

Kongenitálne poruchy glykozylácie a ich diagnostika na Slovensku

Ing. Zuzana Pakanová, PhD.¹, RNDr. Jana Ziburová, PhD.¹, RNDr. Anna Šalingová², MUDr. Darina Behúlová, PhD.², MUDr. Anna Hlavatá, PhD., MPH³, RNDr. Ján Mucha, CSc.¹

¹Centrum excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV, Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny DFNSP, Centrum dedičných metabolických porúch, Bratislava

³2. detská klinika LF UK a DFNSP, Centrum dedičných metabolických porúch, Bratislava

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú rýchlo rastúcou skupinou dedičných metabolických ochorení s rôznorodými klinickými príznakmi. Rozsiahla škála symptomatiky ich tak zaraďuje medzi obťažne diagnostikovateľné ochorenia. Na Oddelení laboratórnej medicíny DFNSP Bratislava, v Centre dedičných metabolických porúch je od roku 2012 v rámci selektívneho skríningu na vrodené metabolické ochorenia vyšetřovaný aj skríninový parameter pre CDG, a to na báze izoelektrickej fokusácie sérového transferínu. Pri záchyťte pozitívneho výsledku skríninového vyšetřenia pre poruchy glykozylácie v rámci ďalšej diagnostiky špecifického CDG-subtypu vznikla spolupráca medzi klinikmi a vedeckými pracovníkmi z Centra excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV, ktorá otvára nové možnosti v personalizovanej medicíne. Štruktúrna analýza N-viazaných glykánov uvoľnených zo sérového proteómu, respektíve uvoľnených špecificky zo zvolených N- a O-glykobiomarkerov pomocou hmotnostnej spektrometrie a celoexómové sekvenovanie vybraných panelov génov metódami sekvenovania novej generácie sa tak stávajú dostupnými diagnostickými technikami, ktoré mediodborovo spájajú lekárov a vedcov. Včasná a presná diagnostika tak môže napomôcť záchyťte tejto skupiny dedičných metabolických porúch a pochopeniu molekulárnej podstaty tejto stále sa rozširujúcej skupiny metabolických ochorení.

Kľúčové slová: kongenitálne poruchy glykozylácie, CDG, glykokonjugáty

Congenital disorders of glycosylation and their diagnostics in Slovakia

Congenital disorders of glycosylation (CDG) is rapidly expanding group of inherited metabolic disorders with various clinical symptoms. A wide range of symptomatology classifies these diseases as difficult to diagnose. Since 2012, a selective screening for CDG, based on isoelectric focusing of serum transferrin, is performed at Department of laboratory medicine DFNSP Bratislava, in the Center of Inherited Metabolic Disorders. After a positive result of CDG-screening, for further diagnosis of the specific CDG-subtype the close collaboration between clinicians and research scientists from the Center of Excellence for Glycomics (Institute of Chemistry, SAV) was initiated, which opens new possibilities for personalized medicine. Structural analysis of N-linked glycans released from serum proteome or released specifically from isolated N- and O-glycobiomarkers by mass spectrometry and whole-exome sequencing of the gene panels by the next generation sequencing thus became available diagnostic techniques that connect clinicians and scientists into intradisciplinary collaboration. Early and accurate diagnosis may help to detect the affected individuals of this group of extremely expanding inherited metabolic disorders and to understand its molecular bases.

