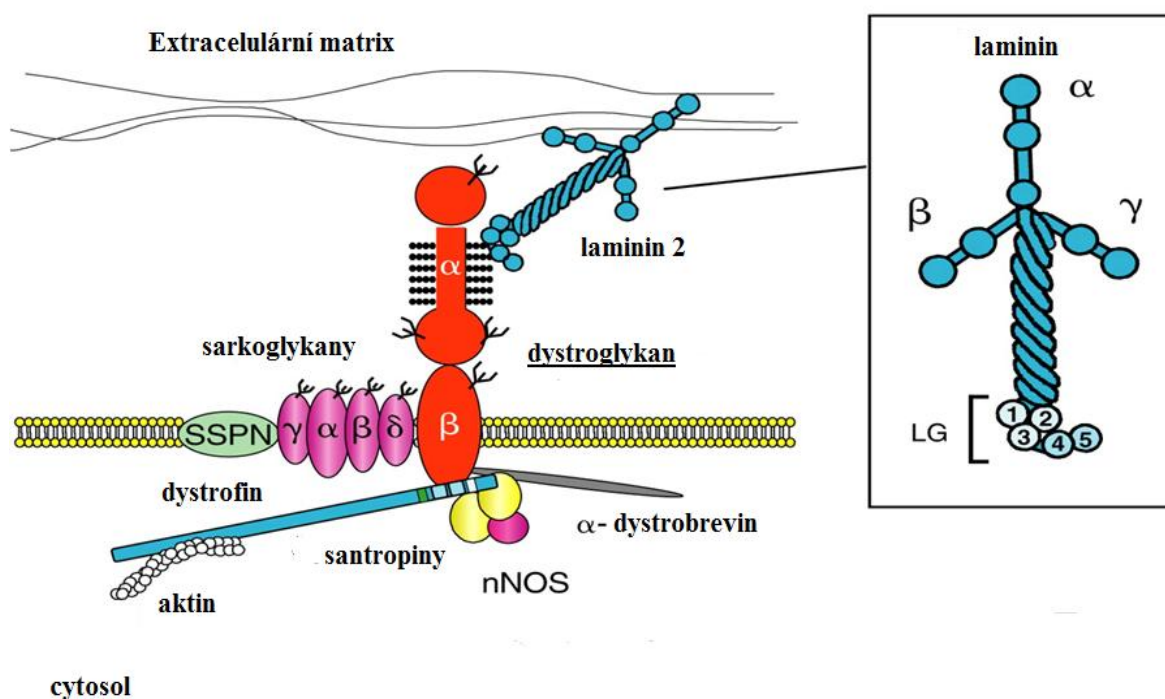
Tento protein byl původně objeven v kosterním svalu, ale je součástí i jiných orgánů a tkání jako např. ledvin, jater, očí a epithelií (12; 13; 14).

DG je kódován genem *DAG1* [MIM 128239] (5), který je umístěn na 21. lidském chromozomu (15) a jeho sekvence se skládá ze dvou exonů rozdělených dlouhým intronem (15).

DG je posttranslačně proteolyticky rozštěpen na dvě proteinové podjednotky: alfa-dystroglykan (α -DG) a beta-dystroglykan (β -DG) (16). Tyto dva proteiny jsou pak na sebe nekovalentně navázány (17; 16).

Úplná funkce celého dystrofin-glykoproteinového komplexu (DGC) není zatím zcela objasněna, ale je zřejmé, že při kontrakci svalu udává strukturní stabilitu sarkolemě a mutace v jeho komponentech vedou k narušení svalových vláken (18).

V kůži se DG váže na lamininovou G-doménu ligandů extracelulárního matrixu (ECM) stejně jako je tomu ve svalech, avšak s odlišnou afinitou (19; 20), a ovlivňuje tak epiteliální morfogenezi (21). Velmi důležitou roli hraje také ve Schwannových buňkách (22), kde ovlivňuje jejich funkci, strukturu, vývoj centrální nervové soustavy, myelinizaci a architekturu periferního nervstva (23). Dalšími funkcemi jsou například buněčná adheze (24) a fotoreceptorová signalizace v oku (závislá na interakci α -DG s pikachurinem) (25).



Obr.č. 2. Dystrofin-glykoproteinový komplex ve svalu a jeho ligandy. α -DG na sebe váže v extracelulárním prostoru pomocí oligosacharidových řetězců ligandy s lamininovou G-doménou (LG) (na obrázku je navázán na lamininovou G-doménu lamininu, která je zobrazena v pravém rohu obrázku). β -DG prostupuje membránou a v cytosolu se váže na dystrofin, který se ve svalové buňce dále váže na aktin. Upraveno podle (26).

1.2.2 Alfa-dystroglykan

α -DG je protein činkovitého tvaru obsahující dvě globulární domény spojené mucinovou doménou (27). Jeho umístění je na vnější straně membrány, jedná se tedy o periferní membránový protein, který obsahuje tři *N*-glykosylační místa (26). Tento protein má centrální mucinovou doménu bohatou na serinové a threoninové zbytky (27), které mohou být dále ve velké míře *O*-glykosylovány. Tato doména je z jedné strany napojená na *N*-terminální doménu a na opačné straně se napojuje *C*-terminální doména (28), jež se nekovalentně váže na *N*-terminální doménu β -DG (viz obr.č. 3 na str.18).

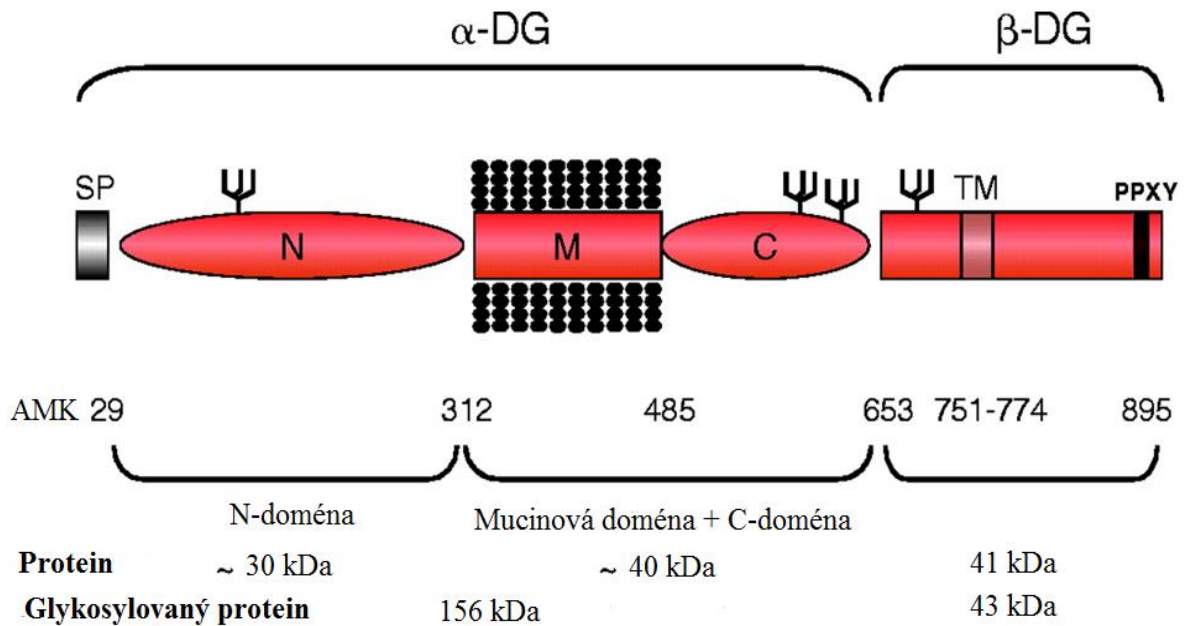
Základní molekulová hmotnost α -DG je 72 kDa (16), avšak díky své rozsáhlé posttranslační glykosylaci je jeho molekulová hmotnost mnohem vyšší a pohybuje se mezi 120 kDa (v mozku) a 156 kDa (v kosterním svalstvu) (29), z čehož vyplývá, že jeho glykosylace je tkáňově specifická (12; 13), tedy že stupeň a typ glykosylace na α -DG se může lišit mezi různými tkáněmi.

Jeho hlavní funkcí je vytvoření vazby s některými ligandy extracelulárního matrixu (ECM) (11) pomocí svých oligosacharidových zbytků (viz obr.č. 2 na str.16). Těmito ligandy mohou být laminin, agrin, perlecan ve svalech a neurexin a pikachurin v nervovém systému (30; 31), neboť mají lamininovou *G*-doménu, kterou se mohou navázat na α -DG. Tato lamininová *G*-doména totiž zprostředkovává jejich vysokou afinitu k vápenatým iontům (32), které jsou nezbytné k navázání této domény ligandů extracelulárního matrixu na oligosacharidové řetězce α -DG (32). Tato interakce je tedy striktně závislá na glykosylačním statusu α -DG.

Snížená glykosylace tohoto glykoproteinu pak vede k nižší afinitě vazby dystroglykanu na ligandy ECM a označuje se jako α -dystroglykanopatie (α -DGP). α -DGP jsou onemocnění patřící do skupiny dědičných svalových dystrofií a stejně tak i dědičných poruch glykosylace (33). Pacienti často vykazují značnou patologii ve svalech, nervech, srdci, očích a mozku (34).

1.2.3 Beta-dystroglykan

Beta-dystroglykan (β -DG) je transmembránový protein, který se svojí intracelulární doménou váže na dystrofin (25) a extracelulárně se váže na α -DG. Skládá se z transmembránové domény, *N*-glykosylačního místa a *C*-terminální cytoplasmatické části bohaté na prolin (27; 28).



Obr.č. 3. Struktura dystroglykanu v kosterním svalu. Na obrázku jsou zobrazeny podjednotky dystroglykanu α -DG a β -DG. α -DG zde má zobrazený signální peptid (SP), *N*-terminální doménu s jedním *N*-glykosylačním místem (N). Dále je u něj zobrazena mucinová doména (M) s rozsáhlou *O*-glykosylací (znázorněna černými body) a na pravé straně má *C*-terminální doménu s dvěma glykosylačními místy. Vpravo je zobrazen β -DG se svými doménami a jedním *N*-glykosylačním místem. TM - transmembránová doména, PPXY - místo pro navázání dystrofinu. Upraveno podle (26).

