

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie



Diplomová práce

**STUDIUM TRANSFERINU JAKO MARKERU  
DĚDIČNÝCH PORUCH GLYKOSYLACE**

**Study of transferrin as a marker  
of congenital disorders of glycosylation**

*Nina Ondrušková*

vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.  
a Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

navazující magisterský studijní obor Biochemie

pracoviště: Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch,

KDDL 1.LF UK a VFN

# Poděkování

Mé poděkování patří na prvním místě RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za vedení diplomové práce, poskytování mnoha rad, korektury a též za podporu při jejím vypracování. Děkuji své školitelce zastupující katedru biochemie PřF UK v Praze Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., bez které by práce nemohla vzniknout, a Ing. Kateřine Veselé, PhD za přínosné konzultace a strávený čas. Za pomoc se sazbou textu bych chtěla poděkovat Lukáši Linhartovi a za korektury Kateřine Jiříčkové. V neposlední řadě děkuji rodině a všem přátelům, kteří mě během psaní práce podporovali a pomáhali mi.

Práce vznikla za podpory MSM0021620806 a 6FP-EUROGLYCANET LSHM-CT-2005-512131.

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne ..... 2010

.....

# Abstrakt

Dědičné poruchy glykosylace proteinů (CDG) představují rozsáhlou skupinu závažných metabolických onemocnění, která jsou způsobena poruchou v biosyntéze glykoproteinů. Pro „screeningové“ vyšetření poruch N-glykosylace se využívá analýza sialovaných isoformů sérového transferinu (Tf) pomocí isoelektrické fokusace (IEF). V případě nemoci dochází ke změnám v zastoupení jednotlivých isoformů Tf, rozlišujeme patologický profil typu I (snížený tetra-, zvýšený di- a asialotransferin) a typu II (má navíc zvýšený tri- a monosialotransferin). Cílem diplomové práce bylo: 1) stanovit referenční rozmezí pro spektrum sialovaných forem Tf separovaných pomocí IEF a 2) provést u tří pacientů (P1-P3) s klinickým podezřením na CDG biochemickou a molekulárně genetickou analýzu. Materiálem byly vzorky sér a genomové DNA od tří pacientů s klinickým podezřením na CDG a rodinných příslušníků od P1. Kontrolní soubor tvořilo 99 vzorků sér od zdravých jedinců ve věku 2-42 let. Sérum bylo analyzováno pomocí IEF s následnou imunofixací, SDS-PAGE a Western blotem s využitím specifické protilátky proti lidskému Tf (Dako). Profily Tf byly kvantifikovány pomocí programu AlphaEaseFC (Alpha Innotech). Data byla zpracována pomocí programu STATISTICA 9.0 (StatSoft). Analýza genů *TF* a *PMM2* byla provedena pomocí cyklického sekvenování ABI PRISM (Applied Biosystems). V práci byly stanoveny referenční intervaly pro jednotlivé isoformy Tf: hexa- ( $6,3 \pm 1,29$  %), penta- ( $18,26 \pm 2,23$  %), tetra- ( $55,11 \pm 4,05$  %), tri- ( $13,66 \pm 2,47$  %), di- ( $6,64 \pm 1,90$  %), mono- a asialotransferin ( $< 1$  %). Statisticky významná závislost jednotlivých sialotransferinů na věku a pohlaví nebyla nalezena. U P1 byl detekován patologický profil Tf typu I. Ten byl způsoben doposud nepopsanou heterozygotní mutací c.1889A>C v genu *TF*, která má za důsledek blokad glykosylačního místa N630 v Tf. Stejný nález byl potvrzen u jeho tří rodinných příslušníků. U P2 byl nalezen patologický profil Tf typu II a vyloučena přítomnost polymorfismů v genu *TF*. Byl zařazen do skupiny pacientů s CDG-IIx. U P3 s patologickým profilem Tf typu I byla potvrzena diagnosa PMM2-CDG na základě identifikace dvou patologických mutací c.338C>T a c.422G>A v genu *PMM2*.

**klíčová slova:** *transferin, isoelektrická fokusace, CDG, PMM2-CDG, diagnostika*

# Abstract

Congenital disorders of glycosylation (CDG) represent a heterogeneous group of multisystemic metabolic disorders which are caused by defects in biosynthetic pathways of glycoproteins. The screening test for N-glycosylation disorders is the analyses of sialylated isoforms of serum transferrin (Tf) by means of isoelectric focusing (IEF). Two distinct pathological IEF patterns of Tf are observed. A type I pattern is characterized by a decrease of tetra- and an increase of di- and asialotransferrin, whereas a type II pattern shows in addition an increase of tri- and monosialotransferrin. The aims of diploma thesis were: 1) to evaluate reference range for spectrum of sialylated forms of Tf separated by IEF and 2) to perform biochemical and molecular analyses in three patients (P1-P3) with clinical suspicion for CDG. Serum and genomic DNA from three patients with clinical suspicion for CDG and family members of P1 were analysed. Sera from 99 healthy volunteers within the age range of 2-42 years served as a control group. Tf was analysed by IEF with direct immunofixation, SDS-PAGE and Western blot using specific antibody against human Tf (Dako). Profiles of Tf were quantified by AlphaEaseFC software (Alpha Innotech). Data were analysed by software STATISTICA 9.0 (StatSoft). *TF* a *PMM2* genes were analysed by cyclic sequencing ABI PRISM (Applied Biosystems). Reference range for individual Tf isoforms was determined: hexa- ( $6,3 \pm 1,29$  %), penta- ( $18,26 \pm 2,23$  %), tetra- ( $55,11 \pm 4,05$  %), tri- ( $13,66 \pm 2,47$  %), di- ( $6,64 \pm 1,90$  %), mono- and asialotransferrin ( $< 1$  %). No significant correlations between individual sialotransferrins and age or gender were found. A type I Tf pattern found in P1 was caused by novel heterozygous mutation c.1889A>C in *TF* gene which blocks N-glycosylation of Tf in the position N630. Identical results were found in three family members of P1. In P2, pathological type II Tf pattern was found. No polymorphism was detected in *TF* gene. P2 was classified as CDG II-x. In P3, type I Tf pattern was found. The analyses of *PMM2* gene revealed that P3 is compound heterozygote for mutations c.338C>T and c.422G>A, proving the diagnosis of PMM2-CDG.

**key words:** *transferrin, isoelectric focusing, CDG, PMM2-CDG, diagnostics*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Literární úvod</b>	<b>1</b>
1.1	Dědičné poruchy glykosylace . . . . .	1
1.1.1	Charakteristika dědičných poruch glykosylace . . . . .	1
1.1.1.1	Rozdělení dědičných poruch glykosylace . . . . .	2
1.1.2	Diagnostika dědičných poruch glykosylace . . . . .	12
1.1.2.1	Isoelektrická fokusace sérového transferinu . . . . .	15
1.1.2.2	Prenatální diagnostika . . . . .	20
1.1.2.3	Sekundární příčiny hypoglykosylace . . . . .	20
1.1.3	Terapie dědičných poruch glykosylace . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Cíle diplomové práce</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>24</b>
3.1	Materiál . . . . .	24
3.1.1	Biologický materiál . . . . .	24
3.1.1.1	Přehled vzorků . . . . .	24
3.1.1.2	Klinický popis pacientů . . . . .	26
3.1.2	Chemikálie . . . . .	27
3.1.2.1	Čisté chemikálie . . . . .	27
3.1.2.2	Roztoky a pufry . . . . .	29
3.1.2.3	Enzymy, primery, protilátky . . . . .	30
3.1.3	Použité přístroje . . . . .	31
3.2	Metody . . . . .	32
3.2.1	Izolace krevního séra z plné krve . . . . .	32
3.2.2	Isoelektrická fokusace lidského sérového transferinu . . . . .	32
3.2.3	Detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace transferinu po inkubaci vzorků s neuraminidasou . . . . .	35
3.2.4	Proteinová analýza sérového transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce . . . . .	36

3.2.5	Molekulárně genetická analýza lidského genu pro transferin . . .	39
3.2.5.1	Izolace DNA ze suché krevní kapky . . . . .	39
3.2.5.2	Primery . . . . .	39
3.2.5.3	Optimalizace PCR genu pro lidský transferin . . . . .	40
3.2.5.4	Molekulárně genetická analýza lidského genu pro transferin u vyšetřovaných pacientů . . . . .	42
3.2.6	Molekulárně genetická analýza lidského genu pro fosfomanomutasu 2 . . . . .	47
3.2.7	Statistické zpracování dat . . . . .	49
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>50</b>
4.1	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací (část I.) . . . . .	50
4.1.1	Závislost relativního zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu na pohlaví a věku v kontrolním souboru . . . . .	52
4.1.2	Detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace po štěpení s neuraminidasou u vzorků kontrolního souboru . . .	54
4.2	Biochemická a molekulárně genetická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG (část II.) . . . . .	56
4.2.1	Biochemická analýza . . . . .	56
4.2.2	Molekulárně genetická analýza . . . . .	61
4.2.2.1	Molekulárně genetická analýza genu pro transferin . .	61
4.2.2.2	Molekulárně genetická analýza genu pro fosfomanomutasu 2 . . . . .	66
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>68</b>
5.1	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací (část I.) . . . . .	68
5.2	Biochemická a molekulárně genetická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG (část II.) . . . . .	69
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>72</b>
	<b>Literatura</b>	<b>73</b>
<b>A</b>	<b>Příloha 1</b>	<b>83</b>
<b>B</b>	<b>Příloha 2</b>	<b>93</b>
B.1	Prezentace na konferencích . . . . .	93

# Seznam obrázků

1.1	N-glykosylační reakce probíhající v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu (1. část N-glykosylace) . . . . .	5
1.2	N-glykosylační reakce probíhající v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu (2. část N-glykosylace) . . . . .	6
1.3	Schéma obecného diagnostického postupu při podezření na syndrom CDG	13
1.4	Mikroheterogenita lidského sérového transferinu podmíněná přítomností různých genetických variant, variabilním stupněm saturace $\text{Fe}^{3+}$ a obsahem kyseliny sialové . . . . .	16
1.5	Komplexní typ N-glykosidicky vázaného glykanu . . . . .	18
1.6	Schematické znázornění struktury glykanů tří sialovaných isoform transferinu s nejvyšším relativním zastoupením (z celkového množství transferinu) za fyziologických podmínek . . . . .	18
1.7	Typické spektrum sialovaných isoform sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací u vzorků jedinců pozitivních a negativních pro CDG . . . . .	20
3.1	Poměr pohlaví jedinců kontrolního souboru SK1–SK100 . . . . .	25
3.2	Věkové složení jedinců kontrolního souboru SK1–SK100 . . . . .	25
3.3	Výstup z analýzy profilů sialovaných isoform transferinu separovaných isoelektrickou fokusací sérového transferinu pomocí programu AlphaEaseFC (Alpha Innotech) . . . . .	35
3.4	Sekvence DNA, kterou enzym <i>Hpy</i> CH4IV specificky rozpoznává a štěpí na označených místech . . . . .	46
4.1	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra kontrolního souboru SK1–SK99 ( $n = 99$ ) . . . . .	51



4.2	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	52
4.3	Poměr relativního zastoupení mezi tetrasialotransferinem a trisialotransferinem nebo disialotransferinem separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	54
4.4	Profily sialovaných isoformů transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 5–7) u vzorků krevního séra analyzovaných jedinců . . . . .	55
4.5	Profily desializovaných variant transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 3–10) u vzorků krevního séra analyzovaných jedinců . . . . .	55
4.6	Profily sialovaných isoformů transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 5–7) u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů . . . . .	57
4.7	Profily desializovaných variant transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 3–10) u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů . . . . .	59
4.8	Profily různě glykosylovaných forem transferinu imunodetekovaných po separaci pomocí SDS-PAGE (7%T) a následným Western blotem u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů . . . . .	59
4.9	Část sekvence exonu 16 genu <i>TF</i> u vzorku pacienta P1 s označenou mutací c.1889A>C a kontroly . . . . .	62
4.10	Restrikční analýza mutace c.1889A>C v genu <i>TF</i> u vzorků gDNA rodiny pacienta P1 . . . . .	64
4.11	Rodokmen a výskyt mutace c.1889A>C v genu <i>TF</i> u rodiny pacienta P1 . . . . .	65
4.12	Část sekvence exonu 4 genu <i>PMM2</i> u vzorku pacienta P3 s označenou patologickou mutací c.338C>T a kontroly . . . . .	67
4.13	Část sekvence exonu 5 genu <i>PMM2</i> u vzorku pacienta P3 s označenou patologickou mutací c.422G>A a kontroly . . . . .	67
A.1	Závislost relativního zastoupení hexasialotransferinu separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	89
A.2	Závislost relativního zastoupení pentasialotransferinu separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	90

A.3	Závislost relativního zastoupení tetrasialotransferinu separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99	90
A.4	Závislost relativního zastoupení trisialotransferinu separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99	91
A.5	Závislost relativního zastoupení disialotransferinu separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99	91
A.6	Restrikční analýza mutace c.1889A>C genu <i>TF</i> u kontrolních vzorků DK1–DK20	92
B.1	Abstrakt k prezentaci „Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru.“z konference <i>Dědičné metabolické poruchy</i> 24. pracovní dny	94
B.2	Abstrakt k prezentaci „Pitfall in CDG-I diagnostics: identification of a novel transferrin polymorphism at the N-glycan attachment site.“z konference <i>Dědičné metabolické poruchy</i> 25. pracovní dny	95

# Seznam tabulek

1.1	Přehled CDG: poruchy N-glykosylace proteinů . . . . .	7
1.2	Přehled CDG: poruchy O-glykosylace proteinů (část 1/2) . . . . .	8
1.3	Přehled CDG: poruchy O-glykosylace proteinů (část 2/2) . . . . .	9
1.4	Přehled CDG: poruchy glykosylace glykosfingolipidů a glykosylfosfatidylinositolové kotvy . . . . .	10
1.5	Přehled CDG: poruchy vícenásobné glykosylace a dalších drah . . . . .	11
3.1	Složení gelu na isoelektrickou fokusaci transferinu . . . . .	33
3.2	Složení gelu na isoelektrickou fokusaci transferinu po inkubaci vzorků s neuraminidasou . . . . .	36
3.3	Složení gelu na SDS-PAGE sérového transferinu . . . . .	37
3.4	Program PCR cyklieru pro optimalizační PCR genu <i>TF</i> . . . . .	40
3.5	Složení směsi pro PCR pro optimalizační PCR genu <i>TF</i> . . . . .	41
3.6	Rozložení teplotního gradientu v bloku PCR cyklieru během hybridizační fáze optimalizační PCR genu <i>TF</i> . . . . .	41
3.7	Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu <i>TF</i> 1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15 a 16 . . . . .	42
3.8	Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu <i>TF</i> 8 a 12 . . . . .	43
3.9	Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu <i>TF</i> 3, 4, 5 a 17 . . . . .	43
3.10	Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu <i>TF</i> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 a 17 . . . . .	43
3.11	Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu <i>TF</i> 8 a 12 . . . . .	44
3.12	Program PCR cyklieru pro sekvenační PCR . . . . .	45
3.13	Směs na restriční analýzu mutace c.1889A>C v genu <i>TF</i> . . . . .	46
3.14	Produkty štěpení při restriční analýze mutace c.1889A>C v genu <i>TF</i> . . . . .	47
3.15	Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu <i>PMM2</i> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 . . . . .	47
3.16	Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu <i>PMM2</i> . . . . .	48
3.17	Pozice zkumavek v bloku PCR cyklieru při PCR genu <i>PMM2</i> . . . . .	48

4.1	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra kontrolního souboru SK1–SK99 (n = 99) . . . . .	51
4.2	Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	53
4.3	Poměr relativního zastoupení mezi tetrasialotransferinem a trisialotransferinem nebo disialotransferinem separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99 . . . . .	53
4.4	Zastoupení jednotlivých isoformů transferinu separovaných isoelektrickou fokusací v séru pacientů s podezřením na syndrom CDG a kontrol . . . . .	58
4.5	Spektrofotometrické stanovení aktivit fosfomanomutasy 2 a fosfomanomerasy v izolovaných lymfocytech u vyšetřovaného pacienta P3 . . . . .	60
A.1	Sekvence primerů genu <i>TF</i> . . . . .	84
A.2	Sekvence primerů genu <i>PMM2</i> . . . . .	84
A.3	Sekvence univerzálních primerů T7 a RP . . . . .	85
A.4	Velikost syntetizovaných fragmentů genu <i>TF</i> . . . . .	85
A.5	Velikost syntetizovaných fragmentů genu <i>PMM2</i> . . . . .	85
A.6	Relativní zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace ve vzorcích kontrolního souboru jedinců negativních pro CDG SK1–SK99 . . . . .	86
B.1	Evidence vypůjčovateli . . . . .	97

# Kapitola 1

## Literární úvod

### 1.1 Dědičné poruchy glykosylace

#### 1.1.1 Charakteristika dědičných poruch glykosylace

##### Úvod

Kongenitální (vrozené) poruchy glykosylace představují skupinu dědičných metabolických onemocnění zapříčiněných poruchou v enzymově katalysovaném procesu vázání oligosacharidových řetězců na biomakromolekuly (především proteiny). V praxi pro ně bylo přijato označení „CDG“, zkratka z anglického „Congenital disorders of glycosylation“ (původní název zněl „Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes“ [1]). Glykosylace je komplexní proces kotranslační a posttranslační modifikace, skládající se z řady chemických reakcí. To předurčuje výskyt velkého množství různých typů poruch glykosylační dráhy. V současnosti je popsáno již 42 typů CDG [2] a jejich počet nadále vzrůstá. Frekvence výskytu této skupiny autosomálně recesivních onemocnění se odhaduje na přibližně 1:50 000 až 1:100 000 [3], přičemž nejčastější typ CDG (PMM2-CDG) má prevalenci cca 1:20 000 [4]. První záznam o CDG pochází z roku 1984, kdy byl zdokumentován případ identických dvojčat se syndromem porušené sializace transferinu v séru a mozkomíšním moku [5].

##### Klinické příznaky

Klinické příznaky CDG zahrnují široké spektrum poruch na úrovni celého organismu. Kritický dopad porušené syntézy glykoproteinů na fungování biologicky významných procesů vychází z jejich důležité fyziologické úlohy – strukturální, ochranné, funkci při

reprodukcí, mezibuněčné adhezi, působení ve formě hormonů či enzymů [6], [7]. U pacientů trpících CDG bylo popsáno postižení následujících orgánů a systémů: mozku a periferního nervového systému, očí, kosterního a svalového systému, kůže, tukové tkáně, kardiovaskulárního systému, střev, jater, ledvin, pohlavních žláz, endokrinních orgánů, krevního a imunitního systému [8]. Zpravidla se vyskytuje psychomotorická retardace. Mezi časté symptomy CDG patří axiální hypotonie, strabismus, atypická morfologie (např. abnormální redistribuce tuku, invertované mamily), koagulopatie, hepatální nemoci, cerebelární hypoplasie. U postižených dětí se dále objevuje tzv. „hydrops fetalis“ (akumulace tekutin v těle plodu), zpomalený růst a neprosívání, cyklické zvracení či poruchy imunitního systému [8], [9]. V důsledku vážných infekcí a orgánového selhání je nezanedbatelně vysoké procento dětské úmrtnosti (cca 25%) [9]. Výjimečný případ z hlediska symptomů představuje MPI-CDG (deficit fosfomanoisomerasy), u kterého nedochází k neurologickému postižení všeobecně charakteristickému pro CDG. Projevuje se především chronickým průjmem, může se vyskytnout cyklické zvracení, neprosívání a enteropatie se ztrátou proteinů [10]. Klinická různorodost byla zaznamenána nejenom mezi jednotlivými typy CDG, ale také v rámci každé dané skupiny – obzvláště u PMM2-CDG (deficit fosfomanomutasy 2) se může míra závažnosti symptomů u pacientů výrazně odlišovat [11]. Protože klinické projevy syndromu CDG jsou variabilní a nespecifické, pro stanovení diagnózy CDG nejsou postačující. Na zachycení pacientů se syndromem CDG je potřebné provést selektivní „screening“, který předchází dalším biochemickým a molekulárně genetickým analýzám pro stanovení diagnózy (viz 1.1.2).

#### 1.1.1.1 Rozdělení dědičných poruch glykosylace

Ve většině případů CDG se jedná o defekt v glykosylační dráze proteinů, ale byly popsány také poruchy glykosylace lipidů. Poruchy proteinové glykosylace je možno rozdělit na poruchy N-glykosylace, O-glykosylace nebo kombinaci poruch v obou biochemických drahách. Defekty C-glykosylace zatím zaznamenány nebyly [12].

N-glykosidická vazba u glykoproteinů je realizována výlučně přes asparagin. Při O-glykosylaci je na vazbu využit zbytek serinu, threoninu nebo hydroxylysinu.

#### Poruchy N-glykosylace

Nejrozšířenějším druhem CDG jsou poruchy N-glykosylace proteinů, které se dělí na dvě skupiny podle toho, v jaké části glykosylační dráhy dochází k defektu. Rozdělení na typ I a II bylo zavedeno na základě pozorovaných odlišností v klinickém a biochemickém obrazu mezi skupinami pacientů se syndromem CDG [13]. Deficit enzymu, který

katalysuje některou z reakcí syntézy oligosacharidového zbytku (glykanu) a jeho následného transportu na nascentní protein, patří do poruch glykosylace typu I (CDG I). Tato první část glykosylační dráhy probíhá v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu (ER) a je schematicky znázorněna na obr. 1.1 (str. 5). Po ní následuje úprava glykanu (už navázaného na protein) v Golgiho aparátu (viz obr. 1.2, str. 6). Při deficitu enzymů účastnících se modifikace glykanu se jedná o skupinu glykosylačních poruch typu II (CDG II).

Glykany N-glykosylovaných proteinů sdílejí typickou jádrovou strukturu a rozdíly mezi nimi vyplývají z různého působení glykosidas a glykotransferas v Golgiho aparátu.

Konkrétní typ CDG I/II, u kterého byl identifikován deficitní enzym, bylo nejdříve doporučeno označovat pomocí připojení malého písmena. V případě, že není známa genetická podstata onemocnění, bylo zavedeno označení CDG-x. Zpočátku se názvy přiřazovaly postupně podle toho, v jakém pořadí byly jednotlivé typy CDG objeveny (tj. CDG-Ia byl první popsán typ CDG I). Protože tento klasifikační systém neodkazuje na genetickou podstatu daného onemocnění, komplikuje to použití termínů v praxi. I z toho důvodu začali odborníci prosazovat změnu nomenklatury CDG [14], podle které se měla označení všech onemocnění skupiny CDG sjednotit prostřednictvím používání názvu patologického genu. Nejaktuálnější verze nomenklatury [12] navrhuje označení CDG pomocí oficiální zkratky defektního genu a přípony „-CDG“, např. onemocnění předtím označované jako CDG-Ia se nyní označuje PMM2-CDG. Přehled dosud popsaných poruch N-glykosylace je uveden v tab. 1.1 (str. 7).

## Gen pro fosfomanomutasu 2

Gen *PMM2* u člověka (*Homo sapiens*) kóduje enzym fosfomanomutasu 2, jejíž deficit je příčinou nejčastějšího typu CDG – syndromu PMM2-CDG. Je lokalizován na chromosomu 16 v oblasti 16p13.3-p13.2, lokus genu *PMM2* je dlouhý 51525 bp. Gen obsahuje 8 exonů o celkové délce 741 bp, které kódují protein složený z 246 aminokyselin [15], [16]. Bylo popsáno nejméně 104 patogenních mutací v genu *PMM2*, z nichž většina vede k záměně aminokyseliny [17]. Není zřejmá korelace mezi genotypem pacientů a reziduální aktivitou fosfomanomutasy 2, resp. závažností syndromu PMM2-CDG. Většina pacientů má kombinaci dvou heterozygotních mutací, přičemž nejfrekventovanější mutace (R141H) nebyla nikdy zaznamenána v homozygotní podobě. Kromě mutace R141H, která se vyskytuje u cca 40 % pacientů, mezi časté patologické mutace patří F119L, V231M a P113L [18].

Funkcí fosfomanomutasy (PMM) je katalýza isomerizační reakce manosa-6-fosfát → manosa-1-fosfát. U člověka existují dva typy fosfomanomutas – enzymy PMM1 a

PMM2, lišící se ve funkční specifitě. Z hlediska aktivity PMM je kritický enzym PMM2, jehož deficit nemůže být kompenzován pomocí PMM1 a má za důsledek poruchu glykosylace. PMM1 navíc působí v mozku jako glukosa-1,6-bisfosfatasa (po stimulaci inosinmonofosfátem) a defekt v genu *PMM1* doposud nebyl spojen se žádným lidským onemocněním [19].

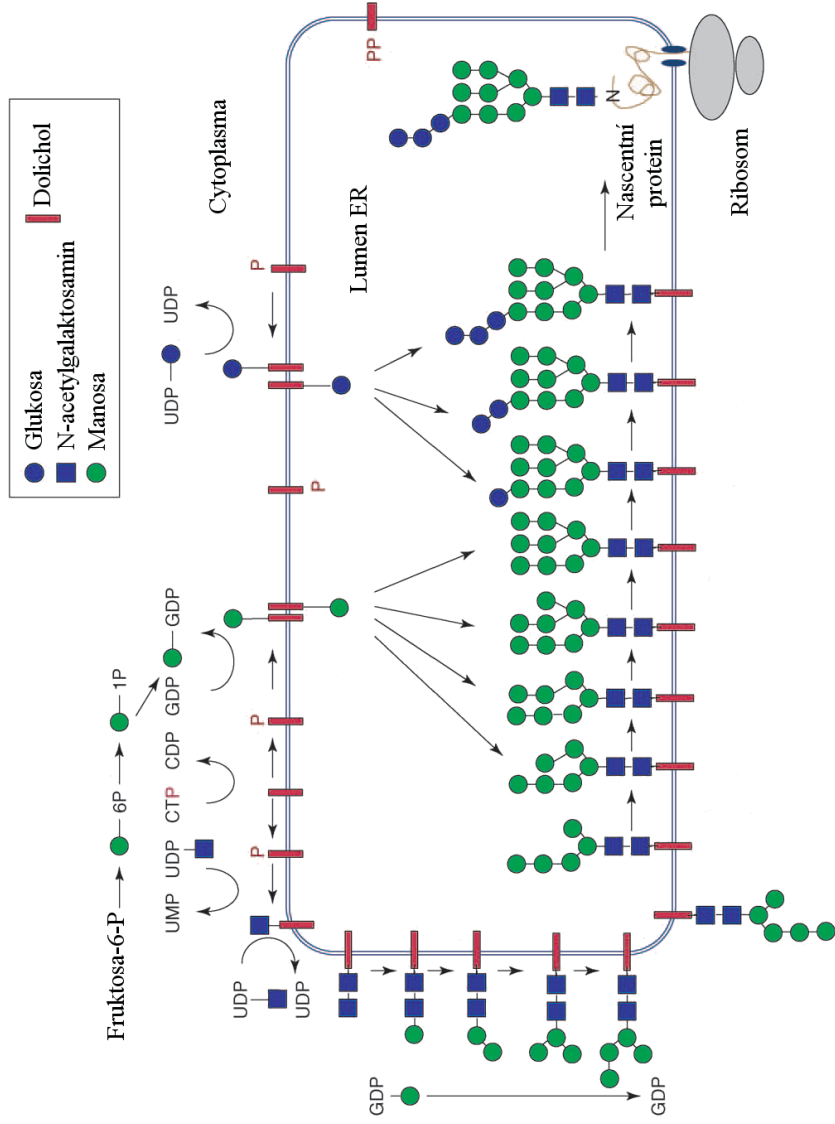
## Poruchy O-glykosylace

O-glykosylační dráha probíhá částečně v ER a hlavně v Golgiho aparátu, a na rozdíl od N-glykosylace je iniciována až po skládání a oligomerisaci proteinu. Typická je vysoká rozmanitost vzniklých oligosacharidových struktur. Podle prvního sacharidu připojeného na proteinovou část molekuly rozlišujeme u člověka 7 typů O-vázaných glykanů: mucinový typ, GAG (glykosaminoglykany), glykany s O-vázaným N-acetylglukosaminem (GlcNAc), glykany s O-vázanou galaktosou (Gal), glykany s O-vázanou manosou (Man), glykany s O-vázanou glukosou (Glc) a glykany s O-vázanou fukosou (Fuc) [21]. Z nich se nejčastěji vyskytuje mucinový typ, který je možné dále rozdělit podle identity a způsobu vazby druhého navázaného cukru. Druhý nejfrekventovanější typ jsou GAG s dlouhým, nerozvětveným polysacharidovým řetězcem složeným z opakujícího se disacharidového motivu. U obou skupin dochází často k chemickým modifikacím, např. k sulfataci. Struktury ostatních typů O-glykanů vykazují menší variabilitu [21]. Zajímavé je, že zatím byly popsány poruchy syntézy především u těch typů O-glykanů, které se u člověka vyskytují v menší míře [22]. Donedávna se pro tuto skupinu onemocnění CDG běžně používaly triviální názvy, v tabulce s přehledem O-glykosylačních poruch 1.2 (str. 8) a 1.3 (str. 9) je uvedeno i označení podle nové nomenklatury.