Key words: congenital disorders of glycosylation, CDG, glycoconjugates

NewsLab, 2016; roč. 7(2): 89–92

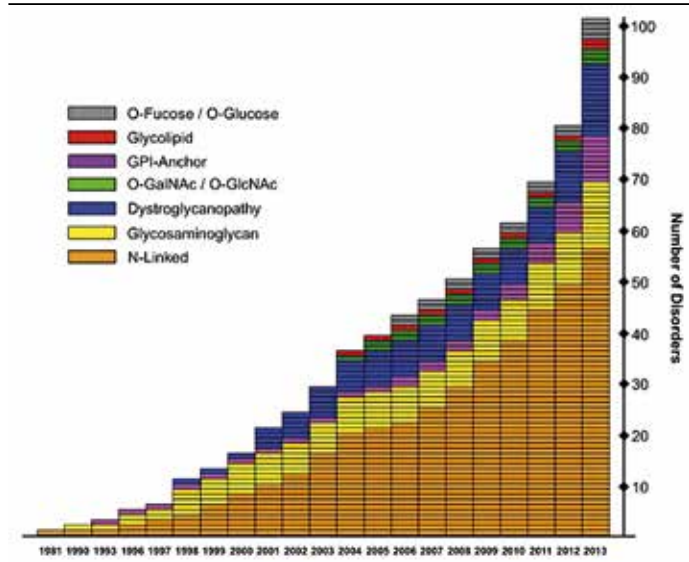
Úvod

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú rýchlo rozširujúcou sa skupinou zriedkavých dedičných metabolických ochorení, zapríčinených poruchou v jednej z najdôležitejších posttranslačných modifikácií proteínov – glykozylácií. V ľudskom tele sa viac než polovica všetkých proteínov a väčšina membránových a sekrečných proteínov (1) nachádza v glykozylovannej forme. Glykány sa kovalentne viažu na proteíny: cez atóm kyslíka na serínové alebo threonínové zvyšky (O-viazané oligosacharidy) alebo cez atóm dusíka na asparagínové zvyšky proteínov (N-viazané oligosacharidy) (2).

V posledných rokoch sa postupne začal zisťovať vzťah medzi aberrantnou glykozyláciou a mnohými ochoreniami. Zmeny v glykozylačnom profile boli zistené u pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou (3)

a vo viacerých biomarkeroch u pacientov trpiacich rôznymi typmi nádorových ochorení bolo potvrdené, že onkogenéza je často v korelačnom vzťahu so zmenami v oligosacharidovej štruktúre (4). Glykozylačný proces je komplexný a zahŕňa stovky špecifických enzýmov, transportérov. Zúčastňuje sa ho 250 – 500 génov, čo reprezentuje 1 % z celého ľudského genómu (5). V roku 1997 boli známe tri defekty génov zúčastňujúcich sa N-glykozylačného procesu, v roku 2011 bolo vďaka neustálemu rozvoju moderných analytických metód známych približne 50 subtypov týchto ochorení (6). Počet známych subtypov neustále narastá (7) a predpokladá sa, že mnoho pacientov stále zostáva nediagnostikovaných (obrázok 1). U približne 40 % CDG pacientov konkrétny enzymatický defekt, a teda aj molekulárna podstata týchto ochorení zostáva stále neobjasnená.

Obrázok 1. Kumulatívny počet známych porúch v glykozylácií v závislosti od roku (7) (V priebehu roku 2013 bola nová, geneticky potvrdená porucha v glykozylácií v priemere reportovaná každých 17 dní. V súčasnosti je známych viac ako 100 rôznych porúch glykozylácie.)



Klinické príznaky

Porucha v jedinom géne zúčastňujúcom sa glykozylačného procesu vedie k širokej škále symptómov, ktoré potenciálne zasiahnu viaceré orgány a klinické príznaky sú veľmi nešpecifické. CDG môže postihnúť akýkoľvek orgán ľudského tela, avšak väčšinou tieto ochorenia bývajú multisystémové a postihujú jeden alebo viaceré orgány. Môžu byť život ohrozujúce, ale aj s miernym priebehom. CDG patria do skupiny ťažko diagnostikovateľných ochorení pre ich častokrát nešpecifickú klinickú manifestáciu ochorenia. Mnohé CDG sú charakteristické poruchami v centrálnom nervovom systéme (hypotónia, záchvaty, oneskorený vývoj, kognitívne poruchy a cerebelárna hypoplázia vedúca k problémom s rovnováhou a koordináciou). Ďalšími symptómami sú hepatopatia, kardiomyopatia, abnormálna distribúcia tuku, koagulačné poruchy, gastrointestinálne ťažkosti, strabizmus, tvárový dysmorfizmus, poruchy prehltania a poruchy rastu.