1.3 Posttranslační modifikace dystroglykanu

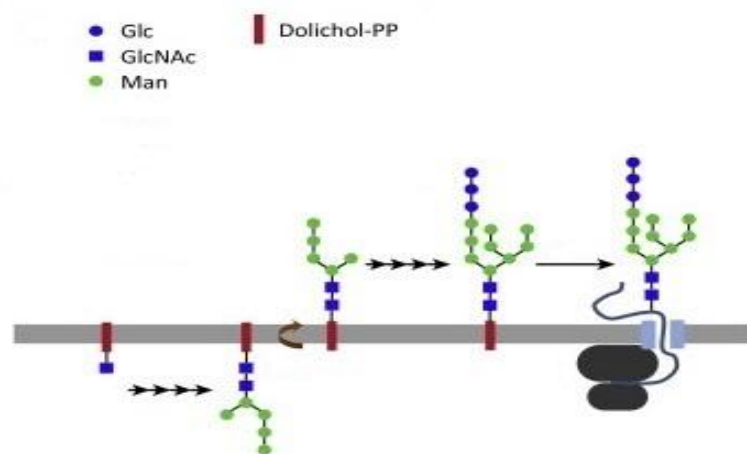
α -DG prochází posttranslační modifikací v podobě glykosylace, a to konkrétně *N*-glykosylací a hlavně *O*-glykosylací.

V současnosti jsou známy na povrchu DG čtyři *N*-glykosylační místa, z čehož tři jsou na α -DG a jedno na β -DG (35). Všechny jsou napojeny přes *N*-acetylglukosamin. Dále má

DG na mucinové doméně zatím deset známých *O*-glykosylačních míst, z čehož dva řetězce jsou napojeny přes *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc), tři přes mannosu a pět je přes hexosu zatím neurčenou, předpokládá se však, že se jedná o mannosu (35).

1.3.1 *N*-vázaná glykosylace alfa-dystroglykanu

Syntéza *N*-vázaného oligosacharidu probíhá v cytoplasmě, ER a GA. V ER se nejprve na dolichol, který má zde funkci lipidové kotvy, naváží dva *N*-acetylglukosaminy (GlcNAc) a na ně postupně několik mannos a glukos (viz obr.č. 4). Takto syntetizovaný oligosacharidový řetězec je pak připojen na vznikající protein a poté je glykoprotein dále modifikován v ER a v GA. Vzniklé oligosacharidové řetězce vykazují určitou heterogenitu, která je dána působením různých enzymů (6).

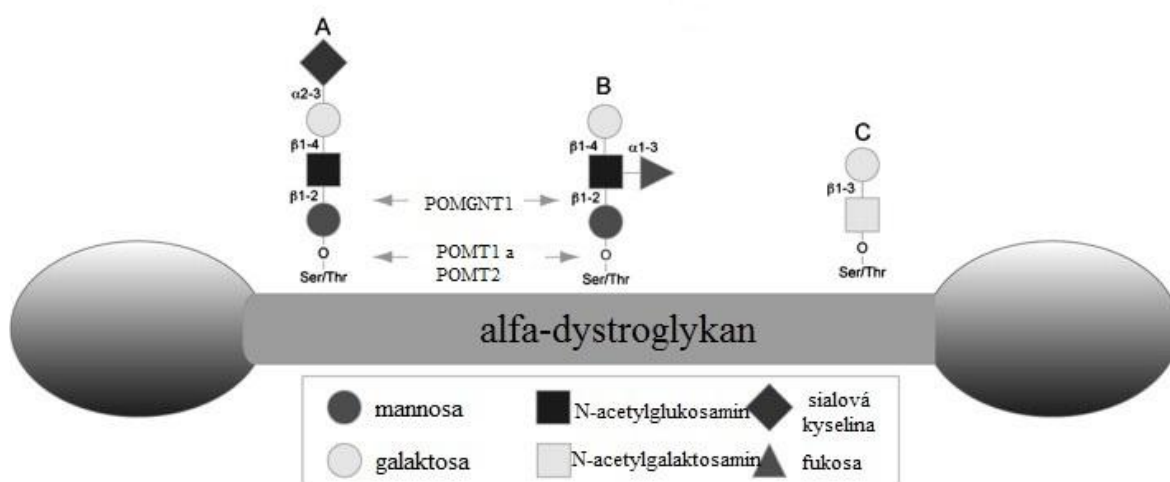


Obr.č. 4. Glykosylace *N*-vázaných glykoproteinů. Postupná syntéza oligosacharidového řetězce, který je dále navázan na protein. Glc - glukosa, GlcNAc - *N*-acetylglukosamin, Man - mannos, Gal - galaktosa, Fuc - fukosa, Sia - kyselina sialová, Dolichol-PP - dolicholbifosfát. Upraveno podle (4).

1.3.2 O-vázaná glykosylace alfa-dystroglykanu

α -DG má na svém povrchu několik oligosacharidových řetězců vázaných přes mannosu a *N*-acetylgalaktosamin, které zprostředkovávají jeho vazbu na proteiny ECM (1).

Bylo prokázáno, že všechny oligosacharidy vázané *O*-vazbou přes mannosu struktury na α -DG jsou funkčně důležité pro aktivitu vázání ligandů na α -DG a jsou tedy přímo zapojeny ve vázání α -DG na lamininovou doménu (36). Jejich struktura je znázorněna na obr.č. 5, struktury A a B.



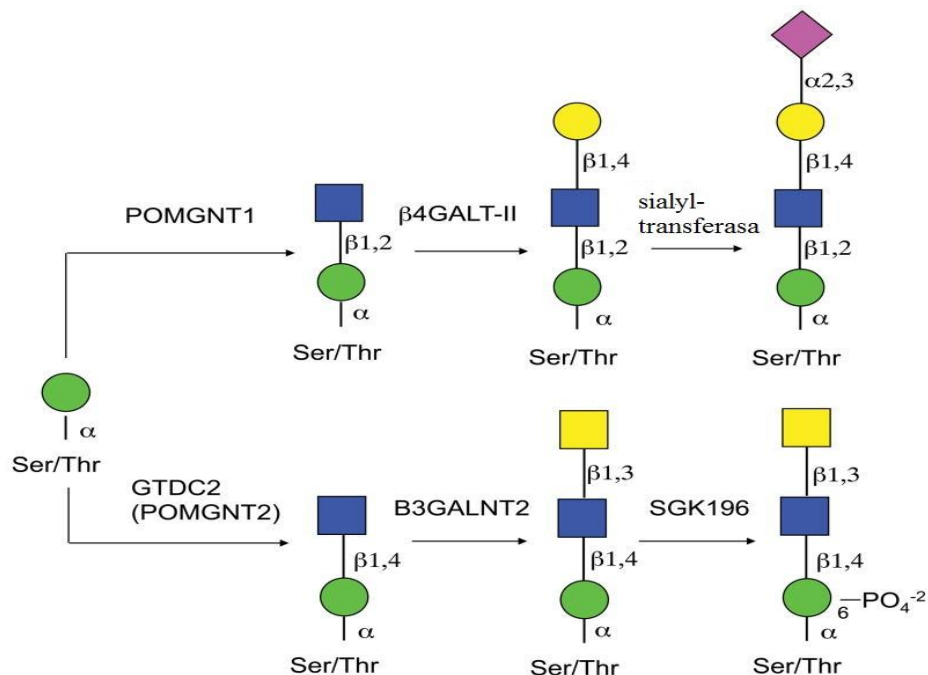
Obr.č. 5. O-glykosylační řetězce na alfa-dystroglykanu. α -DG je zde znázorněn jako protein čínkovitého tvaru, který má uprostřed mucinovou doménu. Na ní jsou ukázány struktury oligosacharidových řetězců. POMT1, POMT2- protein *O*-mannosyltransferasa 1 a 2, POMGNT1 - protein *O*-mannosa- β -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasa, Ser/Thr - serin/threonin, A, B - oligosacharidové řetězce na α -DG vázané přes mannosu, C - oligosacharidový řetězec na α -DG navázaný *O*-vazbou přes *N*-acetylgalaktosamin. Upraveno podle (37).

Dále je však důležité zmínit, že jsou na α -DG i oligosacharidové řetězce *O*-vázané přes více známou strukturu *N*-acetylgalaktosamin (viz obr.č. 5, C) (36). Nicméně hypotéza, že vázání ligandů ECM je zprostředkováno přímo i přes tyto oligosacharidové řetězce, je stále nepotvrzená (37).

Enzymy protein *O*-mannosyltransferasa 1 a 2 (kódované geny *POMT1* a *POMT2*) připojují přímo mannosu (*O*-glykosydovou vazbou) na α -DG v ER a jsou zodpovědné za počátek formace oligosacharidů vázaných přes mannosu (38) (viz obr.č. 6 na str.21). Ko-exprese

POMGNT1 je gen kódující enzym protein *O*-manosa- β -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasu 1, která je lokalizovaná v GA a katalyzuje přenos *N*-acetylglukosaminu na mannosu *O*-vázanou na glykoproteinech (42; 43; 44) (viz obr.č. 6 na str.21). *POMGNT1* je široce exprimován v srdci, placentě, plicích, játrech, ledvinách a slinivce břišní a nejvíce v kosterním svalstvu a mozku (43).

Další kroky biosyntézy oligosacharidového řetězce jsou variabilní a podílejí se na nich enzymy, jejichž mechanismy působení zatím nebyly plně objasněny. Dva možné navazující mechanismy jsou ukázány na obr.č. 7.



Obr.č. 7. Schématické zobrazení prvních kroků biosyntézy oligosacharidového řetězce vázaného *O*-vazbou na serin nebo threonin. zelené kolečko - mannosu, modrý čtvereček - *N*-acetylglukosamin, žluté kolečko - galaktosa, žlutý čtvereček - *N*-acetylgalaktosamin, růžový čtvereček - sialová kyselina, *POMGNT1*, *POMGNT2* - protein *O*-mannosa- β -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasa 1 a 2, *β 4GALT-II* - β -1,4-galaktosyltransferasa 2, *B3GALNT2* - β -1,3-*N*-acetylgalaktosaminyltransferasa 2, *SGK196* - protein podobný *SGK196* kinase, *Ser/Thr* - serin/threonin. Upraveno podle (45).

Dalším důležitým genem pro správnou glykosylaci α -DG je gen *ISPD* pro enzym (z angl. „Isoprenoid synthase domain-containing”) (46), který vykazuje cytidyltransferasovou aktivitu (47) a dále se může zapojit do syntézy oligosacharidových řetězců.

Dále se do glykosylace různými způsoby zapojují další proteiny (např. fukutin, FKRP z angl. „fukutin related protein”, LARGE a další), jejichž mutace také vedou k alfa-dystroglykanopatiím. Jejich mechanismus působení při syntéze oligosacharidového řetězce však není plně znám.

1.4 Alfa-dystroglykanopatie

1.4.1 Alfa-dystroglykanopatie

Alfa-dystroglykanopatie (α -DGP) jsou dědičné poruchy glykosylace, které jsou způsobeny narušenou posttranslační úpravou alfa-dystroglykanu (5). Tato onemocnění patří paralelně do skupiny dědičných poruch glykosylace (CDG) a do skupiny dědičných svalových dystrofií (CMD, z angl. „Congenital muscular dystrophies”), což jsou autosomálně recesivně dědičná onemocnění s variabilními stupni klinické závažnosti (33). Jsou velice často také spojeny s defekty v centrálním nervovém systému a poruchami zraku (37).