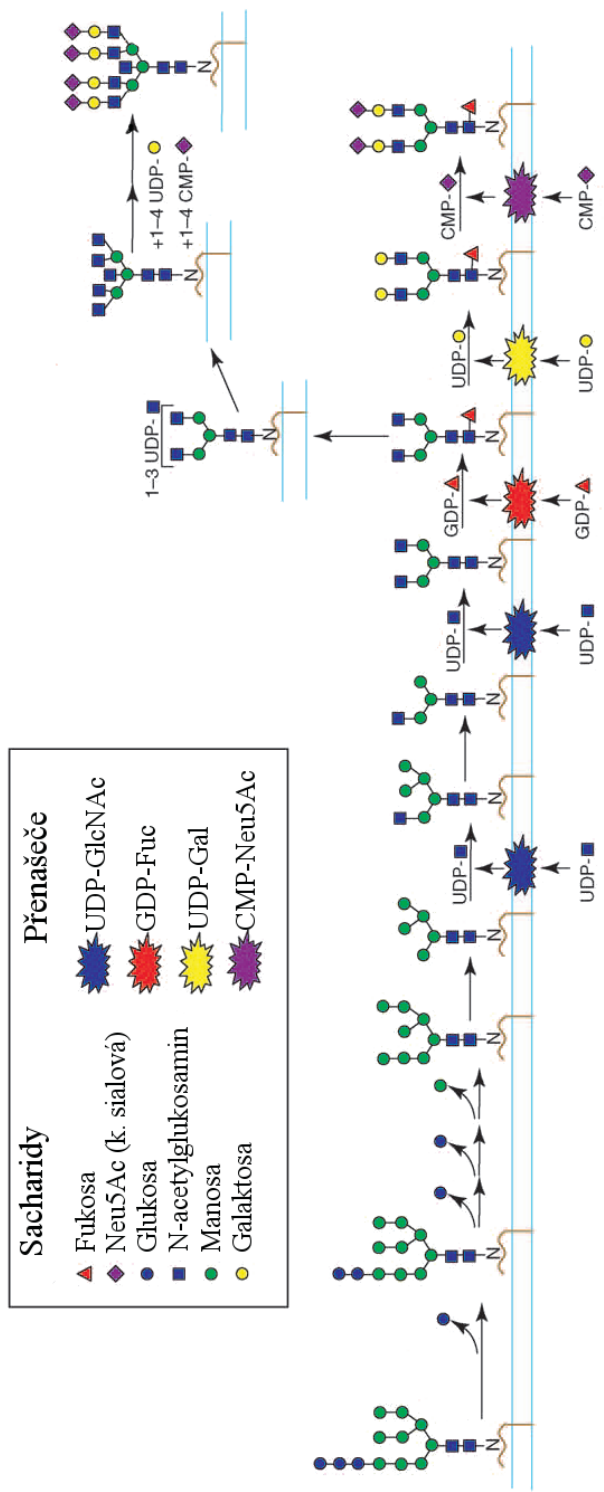
## Ostatní typy poruch glykosylace

Do této skupiny CDG patří poruchy glykosylace glykosfingolipidů a glykosylfosfatidylinositolové kotvy (viz tab. 1.4, str. 10) a poruchy vícenásobné glykosylace a dalších metabolických drah (viz tab. 1.5, str. 11).





Obrázek 1.1: N-glykosylační reakce probíhající v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu (1. část N-glykosylace). Dolichol má funkci jako lipidická kotva v membráně ER, na které probíhá syntéza oligosacharidového řetězce. Jako donor slouží aktivovaná forma sacharidů (vázané na nukleotidy). Syntéza výsledného oligosacharidu  $Glc_3Man_9GlcNAc_2$  je dokončena v lumen ER. Oligosacharyltransferasa katalysuje jeho přenos na nascentní protein (upraveno podle [20]).



Obrázek 1.2: N-glykosylační reakce probíhající v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu (2. část N-glykosylace). Zde probíhá modifikace oligosacharidového řetězce navázaného na nascentní protein. Přenos aktivovaných sacharidů z cytoplasmy je zabezpečen specifickými transportéry. Působením různých enzymů je podmíněna heterogenita vzniklých oligosacharidových struktur (upraveno podle [20]).

Tabulka 1.1: Přehled CDG: poruchy N-glykosylace proteinů (podle [12])

Označení defektu*	Porucha v proteinu
PMM2-CDG ( <i>CDG-Ia</i> )	Fosfomanomutasa 2
MPI-CDG ( <i>CDG-Ib</i> )	Fosfomanoisomerasa
ALG6-CDG ( <i>CDG-Ic</i> )	Dol-P-Glc:Man <sub>9</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol glukosyltransferasa (glukosyltransferasa 1)
ALG3-CDG ( <i>CDG-Id</i> )	Dol-P-Man:Man <sub>5</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosyltransferasa (manosyltransferasa 6)
ALG12-CDG ( <i>CDG-Ig</i> )	Dol-P-Man:Man <sub>7</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosyltransferasa (manosyltransferasa 8)
ALG8-CDG ( <i>CDG-Ih</i> )	Dol-P-Glc:Glc <sub>1</sub> -Man <sub>9</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol glukosyltransferasa (glukosyltransferasa 2)
ALG2-CDG ( <i>CDG-Ii</i> )	GDP-Man:Man <sub>1</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosyltransferasa (manosyltransferasa 2)
DPAGT1-CDG ( <i>CDG-Ij</i> )	UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferasa
ALG1-CDG ( <i>CDG-Ik</i> )	GDP-Man:GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosltransferasa (manosyltransferasa 1)
ALG9-CDG ( <i>CDG-Il</i> )	Dol-P-Man:Man <sub>6</sub> - a Man <sub>8</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosyltransferasa (manosyltransferasa 7-9)
RFT1-CDG ( <i>CDG-In</i> )	Flipasa Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol
MGAT2-CDG ( <i>CDG-IIa</i> )	N-acetylglukosaminyltransferasa 2
GCS1-CDG ( <i>CDG-IIb</i> )	Glukosidasa 1
TUSC3-CDG	Podjednotka oligosacharyltransferasy
MGAT1-CDG	Podjednotka oligosacharyltransferasy

\* za doporučeným označením je v závorce kurzívou uveden starší název

Tabulka 1.2: Přehled CDG: poruchy O-glykosylace proteinů (část 1/2) (podle [12])

Typ O-glykosylace	Označení defektu*	Porucha v proteinu
Syntéza O-xylosylglykanu	EXT1/EXT2-CDG <i>(vícečetné kostní exostozy)</i>	Glukuronyltransferasa/ N-acetylglukosaminyltransferasa
Syntéza O-N-acetylgalaktosaminylglykanu	B4GALT7-CDG <i>(progerická varianta syndromu Ehler-Danlos)</i>	$\beta$ -1,4-galaktosyltransferasa 7
Syntéza O-xylosyl/N-acetylgalaktosaminylglykanu	GALNT3-CDG <i>(familiární tumorosní kalcinosa)</i>	N-acetylgalaktosaminyltransferasa 3
Syntéza O-xylosyl/N-acetylgalaktosaminylglykanu	SLC35D1-CDG <i>(Schneckenbeckenova dysplazie)</i>	UDP-glukuronát/ UDP-N-acetylgalaktosaminový duální přenašeč
Syntéza O-manosylglykanu	POMT1/POMT2-CDG <i>(spektrum kongenitálních svalových dystrofií; syndrom Walker-Warburg)</i>	O-manosyltransferasa 1

\*za doporučeným označením je v závorce kurzívou uveden triviální název

Tabulka 1.3: Přehled CDG: poruchy O-glykosylace proteinů (část 2/2) (podle [12])

Typ O-glykosylace	Označení defektu*	Porucha v proteinu
Syntéza O-manosylglykanu	POMGNT1-CDG ( <i>kongenitální svalové dystrofie; kongenitální svalová dystrofie varianta sval-oko-mozek</i> )	O-manosa- $\beta$ -1,2-N-acetylglukosaminyltransferasa
	FKTN-CDG ( <i>kongenitální svalové dystrofie</i> )	Fukutin
	FKRP-CDG ( <i>kongenitální svalové dystrofie</i> )	Fukutinu příbuzný protein
	LARGE-CDG ( <i>kongenitální svalové dystrofie</i> )	Protein podobný N-acetylglukosaminyltransferase
Syntéza O-fukosylglykanu	LFNG-CDG ( <i>spondylkostální dysostosa typ 3</i> )	O-fukosa-specifická- $\beta$ -1,3-N-acetylglukosaminyltransferasa
	B3GALT1-CDG ( <i>syndrom „Peters plus“</i> )	O-fukosa-specifická- $\beta$ -1,3-glukosyltransferasa

\* za doporučeným označením je v závorce kurzívou uveden triviální název

Tabulka 1.4: Přehled CDG: poruchy glykosylace glykosfingolipidů a glykosylfosfatidyl-  
inositolové kotvy (podle [12])

Označení defektu*	Porucha v proteinu
ST3GAL5-CDG ( <i>Amish časná epilepsie</i> )	Laktosylceramid- $\alpha$ -2,3-sialyltransferasa (GM3 synthasa)
PIGM-CDG ( <i>defekt glykosylfosfatidylinositolu</i> )	Fosfatidylinositolglykan, třída M

\* za doporučeným označením je v závorce kurzívou uveden triviální název

Tabulka 1.5: Přehled CDG: poruchy vícenásobné glykosylace a dalších drah (podle [12])

	Označení defektu*	Porucha v proteinu
	DPM1-CDG ( <i>CDG-Ie</i> )	GDP-Man:Dol-P-manosyl-transferasa (Dol-P-Man synthasa 1)
	MPDU1-CDG ( <i>CDG-If</i> )	Lec35 (Man-P-Dol utilizace 1)
	B4GALT1-CDG ( <i>CDG-IId</i> )	$\beta$ -1,4-galaktosyltransferasa 1
	GNE-CDG ( <i>dědičná myopatie s inkluzivními tělísky</i> )	UDP-GlcNAc epimerasa/kinasa
	SLC35A1-CDG ( <i>CDG-IIj; defekt CMP-Sia přenašeče</i> )	CMP-Sia přenašeč
	SLC35C1-CDG ( <i>CDG-IIc; defekt GDP-Fuc přenašeče</i> )	GDP-Fuc přenašeč
Metabolická dráha dolicholu	DK1-CDG ( <i>CDG-Im</i> )	Dolichol kinasa
Komplex COG**	COG7-CDG ( <i>CDG-IIe</i> )	Podjednotka 7 komplexu COG
	COG1-CDG ( <i>CDG-IIg</i> )	Podjednotka 1 komplexu COG
	COG8-CDG	Podjednotka 8 komplexu COG
	COG4-CDG	Podjednotka 4 komplexu COG
	COG5-CDG	Podjednotka 5 komplexu COG
V-ATPasa	ATP6VOA2-CDG ( <i>cutis laxa typ II</i> )	V0 podjednotka A2 vesikulární H(+)-ATPasy
	SEC23B-CDG ( <i>CDAII</i> )	COPII podjednotka SEC23B

\* za doporučeným označením je v závorce kurzívou uveden triviální/starší název

\*\* „conserved oligomeric Golgi“

### 1.1.2 Diagnostika dědičných poruch glykosylace

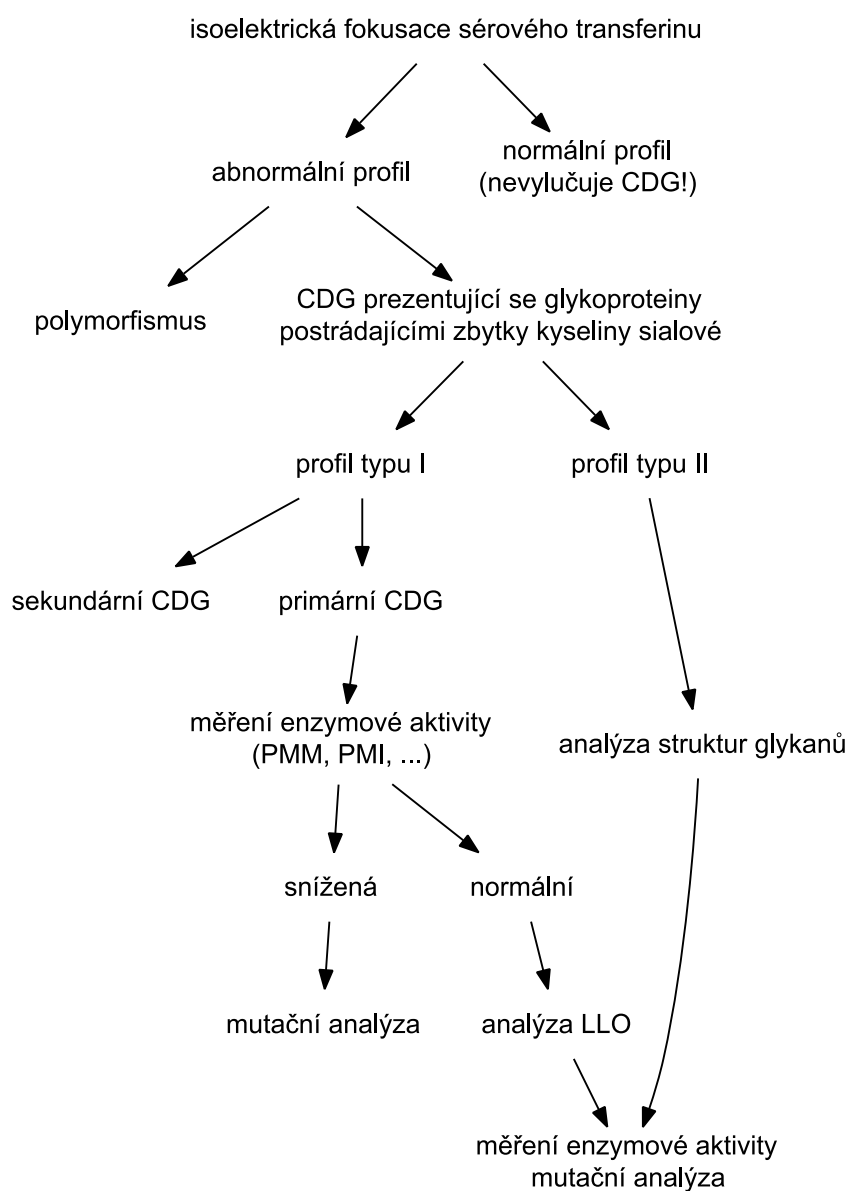
V současnosti neexistuje univerzální diagnostická metoda, kterou by bylo možné použít pro „screening“ všech typů CDG. Ve všeobecnosti je diagnostika CDG založena na kombinaci více analýz, které postupně vedou k zúžení spektra suspektních typů glykosylačních poruch a nakonec k identifikaci defektu na molekulárně genetické úrovni (tzn. detekce patologické mutace v příslušném genu). Obecný diagnostický postup pro případy pacientů podezřelých na CDG s neobjasněnými multisystémovými poruchami znázorňuje schéma na obr. 1.3 (str. 13). Základní metody využívají detekci hypoglykosylovaných glykoproteinů, měření enzymové aktivity a analýzu struktury glykanů vázaných na lipidy (tzv. „LLO“ – lipid-linked oligosaccharides) nebo proteiny (tzv. „PDO“ – protein-derived oligosaccharides). Při diagnostice CDG je vždy důležité vyloučit přítomnost sekundárních příčin hypoglykosylace (viz 1.1.2.3), které mohou vést k falešně pozitivním výsledkům.

#### Analýza hypoglykosylovaných glykoproteinů

Alterovanou glykosylací u CDG pozitivních pacientů je možné detekovat pomocí analýzy mnoha glykoproteinů. Nejčastěji je používána analýza sérového transferinu, na němž byly historicky poprvé studovány abnormality plynoucí z defektu glykosylace [5], a dodnes slouží jako významný diagnostický marker CDG. Isoelektrická fokusace sérového transferinu (IEF Tf) je v praxi nejběžnější metodou užívanou na „screening“ N-glykosylačních poruch (viz 1.1.2.1). Kromě IEF Tf existují další laboratorní techniky založené na detekci hypoglykosylovaných forem transferinu (tzv. „CDT“ – carbohydrate deficient transferrin [23]). Dají se aplikovat elektroforetické metody, při kterých jsou transferinové isoformy separovány na polyakrylamidovém (SDS-PAGE), případně agarosovém gelu a imunodetekovány po přenosu na membránu [24], [25]. Je možné použít kapilární elektroforesu s identifikací píků podle relativních migračních časů, jejíž výhoda spočívá v možnosti automatizace [26]. Na kvantifikaci CDT byly optimalizovány různé chromatografické metody s využitím EIA, RIA a TIA [11], [27]. Zavedeny byly také techniky analýzy isoform transferinu nesoucích náboj pomocí hmotnostní spektrometrie (ESI-MS, MALDI-MS, SELDI-MS) [11].

Při 2DE analýze vzorků séra pacientů se syndromem CDG byly potvrzeny atypické profily pro další sérové glykoproteiny:  $\alpha$ -1-kyselý glykoprotein,  $\alpha$ -1-antichymotrypsin,  $\alpha$ -1-antitrypsin,  $\alpha$ -1B glykoprotein, ceruloplasmin, C1-esterasový inhibitor, komplement C3a a C4a a sérový peptid PLS:34 [28], [29], [30]. Při isoelektrické fokusaci s imunodetekcí byly detekovány abnormální proužky proteinů posunuté ke katodě u





Obrázek 1.3: Schéma obecného diagnostického postupu při podezření na syndrom CDG. *PMM* – fosfomanomutasa; *PMI* – fosfomanoisomerasa; *LLO* – oligosacharidy vázané na lipidy (upraveno podle [9]).

následujících glykosylovaných proteinů v séru: antithrombinu III,  $\alpha$ -1-kyselého glykoproteinu,  $\alpha$ -1-antitrypsinu,  $\alpha$ -1-chymotrypsinu,  $\alpha$ -2-HS glykoproteinu, plasminogenu, thyroxin-vázajícího globulinu a Zn- $\alpha$ -2 glykoproteinu [31], [32]. V mozkomíšním moku pacientů s glykosylačními poruchami byla detekována hypoglykosylovaná prostaglandin D syntasa [33]. U některých typů CDG byla potvrzena abnormální glykosylace proteinu AE1 („anion exchanger 1“) a glykoforinu A [34]. Sérový apolipoprotein C-III se ukázal jako vhodný marker O-glykosylačních poruch, které zasahují do biosyntézy tzv. „core 1“ mucinového typu O-glykanů, a jeho analýza pomocí isoelektrické fokusace spolu s IEF Tf je doporučenou metodou při diagnostice defektů N- a O-glykosylace [35].

### **Měření enzymové aktivity enzymů glykosylační dráhy**

Při podezření na CDG typu I jsou vzorky testovány na sníženou enzymovou aktivitu fosfomanomutasy 2 (defekt PMM2-CDG) a fosfomanoisomerasy (defekt MPI-CDG). Měření se obvykle provádějí na leukocytech periferní krve a kultivovaných fibroblastech a jsou založeny na spřažené reakci se systémem NADP<sup>+</sup>/NADPH [11]. U analýzy fibroblastů byla v některých případech PMM2-CDG zaznamenána vyšší reziduální aktivita fosfomanomutasy 2 (PMM2), proto se na vyhodnocení aktivity PMM2 upřednostňuje použití leukocytů [36]. Protokoly na měření enzymové aktivity jsou dostupné i pro jiné typy CDG, např. jsou využity při diagnostice více typů O-glykosylačních poruch [21].

### **Analýza glykanů vázaných na lipidy nebo proteiny**

Analýza LLO-glykanů vázaných na lipidy (dolicholfosfát) je aplikována u pacientů podezřelých na CDG I s normálními enzymovými aktivitami PMM2 a PMI (fosfomanoisomerasa). Protože N-glykosylace je u eukaryotů vysoce konzervovaný proces, porovnávání abnormálních LLO struktur ve vzorcích pacientů se strukturami LLO detekovanými u mutantních kvasinek bylo úspěšně využito při objevení většiny známých lidských defektů CDG typu I [21]. V případě podezření na CDG typu II nebo defekt biosyntézy O-glykanů jsou analyzovány struktury glykanů vázaných na proteiny – PDO. Obvyklý postup získávání glykanů pro analýzu při studiích *in vitro* je následující: buňky fibroblastů jsou opakovaně extrahovány systémem chloroform/metanol/voda, přičemž z pelety jsou postupně uvolňovány LLO a působením specifických endoglykosidas PDO (N-glykany). Na uvolnění O-glykanů jsou použity jiné chemické metody ( $\beta$ -eliminace, hydrazinolýza), jelikož pro ně není známa univerzálně použitelná endoglykosidasa. LLO jsou pak analyzovány tenkovrstevnou chromatografií (krátké LLO) a glykany uvolněny

z dolicholfosfátu kyselou hydrolysou, N-glykany a O-glykany pomocí HPLC nebo MS [10], [11], [21].

### 1.1.2.1 Isoelektrická fokusace sérového transferinu

#### Transferin

Lidský sérový transferin („serotransferrin“, „siderophilin“, „beta-1 metal-binding globulin“; zkratka „Tf“) je glykoprotein, jehož hlavní funkce je transport železitých kationtů ( $\text{Fe}^{3+}$ ) v krvi. Je exprimován převážně v játrech a sekretován do plasmy (koncentrace v krvi je  $\sim 3 \text{ g.l}^{-1}$  [37]). Syntetizovaný monomerní protein je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem složeným ze 698 aminokyselin, v maturované formě je po odštěpení signálního peptidu kratší o 19 aminokyselin. Ze strukturního hlediska je možno molekulu transferinu rozdělit na dvě homologické domény: N- a C-terminální. Každá z nich obsahuje místo na vazbu kovového kationtu s vysokou afinitou pro  $\text{Fe}^{3+}$  ( $K_m \sim 10^{22} \text{ M}^{-1}$  při pH 7,4). V procesu posttranslační modifikace dochází ke tvorbě několika disulfidických můstků, metylaci (aminokyselina v pozici 42), fosforylaci (poz. 536) a glykosylaci: v C-terminální doméně se nachází jedno O-glykosylační místo (poz. 51), N-terminální doména obsahuje dvě N-glykosylační místa (poz. 432 a 630) [38], [39]. Molekulová hmotnost samotného polypeptidového řetězce je  $\sim 75 \text{ kDa}$ , plně glykosylovaná forma proteinu má  $\sim 80 \text{ kDa}$ . Transferin vykazuje významnou heterogenitu – po elektroforetické separaci a imunodetekci je možné rozlišit řadu isoform (viz obr. 1.4, str. 16).

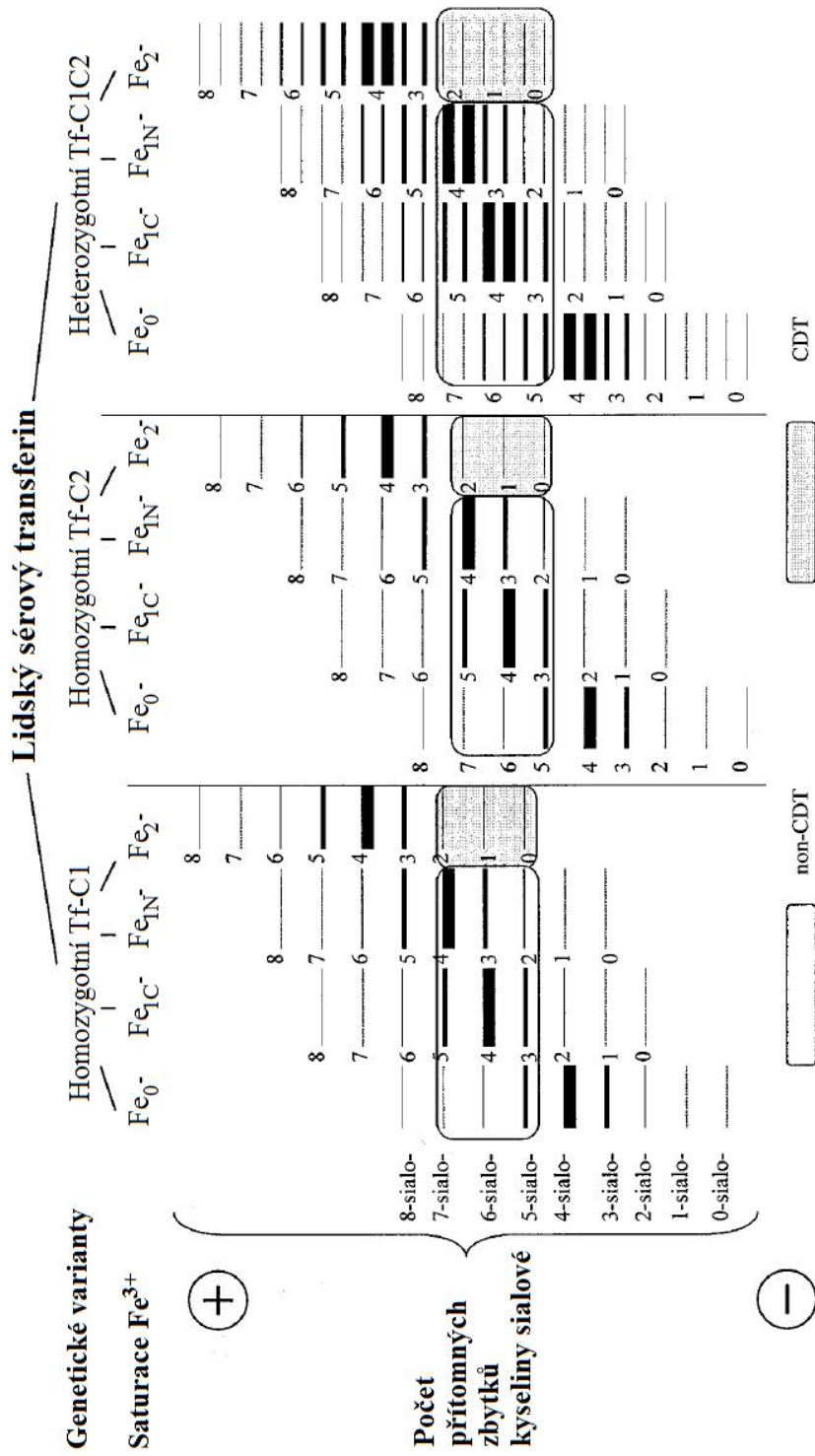
Mikroheterogenitu Tf podmiňují 3 faktory:

- *Stupeň saturace  $\text{Fe}^{3+}$*

Za fyziologických podmínek je saturováno železitými kationty cca 30 % transferinu. V séru je možné detekovat čtyři formy transferinu s různým stupněm nasycení  $\text{Fe}^{3+}$ : molekulu Tf bez  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{Fe}_0\text{-Tf}$  aneb apo-Tf), s jedním železitým kationtem vázaným v N-terminální ( $\text{Fe}_{1N}\text{-Tf}$ ) nebo C-terminální ( $\text{Fe}_{1C}\text{-Tf}$ ) doméně, a s dvěma kationty  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ ). Isoelektrický bod Tf (pI) klesá s každým navázaným železitým kationtem o cca 0,2 jednotky pH [38], [40].