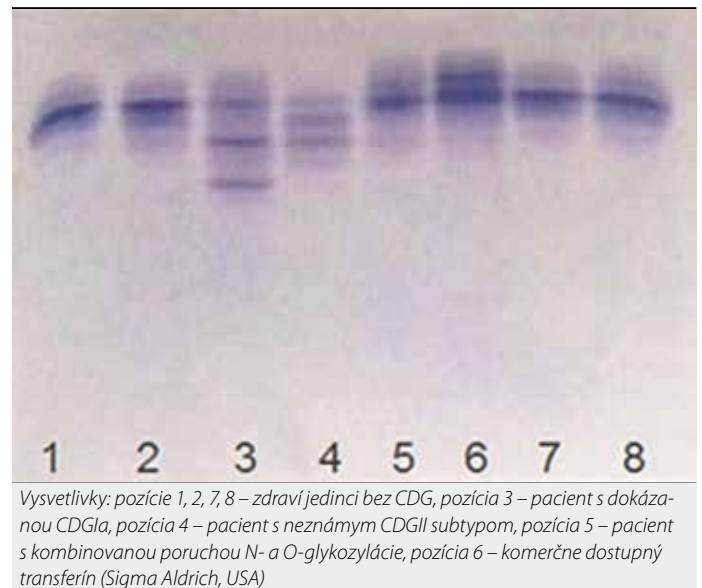
Možnosti diagnostiky

V súčasnosti je alarmujúci neustále rastúci tlak na skrining a diagnostiku tejto skupiny dedičných metabolických porúch v našej krajine. Napriek tomu, že CDG sú vrodenými metabolickými poruchami, nie sú súčasťou novorodeneckého skriningového programu. Pacienti s kongenitálnymi poruchami N- a O-glykozylácie sú zachytávaní cestou selektívneho skriningu na základe špecifických klinických symptómov a laboratórnych nálezov. S neustálym rozvojom robustných analytických metód vo svete stúpa aj známa prevalencia, zatiaľ čo molekulárna podstata ostáva v mnohých prípadoch stále neobjasnená.

Izoelektrická fokusácia

V roku 2012 bola v Centre dedičných metabolických porúch (CDMP) DFNSP Bratislava zavedená metóda selektívneho skriningu CDG založená na izoelektrickej fokusácii (IEF) sérového transferínu. Táto metóda v súčas-

Obrázok 2. Izoelektrická fokusácia sérového transferínu



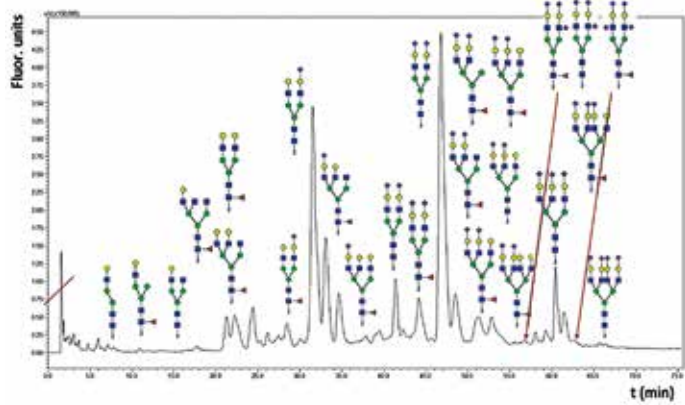
Vysvetlivky: pozície 1, 2, 7, 8 – zdraví jedinci bez CDG, pozícia 3 – pacient s dokázanou CDGla, pozícia 4 – pacient s neznámym CDGII subtypom, pozícia 5 – pacient s kombinovanou poruchou N- a O-glykozylácie, pozícia 6 – komerčne dostupný transferín (Sigma Aldrich, USA)