Alfa-dystroglykanopatie se dají rozdělit na primární, sekundární a terciární. Primární α -DGP jsou způsobeny defektem v genu *DAG1* kódujícím samotný dystroglykan (48). Do sekundární a nejpočetnější skupiny patří poruchy v glykosylačních enzymech (49) (enzymech zajišťujících glykosylaci) a terciární skupina zahrnuje defekty v syntéze sacharidových donorů, které se účastní postranslační *O*-glykosylace oligosacharidových řetězců vázajících se přes mannosu na α -DG (47).

Mezi sekundární α -DGP patří onemocnění způsobená mutací v genu pro protein *O*-mannosyltransferasu 1 a 2 (kódované geny *POMT1* a *POMT2*), které jsou důležité pro první krok v glykosylaci α -DG, tedy navázání mannosy na α -DG (50). Mutace v těchto genech vedou často k těm nejzávažnějším α -DGP. Druhý krok v biosyntéze oligosacharidového řetězce na alfa-dystroglykan je uskutečněn pomocí enzymů protein *O*-mannosa- β -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasou 1 nebo protein *O*-mannosa- β -1,4-*N*-acetylglukosaminyltransferasou 2 kódovaných geny *POMGNT1* a *POMGNT2*. Tyto enzymy napojují *N*-acetylglukosaminový zbytek na mannosu β -1,2 a β -1,4 vazbou (43)

Dodnes bylo popsáno 20 genů zobrazených v tab.č.1, jejichž mutace mohou způsobit α -DGP (33).

Tabulka č.1. Přehled genů, jejichž mutace způsobují alfa-dystroglykanopatie. *Žlutě je znázorněn gen způsobující primární α -DGP, oranžově geny způsobující sekundární α -DGP, zeleně gen způsobující terciární α -DGP a bíle jsou geny způsobující α -DGP zatím nezařazené do žádné skupiny.*

GEN	Funkce kódovaného proteinu
<i>POMT1</i>	protein <i>O</i> -mannosyltransferasa 1
<i>POMT2</i>	protein <i>O</i> -mannosyltransferasa 2
<i>POMGNT1</i>	protein <i>O</i> -mannosa- β -1,2- <i>N</i> -acetylglukosaminyltransferasa 1
<i>POMGNT2</i>	protein <i>O</i> -mannosa- β -1,4- <i>N</i> -acetylglukosaminyltransferasa 2
<i>FKTN</i>	glykosyltransferasa*
<i>FKRP</i>	glykosyltransferasa*
<i>LARGE</i>	xylosyltransferasa, glukoronyltransferasa
<i>DPM2</i>	dolicholfosfátmannosyltransferasa 2
<i>DPM3</i>	dolicholfosfátmannosyltransferasa 3
<i>DOLK</i>	dolichol kinasa
<i>ISPD</i>	isoprenoidsynthasa
<i>GTDC2</i>	glykosyltransferasa
<i>B3GALNT2</i>	β -1,3- <i>N</i> -acetylgalaktosaminyltransferasa 2
<i>TMEM5</i>	glykosyltransferasa*
<i>B3GNT1</i>	β -1,3-glukuronyltransferasa 1
<i>GMPPB</i>	GDP-mannosapyrofosforylase B
<i>SGK196</i>	protein podobný kinase SgK196
<i>DAG1</i>	dystroglykan
<i>MPDU1</i>	dolicholmannosafosfátsynthasa
<i>POMK</i>	protein <i>O</i> -mannosakinasa

*předpokládá se, nebylo ověřeno

Dolicholkinasa (kódována genem *DOLK*) je zodpovědná za fosforylaci dolicholu a mutace v jejím genu vedou k závažným CDG (51). Dolicholfosfátmannosyltransferasový komplex (DPMK) je zodpovědný za syntézu dolicholfosfátu a je složen z DPM1 (katalytická

podjednotka), DPM2 (stabilizační podjednotka) a DPM3 (ER-cílová podjednotka) (52; 53; 54).

GMPPB je gen pro enzym GDP-mannosapyrofosforylase B, jež je cytoplasmatický protein katalyzující přeměnu mannosu-1-fosfátu a GTP na GDP-mannosu (55).

Jelikož celý glykosylační mechanismus α -DG zatím nebyl plně popsán, není překvapivé, že velká část proteinů kódovaných geny, jejichž mutace vedou k α -DGP, má funkce a mechanismy působení zatím neznámé (26).

Je však důležité zdůraznit, že předchozí studie na kosterním svalstvu neprokázaly korelaci mezi mírou glykosylace a závažností klinických příznaků (56).

1.4.2 Diagnostika alfa-dystroglykanopatií

Určení diagnózy je složité a diagnostika je založena vždy na kombinaci podrobného popisu klinických příznaků, biochemických nálezů a molekulárně genetických analýz.

Klinické příznaky α -DGP jsou velice rozmanité, jelikož mohou postihovat téměř většinu orgánů. Nejvíce se však projevují poruchou svalů a mozkovou a oční malformací. Příznaky se u různých druhů mutací mohou prolínat, a proto není možné určit podle nich přesný typ α -DGP.

Nejvážnější formy α -DGP se projevují svalovou dystrofií a vážnou mozkovou a oční malformací (57) sporuchami zahrnujícími Walkerův-Warburgův syndrom (z angl. „Walker-Warburg syndrome”, WWS), „Muscle-Eye-Brain” syndrom (z angl. „Muscle-Eye-Brain syndrome”, MEB) a Fukuyamovu kongenitální svalovou dystrofii (z angl. „Fukuyama Congenital muscular dystrophy”, FCMD) (33). Lehčí formy zahrnují Pletencové svalové dystrofie (z angl. „Limb-girdle muscle dystrophy”, LGMD), u kterých se mohou a nemusí vyskytovat intelektuální poruchy (57).

Mutace v některých genech byly spojeny s fenotypem různé závažnosti nazývaným svalová dystrofie-dystroglykanopatie (MDDG z angl. „muscle dystrophy-dystroglycanopathy”) (58), což vedlo k nové nomenklatuře založené na klinické závažnosti a genetické příčině. Klasifikace pak vypadá takto: A (závažné), B (středně závažné)

a C (mírné). Podtypy jsou číslovány od 1 do 6 vzhledem ke genetické příčině v následujícím pořadí: *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* a *LARGE* (58). Například WWS způsobený mutací v genu *POMT1* je zapsán jako MDDGA1 (58).

MEB onemocnění (nejčastěji MDDGA3) se projevuje už od narození jako svalová slabost, postižení intelektu, poruchy zraku (jako je dědičná krátkozrakost, zelený zákal) a dále malformace centrální nervové soustavy. Tato nemoc se projevuje pomalu a většina pacientů se dožije dospělosti (58).

WWS odkazuje na skupinu α -DGP klinicky charakterizovaných abnormální mozkovou a oční strukturou současně se závažnou svalovou dystrofií (59; 60). WWS je nejzávažnějším typem alfa-dystryglykanopatie, a protože je to klinická diagnóza, může být WWS způsoben mutacemi v rozdílných genech. Geny *POMT1* a *POMT2* jsou zodpovědné za 50 % případů WWS (59; 60), avšak mutace v dalších genech, jako např. *POMGNT1* a *TMEM5*, tuto nemoc také způsobují (59; 60). WWS (většinou MDDGA1, MDDGA2) má těžké projevy a pacienti většinou této nemoci podlehnou do věku 3 let (61).

FCMD (většinou MDDGA4) se překrývají fenotypově s MEB syndromem. Pacienti mají svalovou slabost, hypotonii, intelektuální deficit a někteří i záchvaty. Jsou známé také slabší formy jako např. MDDGB4 (58).

U pacientů, kteří mají postižený stejný gen, se však může objevit významně odlišný klinický obraz. Například mutace v genu *POMT1* může způsobit WWS, MEB, FCMD nebo LGMD (56), tedy téměř celé fenotypové spektrum, což vede k faktu, že je velice těžké jasně definovat genotyp-fenotypovou korelaci.

1.5 Laboratorní metody diagnostiky dědičných poruch glykosylace

Diagnostika u pacientů trpících CDG je velice složitá, neboť dodnes neexistuje univerzální „screeningová“ metoda, která by dokázala zachytit všechny typy CDG. V současné době je detekce CDG založena na více metodách, které postupně zužují výběr typů poruch.

Nejčastěji se vychází ze dvou analýz (detekujících hypoglykosylaci proteinů), které umožňují zachytit kolem poloviny typů těchto poruch. Jedná se o isoelektrickou fokusaci transferinu v séru (6), která detekuje poruchy v *N*-glykosylaci. Další metodou je isoelektrická fokusace apolipoproteinu CIII (62), která detekuje poruchy zahrnující *O*-glykosylaci přes GalNAc.

Avšak jak již bylo zmíněno, nedají se tímto způsobem zachytit všechny typy CDG, a proto bylo zavedeno několik dalších analýz a jiné se teprve hledají. Kromě detekce hypoglykosylovaných proteinů se využívají např. metody měření enzymové aktivity a analýzy struktury oligosacharidových řetězců vázaných na lipidy nebo proteiny pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie nebo hmotnostní spektrometrie.

1.5.1 Laboratorní metody diagnostiky alfa-dystroglykanopatií

α -DGP patří k těm typům CDG, které většinou není možné detekovat analýzou sérového transferinu nebo Apo CIII (výjimkou jsou např. deficity podjednotek komplexu DPMK, které se dají detekovat analýzou sérového transferinu).

Míra glykosylace α -DG je v současnosti hodnocena schopností vazby protilátky IH6 proti specifickému epitopu oligosacharidového řetězce α -DG zapojeného ve vazbě α -DG na lamininovou *G*-doménu (33). Imunohistochemie a metoda „Western Blot“ jsou dvě nejvíce používané metody pro detekci míry glykosylace α -DG ve svalu (33).

Novou alternativní metodou je průtoková cytometrie, pomocí které je možné kvantitativně určit sníženou míru glykosylace. Citlivost této metody nám umožňuje detekci nepatrné redukce množství IH6-reaktivních oligosacharidových řetězců ve fibroblastech pacientů s alfa-dystroglykanopatií (33).

Míra glykosylace α -DG ve fibroblastech pacientů je porovnatelná se stavem v kosterním svalstvu pacienta i přes orgánově specifické odlišnosti glykosylace (14). Tím tato metoda může doplnit existující imunohistochemické testy v kosterním svalstvu jako kvantitativní a jednoduchá metoda a může být taktéž užita v případě nedostupnosti svalové biopsie (33), kdy je odběr svalové tkáně pacientům trpícím svalovou dystrofií velmi zatěžující.