- *Genetický polymorfismus – modifikovaná primární struktura proteinu*

Bylo popsáno nejméně 38 transferinových variant, ale jenom 4 z nich mají prevalentní výskyt  $> 1 \%$  [38]. Nejvyšší výskyt má Tf alela typu C, s nejfrekvencovanějšími subtypy C1 ( $> 70 \%$  v populaci severní Evropy [41]), C2 a C3. V menší míře se objevují alelové varianty B (posun k anodě, nižší pI) a D (posun ke katodě, vyšší pI).



Obrázek 1.4: Mikroheterogenita lidského sérového transferrinu podmíněná přítomností různých genetických variant, variabilním stupněm saturace Fe<sup>3+</sup> a obsahem kyseliny sialové. CDT – skupina hypoglykosylovaných forem transferrinu: di-, mono- a asialotransferrin (zeela nasycen Fe<sup>3+</sup>); non-CDT – skupina forem transferrinu, jež nejsou hypoglykosylovány, ale podle jejich polohy po separaci isoelektrickou fokusací mohou být nesprávně považovány za CDT (upraveno podle [40]).

- *Struktura N-glykosidicky vázaných oligosacharidových řetězců*

Transferin obsahuje dva N-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce komplexního typu (viz obr. 1.5, str. 18). Strukturálně se liší různým stupněm větvení, glykany transferinu jsou kombinací bi-, tri- a tetraantenárního typu (viz obr. 1.6, str. 18). V terminální poloze řetězce se nachází zbytek kyseliny sialové. Podle struktury glykanu, která se projeví na počtu přítomných zbytků kyseliny sialové, rozlišujeme 9 sialovaných isoform Tf od asialo- až po oktasialotransferin (rozmezí pI pro sialované isoformy Tf variant C zcela nasycených  $\text{Fe}^{3+}$  je přibližně 5–6 [38]). Přítomnost každého zbytku záporně nabitě kyseliny sialové snižuje hodnotu pI transferinu o cca 0,1 jednotky pH [38], [40].

### **Gen pro transferin**

Gen pro transferin u člověka (*Homo sapiens*) je lokalizován na chromosomu 3 v oblasti 3q22.1, lokus genu *TF* je dlouhý 32874 bp. Gen obsahuje 17 exonů o celkové délce 2097 bp, které kódují protein složený z 698 aminokyselin [42]. Byly popsány desítky polymorfismů genu *TF*. Elektroforeticky rozlišitelné varianty transferinu (s různým pI) jsou determinovány následujícími mutacemi: G277S (varianta C3), D296G (v. D1), H319R (v. CHI), P589S (v. C2), K646E (v. BV) a G671E (v. B2) [39]. Detekovány byly i patologické mutace *TF* genu (A477P a 562\_571del 572\_580dup; D77N [43]), které zapříčiňují velmi vzácně se vyskytující vážnou poruchu atransferinemii (deficit transferinu). U některých mutací genu *TF* byla nalezena asociace s klinickými projevy – záměna aminokyselin G277S je spojena s redukcí vazebné kapacity pro železité kationty a může být rizikovým faktorem u žen [44].

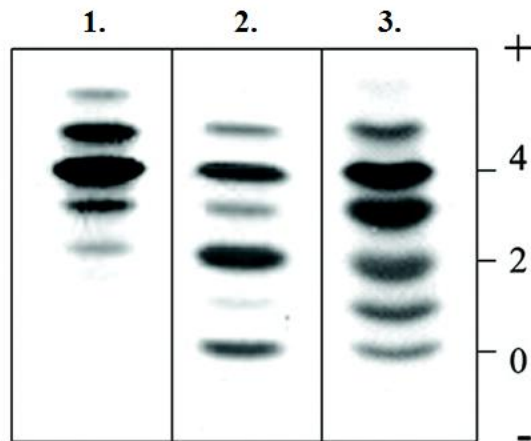


## Isoelektrická fokusace sérového transferinu jako diagnostická metoda CDG

Krátce po zavedení techniky isoelektrické fokusace sérového transferinu byly pomocí této metody analyzovány vzorky pacientů s tehdy ještě neznámým syndromem, který byl spojen s abnormálním profilem sérových proteinů [46]. Ukázalo se, že u pacientů byl profil sérového transferinu po IEF posunut ke katodě, což indikovalo ztrátu záporně nabitě kyseliny sialové v terminální poloze glykanu [47]. Toto pozorování bylo prvním krokem k objasnění biochemické podstaty CDG, a zároveň odhalilo potenciál IEF Tf jako vhodného diagnostického testu pro „screening“ CDG [22], [48].

Princip této metody spočívá v separaci isoform transferinu podle jejich isoelektrického bodu s následnou imunodetekcí a denzitometrickou kvantifikací profilu. Hodnota pI transferinu závisí od 1.) primární struktury polypeptidového řetězce, 2.) stupně nasycení  $\text{Fe}^{3+}$  a 3.) počtu přítomných zbytků kyseliny sialové v terminální poloze vázaného glykanu. Z hlediska diagnostiky CDG je nejvýznamnější heterogenita Tf daná 3. faktorem, která odráží strukturální abnormality syntetizovaných glykanů za patologického stavu. Z toho důvodu je před samotnou separací potřeba analyzovaný vzorek nasytit roztokem  $\text{Fe}^{3+}$ , za vzniku isoform výlučně ve formě  $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ . Vliv genetického polymorfismu Tf na výsledný profil je dodatečně analyzován pomocí IEF Tf po inkubaci vzorku saturovaného  $\text{Fe}^{3+}$  s neuraminidasou.

U zdravých kontrol je výrazně dominantní formou tetrasialotransferin (pI = 5,4), který obsahuje dva kompletní glykany – každý se dvěma zbytky kyseliny sialové v terminální poloze (viz obr. 1.7, str. 20), v menším množství jsou přítomné i penta- a hexasialotransferin, zatímco mono- a asialotransferin jsou obvykle nedetekovatelné. Patologický profil pacientů s CDG se prezentuje zvýšeným podílem hyposialovaných forem Tf, jejichž relativní zastoupení se mění v závislosti od typu glykosylační poruchy. Profil typu I je charakterizován zvýšeným zastoupením disialotransferinu a asialotransferinu, za současného poklesu tetrasialotransferinu a více sialovaných forem (viz obr. 1.7, str. 20). Toto složení isoform indikující absenci kompletního glykanu je typické u pacientů s CDG typu I, kde je porušen proces jeho syntézy. U profilu II se kromě di- a monosialotransferinu objevuje i nárůst podílu trisialotransferinu a/nebo monosialotransferinu (viz obr. 1.7, str. 20); oproti typu I je variabilnější a je možné rozlišovat více podtypů. Popsaný profil je výsledkem alterované struktury glykanů, zapříčiněné poruchami v procesu jejich úpravy, které definují typ CDG II [1], [20]. U pacientů se syndromy GCS1-CDG (CDG-IIb), SLC35C1-CDG (CDG-IIc) a SLC35A1-CDG (CDG-IIf) profily nevykazovaly žádné abnormality [49], [50], [51]. Odlišnosti profilů byly zaznamenány nejenom mezi jednotlivými typy CDG, ale taky v rámci stejného syndromu



Obrázek 1.7: Typické spektrum sialovaných isoform s sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací u vzorků jedinců pozitivních a negativních pro CDG.

1 – profil zdravé kontroly; 2 – profil typu I, charakteristický pro CDG I; 3 – profil typu II, charakteristický pro CDG II. Isoformy jsou značeny čísla vpravo podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové (upraveno podle [52]).

[9], [10]. IEF Tf je vhodnou metodou na „screening“ N-glykosylačních poruch, musí být však kombinována s dalšími analýzami za účelem určení diagnózy.

### 1.1.2.2 Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostiku je možné provádět jenom v případě, že je známa molekulární podstata glykosylačního defektu u jiného probanda v postižené rodině, a to přímou mutační analýzou choriových klků plodu [9]. Metodu IEF Tf není možné aplikovat, jelikož vzorky krve plodu a novorozence krátce po porodu mohou vykazovat normální profil isoform transferinu [53]. Měření enzymové aktivity fosfomanomutasy v kultivovaných fetálních amniocytech a buňkách trofoblastu neposkytuje vždy spolehlivé výsledky [54].

### 1.1.2.3 Sekundární příčiny hypoglykosylace

K sekundární poruše glykosylace může dojít v důsledku snížené aktivity enzymů při jiných primárních onemocněních, jakými jsou např. neléčená galaktosemie [55] nebo dědičná fruktosová intolerance [56]. Známá je spojitost chronické nadměrné konzumace alkoholu se zvýšeným relativním zastoupením CDT [%], která je základem diagnostických testů pacientů s podezřením na alkoholismus. Ve studiích byla potvrzena korelace snížené aktivity sialyltransferasy se zvýšeným příjmem etanolu [40]. Bylo dokázáno, že



na hodnoty CDT [%] mají vliv i hepatální nemoci v konečném stádiu [57]. Hypoglykosylace také může plynout ze zvýšené produkce neuraminidasy při bakteriální infekci *Streptococcus pneumoniae* [58] a při hemolyticko-uremickém syndromu asociovaném s infekcí *Streptococcus pneumoniae* [59].

### 1.1.3 Terapie dědičných poruch glykosylace

V současnosti je MPI-CDG jediným typem CDG, pro který byla vyvinuta účinná léčba. Pomocí orálního podávání manosy je možné docílit výrazného zlepšení zdravotního stavu pacientů [60]. U pacientů se syndromem PMM2-CDG se terapie s použitím manosy neukázala jako úspěšná [61]. Nejnovější studie se zaměřují na výzkum membránově propustných derivátů manosa-1-fosfátu jako potenciálních substrátů pro léčbu tohoto nejfrekventovanějšího typu CDG [62], [63].

# Kapitola 2

## Cíle diplomové práce

Pro „screening“ dědičných poruch glykosylace (CDG) je ve specializovaných metabolických centrech standardně doporučována metoda isoelektrické fokusace sérového transferinu (IEF Tf). U vzorků jedinců s poruchami N-glykosylace je za aplikace této metody potvrzen zvýšený podíl hyposialovaných forem sérového transferinu oproti vzorkům zdravých jedinců. Při hodnocení profilů testovaných jedinců je vhodné používat v každé laboratoři vlastní interní referenční rozmezí.

Cílem předkládané diplomové práce bylo:

I. Vytvořit referenční rozmezí pro hladiny sialovaných forem transferinu v krevním séru za účelem využití při diagnostice syndromů CDG v naší laboratoři. Dílčími úkoly bylo:

- analyzovat soubor 100 vzorků séra od zdravých jedinců pomocí isoelektrické fokusace s následnou imunofixací
- kvantifikovat relativní zastoupení sialovaných forem transferinu pomocí programu AlphaEaseFC (Alpha Innotech) a stanovit referenční hodnoty pro jednotlivé isoformy transferinu
- vyhodnotit vliv věku a pohlaví jedinců kontrolního souboru na kvantifikované hodnoty

II. U tří pacientů s klinickým podezřením na syndrom CDG provést biochemickou a molekulárně genetickou analýzu. Dílčími úkoly bylo:

- analyzovat vzorky séra pomocí IEF Tf a porovnat jejich kvantifikované profily s hodnotami určeného referenčního rozmezí

- zavést proteinovou analýzu sérového transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce jako diagnostickou metodu CDG na naše pracoviště
- optimalizovat a zavést molekulárně genetickou analýzu genu pro transferin
- provést molekulárně genetickou analýzu genu pro fosfomanomutasu 2 na potvrzení diagnózy syndromu PMM2-CDG u testovaného pacienta

# Kapitola 3

## Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

##### 3.1.1.1 Přehled vzorků

Vstupním materiálem biochemické analýzy vyšetřovaných jedinců byla odebraná krev, ze které bylo izolováno krevní sérum (viz 3.2.1). Vzorky krevního séra jsou označeny písmenem „S“ na začátku.

#### A. Kontrolní soubor

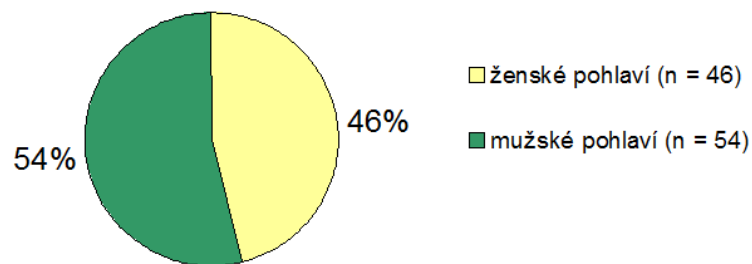
- SK1–SK100: soubor vzorků krevního séra zdravých jedinců obou pohlaví ve věku 2–42 let; poměr pohlaví a věkové složení jedinců zobrazují obrázky 3.1 (str. 25) a 3.2 (str. 25)

#### B. Vzorky pacientů

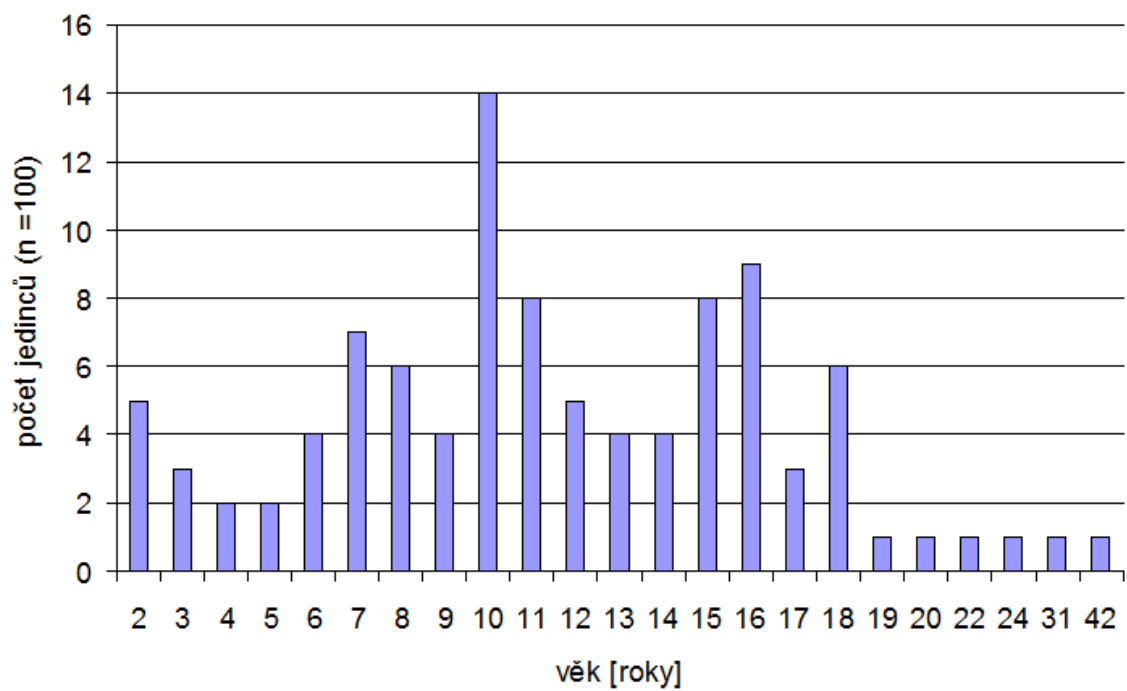
- SP1, SP2, SP3: vzorky krevního séra pacientů P1, P2 a P3
- SP1R1: vzorek krevního séra zdravé matky pacienta P1

#### C. Pozitivní a negativní kontrolní vzorky

- Sneg: vzorek krevního séra (zdravého) jedince negativního pro CDG
- SpozI: vzorek krevního séra pacienta se syndromem PMM2-CDG (typ CDG I)
- SpozII: vzorek krevního séra pacienta pozitivního pro CDG s typem CDG II



Obrázek 3.1: Poměr pohlaví jedinců kontrolního souboru SK1–SK100.



Obrázek 3.2: Věkové složení jedinců kontrolního souboru SK1–SK100.

Při molekulárně genetické analýze jsme pracovali se vzorky izolované genomové DNA (gDNA), které jsou označeny písmenem „D“ na začátku.

Následující gDNA použité při analýze byly předem připraveny pracovníky laboratoře. Ve všech případech byla DNA izolována z krve.

- DK0: vzorek gDNA zdravého jedince, používán při optimalizaci PCR
- DP1, DP2, DP3: vzorky gDNA pacientů P1, P2 a P3
- DK: vzorek gDNA zdravého jedince, u něhož byl při isoelektrické fokusaci sérového transferinu detekován normální profil isoform transferinu a byl použit jako kontrola při molekulárně genetické analýze genu *TF* u vyšetřovaných pacientů
- DK1–DK20: soubor vzorků gDNA jedinců, u nichž byl při isoelektrické fokusaci sérového transferinu detekován normální profil isoform transferinu a byly použity jako kontroly při restriční analýze genu *TF*

Od rodinných příslušníků pacienta P1 byly k dispozici suché krevní kapky, z nichž byla izolována gDNA (viz 3.2.5.1).

- DP1R1: vzorek gDNA matky pacienta P1
- DP1R2: vzorek gDNA otce pacienta P1
- DP1R3: vzorek gDNA babičky pacienta P1 z matčiny strany
- DP1R4: vzorek gDNA dědečka pacienta P1 z matčiny strany
- DP1R5: vzorek gDNA tety pacienta P1 z matčiny strany
- DP1R6: vzorek gDNA sestry babičky pacienta P1 z matčiny strany

### 3.1.1.2 Klinický popis pacientů

#### Pacient P1

Prvním pacientem je sedmiletý chlapec, u něhož bylo doporučeno metabolické vyšetření na základě opakovaných záchvatů cyklického zvracení od věku 3,5 let, obvykle při viróze, s frekvencí dvakrát ročně. V době záchvatu byla zaznamenána ketosa a metabolická acidosa. Pacient trpí obezitou s abnormálními tukovými depozity a invertovanými mamilami.

## Pacient P2

Jde o šestiletého chlapce s nízkým vzrůstem, s obesitou, mírně opožděným psychomotorickým vývojem, po operaci rozštěpu patra. Pacient má známky myopatie, mírnou hypohtyreosu, cholelithiasu, hepatopatii, mírnou hepatomegalii a záchvaty ketotických hypoglykemií. Je přítomna mírná obličejová stigmatizace.

## Pacient P3

Jedná se o pětiměsíční dívku s hypotonií, psychomotorickou retardací, mikrocefalií, strabismem, hepatopatií, mikrocystosou ledvin, koagulopatií, invertovanými mamilami a atypickou redistribucí tuku.

## 3.1.2 Chemikálie

### 3.1.2.1 Čisté chemikálie

- agarosa, Serva (Německo)
- akrylamid, Sigma (USA)
- bisakrylamid, Sigma (USA)
- bromfenolová modř, Lachema (ČR)
- citran železitý, Sigma (USA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma (USA)
- destilovaná voda, Goro (ČR)
- destilovaná voda pro PCR (ultračistá voda–18 Mohm.cm<sup>-1</sup>, ultrafiltrovaná–, ze které byly odstraněny RNasy působením diethylpyrokarbonátu a autoklávováním), Top-Bio (ČR)
- dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma (USA)
- dodecylsírán sodný (SDS), Sigma (USA)
- ethanol (96%), Penta (ČR)
- ethidium bromid, Sigma (USA)

- flavinmononukleotid (FMN), Sigma (USA)
- formamid (Hi-Di Formamide), Applied Biosystems (USA)
- glycerol, Penta (ČR)
- glycin, Sigma (USA)
- hydrogenuhličitan sodný, Lachema (ČR)
- chlorid sodný, Penta (ČR)
- kyselina boritá, Penta (ČR)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma (USA)
- kyselina chlorovodíková, Penta (ČR)
- kyselina octová (99%), Penta (ČR)
- lihobenzín, Penta (ČR)
- methanol (99,8%), Lach-Ner (ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Sigma-Aldrich (USA)
- Orange G, Sigma (USA)
- persíran amonný (APS), Sigma (USA)
- sacharosa, RNDr. Jan Kulich (ČR)
- síran měďnatý, Lékárna VFN (ČR)
- superdestilovaná voda Mili-Q, Millipore (USA)
- Tricine, Sigma (USA)
- Tris, Sigma (USA)
- Tween 20, Sigma (USA)



### 3.1.2.2 Roztoky a pufrы

#### Směsi připravené z chemikálií v laboratoři

- anodový pufr (100 mM Tris-HCl, pH 8,9)
- barvicí roztok pro isoelektrickou fokusaci (0,1% Coomassie R 350, 30% methanol, 10% kyselina octová)
- barvicí roztok pro SDS-PAGE transferinu (0,25% Coomassie Brilliant Blue R 250, 45% methanol, 10% kyselina octová)
- GB (3x koncentrován: 3 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 8,45)
- katodový pufr (100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1% SDS, pH 8,25)
- odbarvovací roztok A pro isoelektrickou fokusaci (20 mM síran měďnatý, 12% ethanol, 7% kyselina octová)
- odbarvovací roztok B pro isoelektrickou fokusaci (25% ethanol, 7% kyselina octová)
- odbarvovací roztok pro SDS-PAGE transferinu (25,5% lihobenzín, 8% kyselina octová)
- nanášecí roztok Orange G (6x koncentrován; 0,35% Orange G, 30% sacharosa)
- TBE (89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA)
- TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,5)
- transferový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 10% methanol, 0,02% SDS)
- vzorkový pufr pro SDS-PAGE transferinu (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2,5% SDS, 0,05% bromfenolová modř, 10% glycerol, pH 8,0)

#### Komerčně vyrobené směsi

- Ampholyte 3–10, Bio-Rad (USA)
- Combi PPP Master Mix, Top-Bio (ČR)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas (Kanada)
- GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas (Kanada)

- GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas (Kanada)
- kit na izolaci DNA ze suché krevní kapky QIAamp DNA Micro, QIAGEN (USA)
- kit na purifikaci DNA Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega (USA)
- kit na sekvenační PCR reakci Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems (USA)
- Pharmalyte 5–7, Sigma (USA)
- PhastGel Blue R tablety (na přípravu roztoku Coomassie R 350), GE Healthcare (Velká Británie)
- PPP Master Mix, Top-Bio (ČR)
- pufr NEB1, New England Biolabs (USA)
- SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Invitrogen (USA)
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce (USA)
- sušené odtučněné mléko Laktino, Promil (ČR)

### 3.1.2.3 Enzymy, primery, protilátky

- restriční endonukleasa *Hpy*CH4IV, New England Biolabs (USA)
- neuraminidasa, Roche Applied Science (Německo)
- primery (n = 34) pro 17 exonů genu *TF* (viz sekvence v tab. A.1, str. 84; velikosti syntetizovaných fragmentů genu *TF* za použití daných primerů uvádí tab. A.4, str. 85), GENERI BIOTECH (ČR)
- primery (n = 16) pro 8 exonů genu *PMM2* (viz sekvence v tab. A.2, str. 84; velikosti syntetizovaných fragmentů genu *PMM2* za použití daných primerů uvádí tab. A.5, str. 85), GENERI BIOTECH (ČR)
- univerzální primery (n = 2) RP a T7 (viz sekvence v tab. A.3, str. 85), GENERI BIOTECH (ČR)
- protilátka proti lidskému transferinu (polyclonal rabbit anti-human transferrin), Dako (Dánsko)

- protilátka proti králičím IgG konjugovaná s peroxidasou (anti-rabbit IgG(whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat), Sigma-Aldrich (USA)

### 3.1.3 Použité přístroje

- analytické váhy ScalTec (USA)
- aparatura na isoelektrickou fokusaci Model 111 Mini IEF Cell, Bio-Rad (USA)
- aparatura na vertikální elektroforesu Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad (USA)
- aparatura na horizontální elektroforesu Liberty 2, Biokey American Instruments (USA)
- automatické pipety Thermo Electron (USA), Eppendorf (Německo), Gilson (USA)
- blotovací aparatura TE77X Semidry blotter, Hoefer (USA)
- centrifugy MINI Centrifuge, Labnet (USA), Biofuge 28RS, Heraeus (Německo), Rotantna 460R, Hettich Zentrifugen (Německo), Mikro 20, Hettich Zentrifugen (Německo), E-Centrifuge, Wealtec (USA)
- „digital imaging system“ Alpha DigiDoc RT, Alpha Innotech (USA)
- „digital imaging system“ VersaDoc 4000, Bio-Rad (USA)
- elektroforetické zdroje PowerPac Basic, PowerPac 1000, PowerPac HC, Bio-Rad (USA)
- chladicí a mrazicí boxy Liebherr (Švýcarsko), Zanussi (Itálie), Sanyo (Japonsko)
- kapilární sekvenátor ABI PRISM 3100-Avant, Applied Biosystems (USA)
- magnetické míchadlo AREX, P-Lab (ČR)
- PCR cykler DNA Engine Dyad Peltier Thermal cykler, Bio-Rad (USA)
- pH-metr 774, Metrohm (Švýcarsko)
- přístroj s UV lampou Bioblock Scientific (Francie)
- spektrofotometr NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop Technologies (USA)
- sušička gelů Biometra (Německo)

- termostaty AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet (USA), TCH 100, Laboratorní přístroje Praha (ČR)
- transiluminátor UV Transilluminator 2000, Bio-Rad (USA)
- třepačka Polymax 1040, Heidolph (Německo)
- „vortex“ Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace krevního séra z plné krve

Plná krev bez přidání antikoagulačních látek byla odstředěna na centrifuze (2000 rpm, 10 min, 25 °C), za účelem separace séra od krevního koláče. Vrchní vrstva obsahující krevní sérum byla odebrána, zamražena a skladována při –20 °C. Po rozmražení bylo krevní sérum dále používáno jako materiál na přípravu vzorků při metodách 3.2.2, 3.2.3 a 3.2.4.

### 3.2.2 Isoelektrická fokusace lidského sérového transferinu

#### Příprava vzorků

Krevní sérum bylo promícháno na „vortexu“ a odstředěno (10 000 rpm, 2 min, 4 °C). Mezitím byla připravena směs roztoků citranu železitého (10 mM) a hydrogenuhličitanu sodného (0,5 M) v poměru 2:1, ze které bylo do zkumavek přeneseno po 2  $\mu$ l. Ze vzorků krevního séra byly odebrány 2  $\mu$ l čirého séra (tak, aby odebraný objem neobsahoval sérum obohacené lipidy z vrchní vrstvy) a přeneseny do zkumavek se saturační směsí. Zkumavky byly krátce centrifugovány na stolní centrifuze (2000 rpm, 2 min, 25 °C) a při laboratorní teplotě se nechaly inkubovat po dobu 30 min–1 h, během které probíhala saturace sérového transferinu železitými kationty. Nakonec byla přidána superdestilovaná voda ( $V = 40 \mu$ l). Takto připravené vzorky byly hned aplikovány na gel, případně až do aplikace na gel skladovány při 4 °C.

#### Příprava gelu

Byl připraven polyakrylamidový gel (5%T, 0,6%C, 5% glycerol, pH 5–7). Složení je uvedeno v tab. 3.1, str. 33 (složky jsou uspořádány podle pořadí pipetování).

Tabulka 3.1: Složení gelu na isoelektrickou fokusaci transferinu

Složka	Objem
superdestilovaná voda	2,875 ml
zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu (25%T, 3%C)	1 ml
25% roztok glycerolu	1 ml
Pharmalyte 5–7*	125 $\mu$ l
10% roztok APS	7,5 $\mu$ l
0,1% roztok FMN	25 $\mu$ l
TEMED	1,5 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	<b>5,034 ml</b>

\* v tomto kroku byl roztok promíchán a ve skleněné nádobce přenesen do Ehrlenmayerovy baňky, kde byl odplyněn pomocí vodní vývěvy (5 min)

Na sklo (12 cm x 6,5 cm) byla aplikována voda, zabezpečující přilnavost přiložené fólie (Gel support film for polyacrylamide, Bio-Rad). Sklo s fólií na spodní straně bylo umístěno do aparatury určené na přípravu gelu (Model 111 Casting Tray, Bio-Rad), kde byl pod fólií pipetován roztok na gel. Aparatura byla vložena do přístroje s UV lampou, kde UV záření ( $9,103 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 70% spodní záření, 45 min–1 h) usnadnilo polymeraci gelu. Polymerovaný gel na fólii se nechal vychladnout, byl se sklem opatrně oddělen od aparatury a připraven pro aplikaci vzorků. V případě, že aplikace vzorků nenásledovala ihned, bylo sklo s gelem umístěno do vlhké komůrky a skladováno při 4 °C.

### Aplikace vzorků na gel a isoelektrická fokusace

Na gel byl položen aplikátor – plastová šablona s horizontálně umístěnými čtvercovými otvory (Bio-Rad). Do těchto políček byly pipetovány připravené vzorky,  $V = 1 \mu\text{l}$ . Po vstřebání celého objemu vzorků do gelu byl aplikátor odstraněn, sklo bylo otočeno a opatrně položeno na elektrody předtím navlhčené destilovanou vodou. Gel byl v přímém styku s oběma elektrodami, přičemž linie nanesených vzorků se nacházela mezi nimi, blíže ke katodě. Při isoelektrické fokusaci byla použita laboratorní aparatura Model 111 Mini IEF Cell (Bio-Rad) a na připojeném zdroji (PowerPac 1000, Bio-Rad) byl nastaven program s uvedenými podmínkami:

100 V, 3 mA, 1 W, 15 min

200 V, 4 mA, 1 W, 15 min

450 V, 5 mA, 2 W, 1 h

## **Imunofixace**

Okamžitě po ukončení isoelektrické fokusace byla na gel aplikována protilátka proti lidskému transferinu (polyclonal rabbit anti-human transferrin, Dako;  $c = 1,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) v množství  $25 \mu\text{l.cm}^{-2}$  a opatrně rozetřena po celém povrchu plochou pipetovací špičkou. Proces vázání protilátky probíhal během jednododinové inkubace ve vlhké komůrce na 3D třepačce. Poté byl gel opatrně opláchnut destilovanou vodou a přenesen do roztoku NaCl (0,15 M) za účelem vymytí neprecipitovaných proteinů. Po jednododinové inkubaci byl roztok NaCl vyměněn za čerstvý a inkubace pokračovala dalších 24–48 h. Nakonec byl gel na 30 min přenesen do destilované vody. Během všech vymývacích kroků byla plastová nádobka s gelem umístěna na 3D třepačce.

## **Barvení a odbarvování gelu**

Gel byl vložen do barvicího roztoku Coomassie R 350, kde se inkuboval 30–60 min. Až se proužky transferinu vizuálně jevíly dostatečně výrazně zbarveny, následovalo odbarvování pozadí inkubačního gelu v odbarvovacích roztocích A a B: roztok A 2x 10 min, roztok B 10 min a 5 min. Fólie s gelem se nechala do druhého dne usušit volně na vzduchu.

## **„Skenování“ gelu**

Usušený gel byl „přeskenován“ a uložen v obrázkovém formátu do počítače (pomocí programu Adobe Photoshop CS). Obrázek byl analyzován v programu AlphaEaseFC od Alpha Innotech, kde byla vyhodnocena intenzita jednotlivých označených proužků v profilu, tj. bylo kvantifikováno relativní zastoupení [%] sialovaných isoformů transferinu (viz obr. 3.3, str. 35).



Obrázek 3.3: Výstup z analýzy profilů sialovaných isoform transferinu separovaných isoelektrickou fokusací sérového transferinu pomocí programu AlphaEaseFC (Alpha Innotech).

### 3.2.3 Detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace transferinu po inkubaci vzorků s neuraminidasou

Byl připraven polyakrylamidový gel (5%T, 0,6%C, 5% glycerol, pH 3–10) identickým postupem jako v 3.2.2. Složení je uvedeno v tab. 3.2 (str. 36)

Byla připravena směs roztoků citranu železitého (10 mM) a hydrogenuhličitanu sodného (0,5 M) v poměru 2:1 a 10  $\mu$ l této směsi bylo smícháno ve zkumavce s 10  $\mu$ l odstředěného (10 000 rpm, 2 min, 4 °C) krevního séra. Po 30-minutové inkubaci bylo přidanych 5  $\mu$ l neuraminidasy (Roche Applied Science;  $c = 10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 0,1 M Tris, pH 7), která se nechala působit přes noc při laboratorní teplotě. Vzorky desializované účinkem neuraminidasy byly ředěny 300  $\mu$ l destilované vody a aplikovány na gel v objemu  $V = 1 \mu\text{l}$ .

Další postup (isoelektrická fokusace, imunofixace, barvení a odbarvování, „skeno-  
vání“ gelu do počítače) byl stejný jako v 3.2.2.

Tabulka 3.2: Složení gelu na isoelektrickou fokusaci transferinu po inkubaci vzorků s neuraminidasou

Složka	Objem
superdestilovaná voda	2,75 ml
zásobný roztok akrylamidu a bisakrylamidu (25%T, 3%C)	1 ml
25% roztok glycerolu	1 ml
Ampholyte 3–10	250 $\mu$ l
10% roztok APS	7,5 $\mu$ l
0,1% roztok FMN	25 $\mu$ l
TEMED	1,5 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	<b>5,034 ml</b>

\* v tomto kroku byl roztok promíchán a ve skleněné nádobce přenesen do Ehrlenmayerovy baňky, kde byl odplyněn pomocí vodní vývěvy (5 min)

### 3.2.4 Proteinová analýza sérového transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce

#### Příprava vzorků

Krevní sérum bylo promícháno na „vortexu“ a odstředěno (10 000 rpm, 2 min, 4 °C). 3  $\mu$ l čirého séra byly zředěny v 897  $\mu$ l destilované vody (tj. 300x). Z roztoku ředěného séra byly 3  $\mu$ l odebrány a pipetovány do 100  $\mu$ l vzorkového pufru. Zkumavky s touto směsí byly zahřáty na termostatu na 95 °C (5 min), potom bylo zahřívání termostatu vypnuto a vzorky byly postupně ochlazeny na 50 °C. Následovala centrifugace (11 000 rpm, 2 min, 25 °C) a vzorky byly aplikovány na gel, případně skladovány při –20 °C .

#### Příprava gelu

Byl připraven dvouvrstvý polyakrylamidový gel (4%T koncentrační gel, 7%T separační gel), složení je uvedeno v tab. 3.3, str. 37. Do složené aparatury na přípravu gelu na vertikální elektroforesu (Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad) byl mezi skla (8,3 cm x 7,3 cm) pipetován jako první roztok separačního gelu cca 2 cm pod okraj a opatrně převrstven destilovanou vodou. Při laboratorní teplotě byl ponechán polymerovat. Voda byla z jeho povrchu odstraněna a navrch byla nanášena vrstva roztoku pro koncentrační gel, do něhož byl vložen hřeben.



Tabulka 3.3: Složení gelu na SDS-PAGE sérového transferinu

Typ gelu	4%T koncentrační	7%T separační
Složka	Objem	Objem
destilovaná voda	5,27 ml	4,29 ml
3x GB	3,33 ml	3,33 ml
zásobní roztok akrylamidu a bisakrylamidu (30,8%T, 2,6%C)	1,3 ml	2,27 ml
10% roztok APS	120 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	12 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	10 ml	10 ml

## SDS-PAGE

Vanička určená na průběh vertikální elektroforesy byla naplněna cca do třetiny anodovým pufrům. Dovnitř byla vložena složená elektrodová konstrukce s párem gelů v elektroforetických sklech, mezi které byl nalit až po okraj katodový pufr. Hřeben byl opatrně vyjmut a vzniklé jamky přečistěny proudem katodového pufru pomocí stříkačky s jehlou. Do jamek byly aplikovány připravené promíchané vzorky v objemu  $V = 10 \mu\text{l}$ . Do jedné z jamek byl pokaždé nanesen marker molekulových hmotností (SeeBlue Plus2 Prestained Standard),  $V = 4 \mu\text{l}$ . Po dokončení aplikace vzorků byla elektroforetická nádoba přikryta víkem, přes které byl zabezpečen vodivý kontakt se zdrojem. Elektroforesa probíhala za uvedených podmínek:

40 V, cca 15 min

100 V, 1,5 h

## Western blot

Po ukončení elektroforesy byl gel oddělen od skel a vrstva koncentračního gelu byla odstraněna. Gel byl vložen do vaničky s transferovým pufrům, kde se nechal ekvilibrovat na 3D třepačce cca 30 min. Podle zjištěných rozměrů gelu byla ve stejné velikosti vystřižena PVDF membrána (Immobilon-P, Millipore, USA) a filtrační papír (v počtu 6x počet gelů). Membrána byla na 15 s ponořena do methanolu (aktivace), potom 2 min hydratována v destilované vodě a nakonec 15 min ekvilibrována v transferovém pufrům. Na anodě – spodní desce blotovací aparatury byl poskládán „sendvič“ (v pořadí vrstvení): 3 kusy filtračních papírů, membrána, gel, 3 kusy filtračních papírů.

Z důvodu dosažení dobré vodivosti bylo důležité zabezpečit, aby všechny složky byly při skládání dostatečně nasáklé/převrstvené transferovým pufrem a mezi jednotlivými kroky vrstvení byly opatrně pomocí válení kónické zkumavky po jejich povrchu vytlačeny vzduchové bubliny. „Sendvič“ byl opatrně přikryt katodou – vrchní deskou blotovací aparatury (předtím opláchnuté v destilované vodě), přes kterou vedl vodivý kontakt se zdrojem. Přenos probíhal za uvedených podmínek:

$[(\text{šířka gelu [cm]} \times \text{délka gelu [cm]}) \times 0,8] \text{ mA}, 60 \text{ min}$

Po ukončení přenosu byla katoda odklopena, „sendvič“ byl opatrně rozebrán a membrána položena (orientována přenesenými proteiny nahoru) na filtrační papír. Na něm se membrána nechala přes noc vyschnout volně na vzduchu. Pro vizuální kontrolu úspěšnosti přenosu byl gel zabarven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250, odbarven v odbarvovacím roztoku a usušen v sušičce gelů.

## **Imunodetekce**

Usušená PVDF membrána byla aktivována v methanolu (5 min) a následně 2x 5 min oplachována v TBS. Mezitím byl připraven blokovací roztok (5% odtučněné sušené mléko v TBS): 2,5 g sušeného mléka bylo „vortexováno“ v cca 10 ml TBS v suspenzi a doplněno TBS do 50 ml. Membrána byla zalita blokovacím roztokem a inkubována 1 h. Zatím byl připraven roztok 0,1% Tween 20 v TBS (TBST) v objemu 200 ml na 1 membránu. Po ukončení blokování byl slit blokovací roztok a membrána byla oplachována v TBS po dobu 5 min, 10 min a 15 min. Během toho byl připraven roztok primární protilátky v 2% roztoku sušeného mléka v TBST: 0,4 g sušeného mléka bylo důkladně suspendováno v 20 ml TBST a do této suspenze bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  protilátky proti lidskému transferinu (polyclonal rabbit anti-human transferrin, Dako;  $c = 1,1 \text{ g.l}^{-1}$ ), tj. v ředění 1:2 000. Membrána byla zalita roztokem primární protilátky. Po dvouhodinové inkubaci byl roztok slit a membrána promývána v TBST 5 min, 10 min a 15 min. Dále byl na membránu aplikován krátce předem připravený roztok sekundární protilátky s konjugovanou peroxidasou (anti-rabbit IgG-peroxidase antibody produced in goat, Sigma-Aldrich) v 2% roztoku sušeného mléka v TBST, v ředění 1:20 000. Proběhla jednodinová inkubace. Roztok sekundární protilátky byl slit, membrána byla oplachována v TBST 5 min, 10 min, 15 min a v TBS 2x 10 min. Všechny inkubační a promývací kroky probíhaly ve skleněné uzavřené vaničce umístěné na 3D třepačce.

Mezitím byla podle rozměrů membrány vystřižena transparentní fólie a ve zkumavce smíchána směs substrátu pro peroxidasu (SuperSignal West Femto Maximum

Sensitivity Substrate) v poměru přiložených roztoků 1:1, přibližně 2 ml na 1 membránu. Byl zapnut přístroj VersaDoc 4000 a spuštěn počítačový program Quantity One (Bio-Rad). Membrána byla vložena do fólie, byl na ní nanesen roztok substrátu a přikrytím fólie byl substrát rovnoměrně distribuován po jejím povrchu. Po 20 s byl pomocí buničiny z fólie vytlačen přebytečný substrát, fólie s membránou byla umístěna do komory VersaDocu, byla zvolena vhodná pozice membrány a nastaven expoziční čas 30 s. Po získání signálu (vzniklého na principu chemiluminiscenční reakce) a uložení obrázku do počítače byla membrána z fólie vyjmuta a pro případ dalšího použití vložena do TBS, v němž byla skladována při 4 °C.

### **3.2.5 Molekulárně genetická analýza lidského genu pro transferin**

#### **3.2.5.1 Izolace DNA ze suché krevní kapky**

Na izolaci DNA ze suché krevní kapky byl použit komerční kit QIAmp DNA Micro, byl dodržen postup v přiloženém protokolu.

#### **3.2.5.2 Primery**

V databázi NCBI Gene [64] byly vyhledány relevantní informace o lidském genu pro transferin (*TF*), tj. počet protein-kódujících sekvencí (exonů) a jejich pozice v rámci sekvence celého genu. Tyto údaje byly dále zpracovány v programu Primer3 [65]. Sekvence oligonukleotidů na amplifikaci studovaných oblastí genu *TF* byly vybrány podle standardních požadavků – 1. pozice: v intronových oblastech minimálně 30 bp od kódující sekvence, 2. fyzikálně chemických vlastností: specifity, teploty tání ( $T_m$ ), tendence tvorby dimerů, obsahu GC basí [%] a délky [bp]. Byly zvoleny nejvhodnější sekvence oligonukleotidů pro přímý a zpětný primer všech 17 exonů genu *TF* a navržené primery byly objednány u firmy GENERI BIOTECH, s.r.o.. Sekvence příslušných primerů jsou uvedeny v tab. A.1 v Příloze (str. 84). Primery byly obdrženy v lyofilizované podobě. Podle přiloženého návodu byly naředěny destilovanou vodou pro PCR (bez obsahu DNAs a RNAs) na zásobní roztoky s koncentrací 0,1 mM. Z nich byl pro každou dvojici primerů připraven jeden roztok s koncentrací přímého/zpětného primeru 10  $\mu$ M, který se dále používal při PCR.

### 3.2.5.3 Optimalizace PCR genu pro lidský transferin

Prvním optimalizačním krokem pro PCR genu *TF* bylo určení vhodné teploty  $T_a$  pro PCR fázi hybridizace („annealing“). Na základě znalosti přibližně vypočítaných hodnot  $T_m$  všech primerů byl navržen program PCR cyklieru s generovaným teplotním gradientem, jehož podmínky jsou uvedeny v tab. 3.4 (str. 40).

Tabulka 3.4: Program PCR cyklieru pro optimalizační PCR genu *TF*

Fáze PCR (v pořadí)	Teplota	Čas
počáteční denaturace	94 °C	2 min
denaturace*	94 °C	45 s
hybridizace*	teplotní gradient 52 °C–67 °C	30 s
elongace*	72 °C	30 s
finální elongace	72 °C	7 min

\* vyznačené fáze byly v daném pořadí opakovány ve 30 cyklech

Byla připravena směs pro PCR (viz tab. 3.5, str. 41) v množství 8 reakčních směsí pro každý ze 17 fragmentů genu *TF* a po důkladném promíchání na „vortexu“ byla pipetována do „stripů“ s tenkostěnnými zkumavkami pro PCR v objemu po 24  $\mu\text{l}$ . Na chlazeném stojanu byl do každé zkumavky pipetován 1  $\mu\text{l}$  kontrolního vzorku ředěné gDNA DK0 ( $c = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Pevně uzavřené a krátce odstředěné zkumavky byly umístěny do PCR cyklieru tak, aby každá z 8 zkumavek (u všech 17 fragmentů) byla během hybridizační fáze PCR vystavena jiné teplotě generovaného teplotního gradientu v 12 řadách bloku PCR cyklieru (viz tab. 3.6, str. 41).

Blok se zkumavkami byl přikryt víkem PCR cyklieru s nastaveným vyhříváním (103 °C) a byl spuštěn program pro optimalizační PCR genu *TF* (tab. 3.4, str. 40). Po ukončení PCR byly zkumavky s produkty PCR uschovány při 4 °C do dalšího použití.

Úspěšnost amplifikace fragmentů genu *TF* byla kontrolována prostřednictvím elektroforesy produktů PCR. Byl připraven agarosový gel (cca 1,5% agarosa v roztoku TBE): 1,2 g agarosu bylo za zahřívání rozpuštěno v 80 ml TBE, roztok byl nalit do složené elektroforetické aparatury (Liberty 2, Biokey American Instruments, Inc.) a byly do něj vloženy hřebeny. Gel se nechal ztuhnout, jeho povrch byl zalit studenou destilovanou vodou a na elektrody se aplikoval TBE. Do jamek po hřebenech byly nanášeny vzorky – produkty PCR v objemu 10  $\mu\text{l}$ . Byl aplikován marker molekulových hmotností (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder/GeneRuler DNA Ladder Mix),

Tabulka 3.5: Složení směsi pro PCR pro optimalizační PCR genu *TF*

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	10,5 $\mu$ l
PPP Master Mix*	12,5 $\mu$ l
roztok primerů ( $c = 10 \mu$ M)	1 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	<b>24 <math>\mu</math>l</b>

\* komerční produkt (od Top-Bio, s.r.o.), složení dodávané 2x koncentrované směsi: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02% Tween 20, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasy, stabilizátory a aditiva

Tabulka 3.6: Rozložení teplotního gradientu v bloku PCR cyklieru během hybridizační fáze optimalizační PCR genu *TF*

Číslo řady	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	54,4	56,2	58,4	60,9	63,0	64,7	65,9	66,7

$V = 5 \mu$ l. Elektroforetická vanička byla přikryta víkem zabezpečujícím vodivý kontakt se zdrojem (PowerPac Basic, Bio-Rad) a byla spuštěna elektroforesa při 180 V.

Doba trvání elektroforesy byla přizpůsobena na základě vizuální kontroly pohybu barevných složek ve vzorcích a markeru. Po jejím ukončení byl gel vložen do vodného roztoku ethidium bromidu ( $c = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V něm se nechal inkubovat cca 30 min, poté byl přenesen do komory Alpha DigiDoc RT s fotoaparátem, byla spuštěna počítačová aplikace Alpha DigiDoc RT, nastavena vhodná pozice gelu a expoziční čas, zapnuto UV záření, a záznam byl uložen do počítače.

Byla vybrána teplota  $T_a$ , při které byl u všech produktů PCR syntetizován dostatečně čistý fragment genu *TF* v postačujícím množství. U fragmentů 8 a 12 byla za účelem zvýšení výtěžku testována jejich syntéza pomocí PCR za aplikace Combi PPP Master Mixu. Z důvodu odstranění nespecifické syntézy u produktů PCR byly fragmenty 3, 4, 5 a 17 amplifikovány za použití směsí pro PCR s různým obsahem DMSO (5% a 10%).

### 3.2.5.4 Molekulárně genetická analýza lidského genu pro transferin u vyšetřovaných pacientů

#### Optimalizovaná PCR lidského genu pro transferin

Na základě optimalizace PCR genu *TF* bylo navrženo složení směsi pro PCR a programy PCR cyklieru uvedeny v tabulkách 3.7 (str. 42), 3.8 (str. 43), 3.9 (str. 43), 3.10 (str. 43) a 3.11 (str. 44). Do připravené směsi pro PCR byl pipetován 1  $\mu\text{l}$  gDNA vyšetřovaných jedinců ředěný na  $c = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Pro všechny analyzované vzorky gDNA byl syntetizován každý fragment dvakrát (z důvodu kontroly, ale také vzhledem k většímu množství získaného produktu). Zároveň byly ze stejných směsí pro PCR připraveny vzorky, do nichž byla místo analyzované gDNA přidána gDNA kontroly DK0 nebo destilovaná voda pro PCR („slepý“ vzorek), aby bylo možné ověřit správný průběh PCR a vyloučit kontaminaci směsi pro PCR.

Výsledek PCR byl kontrolován elektroforesou na agarosovém gelu (1,5% agarosa v TBE). Na gel byly naneseny vzorky následujícího složení: 7  $\mu\text{l}$  destilované vody pro PCR + 1  $\mu\text{l}$  6x Orange G + 2  $\mu\text{l}$  produktu PCR, celkový objem  $V = 10 \mu\text{l}$ . Jako markery byly použity GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder/GeneRuler 1 kb DNA Ladder,  $V = 5 \mu\text{l}$ . Elektroforesa proběhla při 200 V, potom byl gel inkubován cca 30 min v roztoku ethidium bromidu ( $c = 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a nasnímán signál pod UV zářením v Alpha DigiDoc RT. Po ověření, že byly při PCR vyprodukované požadované fragmenty genu *TF* a nedošlo ke kontaminaci nežádoucí DNA, následovala purifikace fragmentů DNA z gelu.

Tabulka 3.7: Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu *TF* 1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15 a 16

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	10,5 $\mu\text{l}$
PPP Master Mix	12,5 $\mu\text{l}$
roztok primerů ( $c = 10 \mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
<b>celkový objem</b>	<b>24 <math>\mu\text{l}</math></b>

Tabulka 3.8: Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu *TF* 8 a 12

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	10,5 $\mu$ l
Combi PPP Master Mix*	12,5 $\mu$ l
roztok primerů ( $c = 10 \mu$ M)	1 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	24 $\mu$ l

\* komerční produkt (od Top-Bio, s.r.o.), složení dodávané 2x koncentrované směsi: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02% Tween 20, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasy, monoklonální anti-Taq DNA polymerasa (38 nM), stabilizátory a aditiva

Tabulka 3.9: Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu *TF* 3, 4, 5 a 17

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	8 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
PPP Master Mix	12,5 $\mu$ l
roztok primerů ( $c = 10 \mu$ M)	1 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	24 $\mu$ l

Tabulka 3.10: Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu *TF* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 a 17

Fáze PCR (v pořadí)	Teplota	Čas
počáteční denaturace	94 °C	2 min
denaturace*	94 °C	45 s
hybridizace*	59 °C	30 s
elongace*	72 °C	30 s
finální elongace	72 °C	7 min

\* vyznačené fáze byly v daném pořadí opakovány ve 35 cyklech

Tabulka 3.11: Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu *TF 8 a 12*

Fáze PCR (v pořadí)	Teplota	Čas
počáteční denaturace	94 °C	2 min
denaturace*	94 °C	45 s
hybridizace*	65 °C	30 s
elongace*	72 °C	30 s
finální elongace	72 °C	7 min

\* vyznačené fáze byly v daném pořadí opakovány ve 35 cyklech

### Purifikace fragmentů DNA z gelu

Byl připraven agarosový gel (1,5% agarosa v TBE) s hlubšími jamkami, do nichž byl aplikován celý zbytek objemu produktů PCR, tj. z jednoho analyzovaného fragmentu cca 46  $\mu\text{l}$ . Byl nanesen marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder,  $V = 5 \mu\text{l}$ . Elektroforeza byla puštěna na 180 V a po jejím ukončení byl gel inkubován v roztoku ethidium bromidu ( $c = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) cca 30 min. Na transiluminátoru s UV zářením byly z gelu pomocí skalpelu vyřezány proužky s fragmenty DNA. Doba expozice DNA UV zářením byla omezena na nutné minimum, aby se předešlo možným poškozením DNA. Vyřezané kusy gelu byly vloženy do zkumavek.

Dále byla DNA purifikována pomocí komerčního purifikačního kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-up System. Byl dodržen postup přiložený k produktu, výjimkou byl krok eluce DNA destilovanou vodou pro PCR – místo jednorázové aplikace 50  $\mu\text{l}$  vody, následné inkubace a centrifugace bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  destilované vody pro PCR nadvakrát (tj. 20  $\mu\text{l}$  + 20  $\mu\text{l}$ , za každou aplikací vody se nechaly vzorky inkubovat a byly centrifugovány). Tento upravený krok se v praxi osvědčil jako účinný pro zvýšení výtěžku extrahované DNA. Roztok purifikované DNA byl skladován při 4 °C.

### Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Po purifikaci DNA byla stanovena její koncentrace spektrofotometricky na přístroji NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Purifikované produkty PCR, jejichž koncentrace přesahovala 30  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , byly zředěny destilovanou vodou pro PCR přibližně na tuto hodnotu (podle doporučení pro používaný sekvenační přístroj).



Tabulka 3.12: Program PCR cyklieru pro sekvenační PCR

Fáze PCR (v pořadí)	Teplota	Čas
počáteční denaturace	95 °C	5 min
denaturace*	95 °C	5 s
hybridizace*	50 °C	25 s
elongace*	68 °C	50 s

\* vyznačené fáze byly v daném pořadí opakovány ve 35 cyklech

### Sekvenování genu *TF*

Pro sekvenační PCR reakci byly použity chemikálie z kitu Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Byl dodržen postup uvedený v příloženém protokolu, s menšími úpravami: směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l (na 1 reakci) obsahovala 2  $\mu$ l směsi Ready Reaction Mix, 3  $\mu$ l pufru 5x Sequencing Buffer, přímý/zpětný primer o koncentraci 3,2 pmol a doporučené množství templátu DNA – purifikovaného fragmentu genu *TF*. Čistění sekvenační reakce na bázi ethanolvé precipitace proběhlo podle příloženého návodu. Na finální denaturaci byl aplikován formamid v množství 20  $\mu$ l na 1 reakci a takto opracovaná směs byla zahřáta na 95 °C (3 min). Pro sekvenování byly použity 50 cm/80 cm kapiláry sekvenačního přístroje ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Program PCR cyklieru pro sekvenační PCR, uvedený v tab. 3.12 (str. 45), odpovídal podmínkám PCR doporučeným v protokolu aplikovaného kitu. Výstupem sekvenování byl chromatogram (ve formátu .ab1), který byl dále analyzován pomocí komerčního programu SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems) a bezplatného programu Chromas Lite 2.01.

### Restrikční analýza mutace c.1889A>C v genu *TF*

Pomocí programu NebCutter [66] byla v databázi restrikčních enzymů vyhledána vhodná endonukleasa na restrikční analýzu mutace c.1889A>C ve fragmentu 16 genu *TF*. Byl vybrán enzym *Hpy*CH4IV, který v rámci fragmentu 16 genu *TF* specificky rozpoznává a štěpí sekvenci DNA lokalizovanou na pozici c.1889\_c.1892, viz obr. 3.4 (str. 46). Na základě charakteristiky komerčního produktu zvoleného enzymu byl sestaven následující pracovní protokol.

Na ledu byla ve zkumavkách připravena a opatrně promíchána směs podle tab. 3.13, str. 46 (složky jsou uspořádány podle pořadí pipetování). Pokaždé byl připraven i „slepý“ vzorek, do něhož byla místo fragmentu DNA přidána destilovaná voda pro



Obrázek 3.4: Sekvence DNA, kterou enzym *Hpy*CH4IV specificky rozpoznává a štěpí na označených místech.

Tabulka 3.13: Směs na restriční analýzu mutace c.1889A>C v genu *TF*

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	7,5 $\mu$ l
pufr NEB1	1,5 $\mu$ l
enzym <i>Hpy</i> CH4IV*	1 $\mu$ l
fragment DNA genu <i>TF</i> 16**	5 $\mu$ l
<b>celkový objem</b>	15 $\mu$ l

\* c = 10,000 U.ml<sup>-1</sup>; \*\* produkt PCR, připraven podle výše popsaného postupu optimalizované PCR lidského genu pro transferin

PCR. Zkumavky se směsí na restriční analýzu byly umístěny do termostatu (37 °C), kde probíhala 15 h inkubace.

Produkty štěpení byly analyzovány elektroforesou. Byl připraven agarosový gel (2,5% agarosa v TBE). Do jamek byly aplikovány vzorky o složení: 7,5  $\mu$ l směsi na restriční analýzu po inkubaci + 1,5  $\mu$ l 6x Orange G, V = 9  $\mu$ l. Byl použit marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, V = 5  $\mu$ l. Elektroforesa probíhala při 150 V, po jejím ukončení byl gel inkubován cca 30 min v roztoku ethidium bromidu (c = 0,5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a byl detekován signál pod UV zářením (Alpha DigiDoc RT).

V tab. 3.14 (str. 47) jsou uvedeny vypočítané velikosti produktů štěpení fragmentu 16 genu *TF* za použití enzymu *Hpy*CH4IV při restriční analýze vzorků s mutací c.1889A>C i bez ní.

Tabulka 3.14: Produkty štěpení při restriční analýze mutace c.1889A>C v genu *TF*

Mutace c.1889A>C v genu <i>TF</i>	Produkty štěpení enzymem <i>Hpy</i> CH4IV
přítomna, homozygotní	395 bp
přítomna, heterozygotní	395 bp + 262 bp + 133 bp
nepřítomna	262 bp + 133 bp

### 3.2.6 Molekulárně genetická analýza lidského genu pro fosfomanomutasu 2

Fragmenty genu *PMM2* byly připraveny ze směsi pro PCR podle tab. 3.15 (str. 47), do níž byl přidán 1  $\mu\text{l}$  analyzovaného roztoku gDNA ( $c = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Stejným způsobem byly připraveny i vzorky kontroly (DK0) a „slepého“ vzorku (destilovaná voda místo roztoku gDNA). Byl použit program PCR cykleru uvedený v tab. 3.16 (str. 48). Tabulka 3.17 (str. 48) znázorňuje, jak byly do bloku PCR cykleru umístěny zkumavky se směsmi pro jednotlivé fragmenty genu *PMM2*, tj. jaké teplotě byly vystaveny v PCR fázi hybridizace.

Následná elektroforesa na ověření úspěšnosti amplifikace PCR produktů, purifikace fragmentů DNA z gelu a stanovení koncentrace DNA měly identický postup jako v 3.2.5.4.

Tabulka 3.15: Složení směsi pro PCR pro fragmenty DNA genu *PMM2* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8

Složka	Objem/1 reakce
destilovaná voda pro PCR	9,5 $\mu\text{l}$
PPP Master Mix	12,5 $\mu\text{l}$
roztok přímého primeru ( $c = 10 \mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
roztok zpětného primeru ( $c = 10 \mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
<b>celkový objem</b>	24 $\mu\text{l}$

Tabulka 3.16: Program PCR cyklieru pro syntézu fragmentů DNA genu *PMM2*

Fáze PCR (v pořadí)	Teplota	Čas
počáteční denaturace	95 °C	2 min
denaturace*	95 °C	30 s
hybridizace*	teplotní gradient 56 °C–66 °C	30 s
elongace*	72 °C	1 min
finální denaturace	95 °C	1 min
finální hybridizace	teplotní gradient 56 °C–66 °C	30 s
finální elongace	72 °C	3 min

\* vyznačené fáze byly v daném pořadí opakovány ve 28 cyklech

Tabulka 3.17: Pozice zkumavek v bloku PCR cyklieru při PCR genu *PMM2*

Číslo řady	Teplota	Fragment
1	56 °C	
2	56,3 °C	
3	56,9 °C	
4	57,7 °C	7
5	58,8 °C	2, 3
6	60,3 °C	6
7	62 °C	
8	63,4 °C	4
9	64,5 °C	5
10	65,3 °C	
11	65,8 °C	1, 8
12	66 °C	

### **Sekvenování genu *PMM2***

Postup byl analogický jako při sekvenování genu *TF* (viz 3.2.5.4) s tím rozdílem, že použitým templátem DNA byly purifikované fragmenty genu *PMM2* a místo specifických primerů pro gen *PMM2* byly do směsi pro PCR přidány tzv. univerzální primery RP a T7. Získaný chromatogram byl analyzován pomocí bezplatného programu Chromas Lite 2.01.

### **3.2.7 Statistické zpracování dat**

Ke statistické analýze byl použit program STATISTICA, verze 9.0 (StatSoft, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány na zvolené hladině významnosti  $p < 0,05$ .

# Kapitola 4

## Výsledky

### 4.1 Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací (část I.)

Analyzovaný soubor se skládal ze 100 vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví různých věkových kategorií negativních pro CDG s označením SK1–SK100. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí isoelektrické fokusace transferinu (popis metody viz 3.2.2). V případě jednoho vzorku (SK100) byl pozorován atypický profil transferinových proužků, jenž indikoval přítomnost různých genetických variant transferinu (viz 4.1.2). Z toho důvodu vzorek SK100 nebyl zařazen do kontrolního souboru. U ostatních vzorků bylo pomocí počítačového programu AlphaEaseFC (Alpha Innotech) kvantifikováno relativní zastoupení [%] sialovaných isoformů sérového transferinu v každém profilu.

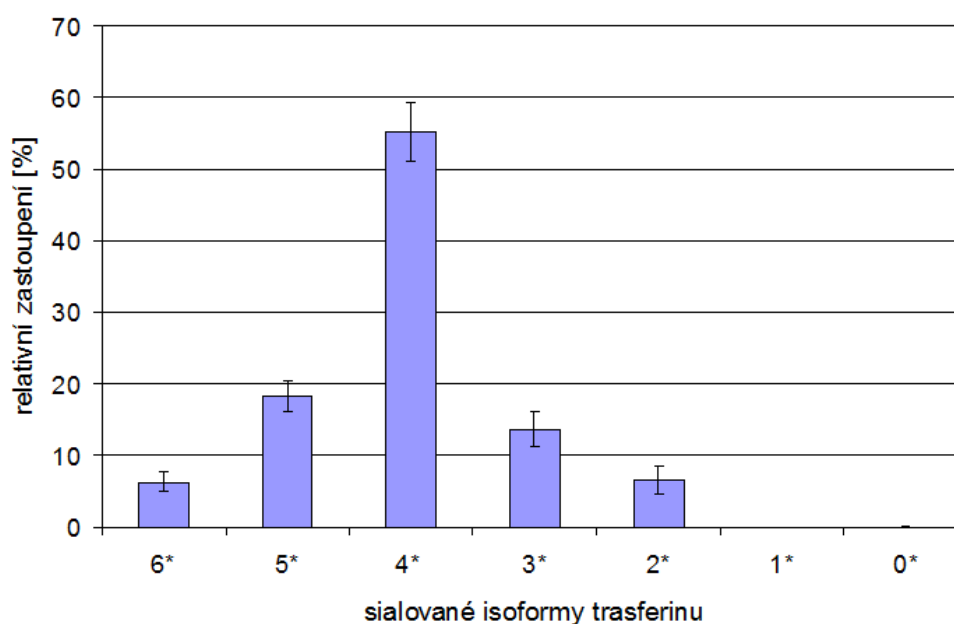
Výsledně byl kontrolní soubor reprezentován vzorky krevního séra 99 jedinců mužského ( $n = 54$ ) a ženského ( $n = 45$ ) pohlaví ve věku 2–42 let negativních pro CDG, označenými SK1–SK99.

Zjištěné hodnoty z kvantifikace profilů transferinových proužků pro všechny vzorky kontrolního souboru jsou sestaveny v tab. A.6 (str. 86) v Příloze. Zpracované výsledky – referenční rozmezí relativního zastoupení jednotlivých sialovaných isoformů transferinu jsou shrnuty v tab. 4.1 (str. 51) a graficky znázorněny na obr. 4.1 (str. 51). Výrazně dominuje tetrasialotransferin (51 %–59 %), druhá nejvíce zastoupená forma je pentasialotransferin (16 %–20 %), o něco méně je trisialotransferinu (11 %–16 %), po něm následují přibližně stejně zastoupeny hexasialo- a disialo- formy transferinu (5 %–8(9) %) a zanedbatelné množství monosialo-/asialotransferinu (méně než 1 %).

Tabulka 4.1: Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra kontrolního souboru SK1–SK99 (n = 99)

x*	Isoforma transferinu	Relativní zastoupení [%]
6	hexasialotransferin	6,30 ± 1,29
5	pentasialotransferin	18,26 ± 2,23
4	tetrasialotransferin	55,11 ± 4,05
3	trisialotransferin	13,66 ± 2,47
2	disialotransferin	6,64 ± 1,90
1	monosialotransferin	< 1
0	asialotransferin	< 1

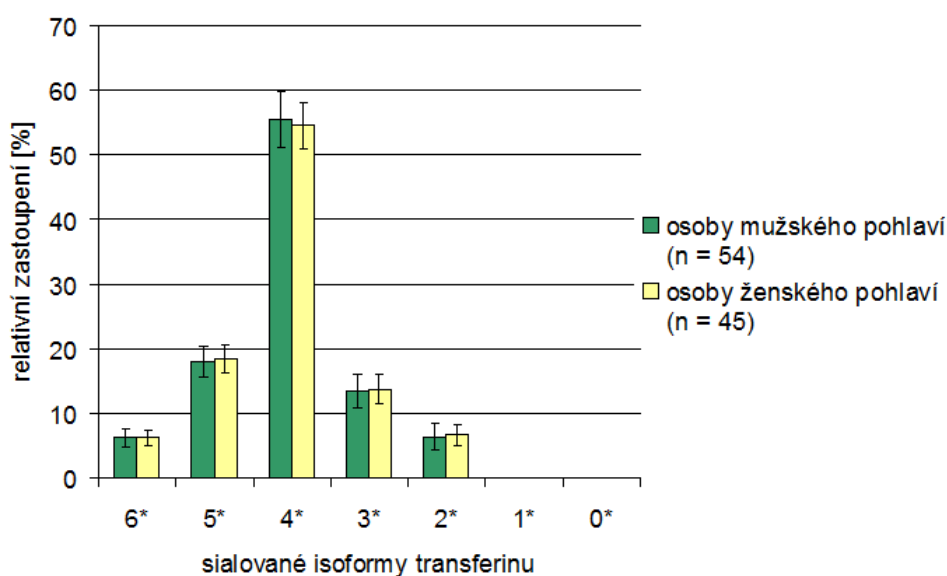
\* počet zbytků kyseliny sialové v terminální poloze oligosacharidových řetězců dané isoformy transferinu



Obrázek 4.1: Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra kontrolního souboru SK1–SK99 (n = 99). \* – sialovaná isoforma transferinu označena podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové.

### 4.1.1 Závislost relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu od pohlaví a věku v kontrolním souboru

Získaná data byla vyhodnocena samostatně pro vzorky krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví. Výsledky uvádí tab. 4.2 (str. 53) a graf na obr. 4.2 (str. 52). Korelace relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu s pohlavím testovaných jedinců nebyla zjištěna (hexasialotransferin:  $p = 0,1025$ ; pentasialotransferin:  $p = 0,4377$ ; tetrasialotransferin:  $p = 0,1895$ ; trisialotransferin:  $p = 0,3267$ ; disialotransferin:  $p = 0,4327$ ).



Obrázek 4.2: Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99. \* – sialovaná isoforma transferinu označena podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové.

S cílem zjistit, zda mezi jednotlivými profily existují korelace v poměrech zastoupení dominantní formy – tetrasialotransferinu – a hypoglykosylovaných forem trisialotransferinu/disialotransferinu, a určit vliv pohlaví jedinců analyzovaných vzorků na tyto hodnoty, byly kvantifikované hodnoty relativního zastoupení příslušných sialovaných isoform transferinu u jednotlivých vzorků dány do poměru tetrasialotransferin/trisialotransferin a tetrasialotransferin/disialotransferin a statisticky vyhodnoceny v rámci skupin vzorků jedinců mužského a ženského pohlaví. Viz tab. 4.3 (str. 53) a graf na obr. 4.3 (str. 54).

Hodnoty poměrů tetrasialotransferinu k trisialotransferinu/disialotransferinu jsou



Tabulka 4.2: Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99

<b>x*</b>	<b>Isoforma transferinu</b>	<b>Rel. zastoupení [%] u muž. pohlaví (n = 54)</b>	<b>Rel. zastoupení [%] u žen. pohlaví (n = 45)</b>
6	hexasialotransferin	6,30 ± 1,42	6,31 ± 1,11
5	pentasialotransferin	18,08 ± 2,32	18,48 ± 2,07
4	tetrasialotransferin	55,51 ± 4,34	54,62 ± 3,57
3	trisialotransferin	13,56 ± 2,61	13,79 ± 2,25
2	disialotransferin	6,55 ± 1,98	6,74 ± 1,76
1	monosialotransferin	< 1	< 1
0	asialotransferin	< 1	< 1

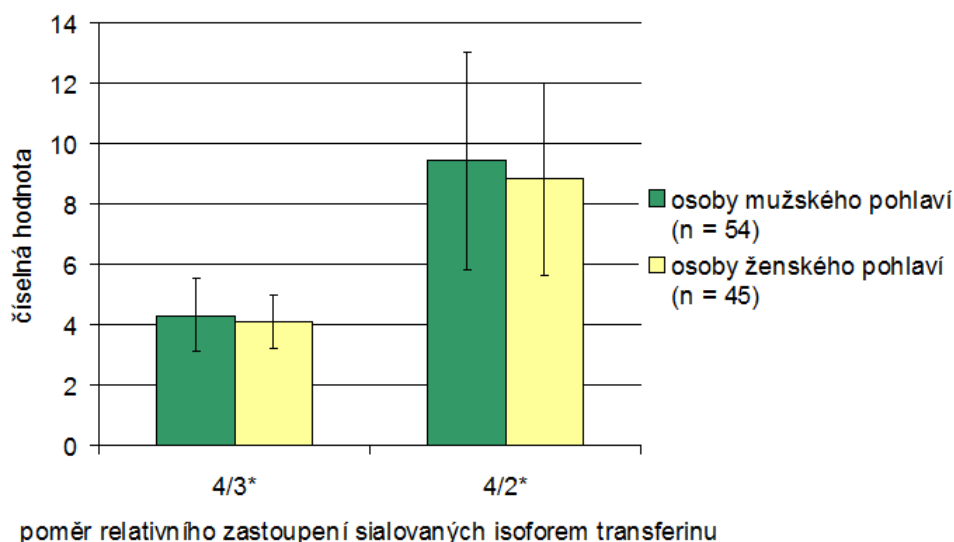
\* počet zbytků kyseliny sialové v terminální poloze oligosacharidových řetězců dané isoformy transferinu

v průměru mírně vyšší u osob mužského pohlaví. Podle statistických výpočtů u poměru tetrasialotransferin/trisialotransferin hodnota  $p = 0,0457$  hraničila s kritickým intervalem ( $p < 0,05$ ). Rozdíl hodnot poměru tetrasialotransferin/disialotransferin mezi vzorky od jedinců různého pohlaví nebyl statisticky významný ( $p = 0,4176$ ).

Na prozkoumání závislosti relativního zastoupení jednotlivých sialovaných isoform Tf od věku jedinců kontrolního souboru byly sestaveny grafy uvedené v Příloze na obr. A.1 (str. 89), A.2 (str. 90), A.3 (str. 90), A.4 (str. 91) a A.5 (str. 91). Statisticky byly zpracovány hodnoty pro věkový interval 2–18 let, vyřazeny byly vzorky starších osob (u nichž každá věková kategorie byla reprezentována jediným vzorkem). Ve zvoleném

Tabulka 4.3: Poměr relativního zastoupení mezi tetrasialotransferinem a trisialotransferinem nebo disialotransferinem separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99

<b>Poměr rel. zastoupení [%] isoform transferinu</b>	<b>Muž. pohlaví (n = 54)</b>	<b>Žen. pohlaví (n = 45)</b>
tetrasialotransferin/trisialotransferin	4,31 ± 1,20	4,10 ± 0,89
tetrasialotransferin/disialotransferin	9,42 ± 3,61	8,82 ± 3,20



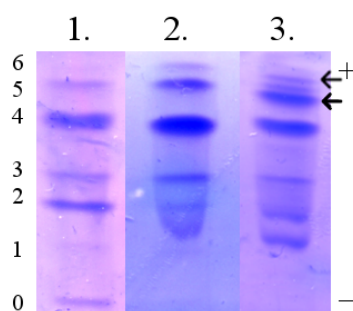
Obrázek 4.3: Poměr relativního zastoupení mezi tetrasialotransferinem a trisialotransferinem nebo disialotransferinem separovaných pomocí isoelektrické fokusace u vzorků krevního séra jedinců mužského a ženského pohlaví kontrolního souboru SK1–SK99. \* – poměr sialovaných isoformů transferinu označených podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové.

věkovém intervalu relativní zastoupení žádné z analyzovaných isoformů nezávisí na věku (hexasialotransferin:  $p = 0,1033$ ; pentasialotransferin:  $p = 0,6183$ ; tetrasialotransferin:  $p = 0,9842$ ; trisialotransferin:  $p = 0,8907$ ; disialotransferin:  $p = 0,7170$ ).

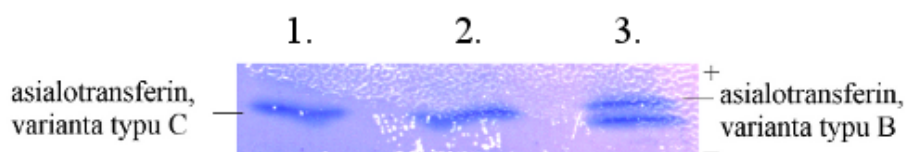
#### 4.1.2 Detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace po štěpení s neuraminidasou u vzorků kontrolního souboru

U vzorku SK100 byl při isoelektrické fokusaci sialovaných forem transferinu pozorován odlišný profil proužků Tf než u vzorků kontrolního souboru SK1–SK99. Oproti typickému profilu vzorku negativního pro CDG byly přítomny navíc dva proužky, lokalizované nad proužky tetrasialotransferinu a pentasialotransferinu (posunuty směrem k anodě), viz obr. 4.4 (str. 55). Na základě těchto výsledků bylo navrženo vyšetření polymorfismů transferinu pomocí inkubace vzorku s neuraminidasou a následné separace desializovaných variant transferinu isoelektrickou fokusací (popis metody viz 3.2.3). Výsledky analýzy jsou znázorněny na obr. 4.5 (str. 55). U SK100 byly detekovány dva proužky reprezentující přítomnost dvou různých genetických variant transferinu. Jeden

z nich (obr. 4.5, 3. dráha, spodní proužek) svou pozicí odpovídal nejběžnější variantě typu C, kterou obsahovaly i kontrolní vzorky pozitivní a negativní pro CDG. Druhý proužek (obr. 4.5, 3. dráha, vrchní proužek) byl posunut směrem k anodě, tj. odpovídal variantě transferinu s nižším pI. Vzhledem k tomu lze usuzovat, že se jedná o variantu transferinu typu B. Nebylo možné provést molekulárně genetickou analýzu genu *TF*, která by potvrdila/vyvrátila náš předpoklad, protože nebyl k dispozici materiál na izolaci gDNA od příslušného jedince.



Obrázek 4.4: Profily sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí elektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 5–7) u vzorků krevního séra analyzovaných jedinců. 1. – *SpozI*: vzorek pacienta se syndromem *PMM2-CDG*; 2. – *SK3*: vzorek jedince kontrolního souboru negativního pro *CDG*; 3. – *SK100*: vzorek jedince negativního pro *CDG* s podezřením na přítomnost různých elektroforeticky rozlišitelných variant transferinu. Isoformy transferinu jsou značeny čísla vlevo podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové. Šipky označují 2 proužky *Tf*, jež byly u *SK100* přítomny navíc oproti profilu kontrolního vzorku *SK3*.



Obrázek 4.5: Profily desializovaných variant transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 3–10) u vzorků krevního séra analyzovaných jedinců. 1. – *SpozI*: vzorek pacienta se syndromem *PMM2-CDG*; 2. – *SK3*: vzorek jedince kontrolního souboru negativního pro *CDG*; 3. – *SK100*: vzorek jedince negativního pro *CDG* s detekovanými polymorfismy transferinu.

## 4.2 Biochemická a molekulárně genetická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG (část II.)

### 4.2.1 Biochemická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG

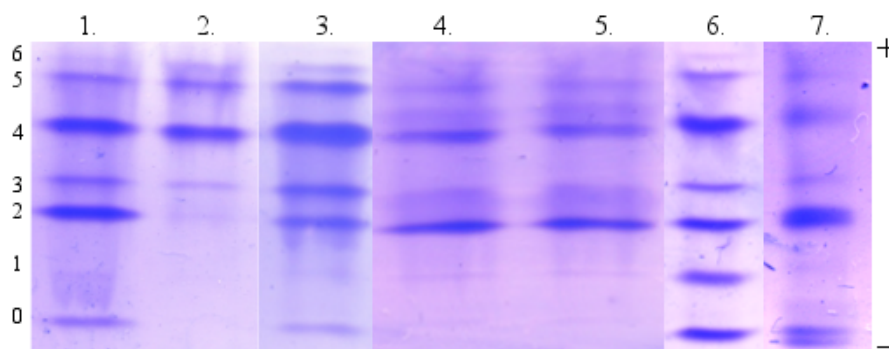
Na základě klinického podezření byly vytipováni tři pacienti P1, P2 a P3, u nichž bylo cílem analyzovat jejich vzorky krevního séra na přítomnost patologického profilu sialovaných isoform transferinu pomocí isoelektrické fokusace. Klinické příznaky příslušných jedinců byly různorodé a vzájemně odlišné (viz 3.1.1.2), společným znakem byl abnormální profil proužků sérového transferinu při IEF. U pacientů byly předem vyloučeny sekundární poruchy glykosylace v důsledku jiných metabolických onemocnění. Ve všech třech případech byla zaznamenána zvýšená hladina méně sialovaných forem Tf (tri-, di-, mono- a asialotransferin), charakteristická pro pacienty pozitivní pro CDG, ale podíly jednotlivých isoform se lišily.

Výsledky analýzy vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů SP1, SP2 a SP3 pomocí isoelektrické fokusace transferinu (popis metody viz 3.2.2) jsou zobrazeny na obr. 4.6 (str. 57). Pro porovnání jsou přiloženy také obrázky profilů vzorků zdravé kontroly a nemocných jedinců s poruchou CDG typu I i II. Kvantifikované hodnoty relativního zastoupení sialovaných isoform transferinu ve znázorněných profilech určené pomocí programu AlphaEaseFC uvádí tab. 4.4 (str. 58). Na porovnání bylo použito referenční rozmezí určené v I. části výsledků.

U testovaných vzorků byla dodatečně provedena detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace po inkubaci vzorků krevního séra (saturovaných roztokem  $\text{Fe}^{3+}$ ) s neuraminidasou (popis metody viz 3.2.3). Výsledky dané analýzy jsou zobrazeny na obr. 4.7 (str. 59).

Dále byla provedena doplňková proteinová analýza transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce (popis metody viz 3.2.4), jejíž optimalizace pro naši laboratoř byla součástí této práce. Výsledky imunodetekce analyzovaných vzorků i kontrol jsou zobrazeny na obr. 4.8 (str. 59).

Profil vzorku pacienta P1 (SP1) při IEF Tf nepřipomínal ani jeden z ukázkových profilů kontrol negativních a pozitivních pro CDG. Charakteristické bylo výrazné zastoupení disialotransferinu, aniž by byly zvýšeny hladiny jiných méně sialovaných forem (viz obr. 4.6, str. 57). Výsledek imunodetekce po SDS-PAGE a Western blotu Tf ukázal



Obrázek 4.6: Profily sialovaných isoform transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokuse na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 5–7) u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů. 1. – *SpozI*: vzorek pacienta se syndromem *PMM2-CDG*; 2. – *Sneg*: vzorek zdravé kontroly; 3. – *SpozII*: vzorek pacienta s typem *CDG II*; 4. – *SP1*: vzorek pacienta *P1*; 5. – *SP1R1*: vzorek zdravé matky pacienta *P1*; 6. – *SP2*: vzorek pacienta *P2*; 7. – *SP3*: vzorek pacienta *P3*. Isoformy transferinu jsou značeny čísla vlevo podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové.

přítomnost dvou proužků o přibližně stejné intenzitě (viz obr. 4.8, str. 59), které odpovídají formě Tf s dvěma (~80 kDa) nebo jen jedním (~77 kDa) navázaným N-glykanem. U vzorku séra pacientovy zdravé matky byl při IEF Tf potvrzen identický profil, podle čehož bylo usouzeno, že abnormální profil není důsledkem patologického stavu. Při analýze polymorfismů Tf pomocí IEF Tf po inkubaci s neuraminidasou byla u obou (pacienta i jeho matky) detekována jenom běžná Tf varianta C (viz obr. 4.7, str. 59). Vznikl tedy předpoklad, že v genu *TF* mohou být přítomny mutace, jež neovlivňují pI syntetizovaného proteinu (resp. ovlivňují ho jenom nepatrně), ale mají dopad na jeho glykosylaci. Byla proto navržena molekulárně genetická analýza genu *TF* (viz 4.2.2.1).

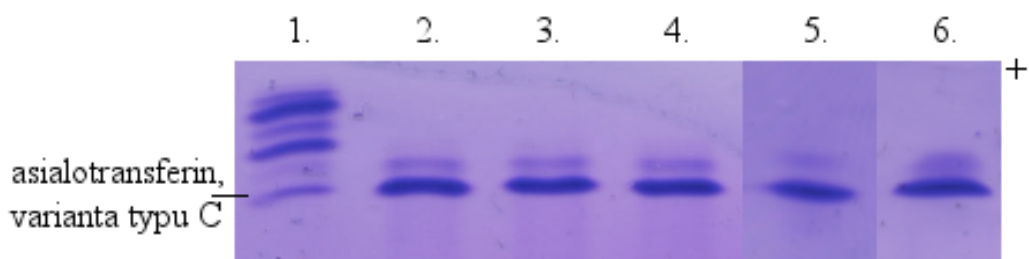
U vzorku pacienta *P2* (*SP2*) byly při IEF Tf v profilu zastoupeny ve zvýšeném množství di-, mono- i asialotransferin (viz obr. 4.6, str. 57). Protože profily pacientů s *CDG II* jsou (na rozdíl od *CDG I*) značně variabilní, bylo by možné pacienta *P2* zařadit do této skupiny, i když měl odlišný profil isoform Tf než kontrolní vzorek *SpozII* (s typem *CDG II*). Přítomnost různých elektroforeticky rozlišitelných variant Tf byla vyloučena pomocí IEF Tf po inkubaci vzorku s neuraminidasou (viz obr. 4.7, str. 59). Zajímavé bylo, že při proteinové analýze Tf pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce byl detekován pro *SP2* signál podobný jako *SP1* (viz obr. 4.8, str. 59). Pro prozkoumání, zda může tento výsledek mít společnou příčinu, byla – jako v případě pacienta *P1* – navržena molekulárně genetická analýza genu *TF* (viz 4.2.2.1).

Tabulka 4.4: Zastoupení jednotlivých isoform transferinu separovaných isoelektrickou fokusací v séru pacientů s podezřením na syndrom CDG a kontrol

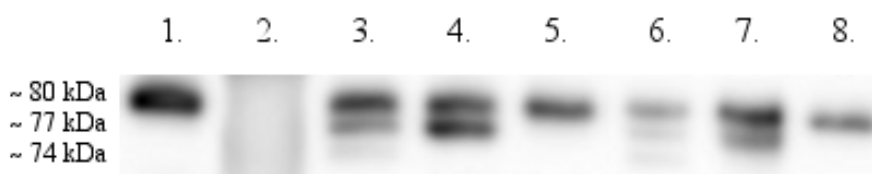
Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
<b>referenční rozmezí</b>	5,01– 7,59	16,03– 20,49	51,06– 59,16	11,19– 16,13	4,74– 8,54	< 1	< 1
<b>SpozI</b>	3,4	9,4	34,1	10,1	31,1	2,6	8,9
<b>SpozII</b>	3,5	16,7	39,4	19,3	16,7	0	4,3
<b>SP1</b>	5,5	13,2	31,3	11,2	33,5	3,0	2,5
<b>SP1R1</b>	0	13,7	29,7	14,7	36,2	3,2	2,6
<b>SP2</b>	1,9	7,1	29,2	8,3	16,9	17,1	19,5
<b>SP3</b>	0	6,1	19,8	7,4	41,6	0	25,1

\* relativní zastoupení [%] sialované isoformy transferinu označené podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové

Vzorek pacienta P3 (SP3) měl profil typický pro CDG typu I, velmi podobný jako SpozI (vzorek pacienta se syndromem PMM2-CDG), při IEF Tf (viz obr. 4.6, str. 57) i proteinové analýze pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce (viz obr. 4.8, str. 59). Při analýze pomocí IEF Tf po inkubaci séra s neuraminidasou nebyla detekována přítomnost polymorfismů transferinu (viz obr. 4.7, str. 59). Na základě těchto výsledků bylo doporučeno enzymové vyšetření spektrofotometrickým měřením aktivity fosfomanomutasy 2 (PMM2) a fosfomanoisomerasy (PMI) v izolovaných lymfocytech. Výsledky měření, které bylo provedeno pracovníky naší laboratoře, uvádí tab. 4.5 (str. 60). Bylo zjištěno, že aktivita PMM2 i její poměr k aktivitě kontrolního enzymu PMI (PMM2/PMI) byly výrazně sníženy, což svědčilo pro syndrom PMM2-CDG. Pro ověření diagnózy bylo dále u pacienta P3 indikováno sekvenování genu *PMM2* (viz 4.2.2.2).



Obrázek 4.7: Profily desializovaných variant transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace na polyakrylamidovém gelu (5%T, pH 3–10) u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů. 1.–*SpozI*: vzorek pacienta se syndromem PMM2-CDG, jenž nebyl inkubován s neuraminidasou; 2.–*SpozI*: vzorek pacienta se syndromem PMM2-CDG po inkubaci s neuraminidasou; 3.–*SP1*: vzorek pacienta P1; 4.–*SP1R1*: vzorek zdravé matky pacienta P1; 5.–*SP2*: vzorek pacienta P2; 6.–*SP3*: vzorek pacienta P3.



Obrázek 4.8: Profily různě glykosylovaných forem transferinu imunodetekovaných po separaci pomocí SDS-PAGE (7%T) a následným Western blotem u vzorků krevního séra vyšetřovaných pacientů. 1. – *Sneg*: vzorek zdravé kontroly; 2. – marker molekulových hmotností *SeeBlue Plus2 Prestained Standard*; 3. – *SpozI*: vzorek pacienta se syndromem PMM2-CDG; 4. – *SP1*: vzorek pacienta P1; 5. – *SpozII*: vzorek pacienta s typem CDG II; 6. – *SP3*: vzorek pacienta P3; 7. – *SP2*: vzorek pacienta P2; 8. – *Sneg*: vzorek zdravé kontroly.

Tabulka 4.5: Spektrofotometrické stanovení aktivit fosfomanomutasy 2 a fosfomanoisomerasy v izolovaných lymfocytech u vyšetřovaného pacienta P3

<b>Vzorek</b>	<b>Aktivita PMM2*</b> [nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protein]	<b>Aktivita MPI**</b> [nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> protein]	<b>Poměr aktivit PMM2/MPI</b>
<b>referenční rozmezí</b>	0,81–1,65	7,38–21,0	0,03–0,41
<b>lymfocyty pacienta P3</b>	0,01	22,11	0,0004

\* fosfomanomutasa 2

\*\* fosfomanoisomerasa



## 4.2.2 Molekulárně genetická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG

### 4.2.2.1 Molekulárně genetická analýza genu pro transferin

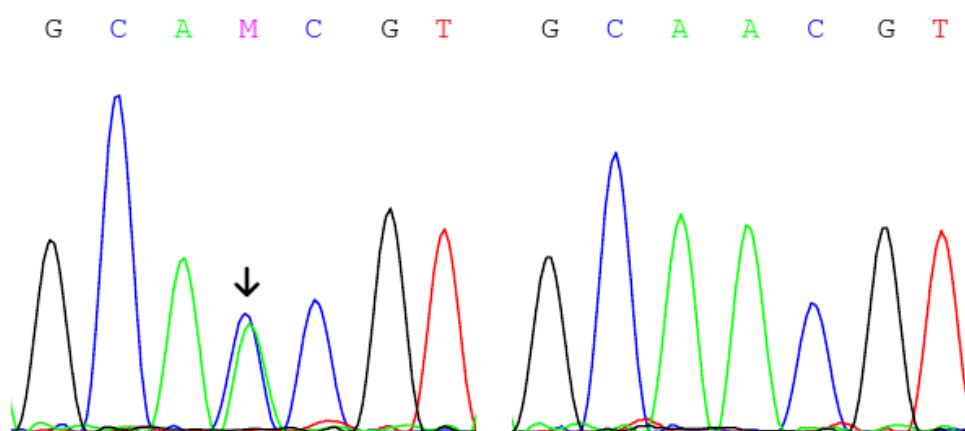
Pro molekulárně genetickou analýzu genu *TF* byla využita námi nově zavedená a optimalizovaná metoda (viz 3.2.5.4).

Vyšetřovány byly vzorky izolované genomové DNA pacientů P1 a P2 (DP1 a DP2) a vzorek gDNA kontroly (DK), která splnila kritérium normálního profilu při IEF Tf. Po amplifikaci 17 fragmentů genu *TF* všech vzorků bylo pomocí elektroforesy a následné vizualizaci produktů PCR ověřeno, že jejich syntéza byla úspěšná a velikosti jednotlivých fragmentů ve všech případech odpovídaly vypočítaným hodnotám. Vzorky fragmentů DNA genu *TF* byly dále podle uvedeného postupu purifikovány a sekvenovány. Výsledný chromatogram byl analyzován pomocí komerčního programu SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems). Jako referenční sekvence genu *TF* byla použita sekvence z databáze NCBI [64] NG\_013080.1 (platí pro predominantní variantu Tf typu C1) a Ensembl [67] na úrovni cDNA. Označení mutací koresponduje s doporučenou nomenklaturou lidských genových mutací [68].

V genu *TF* vzorku DK byla nalezena jediná mutace, a to polymorfní c.1765C>T (homozygotní; v 15. exonu; CCT → TCT). Tato mutace způsobuje záměnu aminokyseliny P589S a determinuje variantu Tf C2 (viz 1.1.2.1). U vzorku DP2 byly ve fragmentech genu *TF* detekovány čtyři mutace, všechny „tiché“. V kódujícím regionu byla nalezena polymorfní mutace c.624G>A (homozygotní; v 5. exonu), v nekódujících regionech to byly mutace c.1-2A>G (homozygotní; v 5' nepřekládané oblasti), c.43+26G>T (heterozygotní; v 1. intronu) a c.1298-23T>C (homozygotní; v 10. intronu). Žádná z uvedených mutací u pacienta P2 pravděpodobně nevede ke změně struktury syntetizovaného proteinu a lze tedy usuzovat, že pozorovaná hypoglykosylace Tf při biochemické analýze SP2 není důsledkem mutace genu *TF*.

U pacienta P1 bylo ve fragmentech genu *TF* nalezeno pět mutací, z nichž jedna byla speciálně zajímavá pro tuto analýzu a zároveň doposud nepopsána v dostupných databázích mutací. V nekódujícím regionu byla přítomna mutace identická jako u pacienta P2 c.1-2A>G (homozygotní; v 5' nepřekládané oblasti). Dvě z nalezených exonových mutací byly „tiché“ c.624G>A (heterozygotní; v 5. exonu) a c.739C>T (heterozygotní; v 7. exonu), obě byly již identifikovány jako polymorfismy. Jednou z mutací, které vedly k záměně aminokyseliny, byla mutace c.829G>A (heterozygotní; v 7. exonu; GGC → AGC). Dochází u ní k substituci G277S, která determinuje Tf variantu C3 a je spojena

s redukcí vazebné kapacity pro železité kationty (viz 1.1.2.1). Z hlediska naší studie nejdůležitější detekovaná mutace byla c.1889A>C (heterozygotní; v 16. exonu; AAC → ACC), viz obr. 4.9 (str. 62). Je lokalizována přímo v kodonu pro N-glykosylační místo syntetizovaného transferinu a má za důsledek záměnu N630T, tj. substituci asparaginu účastnícího se N-glykosidické vazby za threonin. Tím je jednoznačně vysvětlen profil vzorku SP1 při biochemické analýze indikující patologicky zvýšenou hladinu hypoglykosylovaného transferinu (viz obr. 4.6, str. 57 a obr. 4.8, str. 59). Podobné relativní zastoupení plně glykosylované formy Tf a formy postrádající jeden oligosacharidový zbytek je konzistentní s nálezem, že mutace c.1889A>C je heterozygotní. Pro ověření, že daná mutace vzorku DP1 je opravdu příčinou pozorovaného profilu při IEF Tf, a z důvodu zjištění, jak byla zděděna, byla provedena restriční analýza.

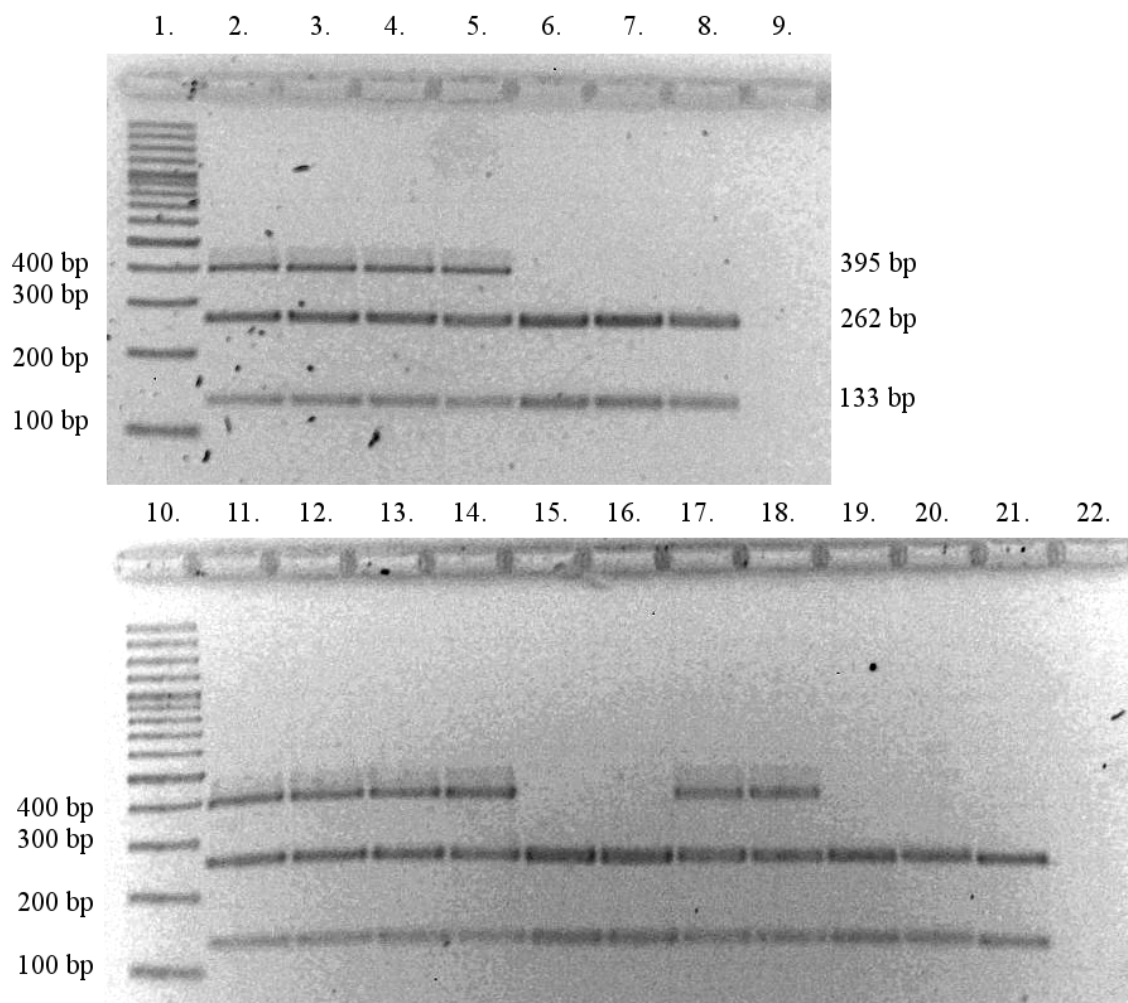


Obrázek 4.9: Část sekvence exonu 16 genu *TF* u vzorku pacienta P1 s označenou mutací c.1889A>C a kontroly. *Vlevo – sekvence u vzorku pacienta P1; vpravo – sekvence u vzorku kontroly. Výstup z analýzy v programu Chromas Lite 2.01.*

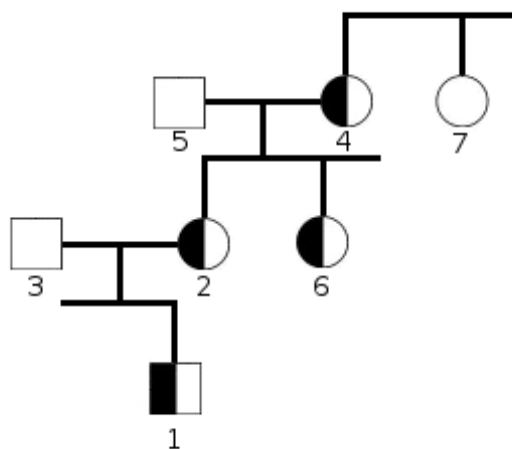
### **Restriční analýza mutace c.1889A>C v genu *TF***

Nejdříve byla provedena analýza 20 kontrolních vzorků od vybraných jedinců, u kterých byl při IEF Tf potvrzen normální profil a zároveň byly k dispozici jejich izolované gDNA (DK1–DK20). Obrázek vizualizovaných produktů štěpení po elektroforetické separaci je uveden v Příloze (viz obr. A.6, str. 92). Všechny kontrolní vzorky fragmentů DNA 16 genu *TF* byly zcela „naštěpeny“, za vzniku produktů o velikosti odpovídající vypočítaným hodnotám 133 bp a 262 bp, bez přítomnosti „nenaštěpeného“ fragmentu DNA (395 bp). Žádný z kontrolních vzorků DK1–DK20 neobsahoval mutaci c.1889A>C v genu *TF*, což koreluje s naším předpokladem, že tato mutace je spojena s hypoglykosylací transferinu.

Dále byla přítomnost dané mutace vyšetřena pomocí restriční analýzy u rodinných příslušníků pacienta P1. Výsledek elektroforesy „naštěpených“ fragmentů DNA 16 genu *TF* u analyzovaných vzorků gDNA členů rodiny pacienta P1 (DP1R1–DP1R6) a pozitivního vzorku DP1 je zobrazen na obr. 4.10 (str. 64). U vzorku DP1 s detekovanou heterozygotní mutací se objevují tři proužky fragmentů DNA, reprezentující jak „nenaštěpený“ fragment 16 genu *TF*, tak i produkty jeho štěpení. Stejný nález byl u vzorků matky, tety a babičky pacienta P1 z matčiny strany, což potvrdilo přítomnost mutace c.1889A>C v genu *TF* v heterozygotní podobě, identické jako u pacienta P1. Naopak negativní se ukázaly vzorky pacientova otce, dědečka z matčiny strany a sestry babičky z matčiny strany, kde vznikly dva produkty (262 bp a 133 bp). Rodokmen s výsledkem restriční analýzy je znázorněn na obr. 4.11 (str. 65).



Obrázek 4.10: Restrikční analýza mutace c.1889A>C v genu *TF* u vzorků gDNA rodiny pacienta P1. 1.,10. – marker molekulových hmotností *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*; 2.,3.,11.,12. – DP1: vzorek pacienta P1 s heterozygotní mutací c.1889A>C; 4.,5. – DP1R1: vzorek matky pacienta P1; 6.,7. – DP1R2: vzorek otce pacienta P1; 8.,21. – DK: vzorek kontroly s normálním profilem při IEF Tf; 9.,22. – „slepý“ vzorek; 13.,14. – DP1R3: vzorek babičky pacienta P1 z matčiny strany; 15.,16. – DP1R4: vzorek dědečka pacienta P1 z matčiny strany; 17.,18. – DP1R5: vzorek tety pacienta P1 z matčiny strany; 19.,20. – DP1R6: vzorek sestry babičky pacienta P1 z matčiny strany.



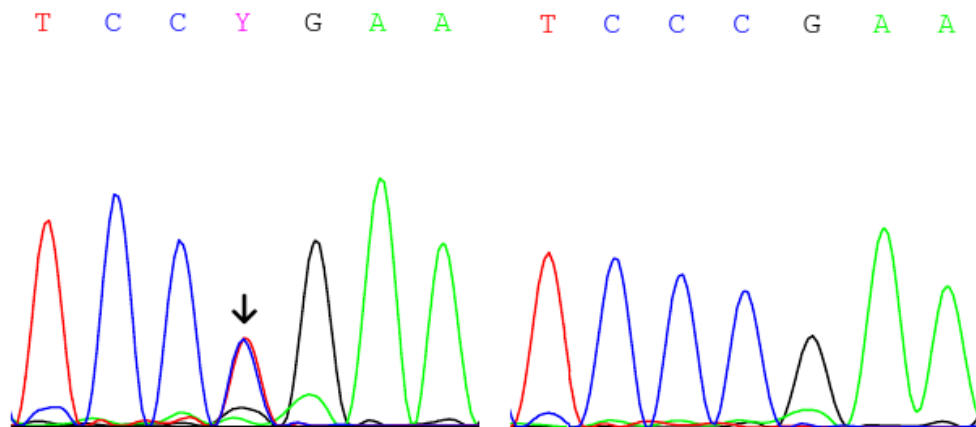
Obrázek 4.11: Rodokmen a výskyt mutace  $c.1889A>C$  v genu  $TF$  u rodiny pacienta P1. 1 – proband: pacient P1 s heterozygotní mutací  $c.1889A>C$ ; 2,4,6 – matka, teta a babička pacienta P1, u nichž byla přítomna heterozygotní mutace  $c.1889A>C$ ; 3,5,7 – otec, dědeček a prateta pacienta P1, u nichž nebyla přítomna mutace  $c.1889A>C$ .

#### 4.2.2.2 Molekulárně genetická analýza genu pro fosfomanomutasu 2

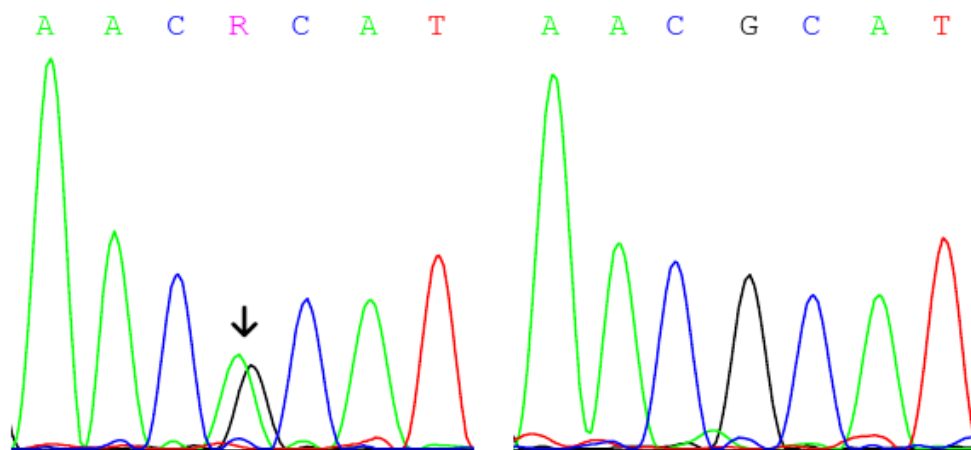
Molekulárně genetická analýza genu *PMM2* byla v naší laboratoři v době vypracování této diplomové práce již zavedenou metodou, tím pádem nevyžadovala přípravné kroky návrhu primerů a optimalizace PCR. Použity byly předem navržené a připravené zásobní roztoky primerů a optimalizované postupy (viz 3.2.6).

Analyzovali jsme vzorek izolované genomové DNA pacienta P3 (DP3), u kterého bylo vyšetření indikováno na základě výsledků biochemické analýzy Tf. Výsledek PCR osmi fragmentů genu *PMM2* byl ověřen pomocí elektroforesy, která potvrdila úspěšnou amplifikaci všech fragmentů DNA o velikostech odpovídajících vypočítaným hodnotám. Přečištěné fragmenty DNA byly sekvenovány a získaný chromatogram analyzován pomocí programu Chromas Lite 2.01. Jako referenční sekvence sloužila sekvence genu *PMM2* z databáze NCBI [69] NG\_009209.1. a Ensembl [70] na úrovni cDNA. Nalezené mutace byly označeny v souladu s doporučenou nomenklaturou [68].

U vzorku DP3 bylo ve fragmentech genu *PMM2* nalezeno dohromady pět mutací. Z toho dvě byly lokalizovány v kódujícím regionu a patřily k často se vyskytujícím patologickým mutacím u syndromu PMM2-CDG. V nekódujícím regionu byly detekovány tři následující mutace: c.348-56\_348-55insATG (ve 4. intronu), c.447+19T>C (heterozygotní; v 5. intronu) a c.447+22T>A (heterozygotní; v 5. intronu). V exonech byly nalezeny dvě patologické mutace v pozici c.338C>T (heterozygotní; ve 4. exonu; CCG → CTG; P113L) a c.422G>A (heterozygotní; v 5. exonu; CGC → CAC; R141H), jejichž asociace se syndromem PMM2-CDG byla ověřena v databázi HGMD [17]. Část chromatogramu ze sekvenování genu *PMM2* u DP3 s vyznačenými patologickými mutacemi je zobrazena na obr. 4.12 (str. 67) a obr. 4.13 (str. 67). Nález kombinace dvou heterozygotních mutací genu *PMM2*, velmi často se vyskytujících R141H a P113L (viz 1.1.1.1, *PMM2* gen), jednoznačně potvrzuje v případě pacienta P3 diagnosu syndromu PMM2-CDG.



Obrázek 4.12: Část sekvenční exonu 4 genu *PMM2* u vzorku pacienta P3 s označenou patologickou mutací c.338C>T a kontroly. Vlevo – sekvenční u vzorku pacienta P3; vpravo – sekvenční u vzorku kontroly. Výstup z analýzy v programu Chromas Lite 2.01.



Obrázek 4.13: Část sekvenční exonu 5 genu *PMM2* u vzorku pacienta P3 s označenou patologickou mutací c.422G>A a kontroly. Vlevo – sekvenční u vzorku pacienta P3; vpravo – sekvenční u vzorku kontroly. Výstup z analýzy v programu Chromas Lite 2.01.

# Kapitola 5

## Diskuze

### 5.1 Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isofořem sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací (část I.)

Referenční rozmezí relativního zastoupení sialovaných isofořem sérového transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokusace, které bylo určeno v předložené diplomové práci, obecně koreluje s hodnotami uváděnými v literatuře [21]. Při porovnání s nimi byl v našem kontrolním souboru detekován mírně vyšší podíl trisialotransferinu (11 %–16 %). Rozdíly však nejsou výrazné a mohou být zapříčiněny odlišným složením jedinců kontrolního souboru, případně rozdílnými podmínkami IEF Tf a procesem kvantifikace jednotlivých isofořem.

Z našeho souboru negativních kontrol byl z finálního hodnocení vyloučen jeden vzorek, u něhož jsme detekovali přítomnost polymorfismu v transferinu. Některé vzácné genetické varianty mohou způsobovat posun profilu Tf při IEF směrem k anodě nebo katodě a způsobovat tak falešnou interpretaci výsledku, nebo naopak pozitivního pacienta přehlédnout. Proto je třeba vždy při nejasném profilu transferinu po IEF provést pro jistotu i test s neuraminidasou.

V práci nebyla zjištěna závislost relativního zastoupení jednotlivých sialovaných isofořem Tf na věku testovaných jedinců. Statisticky byly zpracovány hodnoty pro vybraný věkový interval 2–18 let. Z hlediska diagnostiky CDG je pro analýzu nejdůležitější věková skupina mladší než 18 let, jelikož „screening“ CDG pomocí IEF Tf se běžně provádí u dětských pacientů. U žádné sialované isoformy nebyla nalezena korelace



s většinou testované osoby. Hodnoty relativního zastoupení jednotlivých isoformů sérového transferinu v našem kontrolním souboru nejsou závislé na pohlaví jedinců. Stejný výsledek byl zjištěn i u analýzy transferinu pomocí kapilární zónové elektroforesy [71].

Určené referenční rozmezí je tedy vhodné na obecné použití při hodnocení kvantifikovaných profilů sialovaných isoformů transferinu (separovaných pomocí IEF Tf) u pacientů s podezřením na primární nebo sekundární poruchy glykosylace v naší laboratoři.

## 5.2 Biochemická a molekulárně genetická analýza vzorků vybraných jedinců s podezřením na CDG (část II.)

Pro analýzu byli vybráni tři pacienti (P1, P2 a P3) s různými klinickými příznaky CDG, na základě kterých u nich bylo indikováno biochemické a molekulárně genetické vyšetření na přítomnost dědičných poruch glykosylace. Biochemická analýza testovaných vzorků krevního séra se skládala z IEF Tf, detekce polymorfismů transferinu pomocí isoelektrické fokusace transferinu po neuraminidasovém štěpení a proteinové analýzy sérového transferinu za použití SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce. Po ní následovala molekulárně genetická analýza, při které byly (na základě výsledků biochemické analýzy) u pacientů sekvenovány geny *TF* a *PMM2* a prohledány přítomné mutace.

Metodu proteinové analýzy transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce bylo nejdříve potřebné optimalizovat, jelikož na našem pracovišti předtím nebyla prováděna. Při sestavování pracovního protokolu jsme vycházeli z článku [24], s jistými obměnami. Byla navržena separace isoformů transferinu v 7%T separačním gelu za aplikace SDS-PAGE, bez použití redukčních podmínek. Bylo optimalizováno složení vzorkového pufru. Objem aplikovaného vzorku byl zvolen takový, aby množství transferinu v jedné nanášce (~3 ng) bylo vhodné vzhledem k použitému ředění protilátek při imunodetekci. Ostatní podmínky byly převzaty podle obecného postupu pro SDS-PAGE, Western blot a imunodetekci v naší laboratoři. Podle uvedených podmínek bylo dosaženo požadovaného rozdělení isoformů Tf.

Detekce hypoglykosylovaných forem sérového transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce je kromě IEF Tf další metoda vhodná na „screening“ CDG. Stejně jako při IEF Tf je na test postačující velmi malý objem krevního séra z odebrané

krve vyšetřovaného jedince. Metoda není náročná na přístrojové vybavení, potřebnou aparaturou disponuje většina biochemických laboratoří. Separace isoform Tf podle molekulové hmotnosti (a ne na principu pI jako v případě IEF Tf) při této metodě umožňuje zabránit interferenci hyposialovaných forem Tf ve výsledném profilu, které jsou typické pro jedince s dlouhodobě zvýšenou konzumací alkoholu nebo při bakteriální infekci (viz 1.1.2.3). Také hodnocení profilu není komplikováno přítomností různých genetických variant Tf, které se liší v molekulové hmotnosti jenom zanedbatelně (řádově v setinách kDa). Pomocí této metody je možné rozlišit nejenom vzorky zdravých kontrol od kontrol pozitivních pro CDG, ale také typ CDG I a II: zatímco vzorky negativní pro CDG poskytují signál jediného proužku (~80 kDa), pro typ CDG I jsou typické tři proužky (~80 kDa, ~77 kDa a ~74 kDa) a pro typ CDG II jeden proužek s o něco menší molekulovou hmotností než u zdravé kontroly (~78 kDa) [24].

U pacienta P1 biochemická analýza krevního séra potvrdila zvýšený podíl disialotransferinu (33,5 %) s molekulovou hmotností ~77 kDa, přibližně ve stejném relativním zastoupení jako měl tetrasialotransferin (31,3 %) o velikosti ~80 kDa. Stejný profil proužků při IEF Tf u pacientovy zdravé matky indikoval, že pozorovaná hypoglykosylace transferinu není v tomto případě projevem CDG. Při mutační analýze *TF* genu pacienta P1 byla nalezena heterozygotní mutace c.1889A>C v kodonu N-glykosylačního místa transferinu, vedoucí k záměně aminokyselin N630T. Absence asparaginu, přes který je realizována N-glykosidická vazba, je jasnou příčinou detekované hypoglykosylace transferinu. Restrikční analýzou mutace c.1889A>C bylo zjištěno, že pacient P1 danou mutaci zdědil od rodiny z matčiny strany. Mutace v glykosylačním místě transferinu doposud nebyla popsána v databázích mutací a domníváme se, že toto je první zaznamenaný případ. Vzhledem k tomu, že mutace může komplikovat diagnostiku CDG založenou na detekci hyposialovaných (hypoglykosylovaných) forem transferinu, považujeme za důležité na ni upozornit. Při interpretaci atypických profilů sialovaných (glykosylovaných) forem transferinu separovaných pomocí IEF Tf (SDS-PAGE) doporučujeme zvážit možnost přítomnosti této mutace.

Proteinová analýza transferinu u pacienta P2 pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce ukázala kromě plně glykosylovaného transferinu i přítomnost formy Tf postrádající glykan(y). Pomocí molekulárně genetické analýzy genu *TF* jsme vyloučili výskyt různých variant Tf, které by mohly výsledek falešně pozitivně ovlivnit. Vzorek krevního séra pacienta P2 se při IEF Tf prezentoval zvýšeným zastoupením všech hyposialovaných forem transferinu (disialotransferin: 16,9 %; monosialotransferin: 17,1 %; asialotransferin: 19,5 %). Tento profil odpovídá CDG typu II. CDG typu II zahrnují všechny defekty na úrovni úpravy N-glykanů na již glykosylovaném proteinu. Tyto me-

tabolické kroky jsou lokalizovány v Golgiho aparátu. Poruchy na biosyntetické úrovni N-glykosylace vyúsťují v abnormální IEF Tf profil pro CDG podtypy -IIa (MGAT2-CDG), -IIId (B4GALT1-CDG) a -IIe (COG7-CDG). U našeho pacienta se s největší pravděpodobností nebude jednat o podtyp CDG-IIe, protože ten se při IEF Tf projevuje profilem typu „disialo-CDG II“ (mírně zvýšený asialo- a monosialotransferin, výrazně zvýšený disialo- a snížený tetrasialo- a pentasialotransferin) [72], kdežto v našem případě máme profil „asialo-CDG II“ typu. Také můžeme vyloučit CDG podtypy -IIb (GCS1-CDG), -IIc (SLC35C1-CDG) a -IIf (SLC35A1-CDG), u kterých nedochází k hyposializaci a poskytují tak normální IEF Tf profil. Dalším diagnostickým krokem u tohoto případu bude provedení IEF a SDS-PAGE sérového apolipoproteinu C-III (Apo-CIII), který slouží jako marker poruch O-glykosylace. V případě, že bude nalezen patologický profil u Apo-CIII, budeme uvažovat o kombinované (N- a O-) poruše glykosylace. Nejpravděpodobnější by potom byla porucha na úrovni některé z podjednotek komplexu COG.

Pacient P3 měl při biochemické analýze sérového transferinu profil typický pro pacienty CDG typu I (resp. pro nejfrekventovanější typ CDG I, syndrom PMM2-CDG), tj. oproti zdravým kontrolám nižší podíl tetrasialotransferinu (19,8 %; ~80 kDa), ve spojení se zvýšeným zastoupením disialo- (41,6 %; ~ 77 kDa) a asialotransferinu (25,1 %; ~ 74 kDa). Enzymové vyšetření potvrdilo sníženou aktivitu fosfomanomutasy 2. Při mutační analýze *PMM2* genu byly nalezeny dvě patologické heterozygotní mutace c.338C>T (P113L) a c.422G>A (R141H), na základě čehož byla definitivně stanovena diagnosa syndromu PMM2-CDG. Tento výsledek nám umožní v postižené rodině provést genetické poradenství a v případě dalšího těhotenství poskytnout prenatální diagnostiku.

# Kapitola 6

## Závěr

V souboru 99 zdravých dobrovolníků ve věku 2–42 let byly stanoveny referenční intervaly relativního zastoupení sialovaných forem sérového transferinu separovaných isoelektrickou fokusací: hexasialo- ( $6,3 \pm 1,29$  %), pentasialo- ( $18,26 \pm 2,23$  %), tetrasialo- ( $55,11 \pm 4,05$  %), trisialo- ( $13,66 \pm 2,47$  %), disialo- ( $6,64 \pm 1,90$  %), monosialo- a asialotransferin ( $< 1$  %). Statisticky významná závislost jednotlivých sialotransferinů na věku a pohlaví nebyla nalezena. Výsledky studie jsou využívány při hodnocení profilů u pacientů s primárními i sekundárními poruchami glykosylace.

Byly optimalizovány a zavedeny do praxe na našem pracovišti: metoda analýzy sérového transferinu pomocí SDS-PAGE, Western blotu a imunodetekce, a molekulárně genetická analýza genu pro transferin.

Bylo provedeno biochemické a molekulárně genetické vyšetření tří pacientů (P1-P3) s klinickým podezřením na CDG.

U P1 s patologickým profilem sérového transferinu typu I bylo vyloučeno podezření na primární poruchu glykosylace. V genu *TF* byla nalezena heterozygotní mutace c.1889A>C, která má za důsledek záměnu asparaginu za threonin (p.630N>T). N630 je druhým glykosylačním místem transferinu a mutace blokuje glykosylaci v této pozici. Mutace byla potvrzena i u matky, tety a babičky pacienta.

U P2 s nízkým věkem, s obezitou, mírně opožděným psychomotorickým vývojem a s hypotyreosou byl v séru potvrzen patologický profil transferinu typu II. Přítomnost polymorfismů transferinu byla vyloučena pomocí analýzy genu *TF* a bylo vysloveno podezření na CDG-IIx.

U P3 s hypotonií, psychomotorickou retardací, mikrocefalií a strabismem byl v séru nalezen patologický profil transferinu typu I a v izolovaných lymfocytech snížená aktivita fosfomanomutasy 2. V genu *PMM2* byly identifikovány dvě patologické mutace v heterozygotním stavu c.338C>T a c.422G>A, které potvrdily diagnosu PMM2-CDG.

# Literatura

- [1] Marquardt T and Freeze H. Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defects in man and biological models for their study. *The Journal of Biological Chemistry*, 382:161–177, 2001.
- [2] Jaeken J, Vleugels W, Régal L, Corchia C, Goemans N, Haeuptle MA, Foulquier F, Hennet T, Matthijs G, and Dionisi-Vici C. RFT1-CDG: Deafness as a novel feature of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Online:Short report #189, 2009.
- [3] Seta N. The CDG syndrome.  
<http://www.orpha.net/data/patho/Pro/en/CDGSyndrome-FRenPro3553.pdf>.
- [4] Jaeken J and Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2:129–151, 2001.
- [5] Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, and Eggermont E. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 144:245–247, 1984.
- [6] <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Glycoproteins/Glycoproteins.HTML>.
- [7] Yarema KJ and Bertozzi CR. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biology*, 2, 2001.
- [8] Jaeken J and Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Current Opinion in Pediatrics*, 4:434–439, 2004.
- [9] Grünewald S, Matthijs G, and Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatric Research*, 52:618–624, 2002.

- [10] Marquardt T and Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases and clinical presentations and specific therapies. *European Journal of Pediatrics*, 162:359–379, 2003.
- [11] Marklová E and Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clinica Chimica Acta*, 385:6–20, 2007.
- [12] Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, and Freeze HH. CDG nomenclature: Time for a change! *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792:825–826, 2009.
- [13] Jaeken J, Schachter H, Carchon H, de Cock P, Coddeville B, and Spik G. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Archives of Disease in Childhood*, 71:123–127, 1994.
- [14] Jaeken J, Hennet T, Freeze HH, and Matthijs G. On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31:669–672, 2008.
- [15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5373>.
- [16] <http://www.uniprot.org/uniprot/015305>.
- [17] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PMM2>.
- [18] Grünewald S. *Congenital disorders of glycosylation: clinical and molecular studies*. Frick Werbeagentur, Krumbach, 2006.
- [19] Quental R, Moleirinho A, Azevedo L, and Amorim A. Evolutionary history and functional diversification of phosphomannomutase genes. *Journal of Molecular Evolution*, pages 1–9, 2010.
- [20] Freeze HH and Aebi M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 15:490–498, 2005.
- [21] Wopereis S. *O-glycosylation in health and disease*. Ponsen&Looijen BV, 2006.
- [22] Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): It’s all in it! *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26:99–118, 2003.
- [23] Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clinical Chemistry*, 37:2029–2037, 1991.

- [24] Seta N, Barnier A, Hochedez F, Besnard M-A, and Durand G. Diagnostic value of Western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 254:131–140, 1996.
- [25] Keir G, Winchester BG, and Clayton P. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: inborn errors of protein glycosylation. *Annals of Clinical Biochemistry*, 36:20–36, 1999.
- [26] Carchon HA, Chevigné R, Falmagne JB, and Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clinical Chemistry*, 50:101–111, 2004.
- [27] Pérez-Cerdá C, Quelhas D, Vega AI, Ecaj J, Vilarinho L, and Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clinical Chemistry*, 54:93–100, 2008.
- [28] Harrison HH, Miller KL, Harbison MD, and Slonim AE. Multiple serum protein abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: pathognomonic finding of two-dimensional electrophoresis? *Clinical Chemistry*, 38:1390–1392, 1992.
- [29] Mills K, Mills PB, Clayton PT, Johnson AW, Whitehouse DB, and Winchester BG. Identification of alpha(1)-antitrypsin variants in plasma with the use of proteomic technology. *Clinical Chemistry*, 47:2012–2022, 2001.
- [30] Mills K, Mills PB, Clayton PT, Mian N, Johnson AW, and Winchester BG. The underglycosylation of plasma alpha(1)-antitrypsin in congenital disorders of glycosylation type I is not random. *Glycobiology*, 13:73–85, 2003.
- [31] Yuasa I, Ohno K, Hashimoto K, Iijima K, Yamashita K, and Takeshita K. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome electrophoretic study of multiple serum glycoproteins. *Brain & Development*, 17:13–19, 1995.
- [32] Fang J, Peters V, Körner C, and Hoffmann GF. Improvement of CDG diagnosis by combined examination of several glycoproteins. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27:581–590, 2004.
- [33] Pohl S, Hoffmann A, Rüdiger A, Nimitz M, Jaeken J, and Conradt HS. Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (beta-trace protein) in CDG syndromes due

- to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. *Glycobiology*, 7:1077–1084, 1997.
- [34] Zdebska E, Bader-Meunier B, Schischmanoff PO, Dupré T, Seta N, Tchernia G, Kościelak J, and Delaunay J. Abnormal glycosylation of red cell membrane band 3 in the congenital disorder of glycosylation Ig. *Pediatric Research*, 53:224–229, 2003.
- [35] Wopereis S, Grünewald S, Huijben KM, Morava E, Mollicone R, van Engelen BG, Lefeber DJ, and Wevers RA. Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects. *Clinical Chemistry*, 53:180–187, 2007.
- [36] Grünewald S, Schollen E, van Schaftingen E, Jaeken J, and Matthijs G. High residual activity of PMM2 in patients’ fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *The American Journal of Human Genetics*, 68:347–354, 2001.
- [37] <http://pathcuric1.swmed.edu/PathDemo/nrrt.htm>.
- [38] de Jong G, van Dijk JP, and van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 190:1–46, 1990.
- [39] <http://www.uniprot.org/uniprot/P02787>.
- [40] Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis and analysis and and interpretation. *Clinical Chemistry*, 47:13–27, 2001.
- [41] Helander A, Eriksson G, Stibler H, and Jeppsson JO. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clinical Chemistry*, 47:1225–1233, 2001.
- [42] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7018>.
- [43] Knisely AS, Gelbart T, and Beutler E. Molecular characterization of a third case of human atransferrinemia. *Blood*, 104:2607, 2004.
- [44] Lee PL, Halloran C, Trevino R, Felitti V, and Beutler E. Human transferrin G277S mutation: a risk factor for iron deficiency anaemia. *British Journal of Haematology*, 115:329–333, 2001.



- [45] Testa U. *Proteins of iron metabolism*. CRC Press LLC, 2002.
- [46] Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E, and Eeckels R. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulfatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatric Research*, 14:179, 1980.
- [47] Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, and Eggermont E. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 144:245–247, 1984.
- [48] Jaeken J and Stibler H. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systematic hereditary syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 65:107–111, 1990.
- [49] De Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegenthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, De Paepe AM, Chan NW, Dacremont GA, and Van Coster RN. A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 66:1744–1756, 2000.
- [50] Lubke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, and Körner C. Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nature Genetics*, 28:73–76, 2001.
- [51] Martinez-Duncker I, Dupré T, Piller V, Piller F, Candelier JJ, Trichet C, Tchernia G, Oriol R, and Mollicone R. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood*, 105:2671–2676, 2005.
- [52] Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Jaeken J, Mills P, Winchester B, Krieger M, Annaert W, and Matthijs G. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *PNAS*, 103:3764–3769, 2006.
- [53] Clayton P, Winchester B, Di Tomaso E, Young E, Keir G, and Rodeck C. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome: normal glycosylation in the fetus. *Lancet*, 341:956, 1993.

- [54] Matthijs G, Schollen E, Cassiman JJ, Cormier-Daire V, Jaeken J, and van Schaftingen E. Prenatal diagnosis in CDG1 families: beware of heterogeneity. *European Journal of Human Genetics*, 6:99–104, 1998.
- [55] Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, Pavone L, Tortorelli S, O'Brien JF, Jaeken J, and Garozzo D. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology*, 15:1268–1276, 2005.
- [56] Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, and van Schaftingen E. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatric Research*, 40:764–766, 1996.
- [57] Fleming MF, Anton RF, and Spies CD. A review of genetic and biological and pharmacological and and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28:1347–1355, 2004.
- [58] Quintana E, Gala S, García-Cazorla A, Montero R, Muñoz-Almagro C, Vilaseca MA, Briones P, and Artuch R. Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 254:267, 2007.
- [59] de Loos F, Huijben KM, van der Kar NCAJ, Monnens LAH, van den Heuvel LPWJ, Groener JEM, de Moor RA, and Wevers RA. Hemolytic uremic syndrome attributable to *Streptococcus pneumoniae* infection: a novel cause for secondary protein N-glycan abnormalities. *Clinical Chemistry*, 48:781–784, 2002.
- [60] Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, and Marquardt T. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 101:1414–1420, 1998.
- [61] Mayatepek E and Kohlmüller D. Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 157:605–612, 1998.

- [62] Rutschow S, Thiem J, Kranz C, and Marquardt T. Membrane-permeant derivatives of mannose-1-phosphate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10:4043–4049, 2002.
- [63] Eklund EA, Merbouh N, Ichikawa M, Nishikawa A, Clima JM, Dorman JA, Norberg T, and Freeze HH. Hydrophobic man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology*, 15:1084–1093, 2005.
- [64] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_013080.1?&from=5000&to=37873&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_013080.1?&from=5000&to=37873&report=genbank).
- [65] <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>.
- [66] <http://tools.neb.com/NEBcutter2>.
- [67] [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000091513;r=3:133419211-133497850;t=ENST00000402696](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000091513;r=3:133419211-133497850;t=ENST00000402696).
- [68] den Dunnen JT and Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation*, 15:7–12, 2000.
- [69] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_013080.1?&from=5000&to=37873&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_013080.1?&from=5000&to=37873&report=genbank).
- [70] [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000140650;r=16:8891674-8943188;t=ENST00000268261](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000140650;r=16:8891674-8943188;t=ENST00000268261).
- [71] Parente F, Ah Mew N, Jaeken J, and Gilfix BM. A new capillary zone electrophoresis method for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDG). *Clinica Chimica Acta*, 411:64–66, 2010.
- [72] Wopereis S, Morava É, Grünewald S, Adamowicz M, Huijben KMLC, Lefeber DJ, and Wevers RA. Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. *Glycobiology*, 15:1312–1319, 2005.

# Seznam zkratek

**Apo-CIII** apolipoprotein C-III

**APS** persíran amonný

**Asn** asparagin

**bp** páry basí

**CDG** dědičné poruchy glykosylace („congenital disorders of glycosylation“)

**CDT** hypoglykosylované formy transferinu („carbohydrate deficient transferrin“)

**CMP/CDP/CTP** cytidinmono(di/tri)fosfát

**COG** komplex „conserved oligomeric Golgi“

**dATP/dCTP/dGTP/dTTP** deoxyadenosin(cytidin/guanosin/thymidin)trifosfát

**DMSO** dimethylsulfoxid

**Dol** dolichol

**EDTA** kyselina ethylendiamintetraoctová

**EIA** enzymová imunoanalýza („enzyme immunoassay“)

**ER** endoplasmatické retikulum

**ESI-MS** hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem („electrospray ionization mass spectrometry“)

**FMN** flavinmononukleotid

**Fuc** fukosa

**GAG** glykosaminoglykany

**Gal** galaktosa

**GB** pufr, viz složení v 3.1.2.2

**gDNA** genomová deoxyribonukleová kyselina

**GDP** guanosindifosfát

**Glc** glukosa

**GlcNac** N-acetylglukosamin

**HPLC** vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“)

**IEF** isoelektrická fokusace

**IgG** imunoglobulin G

$K_m$  afinitní konstanta

**LLO** glykany vázané na lipidy („lipid-linked oligosaccharides“)

**MALDI-MS** hmotnostní spektrometrie s desorpací/ionizací laserem za přítomnosti matrice („matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry“)

**Man** manosa

**MPI(PMI)** fosfomanoisomerasa

**MS** hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)

**NADP<sup>+</sup>** nikotinamidadeninukleotidfosfát, oxidovaná forma

**NADPH** nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukováná forma

**NEB1** označení komerčního pufru

**Neu5Ac/NeuAc/Sia** kyselina sialová

**p** hladina významnosti (statistika)

**PCR** polymerasová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)

**PDO** glykany vázané na proteiny („protein-derived oligosaccharides“)

**pH** záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů

**pI** isoelektrický bod

**PMM** fosfomanomutasa /gen pro fosfomanomutasu (kurzívou)

**P/PP** fosfát (zbytek kyseliny fosforečné)/pyrofosfát

**PVDF** polyvinylidendifluorid

**RIA** radioimunoanalýza („radioimmunoassay“)

**SDS** dodecylsírán sodný

**SDS-PAGE** elektroforesa v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíránu sodného

**SELDI-MS** hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací usnadněnou povrchem („surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry“)

**Ta** teplota hybridizace („annealing temperature“)

**TBE** pufr, viz složení v 3.1.2.2

**TBS** pufr, viz složení v 3.1.2.2

**TBST** pufr: 0,1% Tween 20 v TBS

**TEMED** N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin

**Tf/TF** transferin/gen pro transferin (kurzívou)

**TIA** turbidimetrická imunoanalýza („turbidimetric immunoassay“)

**Tm** teplota tání DNA („melting temperature“)

**UMP/UDP** uridinmono(di)fosfát

**UV** ultrafialové záření

**2DE** dvojdimenzionální elektroforéza

**3D** trojdimenzionální

**Dodatek A**

**Příloha 1**

Tabulka A.1: Sekvence primerů genu *TF*

Fragment	Přímý primer	Zpětný primer
1	acaaacacgggaggtcaaag	cgtagagaggcaatggaaa
2	cgatgctgtctctccctca	acctccccatttccactttt
3	ggaatgtggtggctaagtgc	caaaacctgcctgtaaaacaca
4	ctccccctcctcctcaa	taacctctttccccacct
5	ggtttttagtccccctctgttcc	gagtcccagggttgcttct
6	ttccccatctcagcactac	accaggcaatgataaagga
7	tcttgagcgagtcattctcc	gaaaacccccaaatccaa
8	ccgactgcctctctcc	ccaggtttcccaagtgt
9	tccttgaatgggtctgtt	tgggagccagggttttg
10	gggggttcagtatcagcatc	ttttccatctcctctctcca
11	ccaggaggtgaaatggact	atggcaagtgtaaagggataac
12	ggaagccccagaggtgta	tagaaccagagcccacagca
13	gtggtggctgggtcacagaat	gccgactaatggaatagga
14	tcagagtgtttgtttttgttctc	aagtgaataccagtgaccagga
15	gcccaggttctctacacacc	gtcatggctgcactttgttg
16	tccgtagcttccccctttcc	cacagcctaccctcctgta
17	gcaggcaagtagaaaagagca	cagtgaaccaggggcaact

Tabulka A.2: Sekvence primerů genu *PMM2*

Fragment	Přímý primer	Zpětný primer
1	ccgagttcctcgtgcc	cctcctctcattctctcc
2	cccttagagttttggtctcc	gcaaaggccaagaaaatg
3	cttgctggagtttagcg	taccgttctctatcttct
4	aaacagacagtggggcatgt	atgttctgtgacgcctctt
5	cacactagcctctgcttttt	ctcctgggctcaagt
6	caagacccccatctcaaaaa	atagctcactggcccacaac
7	gcccctttttcacctttt	tcaatcaccacctctcc
8	ctctcctgcccagttaaatc	ccaccgaatgcctatgct



Tabulka A.3: Sekvence univerzálních primerů T7 a RP

Primer	Sekvence
RP	caggaaacagctatgac
T7	aatacgactcactatag

Tabulka A.4: Velikost syntetizovaných fragmentů genu *TF*

Fragment	Velikost [bp]	Fragment	Velikost [bp]
1	316	10	297
2	391	11	386
3	379	12	310
4	390	13	370
5	391	14	358
6	354	15	368
7	395	16	395
8	360	17	273
9	394		

Tabulka A.5: Velikost syntetizovaných fragmentů genu *PMM2*

Fragment	Velikost [bp]
1	282
2	329
3	279
4	275
5	341
6	281
7	316
8	274

Tabulka A.6: Relativní zastoupení sialovaných isoformů sérového transferinu separovaných pomocí isoelektrické fokuse ve vzorcích kontrolního souboru jedinců negativních pro CDG SK1–SK99

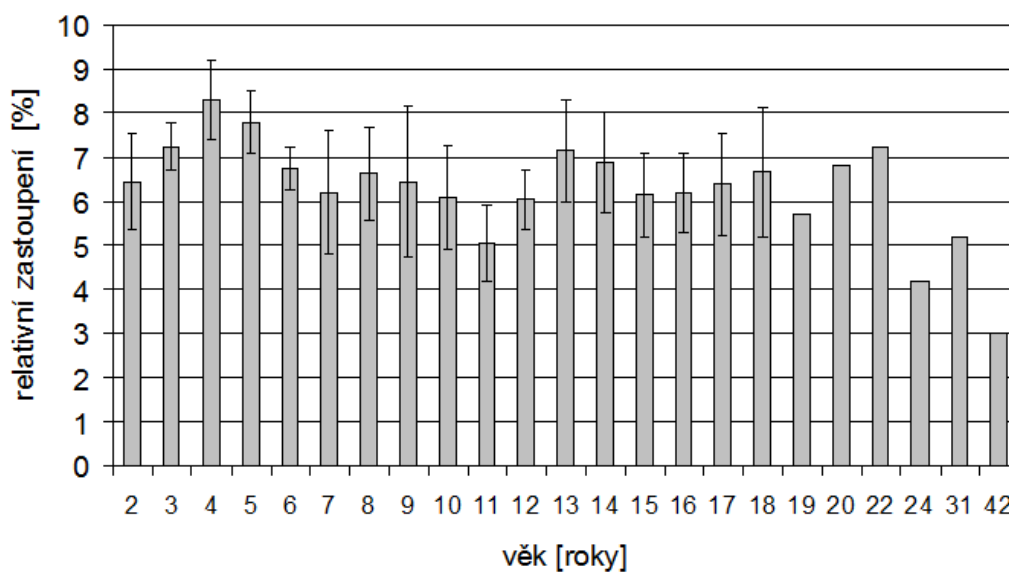
Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK1	6,2	20,2	52,7	14,6	6,2	0	0
SK2	7,2	18,3	50,2	15,8	8,4	0	0
SK3	6,3	19,7	56,6	10,6	6,8	0	0
SK4	9,2	20,2	49,6	12,4	8,5	0	0
SK5	6,1	18,4	52,8	14,6	8,1	0	0
SK6	7	20	50,7	14,4	7,9	0	0
SK7	6,4	20,6	48,8	16,3	7,9	0	0
SK8	5,2	21,5	47,6	18,4	7,3	0	0
SK9	5,7	20,9	56,9	9,5	7,1	0	0
SK10	5,9	18	58,8	9,1	8,3	0	0
SK11	7,1	18	53,8	13,1	8	0	0
SK12	3	11,4	55,4	19,7	10,5	0	0
SK13	5,7	16,9	52,9	14,6	9,8	0	0
SK14	5,7	19	56,8	12,7	5,9	0	0
SK15	5,5	16,5	53,5	16,5	8	0	0
SK16	8,7	18,2	56,3	11,3	5,5	0	0
SK17	6,9	16,5	56,1	13,6	6,9	0	0
SK18	5,2	16,2	53	18,5	7,1	0	0
SK19	5,7	17,9	54,4	12,3	9,7	0	0
SK20	7,5	19,7	54,8	12,5	5,5	0	0
SK21	5	19	60	12,6	3,4	0	0
SK22	7,1	16,8	44,7	17,4	14	0	0
SK23	6,2	19,7	56,1	12,4	5,6	0	0
SK24	4,6	18,1	59,7	11,8	5,7	0	0
SK25	6,1	18	55,8	14,8	5,3	0	0
SK26	7	22,1	52,4	11,5	7	0	0
SK27	8,4	20,3	48,8	14,7	7,8	0	0
SK28	6,2	17,3	59,6	10,4	6,5	0	0
SK29	7,6	20,7	47	15,4	9,2	0	0

Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK30	8,1	19	48,7	14,1	10,2	0	0
SK31	9,3	17,7	54,1	12,6	6,4	0	0
SK32	5,6	17,7	54,3	15,2	7,2	0	0
SK33	5,5	15,7	53,7	17	8,2	0	0
SK34	6,7	18,5	54,7	14,4	5,7	0	0
SK35	9,1	20,3	46,3	16,6	7,6	0	0
SK36	8	23,7	48,6	13,4	6,3	0	0
SK37	8,5	18,2	50,7	14	8,7	0	0
SK38	7,4	16,1	60,4	13,4	2,7	0	0
SK39	5,2	16,2	55,4	10,7	12,5	0	0
SK40	4,9	19,4	57,7	13,1	4,9	0	0
SK41	6,1	14	61,1	10,2	8,6	0	0
SK42	5,5	16,4	65,6	7,8	4,8	0	0
SK43	5,1	13,3	59,9	16,5	5,1	0	0
SK44	5,1	18,3	57,6	14,2	4,8	0	0
SK45	4,7	16,9	56,1	15,8	6,4	0	0
SK46	4,2	16,2	57,7	14,7	7,2	0	0
SK47	4,2	15,7	62,5	14,7	2,9	0	0
SK48	5,1	17,6	55,7	15,8	5,8	0	0
SK49	7,2	18,9	51,6	15,8	6,4	0	0
SK50	6,9	19,7	56,7	12,5	4,2	0	0
SK51	5,6	15,7	55,6	15,3	7,8	0	0
SK52	5,6	17,7	54,7	16,1	6	0	0
SK53	4,5	19,3	58	13,3	5	0	0
SK54	8,4	22,5	53,1	11	5	0	0
SK55	4,9	16,6	55,4	16,8	6,3	0	0
SK56	5,6	19,6	53	16,1	5,8	0	0
SK57	4,7	15,4	59,1	14,1	6,6	0	0
SK58	7	20,6	53,4	13,5	5,5	0	0
SK59	6,8	22,3	53,6	11,1	6,2	0	0
SK60	5,7	18,9	53,9	15,2	6,3	0	0
SK61	6,4	14,9	62,7	10,4	5,6	0	0
SK62	7,4	15,5	59,9	9,5	7,7	0	0
SK63	5,5	18,1	58,1	12,9	5,3	0	0

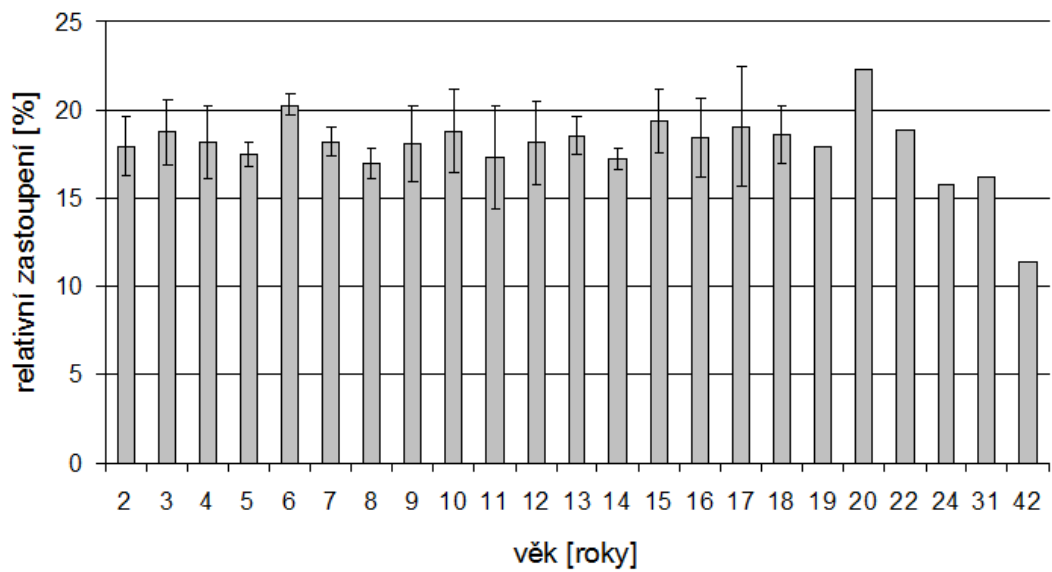
Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK64	4,4	16,8	59,7	12,4	6,7	0	0
SK65	5	19,2	54,2	14,3	7,3	0	0
SK66	6,5	17,1	60,3	10,6	5,5	0	0
SK67	6,2	18,3	59,7	11,2	4,6	0	0
SK68	7,9	16,7	54,2	14,5	6,8	0	0
SK69	6,6	21,2	52,5	13,8	5,9	0	0
SK70	7	20,7	61,8	7,9	2,6	0	0
SK71	7,2	20,9	54	12,9	5	0	0
SK72	6,5	19,3	58,8	10,9	4,5	0	0
SK73	5,5	20,4	58,2	11,1	4,9	0	0
SK74	4,5	17,2	57	17	4,3	0	0
SK75	7,2	15,4	49,5	17,8	10,1	0	0
SK76	5,2	15	61,1	11,6	7	0	0
SK77	8,1	17,3	57,9	11,9	4,9	0	0
SK78	6	15,4	59,6	12,4	6,5	0	0
SK79	5,9	14	60,2	12	7,9	0	0
SK80	6,9	18,3	53,1	14,6	7,1	0	0
SK81	8,2	17,4	54,8	11,2	8,4	0	0
SK82	6,9	20,3	49,8	16	7	0	0
SK83	7,4	16,7	54,3	14,6	7	0	0
SK84	5,2	18,2	50,7	17	6,8	0	2,1
SK85	6,5	20,7	54,9	13,1	4,7	0	0
SK86	3,2	13,6	59	15,5	8,6	0	0
SK87	6,1	20,6	52,5	15,9	4,9	0	0
SK88	7,2	19,8	52,7	13,1	7,1	0	0
SK89	6	21,9	50,6	14,5	6,9	0	0
SK90	6,7	20,9	47,2	17,1	8,1	0	0
SK91	5	20,8	53,9	16,6	3,6	0	0
SK92	5,7	18,1	51,5	16,9	7,7	0	0
SK93	7,9	17,8	56,1	11	7,1	0	0
SK94	8,9	17,4	57,2	11,1	5,4	0	0
SK95	5,7	17,9	55,9	16,1	4,4	0	0
SK96	5,1	20,7	55,4	13,2	5,6	0	0
SK97	7	18	56,6	10,4	8,1	0	0

Vzorek	6*	5*	4*	3*	2*	1*	0*
SK98	6,5	16,7	61,5	9,6	5,7	0	0
SK99	7,4	20,5	53,6	13,6	4,8	0	0

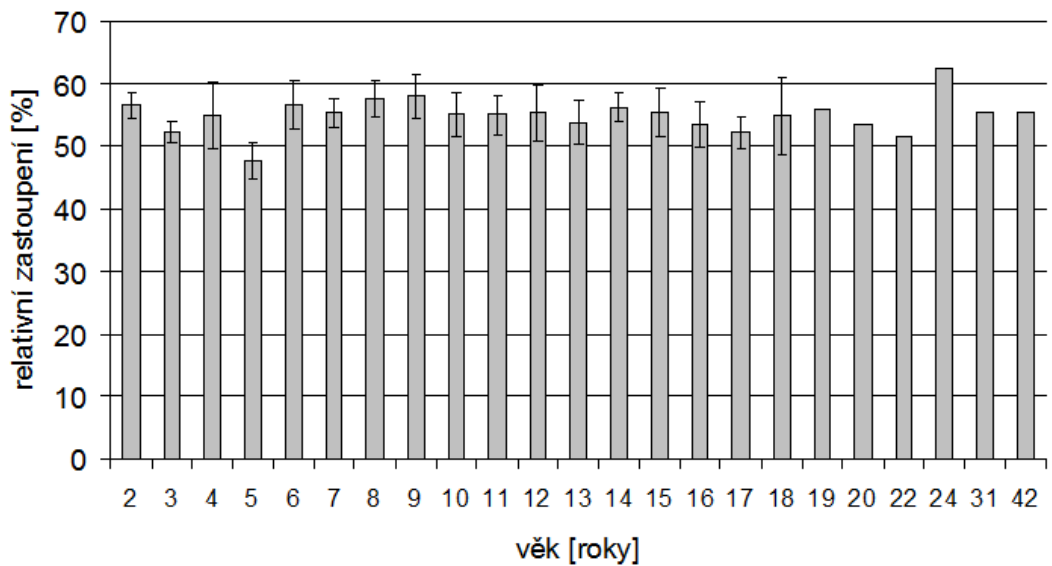
\* relativní zastoupení [%] sialované isoformy transferinu označené podle počtu přítomných zbytků kyseliny sialové



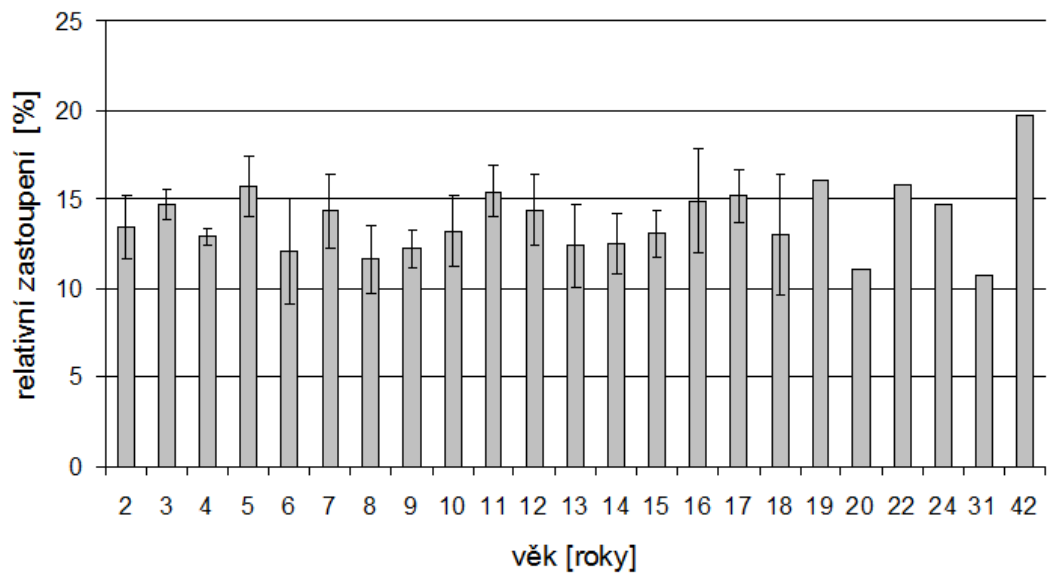
Obrázek A.1: Závislost relativního zastoupení **hexasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



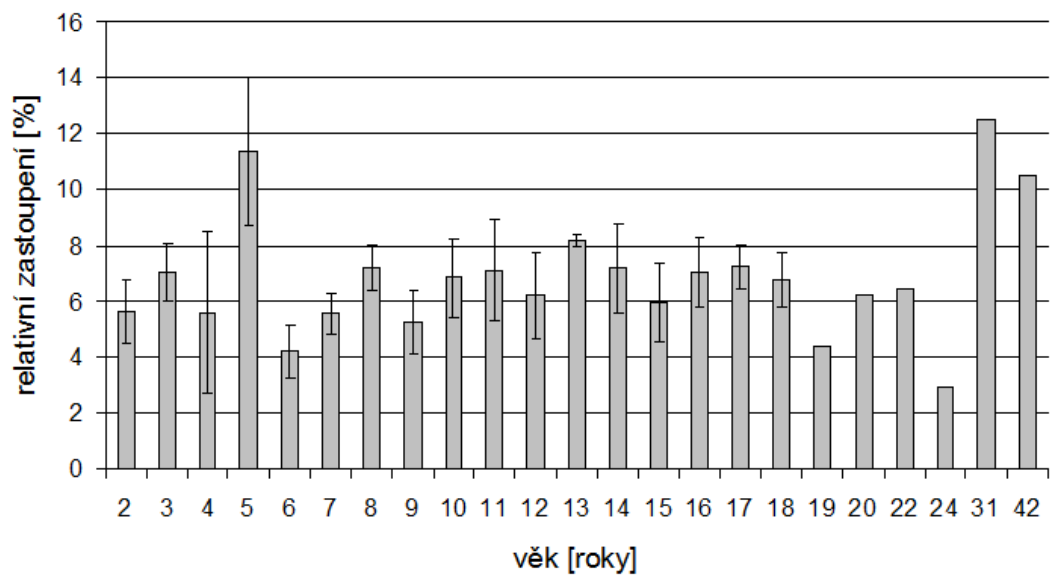
Obrázek A.2: Závislost relativního zastoupení **pentasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



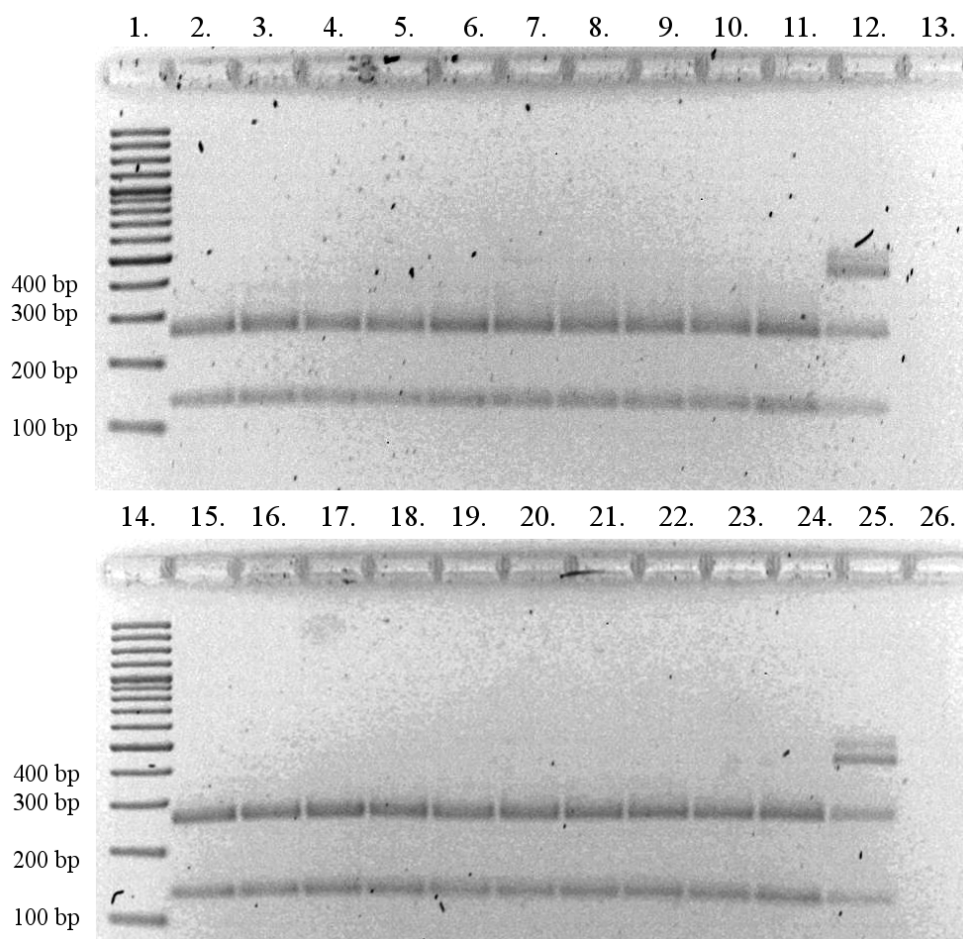
Obrázek A.3: Závislost relativního zastoupení **tetrasialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.4: Závislost relativního zastoupení **trisialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.5: Závislost relativního zastoupení **disialotransferinu** separovaného pomocí isoelektrické fokusace na věku jedinců kontrolního souboru SK1–SK99.



Obrázek A.6: Restrikční analýza mutace c.1889A>C genu *TF* u kontrolních vzorků DK1–DK20. 1.,14. – marker molekulových hmotností GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 2. – DK1; 3. – DK2; 4. – DK3; 5. – DK4; 6. – DK5; 7. – DK6; 8. – DK7; 9. – DK8; 10. – DK9; 11. – DK10; 12.,25. – DP1: vzorek pacienta P1 s heterozygotní mutací c.1889A>C; 13.,26. – „slepý“ vzorek; 15. – DK11; 16. – DK12; 17. – DK13; 18. – DK14; 19. – DK15; 20. – DK16; 21. – DK17; 22. – DK18; 23. – DK19; 24. – DK20.



# Dodatek B

## Příloha 2

### B.1 Prezentace na konferencích

Výsledky diplomové práce byly prezentovány na konferencích s mezinárodní účastí:

Ondrušková Nina, Hansíková Hana: Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru. *Dědičné metabolické poruchy* 24. pracovní dny, 13.–15. května 2009, Hotel Priessnitz, Lázně Jeseník

Veselá Kateřina, Ondrušková Nina, Hansíková H., Horová E., Guillard M., Janssen A., Van den Heuvel B., Morava E., Wevers R.A., Marklová E., Lefeber D.J., Zeman J.: Pitfall in CDG-I diagnostics: identification of a novel transferrin polymorphism at the N-glycan attachment site. *Dědičné metabolické poruchy* 25. pracovní dny, 5.–7. května 2010, Hotel Slovakia, Trenčianske Teplice

POSTER 21

**Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru**

Ondrušková Nina a Hansíková Hana

Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Izoelektrická fokusace (IEF) sérového transferinu je hlavní metodou pro skríníng dědičných poruch glykosylace (CDG). Mikroheterogenita lidského sérového transferinu detekovatelná pomocí IEF je především způsobena různým stupněm větvení (2-4 větve) dvou N-vázaných glykoproteinových řetězců transferinu a odlišným obsahem monosacharidových zbytků. Díky rozdílnému obsahu sialových kyselin můžeme pomocí IEF separovat a detekovat obvykle sedm isotransferinů (a-, mono-, di-, tri-, a tetra- (běžná forma) až hexasialotransferin). Informace o hladinách a poměrech mezi jednotlivými isotransferiny je nezbytná pro správnou interpretaci výsledků skríníngového vyšetření u pacientů s podezřením na poruchu glykosylace.

**Cílem studie** bylo stanovit referenční rozmezí pro spektrum sialovaných forem transferinu v séru, které by následně mohly sloužit pro hodnocení profilů IEF u pacientů s CDG syndromem.

**Materiál a metody:** Kontrolní soubor tvořilo 66 vzorků sér od zdravých jedinců ve věku 2-24 let (30 dívek a 36 chlapců). Vzorky byly analyzovány pomocí IEF s následnou imunofixací a Coomassie blue barvením. Profily byly analyzovány pomocí programu AlfaDigiDoc (Alpha Innotech).

**Výsledky:** Byly stanoveny referenční intervaly pro jednotlivé isotransferiny v séru ve skupině zdravých dobrovolníků vyjádřené jako procento z celkového obsahu transferinu: hexasialo- (6,14±1,15 %), pentasialo- (18,66±1,98 %), tetrasialo- (55,41±3,83 %), trisialo- (13,77±2,42 %), disialo- (5,97±1,47 %), monosialo- a asialotransferin (< 1%).

Výsledky studie budou využity při hodnocení profilů u pacientů s primárními poruchami glykosylace (CDG syndrom) i sekundárními (galaktosémie, fruktózová intolerance) odchylkami od fyziologického stavu.

*Podporováno : 6FP- EUROGLYCANET , LSHM-CT-2005-512131 a VZ 64165*

Obrázek B.1: Abstrakt k prezentaci „Kvantifikace sialovaných forem transferinu v lidském séru.“ z konference *Dědičné metabolické poruchy* 24. pracovní dny

POSTER 28

## PITFALL IN CDG-I DIAGNOSTICS: IDENTIFICATION OF A NOVEL TRANSFERRIN POLYMORPHISM AT THE N-GLYCAN ATTACHMENT SITE

<sup>1</sup>K. Vesela, <sup>1</sup>N. Ondruskova, <sup>1</sup>H. Hansikova, <sup>1</sup>E. Horova, <sup>2</sup>M. Guillard, <sup>2</sup>A. Janssen, <sup>2</sup>B. Van den Heuvel, <sup>2</sup>E. Morava, <sup>2</sup>R. A. Wevers, <sup>3</sup>Marklova E., <sup>2</sup>D. J. Lefeber and <sup>1</sup>J. Zeman

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin is commonly used as a tool to detect congenital disorders of glycosylation (CDG). Here we describe a proband with altered serum transferrin pattern with clearly increased disialotransferrin, suggestive of a CDG type I profile. The proband with obesity was referred to our service for evaluation of frequent attacks of acetonemic vomiting started at the age of 3.5 years. Except ketosis and metabolic acidosis no hypoglycemia, hepatopathy or other laboratory abnormalities (including metabolic investigations) were documented. Further work-up including neuraminidase treatment showed a single band at the position of asialotransferrin, normally excluding a protein polymorphism. SDS-PAGE of transferrin clearly showed an additional band at the position of monoglycosylated transferrin, indicating loss of a complete biantennary N-glycan as is seen in CDG-I. The equal intensity of the two bands and the identification of identical TIEF and SDS-PAGE results in a serum sample of the patient's mother, suggested a protein polymorphism. Sequencing of all coding exons and neighbouring regions of the transferrin gene brought an explanation of the abnormality. Heterozygous substitution of adenosine at position c.1889 to cytidine (c.1889A>C) resulted in replacement of asparagine at position 630 of the amino acid chain to threonine (p.630N>T). N630 is the second glycosylation site of transferrin itself and mutation blocks the N-glycosylation of this position. Current proteomics studies are in progress to confirm the alterations on the protein level. These results explain the equal distribution of tetra- and disialotransferrin isoforms and confirm the hypothesis that the accumulation of disialotransferrin is a consequence of mutation in the transferrin gene itself.

*Supported by: CAG 1M0520 and MSM0021620806*

Obrázek B.2: Abstrakt k prezentaci „Pitfall in CDG-I diagnostics: identification of a novel transferrin polymorphism at the N-glycan attachment site.“ z konference *Dědičné metabolické poruchy* 25. pracovní dny

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

Tabulka B.1: Evidence vypůjčovateliů

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			