nosti predstavuje zlatý štandard uplatňujúci sa všade vo svete na záchyt pacientov s poruchami glykozylácie. CDMP je v súčasnosti jediné pracoviisko na Slovensku, ktoré sa zaoberá skriningom CDG. Tento test rozdeľuje glykoizoformy na základe náboja, čím umožňuje odlíšiť zdravých jednotlivcov od suspektných pacientov s poruchou N-glykozylácie podtypu I alebo II. U CDG I pacienta je v IEF profile prítomný asialo- a vo veľkom množstve disialotransferín, kým tetrasialotransferín sa v sére nachádza v nižšej koncentrácii v porovnaní s kontrolnou vzorkou séra od zdravého jedinca (pozri obrázok 2) (8). Získaný patologický profil glykoizoforiem však nevytvára o konkrétnom enzymatickom deficite. Okrem primárnych porúch N-glykozylácie I. a II. podtypu zachytáva CDMP aj sekundárne patologický profil v obraze IEF transferínu u pacientov s hereditárnou intoleranciou fruktózy, galaktozemiou, závislosťou od alkoholu, ale aj pri polymorfizme transferínu, ťažkých ochoreniach pečene a u pacientov s hemolyticko-uremickým syndrómom. IEF sérového transferínu teda umožňuje detegovať glykozylačné defekty vedúce k zníženej sialyzácii, avšak neposkytuje dostatočné rozlíšenie potrebné na objasnenie špecifických enzymatických defektov, a teda neumožňuje diagnostiku konkrétneho subtypu.

Štruktúrna analýza N-viazaných glykánov

Na ďalšiu diagnostiku špecifického subtypu a konkrétneho enzymatického deficitu vznikla spolupráca medzi klinikmi a vedcami z Centra excelentnosti pre glykomiku (CEG), Chemický ústav SAV, ktorá otvára nové možnosti v personalizovanej medicíne. Vzorky od pacientov s pozitívnym výsledkom skriningu sa spracujú prístupom analýzy N-glykoprotinu celkového séra alebo analýzy N-glykoprotinu zvoleného biomarkera (napríklad sérového transferínu) izolovaného imunoafinitnou preparatívnou chromatografiou. N-glykány sú uvoľnené prostredníctvom enzymatickej deglykozylácie, frakcionované a fluorescenčne značené za účelom stanovenia ich štruktúr pomocou LC-MS (tzv. „offline“ prepojenie HPLC chromatografie a MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie).

Obrázok 3. Reprezentatívna LC-MS analýza uvoľnených N-glykánov z referenčného séra (Jednotlivé N-glykánové štruktúry je možné kvantifikovať na základe nameraných intenzít fluorescenčného signálu. Kvalitatívnu zložku analýzy predstavuje hmotnostná spektrometria, ktorá priradí jednotlivým chromatografickým signálom príslušnú N-glykánovú štruktúru.)



Reprezentatívna analýza sialylovanej frakcie celkového N-glykoprotéinu ľudského séra je zobrazená na obrázku 3. Prípadné zmeny v špecifickom kroku syntézy N-glykánových štruktúr sú tak detegovateľné na kvantitatívnej i kvalitatívnej úrovni, vďaka čomu môžu byť predpokladom pre vybraný konkrétny enzymatický defekt. Tým sa mnohonásobne zužuje okruh potenciálnych kandidátnych glykogénov zúčastňujúcich sa glykozylačného procesu.

Štruktúrna analýza O-viazaných glykánov apolipoproteínu CIII

V CEG Chemického ústavu SAV bola na sledovanie prípadných porúch v O-glykozylnácii v roku 2015 zavedená metóda stanovenia O-glykoprotéinu apolipoproteínu CIII (9). Sérové lipoproteínové komplexy sú mechanicky rozbité a následne je vzorka odsolená pomocou chromatografie na reverznej fáze. V MALDI TOF hmotnostnom spektre takto pripravenej vzorky je možné pozorovať jednotlivé signály príslúchajúce asialo-, monosialo- a disialo-O-glykoizoformám, ktorých relatívny pomer a jeho zmeny môžu vypovedať o poruchách v procesoch O-glykozylnácie.