Jako další možná metoda detekce a rovněž za účelem definitivního potvrzení diagnózy jsou

prováděny molekulárně-genetické analýzy. V případě, že na základě klinického obrazu a laboratorních testů je vysloveno podezření na specifický typ α -DGP, je příslušný gen přímo sekvenován (Sangerovo sekvenování). Když takovéto zacílení není možné, může se použít tzv. sekvenace nové generace (NGS) (z angl. "next generation sequencing") (63), což jsou techniky, které umožňují hledat mutace v celých genomech, exomech nebo ve vybraném panelu genů. Jejich výhodou oproti běžným molekulárně-genetickým metodám je pokrytí celého spektra genů.

2 Cíl bakalářské práce

Alfa-dystroglykanopatie jsou vzácná dědičná onemocnění způsobená poruchou biosyntézy oligosacharidových řetězců *O*-vázaných přes mannosu na alfa-dystroglykan.

Cílem této práce bylo:

V teoretické části:

- popsat strukturu, funkci a výskyt alfa-dystroglykanu
- charakterizovat posttranslační modifikaci alfa-dystroglykanu
- shrnout současný stav a možnosti diagnostiky alfa-dystroglykanopatií

V praktické části:

- v pilotním experimentu otestovat možnost použití metody „Western Blot“ pro účely diagnostiky alfa-dystroglykanopatií

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem byly vzorky homogenátů z kosterního svalu od dvou pacientů s podezřením na CDG syndrom. Jako kontrolní vzorek sloužil svalový homogenát od dvou pacientů, u kterých nebyla prokázána dědičná porucha metabolismu. 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 tkáně v KTEA pufru pomocí ultrathoraxu a homogenizátoru teflon/sklo a byl skladován při -80 °C do doby použití.

Přehled vzorků:

CI: Negativní kontrola (věk: 13 let, pohlaví ženské)

C2: Negativní kontrola (věk: 1 rok, pohlaví mužské)

PI: Jedenáctiletý chlapec s myopatií a hypercholesterolémií s psychomotorickým vývojem v normě. Předchozí vyšetření vyloučilo Duchennovu svalovou dystrofii.

P2: Dívka ve věku 9 měsíců s hypotonií a myopatií, s vysokou hladinou kreatin kinasy, s normálním psychomotorickým vývojem a sociální interakcí.

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Chemikálie

- | | | |
|---|---------------|-------|
| • akrylamid | Sigma-Aldrich | (USA) |
| • bromfenolová modř | Sigma-Aldrich | (USA) |
| • deoxycholát sodný | Sigma-Aldrich | (USA) |
| • destilovaná voda | Goro | (ČR) |
| • EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina | Sigma-Aldrich | (USA) |
| • Folinovo reagens | Penta | (ČR) |
| • glycerol | Penta | (ČR) |
| • glycin | Sigma-Aldrich | (USA) |

• HCl 35%	Penta	(ČR)
• isopropylalkohol	Penta	(ČR)
• methanol	Penta	(ČR)
• <i>N,N'</i> -metylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich	(USA)
• NaCl (chlorid sodný)	Penta	(ČR)
• peroxosíran amonný	Sigma-Aldrich	(USA)
• PIC „protease inhibitor cocktail”	Sigma-Aldrich	(USA)
• PMSF: flolid fenylmethylsulfonylu	Sigma-Aldrich	(USA)
• SDS: dodecyl sulfát sodný	Sigma-Aldrich	(USA)
• vyvolávací roztok Super signal west femto maximum sensitivity	Thermo Scientific	(USA)
• sušené odtučněné mléko Laktino	Promil	(ČR)
• TEMED: <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	Serva	(DE)
• tricín	Sigma-Aldrich	(USA)
• Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich	(USA)
• Triton X-100	Sigma-Aldrich	(USA)
• Tween20	Sigma-Aldrich	(USA)
• β -merkaptóethanol	Sigma-Aldrich	(USA)

3.1.2.2 Roztoky a pufrý:

30,8% Akrylamid: (30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) bisakrylamid)

3xGB pH 8,45 (z angl. "gel buffer"): (3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS)

Katodový pufr pH 8,25: (100 mM Tris-HCl, 100mM tricín, 0,1 % (w/v) SDS)

Anodový pufr pH 8,9: (100 mM Tris-HCl)

T pufr (z angl. "transfer buffer"): (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 10 % (v/v) methanol, 0,02% (w/v) SDS)

RIPA pufr: pH 7,4, (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X.-100, 1 % (w/v) deoxycholát sodný, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)

RIPAPP pufr: (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X.-100, 1 % (w/v) deoxycholát sodný, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % PIC (v/v), 25 µM PUGNAc)

1xTBS pufr (z angl. „tris-buffered saline“): (20 mM Tris, 130 mM NaCl, (pH 7,5))

1xTBS-T pufr (z angl. „tris-buffered saline, 0,1% Tween 20“): (20 mM Tris, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20, (pH 7,5))

4xSB pufr-vzorkový pufr (z angl. "sample buffer"): (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 12 % (v/v) glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromfenolová modř, 2 % (v/v) β-merkaptoethanol)

Roztok MIX :

roztok A: (0.1 M NaOH, 2 % (w/v) Na₂CO₃)

roztok B: (0.5 % (w/v) CuSO₄ x 1 H₂O)

roztok C: (1 % (w/v) vinan sodno-draselný)

3.1.2.3 Protilátky a markery:

Anti-α-dystroglycan monoklonální primární protilátka I1H6C4 (myší, IgM 1:1000, v 2% Laktino v TBST), produkt. č. #05-393, **Merck**

Anti-beta-dystroglycan primární protilátka (králičí, IgG 1:300 v 2% Laktino v TBST), produkt.č.ab43125, **Abcam**

Anti-Rabbit IgG sekundární protilátka, „peroxidase conjugate“, (1:5000 v 2% Laktino v TBST), produkt.č. A0545, **Sigma-Aldrich**

Anti-Mouse IgM sekundární protilátka, „peroxidase conjugate“ (1:10000 v 2% Laktino v TBST), produkt.č.A8786, **Sigma**

marker molekulové hmotnosti protein standard, „See Blue Plus2 prestained standard“, produkt. č. LC5925, **Novex**

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- aparatura na gelovou elektroforézu BioRad, PROTEAN 3 CELL
- automatické pipety Thermo Electron, Eppendorf, Gilson
- aparatura pro přenos proteinů na PVDF membránu TE77X Semidry blotter, Hoefer
- centrifugy MINI Centrifuge, Thermo Scientific Heraeus
- elektroforetické zdroje BioRad PowerPac Basic, BioRad PowerPac 1000
- chladicí a mrazicí boxy Liebherr, Zanussi, Sanyo
- PVDF membrána, millipore, „polyvinylidene difluorid“ Immobilon
- spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu
- G:BOX SYNGENE Imaging System
- termostat AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet
- třepačka Polymax 1040, Heidolph
- váhy Kern
- vortex Velp Scientifica

3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků

Vzorky homogenátů C1, C2, P1 a P2, které byly skladovány při teplotě -80°C , byly přeneseny na led. Dále byl připraven pufr RIPAPP (400 μl RIPA, 4 μl PIC, 1 μl PUGNAc), který byl přidán k mírně rozmraženým homogenátům v poměru 1:1 (50 μl homog. + 50 μl RIPAPP) a poté ponechán 20 minut na ledě s občasným mícháním na vortexu. Tento roztok homogenátu s pufrem byl centrifugován (50 000 g, centrifuga *Thermo Scientific*,

Heraeus, při 4°C, 20 minut). Ze vzniklého lyzátu (dále skladovaného při -80 °C) bylo odebráno 15 µl a 2x zředěno destilovanou vodou (přidáním 15 µl destilované vody), a takto předředěný lyzát byl použit pro stanovení koncentrace proteinů.

3.2.2 Stanovení proteinů Lowryho metodou (64)

Pro získání kalibrační řady byla ve dvou sadách do mikrozkušavek napipetována destilovaná voda a poté hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci zásobního roztoku 0,2 mg.ml⁻¹ podle tab.č. 2. Měření pro získání kalibrační řady bylo provedeno ve dvou sadách.

Tab.č. 2. Rozpis pipetování pro přípravu kalibrační řady.

<i>zkumavka č.</i>	<i>H₂O(µl)</i>	<i>BSA o koncentraci 0.2 mg.ml⁻¹ (µl)</i>	<i>hmotnost proteinů v roztoku (µg)</i>
1	200,0	0,0	0,0
2	175,0	25,0	5,0
3	150,0	50,0	10,0
4	125,0	75,0	15,0
5	100,0	100,0	20,0
6	75,0	120,0	25,0

Smícháním roztoků B (0.5 % (w/v) CuSO₄ . 1 H₂O) a C (1 % (w/v) vinan sodno-draselný) a poté přidáním roztoku A (0.1 M NaOH, 2 % (w/v) Na₂CO₃) (v poměru A:B:C = 48:1:1) byl připraven roztok MIX, který byl přidán do všech vzorků po 1 ml. Vzorky byly poté zamíchány na vortexu a 15 minut ponechány stát při laboratorní teplotě. Poté k nim bylo přidáno 0,1 ml čerstvě naředěného Folinova reagens s destilovanou vodou (poměr 1:1) a roztok byl okamžitě promíchán a poté ponechán 30 minut stát při laboratorní teplotě. Následně byly změřeny absorbance standardních roztoků a roztoků vzorků na spektrofotometru *Schimadzu* při vlnové délce 700 nm.

3.2.3 Příprava gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Do vychlazené kádinky na ledu byl připraven 8% separační gel (který byl mezi jednotlivými přísadkami promícháván) podle tab.č. 3 a následně pomocí pipety aplikován mezi skla na elektroforézu. Poté byl gel převrstven destilovanou vodou a ponechán hodinu polymerovat.

Tab.č. 3. Složení 8% separačního gelu

<i>složka</i>	<i>objem</i>
destilovaná H ₂ O	4,30 ml
3x GB pufr	3,33 ml
30% akrylamid + 0,8 % bisakrylamid	2,28 ml
10% peroxosíran amonný	100 µl
TEMED	10 µl

Na ledu byl připraven 4% zaostřovací gel (taktéž promícháván mezi jednotlivými přísadkami) v pořadí podle tab.č. 4, který byl napipetován na separační gel, ze kterého byla odstraněna převrstvená destilovaná voda. Do zaostřovacího gelu byl opatrně vložen hřebínek na vytvoření 10 jamek.

Tab.č. 4. Složení 4% zaostřovacího gelu

<i>složka</i>	<i>objem</i>
destilovaná H ₂ O	5,27 ml
3x GB pufr	3,33 ml
30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid	1,3 ml
10% peroxosíran amonný	120 µl
TEMED	12 µl

Poté byla sestavena aparatura na SDS-PAGE elektroforézu. Mezi skla byl nalit katodový pufr, hřebínek byl odstraněn a jamky v gelu opatrně promyty katodovým pufrem stříkačkou s jehlou.

3.2.4 Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu

Do mikrozkušavek bylo pipetováno takové množství lyzátů a doplněno RIPAPP a 4xSB pufrem, aby jejich výsledná koncentrace byla $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ viz. tab.č. 5.

Tab.č. 5. Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu

<i>vzorky</i>	<i>Lyzát(μl)</i>	<i>4xSB(μl)</i>	<i>RIPAPP(μl)</i>
<i>C1</i>	53,2	20	6,8
<i>C2</i>	28,4	20	31,6
<i>P1</i>	34,8	20	25,2
<i>P2</i>	53,2	20	6,8

Tyto lyzáty s pufrů byly inkubovány v termostatu při 37°C na 30 minut a následně bylo poloviční množství z těchto vzorků 2x naředěno pomocí 1xSB (připraveného ředěním zásobního 4xSB pomocí RIPAPP), čímž byly získány od každého pacienta a kontrolních vzorků vzorky o proteinové koncentraci $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Tyto vzorky byly aplikovány na gel do jamek v objemu po 20 μl .

3.2.5 Aplikace vzorků na gel

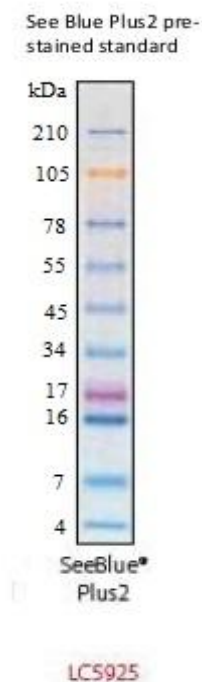
Do jamek gelu byly napipetovány vzorky, standard molekulové hmotnosti a 1xSB pufr podle tab.č. 6.

Tab.č. 6. Rozmístění vzorků v jamkách gelu

<i>dráha</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
<i>vzorek</i>	MA	M20	B20	V20	D20	M10	B10	V10	D10	SB
<i>množství prot.(μg)</i>		20	20	20	20	10	10	10	10	
<i>aplikovaný objem(μl)</i>	10	20	20	20	20	20	20	20	20	10

MA - standard molekulové hmotnosti, „marker“, SB - 1x SB pufr

Při experimentu byl použit standard molekulové hmotnosti „*See Blue Plus2 prestained standard*” (Novex) (viz obr.č. 7), díky kterému bylo možné vizuálně určit přibližnou pozici zkoumaných proteinů (α -DG a β -DG) v gelu podle jejich známé molekulové hmotnosti (156 kDa a 41-43 kDa).



Obr.č. 8. Marker molekulové hmotnosti „*See Blue Plus2 prestained standard*”. Profil barevně značených proteinů obsažených ve směsi. Nalevo jsou uvedeny velikosti daných proteinů v kDa.

3.2.6 SDS-PAGE elektroforéza

Do aparatury na elektroforézu byl nalit anodový pufr a do vnitřního prostoru mezi skla byl dolit katodový pufr po povrch skel. Aparatura byla zavřena víkem a zapojena do zdroje napětí. Elektroforéza probíhala 30 minut při 40 V a po zaostření vzorků bylo nastaveno napětí na 90 V po dobu 90 minut. Poté byl gel vyjmut z aparatury, zaostřovací gel byl odstraněn a separační opatrně odebrán ze skel.

3.2.7 Přenos proteinů na PVDF membránu

Po vyjmutí byl gel ihned přenesen do T pufru (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 10 % (w/v) methanol, 0,02 % (w/v) SDS) na 30-45 minut na 3D třepačku (v plastové krabici) a protřepán. Gel byl změřen a ve stejné velikosti bylo nastříháno 6 filtračních papírů a jedna PVDF membrána.

PVDF membrána byla aktivována ve 100% methanolu na 15 s, následně inkubována 5 minut v destilované vodě a poté ekvilibrována 10-15 minut v T pufru.

Na anodu přenosové aparatury *Semidry blotter* byly nanесeny 3x filtrační papíry nasáklé T pufrem, na ně byla položena PVDF membrána, na ní gel a opět 3x filtrační papíry nasáklé T pufrem (tj. byl poskládán tzv. „sendvič“). Vše bylo ještě převrstveno T pufrem a lehce uváleno (aby se uvolnily vzduchové bubliny). Aparatura byla uzavřena, připojena ke zdroji napětí a spuštěna na 75 minut při konstantním proudu o hodnotě (0,65x obsah plochy membrány) mA.

Po rozebrání tohoto „sendviče“ byla membrána ponechána schnout přes noc.

3.2.8 Imunodetekce

Usušená PVDF membrána s proteiny byla opláchnuta na 15 s v methanolu, rozstříhnuta v místě okolo 78 kDa (podle standardu molekulové hmotnosti), přenesena pinzetou do krabičky s nalitou destilovanou vodou a ponechána 5 minut inkubovat na třepačce. Poté byla inkubována v TBS (20 mM Tris, 130 mM NaCl, (pH 7,5))10 minut a poté 1 hodinu v čerstvě připraveném blokovacím roztoku (5 % Laktino v TBS).

Na horní část membrány byla přidána (po odstranění blokovacího roztoku) primární protilátka IIH6C4 (myší, IgM 1:1000, v 2 % Laktino v TBST) a ponechána 2 hodiny inkubovat.

Na dolní část membrány byla přidána primární protilátka proti beta-dystroglykanu (králičí, IgG 1 : 300 v 2 % Laktino v TBST) a inkubována 2 hodiny.

Po odstranění roztoku s primární protilátkou byly obě části membrány oplachovány v TBST (5, 10, 15 minut).

Následně na horní část membrány byla přidána sekundární protilátka (myší IgM, 1:10000 v 2% mléku v TBST) a na dolní část sekundární protilátka (králíčí IgG, 1:5000 v 2% mléku v TBST) a ponechána inkubovat 1 hodinu. Nakonec byly obě části membrány oplachovány v TBST (5, 10, 15 minut) a v TBS (2, 10 minut).

3.2.9 Detekce signálu a dokumentace

Detekce signálu byla provedena na přístroji *G:BOX Imaging System (SYNGENE)* v počítačovém programu *GENESYS*. Membrána byla vložena do silné fólie a pipetou rovnoměrně převrstvena vyvolávacím roztokem (přípraven podle návodu smícháním komerčně získanými Roztoky 1 a 2 West Femto v poměru 1:1), přikryta folií (přebytečný vyvolávací roztok vytlačen) a vložena do komory přístroje *G:BOX Imaging System (SYNGENE)*. Systém automaticky nastavil vhodný expoziční čas a pomocí kamery v přístroji byl detekován vzniklý chemiluminiscenční signál. Kvantifikace signálu byla provedena pomocí programu *Quantity One (BioRad)*.

4 Výsledky

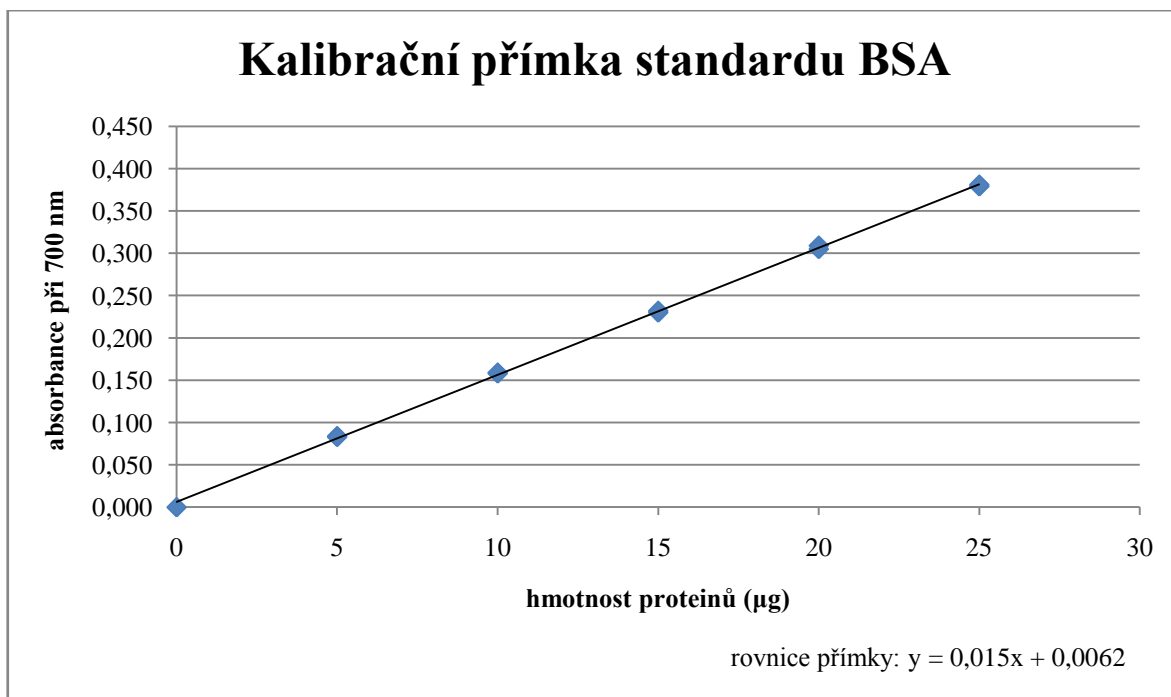
4.1 Stanovení koncentrace proteinů

Pomocí spektrofotometrického měření prováděného při vlnové délce 700 nm byla určena koncentrace proteinů v lyzátech vzorků. K jejímu stanovení byla použita kalibrační přímka vytvořená ze známých koncentrací vzorků BSA a jejich změřených absorbancí zobrazených v tab.č. 7. Kalibrační přímka spolu s její rovnicí je zobrazena v grafu na obr.č. 9 na str. 41.

Tab.č. 7. Hodnoty absorbance standardu BSA o různé koncentraci pro účely sestavení kalibrační přímky.

<i>vzorek</i>	<i>A₇₀₀</i>	<i>Hmotnost proteinů (BSA) v roztoku (μg)</i>
1	0,000	0,00
2	0,084	5,00
3	0,083	5,00
4	0,158	10,00
5	0,159	10,00
6	0,230	15,00
7	0,232	15,00
8	0,309	20,00
9	0,305	20,00
10	0,379	25,00
11	0,381	25,00

první vzorek zobrazuje absorbanci slepého vzorku (destilované vody), A₇₀₀ - hodnoty absorbance při vlnové délce 700 nm,



Obr.č. 9. Kalibrační přímka standardu BSA. Závislost absorbance měřené při 700 nm na koncentraci BSA. V pravém dolním rohu je zobrazena rovnice kalibrační přímky.

Tab.č. 8. Absorbance lyzátů při vlnové délce 700 nm a jejich vypočítané koncentrace.