Sekvenovanie novej generácie

Ďalšie možnosti otvára analýza na úrovni DNA, pri ktorej sa na základe štruktúrneho profilu glykánov vymedzí súbor potenciálne postihnutých glykogénov. Takto vytipované gény sú ďalej podrobené genomickej analýze na zistenie mutácií potenciálne zodpovedných za vznik tohto typu ochorení. Testovanie na úrovni jedného génu nemá význam, pretože presná príčina vzniku ochorenia nie je známa. V prípade symptomatiky CDG ochorenia ide o multisystémové zlyhanie, a to utvára predpoklad, že sa sledovaná mutácia môže vyskytovať v ktoromkoľvek z génov (jednom či viacerých) zúčastňujúcich sa biosyntetickej dráhy glykánov. Na analýzu glykogénov bude preto použité sekvenovanie novej generácie ako veľmi robustná metóda, pri ktorej je možné súčasne analyzovať viacerých pacientov a veľké množstvo génov v jednom sekvenačnom behu. Neustále znižovanie ceny, zjednodušovanie prípravy vzoriek a čoraz väčšie množstvo dát získaných z jediného sekvenačného behu radí túto metódu medzi progresívne sa rozvíjajúce metódy v diagnostike aj v základnom

Tabuľka 1. Analýzy realizovateľné v Centre excelentnosti pre glykomiku, Chemický ústav SAV

štruktúrna analýza N-glykánov v sére	celkový N-glykoprotéin	potrebných 1,5 ml séra
štruktúrna analýza N-glykánov viazaných na sérovom transferíne	N-glykoprotéin vybraného glykobiomarkera	potrebných 1 ml séra
štruktúrna analýza O-glykánov viazaných na apolipoproteínu CIII	O-glykoprotéin vybraného glykobiomarkera	potrebných 5 µl séra
sekvenovanie novej generácie	panel vybraných génov zúčastňujúcich sa na syntéze N- a O-glykánov	potrebných 200 µl celej krvi s prídavkom EDTA

výskume. Na analýzu vytipovaných génov sa používajú prednastavené panely génov dodávané výrobcom. Analyzujú sa celé exóny vopred vytipovaných génov postihnutých jedincov, ako aj parentálnej generácie na zistenie genetického pozadia CDG ochorenia (10).

Sekvenovaním exónových častí kandidátnych génov sa nemusia zachytiť všetky mutácie spôsobujúce ochorenie. Existuje totiž predpoklad, že približne 15 % pacientov má mutáciu v nekódujúcich oblastiach sledovaných génov. Z tohto dôvodu je nevyhnutné podrobiť sekvenčnej analýze nielen oblasti, v ktorých dochádza k zotrhu, ale aj hlboké intrónové oblasti sledovaných génov (11).

Perspektíva CDG

Objav vhodných terapeutických prístupov v liečbe CDG stále ostáva významnou výzvou, nakoľko sa celková prevalencia týchto ochorení v USA odhaduje až na 1 : 10 000 (7). V priebehu roku 2013 bol vo svete nový známy CDG subtyp reportovaný každých 17 dní, a to práve vďaka vývoju stále citlivejších analytických metód, ktoré sú dnes dostupné aj na pôde Slovenskej republiky. Napriek obrovskému rozvoju diagnostických možností sa však stále predpokladá, že väčšina CDG pacientov ostáva poddiagnostikovaných. Od roku 2012 je v našej krajine dostupná efektívna skriningová metóda, ktorá umožňuje záchyt pacientov s CDG. Na lepšie poznanie CDG a príčin ich vzniku bude preto v budúcnosti nevyhnutná úžšia spolupráca medzi výskumnými pracoviskami a diagnostickými laboratóriami. Len aplikáciou molekulárno-biologických dát v spolupráci s poznatkami o glykozylnácii proteínov sa umožní rozšírenie panelu kandidátnych génov potenciálne zodpovedných za tento typ ochorenia (5). Na diagnostiku porúch súvisiacich s metabolizmom glykokonjugátov je preto limitujúce zavedenie rýchlych, presných a spoľahlivých metód.

Záver

Poruchy glykozylnácie sú v našej krajine poddiagnostikované z rôznych dôvodov: neuspokojivé lekárske povedomie, vysoká mortalita v prvom roku života, ako aj nedostupnosť v minulosti štandardného skriningového laboratórneho testu. Keďže ide o zriedkavé ochorenia, úspešnosť záchytu i dôkladná diagnostika, až na úrovni štruktúrnej analýzy glykánov či mutačnej analýzy celých panelov glykogénov, závisí aj od dobrej spolupráce klinických pracovísk s pracoviskami výskumného, respektíve akademického charakteru. Iba včasná a presná diagnostika dokáže na-

pomôcť stanoveniu správnej diagnózy u pacienta, prípadne prenatálnej diagnostiky pri ďalšej gravidite matky, pochopeniu molekulárnej podstaty týchto ochorení, ako aj zabráneniu prípadného ireverzibilného poškodenia organizmu.

Podakovanie: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Osobitné podakovanie patrí aj celému Centru dedičných metabolických porúch v Bratislave za vysoko odbornú spoluprácu tohto klinického pracoviska s Chemickým ústavom SAV.

Literatúra

1. Durand G, Seta N. Protein Glycosylation and diseases: Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem*. 2000;46(6):795–805.
2. Solá RJ, Griebenov K. Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy. *BioDrugs*. 2010;24(1):9–21.
3. Abou-Abbass H, Abou-El-Hassan H, Bahmad H, et al. Glycosylation and other PTMs alterations in neurodegenerative diseases: Current status and future role in neurotrauma. *Electroph*. 2016; published online.
4. Ferreira JA, Magalhães A, Gomes J, et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. *Canc Letters*. 2016; in press.

5. Jones MA, Hegde MR. *Congenital Disorders of Glycosylation. Molecular Pathology in Clinical Practice*. New York: Springer International Publishing; 2016: 121–125.

6. Morava E, Lefeber D. CDG – an update. *J Inher Metab Dis*. 2011;34(4):847–48.

7. Freeze HH. Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. *J Biol Chem*. 2013;288:6936–45.

8. Dörre K, Olczak M, Wada Y, et al. A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SL-C35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. *J Inh Met Dis*. 2015;38(5):931–940.

9. Wada Y, et al. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiol*. 2012;22(8):1140–1144.

10. Jones MA, Rhodenizer D, da Silva C, et al. Molecular diagnostic testing for congenital disorders of glycosylation (CDG): detection rate for single gene testing and next generation sequencing panel testing. *Mol gen metab*. 2013;110(1):78–85.

11. Raffan E, Semple RK. Next generation sequencing-implications for clinical practise. *Brit Med Bull*. 2011;99:53–71.



Ing. Zuzana Pakanová, PhD.
Centrum excelentnosti pre glykomiku
Chemický ústav SAV
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
zuzana.pakanova@savba.sk

MEDICAL DEVICES
LIFE SCIENCES
IN VITRO IMMUNOASSAYS DIAGNOSTICS
VETERINARY AND FOOD DIAGNOSTICS

CLINICAL IT
IN VITRO DIAGNOSTICS

MEDICAL DEVICES
VETERINARY
AND FOOD DIAGNOSTICS

BIOMEDICA IMMUNOASSAYS
LIFE SCIENCES
CLINICAL IT

www.biomedica.sk

Váš spoľahlivý partner v zdravotníctve