<i>vzorek</i>	<i>V_{2xlyzátu}(ml)</i>	<i>A₇₀₀</i>	<i>hmotnost proteinů(μg)</i>	<i>Průměrná hmotnost proteinů(μg)</i>
<i>C1</i>	5	0,067	1,6	1,5
	7	0,086	1,5	
	10	0,114	1,4	
<i>C2</i>	5	0,115	2,9	2,8
	7	0,153	2,8	
	10	0,216	2,8	
<i>P1</i>	5	0,094	2,3	2,3
	7	0,129	2,3	
	10	0,172	2,2	
<i>P2</i>	5	0,067	1,6	1,5
	7	0,091	1,6	
	10	0,121	1,5	

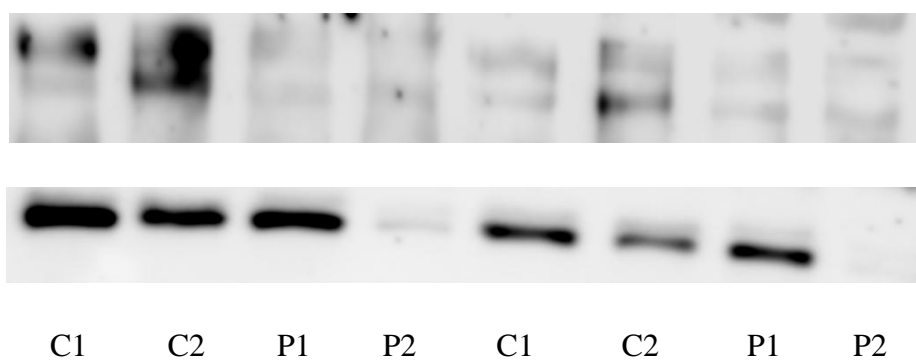
V_{2xlyzátu} - objem 2x zředěného lyzátu v měřeném vzorku, *A₇₀₀* - hodnoty absorbance při vlnové délce 700 nm,

Pomocí programu přepojeného se spektrofotometrem (*UVPC Personal Spectroscopy Software Version 3.9, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.*) byla po změření absorbancí standardu se známým množstvím proteinů vytvořena kalibrační přímka, která byla následně použita ke zjištění celkového množství proteinů ve vzorcích výpočtem na základě naměřené absorbance. Z hodnot získaných ve třech sadách byly vypočteny průměry a byla tak získána výsledná koncentrace proteinů v lyzátech vzorků před ředěním, viz tab. č. 8.

Podle výsledných koncentrací proteinů v lyzátech byly připraveny vzorky pro nanášení na gel smíchaním lyzátu, pufru RIPAPP a 4xSB tak, aby v nich byla koncentrace proteinů $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($20 \mu\text{g}$ v $20 \mu\text{l}$) a $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($10 \mu\text{g}$ v $20 \mu\text{l}$). (viz Kapitola 3.2.4.).

4.2 Imunodetekce proteinů a kvantifikace signálu

Pomocí přístroje *G:BOX Imaging System (SYNGENE)* byl zdokumentován signál značených proteinů na membráně. Získané fotografie signálů (následně invertované v programu *AdobePhotoshop*) jsou zobrazeny na obr.č. 10.



množství nanášených proteinů: $20 \mu\text{g}$

množství nanášených proteinů: $10 \mu\text{g}$

Obr.č. 10. Fotografie membrány se signálem alfa-dystroglykanu a beta-dystroglykanu. V horní části obrázku je zobrazen signál získaný pro α -DG a ve spodní části je zobrazen signál získaný pro β -DG. C1 a C2 jsou signály kontrolních vzorků a P1 a P2 jsou signály pacientů s podezřením na α -DG.

Tyto fotografie byly dále upraveny v programu *AdobePhotoshop* (zobrazeno na obr.č. 11 pro α -DG a na obr.č. 12 pro β -DG na str. 44) pro docílení vyššího kontrastu a v programu

Quantity One (BioRad) byla kvantifikována intenzita signálu pro jednotlivé proužky proteinů u vzorků lyzátů, jejichž koncentrace byla $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, neboť u vzorků o koncentraci $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nebyl signál dostatečně silný. Pro každý vzorek byl signál změřen 5x a ze získaných hodnot byl vypočten průměr (zobrazeno v tab.č. 9 pro α -DG a v tab.č. 10 pro β -DG).

Tab.č. 9. Odečtení intenzity signálu pro alfa-dystroglykan pomocí programu *Quantity One* na přístroji *G:BOX Imaging System (SYNGENE)*.

<i>měření</i>	<i>intenzita C1/10⁻⁷</i>	<i>intenzita C2/10⁻⁷</i>	<i>intenzita P1/10⁻⁶</i>	<i>intenzita P2/10⁻⁶</i>
1	1,93	3,00	4,02	3,34
2	1,95	3,18	4,37	3,08
3	1,95	3,08	4,37	3,58
4	1,96	3,17	4,64	3,52
5	1,93	3,26	5,35	3,57
průměr	1,94	3,14	4,55	3,42

C1 a C2 jsou signály kontrolních vzorků (bez defektu na α -DG i β -DG) a P1 a P2 jsou signály pacientů s podezřením na α -DGP

Tab.č. 10. Odečtení intenzity signálu pro beta-dystroglykan pomocí programu *Quantity One* na přístroji *G:BOX Imaging System (SYNGENE)*.

<i>měření</i>	<i>intenzita C1/10⁻⁷</i>	<i>intenzita C2/10⁻⁷</i>	<i>intenzita P1/10⁻⁷</i>	<i>intenzita P2/10⁻⁶</i>
1	3,04	2,44	2,71	3,23
2	3,00	2,38	2,67	3,21
3	3,08	2,38	2,74	2,93
4	3,03	2,46	2,68	3,16
5	2,88	2,38	2,56	3,24
průměr	3,00	2,41	2,67	3,16

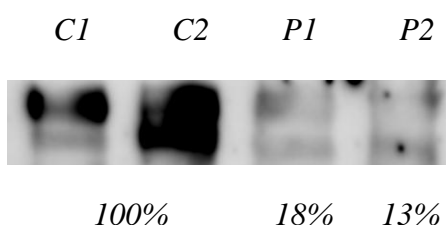
C1 a C2 jsou signály kontrolních vzorků (bez defektu na α -DG i β -DG) a P1 a P2 jsou signály pacientů s podezřením na α -DGP

Z hodnot signálů kontrolních vzorků byl vypočten průměr, který představoval 100 %. Poté bylo u pacientů s podezřením na α -DGP vypočteno relativní zastoupení signálu (v procentech) vůči kontrolním vzorkům (viz tab.č. 11).

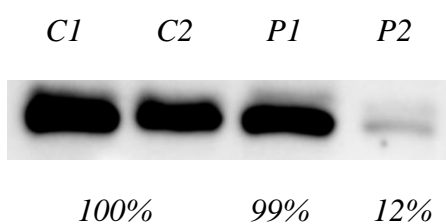
Tab.č. 11. Procentuální zastoupení signálu glykosylovaného alfa-dystroglykanu a signálu beta-dystroglykanu u pacientů s podezřením na alfa-dystroglykanopatie.

	<i>C</i> (%)	<i>P1</i> (%)	<i>P2</i> (%)
<i>α-DG</i>	100	18	13
<i>β-DG</i>	100	99	12

Zobrazení signálů vzorků pro plně glykosylovaný α -DG a pro signál β -DG společně s procentuálním zastoupením vůči kontrole je znázorněno na obr.č. 11 a obr.č. 12.



Obr.č. 11. Analýza množství plně glykosylovaného alfa-dystroglykanu pomocí metody „Western Blot“ v kosterním svalu u pacientů s podezřením na CDG syndrom a kontrol. Vzorky byly separovány na 8% gelu, přeneseny na membránu a detekce byla provedena pomocí protilátky H116C4 (Merck) C1 a C2 jsou signály kontrolních vzorků a P1 a P2 jsou signály pacientů s podezřením na α -DGP



Obr.č. 12. Analýza množství plně glykosylovaného beta-dystroglykanu pomocí metody „Western Blot“ v kosterním svalu u pacientů s podezřením na CDG syndrom a kontrol. Vzorky byly separovány na 8% gelu, přeneseny na membránu a detekce byla provedena pomocí primární protilátky proti β -DG (Abcam). C1 a C2 jsou signály kontrolních vzorků a P1 a P2 jsou signály pacientů s podezřením na α -DGP

5 Diskuze

CDG jsou velice vzácná dědičná onemocnění, která vykazují široké spektrum klinických příznaků od mírných až po vážné poruchy organismu, které mohou vést až k úmrtí. Do této velice rozsáhlé skupiny patří α -DGP, které jsou způsobeny geny, jejichž mutace mohou vést k hypoglykosylaci α -DG.

Diagnostika α -DG je obtížná jednak z důvodu nedostatku vhodných analytických metod pro určení diagnózy a jednak z důvodu neustále se rozrůstajícího počtu nově popsanych genů, které se mohou účastnit procesu syntézy, úpravy a správné funkce α -DG.

Pomocí metody „Western Blot“ bylo u pacienta P1 nalezeno významné snížení signálu pro glykosylovanou formu α -DG (na 18 % hodnoty kontrolních vzorků), což jasně poukazuje na porušenou glykosylaci α -DG.

Relativní zastoupení β -DG oproti kontrolám, které činí 99 %, dokazuje, že exprese β -DG není ovlivněna. Protože α -DG a β -DG by měly být v poměru 1:1, zastoupení β -DG je možno v tomto případě použít jako tzv. „kontrolní protein“, vůči kterému je normalizován signál pro glykosylovaný α -DG (po normalizaci tato hodnota odpovídá 18.2 % hodnoty kontrol). Tyto výsledky rovněž naznačují, že gen pro dystroglykan s největší pravděpodobností neobsahuje žádnou mutaci, která by způsobila poruchu.

Naopak výrazně snížený signál glykosylovaného α -DG indikuje, že P1 by mohl mít mutaci v některém z genů kódujících enzymy podílející se na procesu *O*-glykosylace α -DG oligosacharidovými řetězci vázanými přes manosu.

Touto metodou byla tedy u P1 diagnostikována α -DGP. Bližší diagnostické zacílení však touto metodou určit nelze, a bude tak nutné dále použít molekulárně-genetické analýzy genů, jejichž mutace vedou k α -DGP.

Paralelně s metodou „Western Blot“ byla u pacienta P1 provedena imunohistochemická analýza obsahu alfa-dystroglykanu na řezech kosterního svalu odebraného při biopsii (*prof. MUDr. J. Zámečník, Ph.D., Laboratoř neuropatologie a svalových biopsií, Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole*). Výsledek

imunohistochemické analýzy je zobrazen na obr.č. 13 a dokazuje porušení svalové tkáně u pacienta P1.



Obr.č. 13. Imunohistochemický průkaz alfa-dystroglykanu v kosterním svalu u pacienta P1 a kontroly. Na levé straně obrázku je zobrazen výsledek imunohistochemické analýzy neporušené svalové tkáně a na pravé straně je zobrazen výsledek této analýzy svalové tkáně u pacienta P1, kde si lze povšimnout oslabení až fokálních výpadků exprese α -DG. Detekce byla provedena pomocí IHH6 (Merck). S laskavým svolením prof. MUDr. J. Zámečnicka, Ph.D., (Laboratoř neuropatologie a svalových biopsií, 2. LF UK a FN v Motole)

Signál glykosylovaného α -DG u P2 byl také jako u předchozího případu velmi slabý oproti kontrolám (pouze na 13 % hodnoty kontrol), avšak signál u β -DG byl taktéž výrazně snížen, a to na 12 % hodnot kontrol.

U P2 bylo tedy zjištěno snížení obsahu glykosylovaného α -DG a zároveň (v podobné míře) snížení obsahu β -DG. Do úvahy proto přicházela možnost, že pacient P2 by mohl mít mutace v genu kódujícím dystroglykan (*DAG1*).

U pacienta P2 bylo indikováno molekulárně-genetické vyšetření panelu genů zodpovědných za svalové dystrofie (doc. RNDr. L. Fajkusová, CSc. Sekce vrozených genetických chorob, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno), kde byla zjištěna mutace v genu *LAMA2*, který kóduje lamininovou alfa-podjednotku (viz obr.č. 2) u lamininu 2, lamininu 4 a lamininu 12 (65), který je zodpovědný za správné navázání lamininu na extracelulární matrix (66). *LAMA2* patří do skupiny genů, jejichž mutace vedou ke svalovým dystrofiím. Je možné předpokládat, že tato porucha struktury lamininů způsobila destabilizaci α -DG

i β -DG v sarkolemové membráně svalových buněk, což by vysvětlovalo snížený signál jak na α -DG tak i na β -DG při provádění imunodetekci.

Pro metodu „Western Blot” byly použity pouze dva kontrolní vzorky (C1 a C2) a z nich byla získána průměrná hodnota intenzity signálu. Více kontrol nebylo k dispozici, protože svalová biopsie je invazivní metoda, a kontrolní materiál je tedy obtížné získat.

Taktéž byly použity dvě rozdílné koncentrace proteinů ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) ve vzorcích pro získání dvou možných řad signálů s různou intenzitou pro možnost vhodného výběru pro vyhodnocení. Po vyfotografování membrán bylo zjevné, že signál vzorků s nižší koncentrací proteinů je příliš slabý na vyhodnocování. Proto bylo vyhodnocení výsledků provedeno jen na vzorcích s vyšší koncentrací proteinů.

Snížení obsahu glykosylovaného α -DG detegované pomocí metody „Western Blot” bylo v souladu s imunohistochemickou analýzou (obr.č.13 na str. 46).

6 Závěr

Předkládaná práce shrnuje současné poznatky o skupině onemocnění alfa-dystroglykanopatií jako součásti dědičných poruch glykosylace. Specificky byla zaměřena na strukturu, posttranslační modifikaci a patologii alfa-dystroglykanu.

V pilotním experimentu byla úspěšně otestována použitelnost metody „Western blot“ zahrnující elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného, elektropřenosu proteinů na membránu a následné imunodetekce pomocí specifických protilátek proti alfa- a beta-dystroglykanu pro diferenciální diagnostiku u dvou pacientů (P1, P2) s podezřením na alfa-dystroglykanopatii tedy vzácný typ dědičné poruchy glykosylace.

V kosterním svalu byl u obou vyšetřovaných pacientů nalezen snížený obsah alfa-dystroglykanu a u pacienta P2 byl detekován i snížený obsah beta-dystroglykanu. Nálezy jsou v korelaci s dalšími vyšetřeními a jsou podkladem pro použití v diferenciálně-diagnostické rozvaze u pacientů s podezřením na alfa-dystroglykanopatie.

7 Citovaná literatura

1. **T. Hennet.** Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta. 1820.* 2012, stránky 1306-1317.
2. **J. Jaeken, H. Stibler, B. Hagberg.** The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta Paediatr. Scand. Suppl. 375.* 1991, stránky 1-71.
3. **M. Aebi, A. Helenius, B. Schenk, R. Barone, A. Fiumara, S.G. Berger, T. Hennet, T. Imbach, A. Stutz, C. Bjursell, A. Uller, J.G. Washstrom, P. Briones, E. Cardo, P. Clayton, B. Winchester, V. Cormier-Dalre, P. de Lonlay, M. Cuer, T. Dupre, N. Seta, T. de Koning, L. Dorland, F. de Loos, L. Kupers.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First international workshop on CDGS. *Glycoconj. J. 16.* 1999, stránky 669-671.
4. **T. Hennet, J. Cabalzar.** Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycolyx dysfunction. *Trends Biochem. Sci. 40.* 2015, 377-384.
5. **H.H. Freeze, J.X. Chong, M.J. Bamshad, B.G. Ng.** Solving glycosylation disorders: Fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am. J. Hum. Genet. 94.* 2014, stránky 161-175.
6. **N. Ondrušková.** Studium transferinu jako markeru dědičných poruch glykosylace, Diplomová práce. *Praha: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, katedra biochemie,* 2010.
7. **H.H. Freeze, E.A. Eklund, B.G. Ng, M.C. Patterson.** Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol. 11.* 2012, stránky 453-466.
8. **K. Scott, T. Gadomski, T. Kozicz, E. Morava.** Congenital disorders of glycosylation: new defets and still counting. *J. Inherit. Metab. Dis. 37.* 2014, stránky 609-617.
9. **R. Niehues, M. Hasilik, G. Alton, C. Körner, M. Schiebe-Sukumar, H.G. Koch, K.P. Zimmer, R. Wu, E. Harms, K. Reiter, K. von Figura, H.H. Freeze, H.K. Harms, T. Marquardt.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J. Clin. Invest. 101.* 1998, stránky 1414-1420.
10. [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3553&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=CDG&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group%20of%20diseases=Congenital-disorder-of-glycosylation&title=Congenital-disorder-of-gl](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3553&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=CDG&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group%20of%20diseases=Congenital-disorder-of-glycosylation&title=Congenital-disorder-of-gl). [Citace: 4. 2. 2016]
11. **D.J. Blake, A. Weir, S.E. Newey, K.E. Davies.** Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev. 82.* 2002, stránky 291-329.
12. **M. Dubreej, E. Lanson, O. Ibraghimov-Beskrovnaya, S.L. Roberds, K.P. Campbell, P. Ekblom.** Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *J. Cell Biol. 130.* 1995, stránky 79-91.

13. **M. Durbeej, M.D. Henry, M. Ferletta, K.P. Campbell, P. Ekblom.** Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 46. 1998, stránky 449-457.
14. **C. Herzog, C. Has, C.W. Franzke, F.G. Echtermeyer, Ursula Schlötzer-Schrehardt, S. Kröger, E. Gustafsson, R. Fässler, L. Bruckner-Tuderman.** Dystroglycan in skin and cutaneous cells: beta-subunit is shed from the cell surface. *J. Invest. Dermatol.* 122. 2004, stránky 1372-1380.
15. **O. Ibraghimov-Beskrovnaya, A. Milatovich, T. Ozcelik., B. Yang, K. Koepnick, U. Francke, K.P. Campbell.** Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.* 2. 1993, stránky 1651-1657.
16. **O. Ibraghimov-Besrovnaya, J.M. Ervasti, C.J. Leveille, C.A. Slaughter, S.W. Sernett, K.P. Campbell.** Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355. 1992, stránky 696-702.
17. **K.H. Holt, R.H. Crosbie, D.P. Venzkea, K.P. Campbell.** Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett.* 468. 2000, stránky 79-83.
18. **B.J. Petrof, J.B. Shrager, H.H. Stedman, A.M. Kelly, H.L. Sweeney.** Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90. 1993, stránky 3710-3714.
19. **J.F. Talts, Z. Andac, W. Göhring, A. Brancaccio, R. Timpl.** Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 18. 1999, stránky 863-870.
20. **Z. Andac, T. Sasaki, K. Mann, A. Brancaccio, R. Deutzmann, R. Timpl.** Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 287. 1999, stránky 253-264.
21. **M. Durbeej, J.F. Talts, M.D. Henry, P.D. Yurchenco, K.P. Campbell, P. Ekblom.** Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* 69. 2001, stránky 121-134.
22. **T. Masaki, K. Matsumura.** Biological role of dystroglycan in schwann cell function and its implications in peripheral nervous system disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, stránky 1-17.
23. **F. Saito, S.A. Moore, R. Barresi, M.D. Henry, A. Messing, S.E. Ross-Barta, R.D. Cohn, R.A. Williamson, K.A. Sluka, D.L. Sherman, P.J. Brophy, J.D. Schmelzer, P.A. Low, L. Wrabetz, M.L. Feltri, K.P. Campbell.** Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 38. 2003, stránky 747-758.
24. **K. Matsumura, A. Chiba, H. Yamada, H. Fukuta-Ohi, S. Fujita, T. Endo, A. Kobata, L.V. Anderson, I. Kanazawa, K.P. Campbell, T. Shimizu.** A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* 272. 1997, stránky 13904-13910.
25. **S.J. Winder.** The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci.* 26. 2001, stránky 118-124.

26. **R. Barresi, K.P. Campbell.** Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J. Cell Sci.* 119. 2006, stránky 199-207.
27. **A. Brancaccio, T. Schulthess, M. Gesemann, J. Engel.** Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle α -dystroglycan. *FEBS lett.* 368. 1995, stránky 139-142.
28. **A. Brancaccio, T. Schulthess, M. Gesemann, J. Engel.** The N-terminal region of alpha-dystroglycan is an autonomous globular domain. *Eur. J. Biochem.* 246. 1997, stránky 166-172.
29. **J.M. Ervasti, K.P. Campbell.** Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66. 1991, stránky 1121-1131.
30. **M.A. Bowe, K.A. Deyst, J.D. Leszyk, J.R. Fallon.** Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 12. 1994, stránky 1173-1180.
31. **S. Sugita, F. Saito, J. Tang, J. Satz, K. Campbell, T. C. Sudhof.** A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.* 154. 2001, stránky 435-445.
32. **E. Hohenester, D. Tisi, J.F. Talts, R. Timpl.** The Crystal Structure of a Laminin G-like Module Reveals the Molecular Basis of α -Dystroglycan Binding to Laminins, Perlecan, and Agrin. *Mol. Cell* 4. 1999, stránky 783-792.
33. **E. Stevens, S. Torelli, L. Feng, R. Phadke, M.C. Walter, P. Schneiderat, A. Eddaoudi, C.A. Sewry, F. Muntoni.** Flow cytometry for the analysis of α -dystroglycan glycosylation in fibroblasts from patients with dystroglycanopathies. *PLoS One* 8. 2013, stránky 1-9.
34. **C. Godfrey, A.R. Foley, E. Clement, F. Muntoni.** Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21. 2011, stránky 278-285.
35. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14118>. [Citace: 21. 2. 2016]
36. **A.K. Chiba, H. Matsumura, T. Yamada, T. Inazu, S. Shimizu, I. Kusunoki, A. Kanazawa, A. Kobata, T. Endo.** Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine periprethal nerve α -dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in binding of α -dystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.* 272. 1997, stránky 2156-2162.
37. **J.E. Hewitt.** Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792. 2009, stránky 853-861.
38. **T. Willer, M.C. Valero, W. Tanner, J. Cruces, S. Strahl.** O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13. 2003, stránky 621-630.
39. **H. Manya, A. Chiba, A. Yoshida, X. Wang, Y. Chiba, Y. Jigami, R.U. Margolis, T. Endo.** Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101. 2004, stránky 500-505.
40. **L.A.P. Jurado, A. Coloma, J. Cruces.** Identification of a human homologue of the Drosophila rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative O-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 58. 1999, stránky 171-180.

41. **T. Willer, W. Amselgruber, R. Deutzmann, S. Strahl.** Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 12. 2002, stránky 771-783.
42. **W.L. Zhang, C. Betel, H. Schachter.** Cloning and expression of a novel UDP-GlcNAc: alpha-D-mannoside beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase homologous to UDP-GlcNAc: alpha-3-D-mannoside beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Biochem. J.* 361. 2002, stránky 153-162.
43. **A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Tapaloglu, T. Toda, T. Endo.** Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase POMGnT1. *Dev. Cell* 1. 2001, stránky 717-724.
44. **S. Takahashi, T. Sasaki, H. Manya, Y. Chiba, A. Yoshida, M. Mizuno, H. Ishida, F. Ito, T. Inazu, N. Kotani, S. Takasaki, M. Takeuchi, T. Endo.,** A new, b1,2-N-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans. *Glycobiology* 11. 2002, stránky 37-45.
45. **D. Live, L. Wells, G.J. Boons.** Dissecting the Molecular Basis of the Role of the O-Mannosylation Pathway in Disease: α -Dystroglycan and Forms of Muscular Dystrophy. *Chembiochem.* 14. 2013, stránky 2392–2402.
46. **T. Roscioli, E.J. Kamsteeg, K. Buysse, I. Maystadt, J. van Reeuwijk, C. van den Elzen, E. van Beusekom, M. Riemersma, R. Pfundt, L.E. Vissers, M. Schraders, U. Altunoglu, M.F. Buckley, H.G. Brunner, B. Grisart, H. Zhou, J.A. Veltman, C. Gilissen, G.M. Mancini, P. Delrée, M.A. Willemsse, D.P. Ramadža, D. Chitayat, C. Bennett, E. Sheridan, E.A. Peeters, G.M. Tan-Sindhunata, C.E. de Die-Smulders, K. Devriendt, H. Kayserili, O.A. El-Hashash, D.L. Stemple, D.J. Lefeber, Y.Y. Lin, H. van Bokhoven.** Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Nat. Genet.* 44. 2012, stránky 581-585.
47. **M. Riemersma, D.S. Froese, W. van Tol, U.F. Engelke, J. Kopec, M. van Scherpenzeel, A. Ashikov, T. Krojer, F. von Delft, M. Tessari, A. Buczkowska, E. Swiezewska, L.T. Jae, T.R. Brummelkamp, H. Manya, T. Endo, H. van Bokhoven, W.W. Yue, D. Lefeber.** Human ISPD Is a Cytidyltransferase Required for Dystroglycan O-Mannosylation. *Chem. Biol.* 22. 2015, stránky 1643-1652.
48. **T. Geis, K. Marquard, T. Rodl, C. Reihle, S. Schirmer, T. von Kalle, A. Bornemann, U. Hehr, M. Blankenburg.** Homozygous dystroglycan mutation associated with a novel muscle-eye-brain disease-like phenotype with multicystic leucodystrophy. *Neurogenetics* 14. 2013, stránky 205-213.
49. **L. Wells.** The O-mannosylation pathway: glycosyltransferases and proteins implicated in congenital muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 288. 2013, stránky 6930-6935.
50. **D. Beltran-Valero de Bernabe, S. Currier, A. Steinbrecher, J. Celli, E. van Beusekom, B. van der Zwaag, H. Kayserili, L. Merlini, D. Chitayat, W.B. Dobyns, B. Cormand, A. Lehesjoki, J. Cruces, T. Voit, C.A. Walsh, H. van Bokhoven, H.G. Brunner.** Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 71. 2002, stránky 1033-1043.

51. **C. Kranz, C. Jungeblut, J. Denecke, A. Erlekotte, C. Sohlbach, V. Debus, H.G. Kehl, E. Harms, A. Reith, S. Reichel, H. Gröbe, G. Hammersen, U. Schwarzer, T. Marquardt.** A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 80. 2007, stránky 433-440.
52. **R. Barone, C. Aiello, V. Race, E. Morava, F. Folquier, M. Riemersma, C. Passarelli. D. Concolino, M. Carella, F. Santorelli, W. Vleugels, E. Mercuri, D. Garozzo, L. Sturiale, S. Messina, J. Jaeken, A. Fiumara, R.A. Wevers, E. Bertini, G. Matthijs, D.J. Lefeber.** DPM2-CDG: a uscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. *Ann. Neurol.* 72. 2012, stránky 550-558.
53. **D.J. Lefeber, J. Schönberger, E. Morava, M. Guillard, K.M. Huyben, K. Verrijp, O. Grafakou, A. Evangelidou, F.W. Preijers, P. Manta, J.Yildiz, S. Grünwald, M. Spilioti, C. van den Elzen, D. Klein, D. Hess, H. Ashida, J. Hofsteenge, Y. Maeda, L. van den Heuvel, M. Lammens, L. Lehle, R.A. Wevers.** Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am. J. Hum. Genet.* 85. 2009, stránky 76-86.
54. **A.C. Yang, B.G.Ng, S.A. Moore, J. Rush, C.J. Waechter, K.M. Raymond, T. Willer, K.P. Campbell, H.H. Freeze, L. Mehta.** Congenital disorders of glycosylation due to DPM1 mutations presenting with dystroglycanopathy-type congenital muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* 110. 2013, stránky 345-351.
55. **B. Ning, A.D. Elbein.** Cloning, expression and characterization of the pig liver GDP-mannosepyrophosphorylase: Evidence that GDP-mannose and GDP-Glc pyrophosphorylases are different proteins. *Eur. J. Biochem.* 267. 2000, stránky 6866-6874.
56. **C. Godfrey, E. Clement, R. Mein, M. Brockington, J. Smith, B. Talim, V. Straub, S. Robb, R. Quinlivan, L. Feng, C. Jimenez-Mallebrera, E. Mercuri, A.Y. Manzur, M. Kinali, S. Torelli, S.C. Brown, C.A. Sewry, K. Bushby, H. Topaloglu, K. North, S. Abbs, F. Muntoni.** Refining genotype-phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 130. 2007, stránky 2725-2735.
57. **C.H. Wang, C.G. Bonnemann, A. Rutkowski, T. Sejersen, J. Bellini, V. Battista, J.M. Florence, U. Schara, P.M. Schuler, K. Wahbi, A. Aloysius, R.O. Bash, C. Bérout, E. Bertini, K. Bushby, D. Cohn, A.M. Connolly, N. Deconinck, I. Desguerre, M. Eagle, B. Estournet-Mathiaud, A. Ferreira, A. Fajak, N. Goemans, S.T. Iannaccone, P. Jouinot, M. Main, P. Melacini, W. Mueller-Felber, F. Muntoni, L.L. Nelson, J. Rahbek, S. Quijano-Roy, C. Sewry, K. Storhaug, A. Simonds, B. Tseng, J. Vajsar, A. Vianello, R. Zeller.** Consensus statement on standard of care for congenital muscular dystrophies. *J. Child Neurol.* 25. 2010, stránky 1559-1581.
58. **E. Clement, E. Mercuri, C. Godfrey, J. Smith, S. Robb, M. Kinali, V. Straub, K. Bushby, A. Manzur, B. Talim, F. Cowan, R. Quinlivan, A. Klein, C. Longman, R. McWilliam, H. Topaloglu, R. Mein, S. Abbs, K. North, A.J. Barkovich, M. Rutherford, F. Muntoni.** Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann. Neurol.* 64. 2008, stránky 573-582.

59. **M.C. Manzini, D.E. Tambunan, R.S. Hill, T.W. Yu, T.M. Maynard, E.L. Heinzen, K.V. Shianna, C.R. Stevens, J.N. Partlow, B.J. Barry, J. Rodriguez, V.A. Gupta, A.K. Al-Qudah, W.M. Eyaid, J.M. Friedman, M.A. Salih, R. Clark, I. Moroni, M. Mora, A.H. Beggs, S.B. Gabriel, C.A. Walsh.** Exome sequencing and functional validation in zebrafish identity GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 91. 2012, stránky 541-547.
60. **S. Vuillaumier-Barrot, C. Bouchet-Séraphin, M. Chelbi, L. Devisme, S. Quentin, S. Gazal, A. Laquerrière, C. Fallet-Bianco, P. Loget, S. Odent, D. Carles, A. Bazin, J. Aziza, A. Clemenson, F. Guimiot, M. Bonnière, S. Monnot, C. Bole-Feysot, J.P. Bernard, L. Loeuillet, M. Gonzales, K. Socha, B. Grandchamp, T. Attié-Bitach, F. Encha-Razavi, N. Seta.** Identification of mutations in TMEM5 and ISPD as a cause of severe cobblestone lissencephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 91. 2012, stránky 1125-1143.
61. **J. Vajsar, H. Schachter.** Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 1. 2006, str. 29.
62. **N. Ondrušková, T. Honzík, J. Kytarová, M. Matoulek, J. Zeman, H. Hansíková.** Isoelectric focusing of serum apolipoprotein C-III as sensitive screening method for the detection of O-glycosylation disturbances. *Prague Med. Rep.* 116. 2015, stránky 73-86.
63. **M.A. Jones, D. Rhodenizer, C. da Silva, I.J. Huff, L. Keong, L.J. Bean, B. Coffee, C. Collins, A.K. Tanner, M. He, M.R. Hegde.** Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Mol. Genet. Metab.* 110. 2013, stránky 78-85.
64. **O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randal.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 1951, stránky 265-275.
65. <http://www.uniprot.org/uniprot/P24043>. [Citace: 20. 4. 2016]
66. **J. Dinga, D. Zhaob, R. Duc, Y. Zhanga, H. Yanga, J. Liua, C. Yanb, F. Zhangc, H. Xiong.** Clinical and molecular genetic analysis of a family with late-onset LAMA2-related muscular dystrophy. *Brain Dev.* 38. 2016, stránky 242-249.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka