

Využitie hmotnostnej spektrometrie v diagnostike porúch glykozylácie

Zuzana Pakanová¹, Marek Nemčovič¹, Rebeka Kodríková¹, Maroš Krchňák¹, Anna Šalingová²,
Claudia Šebová², Vladimír Bzdúch³, Hana Hansíková⁴, Ján Mucha¹

¹Chemický ústav SAV Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny NÚDCH Bratislava

³Detská klinika LFUK a NÚDCH Bratislava

⁴Klinika pediatrie a dedičných porúch metabolizmu 1. LF a VFN v Praze

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú zriedkavé dedičné ochorenia vznikajúce v dôsledku mutácií génov kódujúcich enzýmy komplexnej dráhy glykozylácie proteínov. Bežnými príznakmi sú najmä poruchy rastu, psychomotorická retardácia, imunodeficiencia, hypotónia, záchvaty či muskuloskeletové abnormality. Heterogenita klinických príznakov robí z CDG ťažko diagnostikovateľné ochorenia. Izoelektrickou fokusáciou (IEF) transferínu s imunodetekciou môžeme rozlíšiť dva základné typy porúch N-glykozylácie (typ I a II). Na diagnostiku porúch O-glykozylácie sa využíva izoelektrická fokusácia apolipoproteínu C-III, glykobiomarkera nesúceho jedno O-glykozylačné miesto. Pre špecifikáciu konkrétneho subtypu po pozitívnom alebo hraničnom výsledku IEF môže byť glykoproteín pacienta analyzovaný prostredníctvom MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie, ktorá umožní zacieliť diagnostický proces na kauzálny gén, najmä v nejasných prípadoch. V práci prezentujeme dvoch pacientov s odlišnými typmi porúch v N-glykozylácii. U pacienta I s mutáciou génu *ALG12* kódujúceho α -mannozyltransferázu 8 boli pozorované znížené hladiny jej produktov. V prípade pacienta II spôsobila mutácia génu *SLC37A4* mislokalizáciu glukózo-6-fosfátového transportéra. Analýzou sérového glykoproteínu pacienta II boli zaznamenané významne zvýšené hladiny tzv. hybridných glykánov. Diagnostika CDG hmotnostnou spektrometriou umožňuje lepšiu personalizáciu liečby a napomáha objasneniu molekulovej podstaty týchto ochorení.

Kľúčové slová: diagnostika; kongenitálne poruchy glykozylácie; hmotnostná spektrometria

The application of mass spectrometry in diagnostics of glycosylation disorders

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are rare hereditary diseases caused by mutations of genes coding enzymes of complex glycosylation pathways. Common clinical manifestation includes growth and psychomotor retardation, immunodeficiency, hypotonia, seizures, or musculoskeletal abnormalities. Because of the heterogeneity of the clinical spectrum, CDG is difficult to diagnose. Isoelectric focusing of transferrin (IEF) with immunodetection enables distinguishing between two primary N-glycosylation disorders (type I and II). In contrast, isoelectric focusing of apolipoprotein C-III is used to diagnose O-glycosylation disorders, as this glycoprotein bears one O-glycosylation site. For closer specification of subtype upon positive or borderline IEF result, MALDI-TOF mass spectrometry, which enables to focus the diagnostic process on the causal gene, mostly in unclear cases, can be utilized. In this study, we present two patients diagnosed with different types of N-glycosylation disorders. The patient I possessed a mutation in gene *ALG12*, coding α -mannosyltransferase 8. In this patient's serum, significantly decreased levels of its products were observed. In the case of the patient II, mutation of the *SLC37A4* gene caused the misallocation of the glucose-6-phosphate transporter. Analysis of this patient's glycoproteome revealed increased levels of hybrid glycans. Diagnostics of CDG by MALDI-TOF mass spectrometry enables the personalization of treatment and helps clarify the molecular basis of these disorders.

Keywords: diagnostics; congenital disorders of glycosylation; mass spectrometry

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 69 – 72

Úvod

Glykozylácia je esenciálna modifikácia proteínov, ktorá zásadne ovplyvňuje ich funkciu, stabilitu, aktivitu a mnohé iné vlastnosti. Na rozdiel od transkripcie a translácie je to netemplátový proces, katalyzovaný stovkami rôznych enzýmov a transportérov, prebiehajúci v endoplazmatickom retikule, Golgiho aparáte a cytozole. Dnes je známe, že porucha homeostázy organizmu môže negatívne ovplyvniť súhrn týchto glykozylačných metabolických kaskád. Aberantná glykozylá-

cia bola pozorovaná pri rôznych onkologických, neurodegeneratívnych, autoimunitných a iných ochoreniach⁽¹⁻³⁾ pravdepodobne ako sekundárny jav; ale takisto pri kongenitálnych poruchách glykozylácie (CDG), ktoré sú primárne spôsobené mutáciou génov komplexnej glykozylačnej dráhy.

Pôvodne sa skupina CDG delila na dva typy (typ I a II) podľa profilu IEF transferínu (Tf), pričom do skupiny CDG I patrili defekty spôsobené pri syntéze N-glykánov vzniknuté v cytozole alebo v endoplazmatickom retikule a do CDG II defekty

vzniknuté v Golgiho aparáte pri úprave glykánov. Toto rozdelenie zahŕňalo len poruchy N-glykozylácie. Vzhľadom na narastajúci počet ochorení a neustále odhaľovanie nových porúch v dráhach glykozylácie bolo nutné po opísaní viac ako 40 ochorení v roku 2009 klasifikáciu aj nomenklatúru zmeniť. Na označenie ochorenia sa v súčasnosti používa názov mutovaného génu spolu so skratkou CDG. V súčasnosti je známych viac ako 160 rôznych porúch glykozylácie. Nová klasifikácia rozdeľuje celú skupinu na: (a) poruchy N-glykozylácie proteínov, (b) poruchy O-glykozylácie proteínov, (c) poruchy syntézy glykozylfosfatidylinozitolovej kotvy a glykolipidov, (d) poruchy viacerých dráh glykozylácie a poruchy ostatných dráh.

Biochemickým skríningom N-glykozylačných, O-glykozylačných a zmiešaných porúch a porúch syntézy dolicholu je IEF Tf, apolipoproteínu C-III zo séra a vyšetrenie profilu dolicholov v moči.

Klinické príznaky CDG často zahŕňajú multiorgánové postihnutie. Medzi častými nálezmi sú polystigmatizácia, poruchy rastu, psychomotorická retardácia, poruchy imunity, hypotónia, záchvaty a muskuloskeletové abnormality. Klinické manifestácie takmer u všetkých CDG pacientov sa objavujú už v dojčenskom veku⁽⁴⁾. Biochemické parametre zahŕňajú koagulopatie a zvýšené hladiny pečeňových transamináz. V prípade PMM2-CDG, subtypu s celosvetovo najvyššou frekvenciou výskytu heterogenita klinických prejavov zahŕňa skorú neonatálnu mortalitu až po dosiahnutie normálnej dospelosti⁽⁵⁾. Korelácie medzi genotypom a fenotypom sú u jednotlivých pacientov veľmi variabilné, čo spolu s nešpecifickými klinickými príznakmi zaraďuje tieto ochorenia medzi ťažko diagnostikovateľné.

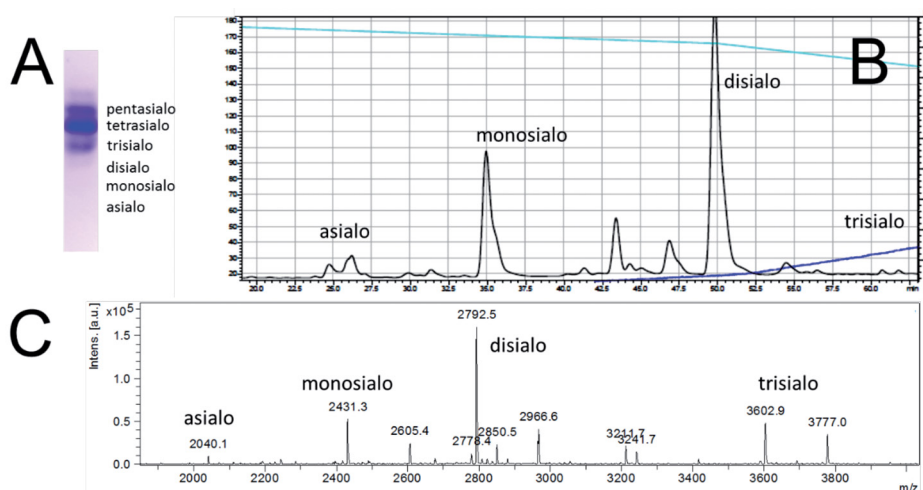
Materiál a metóda

V roku 2012 bol v Centre dedičných metabolických porúch (CDMP) NÚDCH zavedený selektívny skríning CDG založený na metóde izoelektrickej fokusácie (IEF) sérového transferínu. Za obdobie rokov 2012 – 2020 bolo celkovo analyzovaných 3 600 vzoriek pacientov so suspektným podozrením na CDG odoslaných z metabolických ambulancií a klinických

pracovník v rámci celého Slovenska. Princíp IEF Tf spočíva v separácii izoform transferínu (biomarkera nesúceho dve N-glykozylačné miesta) na základe ich izoelektrického bodu s následnou imunodetekciou a denzitometrickou kvantifikáciou. Metóda umožňuje rozlíšiť poruchu glykozylácie v syntéze oligosacharidického prekursora v endoplazmatickom retikule (CDG typ I) od poruchy v procesovaní glykánov (CDG typ II), ktoré prebieha v Golgiho aparáte. Táto metóda je veľmi spoľahlivá, reprodukovateľná a predstavuje celosvetovo tzv. zlatý štandard pre CDG diagnostiku, nedokáže však určiť konkrétne miesto prerušenia glykozylačnej metabolickej dráhy. Odhaduje sa, že až 40 % zachytených CDG pacientov stále nemá potvrdenú presnú molekulárnu podstatu⁽⁶⁾. Diagnostika týchto zriedkavých ochorení vyžaduje personalizovaný prístup, kde nachádza svoje uplatnenie spolupráca klinických diagnostikov s vedeckými laboratóriami.

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied sa vďaka bohatým skúsenostiam v oblasti štruktúrnej analýzy glykokonjugátov zapojil do regionálnej (CDMP NÚDCH) i medzinárodnej spolupráce (v rámci CDG & ALLIES – PPAIN siete). Zavedený štandardný operačný protokol analýzy N-glykoprotinu využíva 10 mikrolitrov krvného séra alebo približne 100 mikrogramov imunoafinitne izolovaného glykobiomarkera (napr. Tf). Glykány sú enzymaticky odštiepené a separované od proteínov prostredníctvom „solid-phase extrakcie“. S cieľom zvýšenia intenzít signálov v následne nameraných MALDI TOF hmotnostných spektrách (MS) sa vzorky derivatizujú permetyláciou. V prípade potreby kvantifikácie jednotlivých štruktúr sa využíva vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) v kombinácii s MS. Reprezentatívny glykoprotín Tf získaný zo vzorky negatívnej kontroly metódami tradičného selektívneho skríningu, HPLC a MS je znázornený na **obrázku 1**. Pri podozrení na poruchu glykozylácie prvého typu (CDG I) je vhodná analýza neutrálnej frakcie N-glykánov prostredníctvom MALDI TOF MS a pri podozrení na CDG II je, naopak, najvhodnejším prístupom analýza sialylovaných glykánov, kde možno pozorovať prípadné defekty v konečnom procesovaní glykánov už naviazaných na vznikajúci proteín.

Obrázok 1. Reprezentatívny glykoprotín sérového transferínu (Tf), získaný zo vzorky negatívnej kontroly metódami tradičného selektívneho skríningu na báze IEF (A), vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (B) a MALDI TOF hmotnostnou spektrometriou (C). Na základe prítomnosti dvoch N-glykozylačných miest, ktoré Tf nesie, je „tetrasialo“ frakcia v IEF (A) priamo korelovaná s „disialo“ štruktúrami pozorovanými v chromatograme (B) a hmotnostných spektrách (C) uvoľnených a izolovaných glykánov.



Výsledky a diskusia

V predloženej práci prezentujeme dvoch vybraných slovenských pacientov, ktorým bola diagnostikovaná CDG s nasledujúcou skrátanou epikrizou:

Pacient I – novorodenec, respiračná insuficiencia, hypoglykémia, trombocytopenia, hypokolaguačný stav, skeletové abnormality, nefropatia, hepatopatia, opakujúce sa respiračné infekcie. IEF Tf poukázala na CDG typu I. Pacient exitoval vo veku 164 dní. Sekvenovaním klinického exómu bola potvrdená homozygotná mutácia v géne *ALG12*, kódujúceho esenciálny enzým zúčastňujúci sa na výstavbe oligosacharidického prekursora v endoplazmatickom retikule⁽⁷⁾.

Pacient II – vek v čase stanovenia diagnózy 12 rokov; k dnešnému dňu v dobrom klinickom stave; pretrvávajúci hypokoagulačný stav, mierne zvýšené hladiny AST, ALT, hypcholesterolémia, hypobetalipoproteinémia. IEF Tf poukázala na CDG typu II. Na základe exómového sekvenovania bola u pacienta potvrdená de novo mutácia v géne *SLC37A4*, zodpovedná za mislokalizáciu glukóza-6-fosfátového transportéra⁽⁸⁾.

U prezentovaných CDG I aj II pacientov bola na základe pozitívneho výsledku zo selektívneho skríningu vykonaná analýza sérových N-glykánov prostredníctvom MALDI TOF MS. V prípade pacienta I boli pozorované znížené hladiny GlcNAc2Man8-9 (m/z 2192.2 a 2396.3). Hladina GlcNAc2Man9Glc1 (m/z 2600.6) bola u pacienta I nedetegovateľná. V prípade pacienta II boli pozorované signifikantne zvýšené hladiny „hybridných“ štruktúr Hex6GlcNAc3NeuAc1 (m/z 2390.2), Hex5GlcNAc3NeuAc1 (m/z 2186.1), a Hex4GlcNAc3NeuAc1 (m/z 1982.0). Reprezentatívne spektrá porovnané s negatívnymi kontrolami, napovedajúce o primárnej poruche v glykozylácii, sú znázornené na **obrázku 2**. (GlcNAc – N-acetylglukozamín, Man – manóza, Glc – glukóza, NeuAc – kys. sialová).

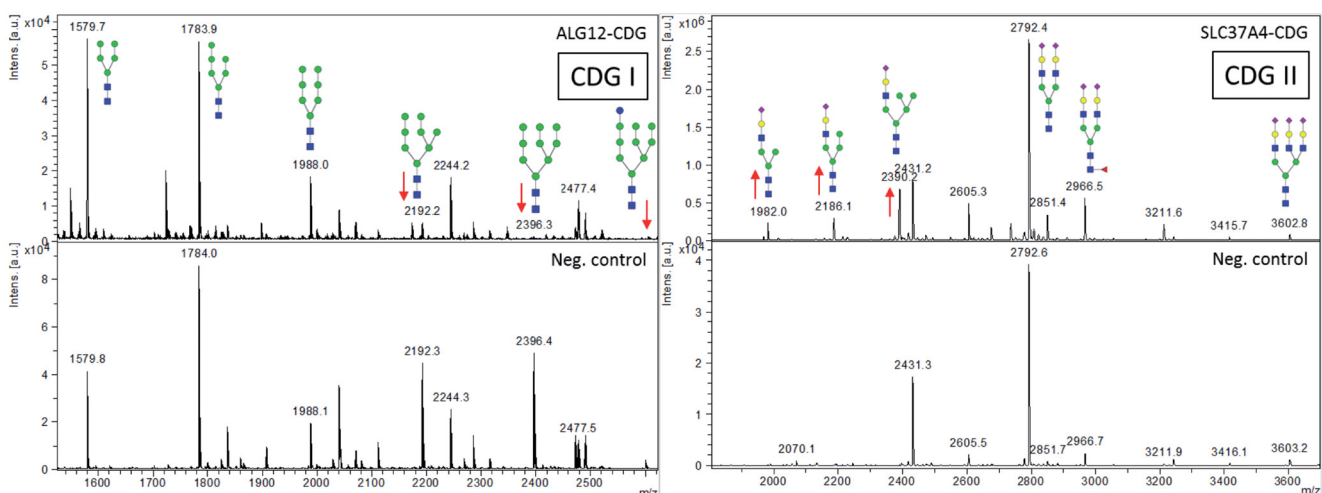
U pacienta I signifikantný pokles hladín GlcNAc2Man8-9 vo frakcii neutrálnych sérových N-glykánov poukázal na zníženú aktivitu α -manozyltransferázy 8, kódovanej génom *ALG12*. Tento enzým katalyzuje pridanie ôsmeho manózové-

ho zvyšku na vznikajúci oligosacharid, viazaný prostredníctvom lipidového nosiča na membránu endoplazmatického retikula. Analýza klinického exómu prostredníctvom Clinical Exome Solution panelu sekvenovania novej generácie (z angl. „next generation sequencing“, NGS) identifikovala homozygotný variant c.1439T>C p.(Leu480Pro) v exóne 10 génu *ALG12*. K dnešnému dňu bolo celosvetovo identifikovaných iba 16 pacientov s týmto ochorením.

Poruchy glykozylácie druhého typu sú veľkou výzvou pre diagnostiku, pretože aberantný glykoprolfil často nepoukazuje na konkrétny defekt v glykozylačnej kaskáde. Prezentované výsledky z analýzy sérových N-glykánov pacienta II, ktorého molekulárna podstata bola objasnená na zahraničnom pracovisku⁽⁸⁾, však na základe akumulácie aberantných hybridných štruktúr poukazujú na primárnu poruchu v glykozylácii. NGS analýza exómu poukázala na de novo mutáciu c.1267C > T (R423*) v géne *SLC37A4* kódujúcom transportér glukózo6fosfátu⁽⁸⁾. Na základe literatúry strata funkcie transportéra glukózo-6-fosfátu vedie k lyzozómovej poruche s názvom „Glycogen storage disorder (GSD)“ typu Ib⁽⁹⁾, ale špecifická mutácia v tomto géne môže viesť aj k intracelulárnej mislokácii tohto transportéra s úplne odlišnou klinickou manifestáciou⁽⁸⁾.

Hmotnostná spektrometria predstavuje významný prínos v diagnostike CDG prvého aj druhého typu a môže byť štandardne zavedená ako nasledujúci krok, nadväzujúci na pozitívny, respektíve hraničný výsledok selektívneho skríningu. Štruktúrna analýza predstavuje esenciálnu súčasť personalizovanej diagnostiky a aj vďaka svojej nižšej finančnej a časovej náročnosti by mala predchádzať molekulárnogenetickým analýzám (NGS). Odhaduje sa však, že pre technologickú náročnosť personalizovanej diagnostiky a širokú heterogenitu klinických príznakov celosvetovo stále ostáva mnoho CDG pacientov poddiagnostikovaných. Zvýšenie povedomia laickej i odbornej verejnosti o týchto ochoreniach a spolupráca klinických a vedeckých pracovísk však môže významne prispieť k včasnemu a spoľahlivému určeniu diagnózy, čo môže mať aj výrazný vplyv na kvalitu života pacientov a ich rodín.

Obrázok 2. MALDI TOF hmotnostné spektrá permetylovaných N-glykánov, získaných zo sérových proteínov *ALG12*-CDG (CDG I) a *SLC37A4*-CDG (CDG II) pacientov, porovnané s negatívnou kontrolou vo vybranej m/z oblasti. Štruktúry glykobiomarkerov typických pre tieto ochorenia sú znázornené schematicky (zelený kruh – manóza, žltý kruh – galaktóza, modrý štvorec – N-acetylglukozamín, fialový kosoštvorec – kyselina sialová, červený trojuholník – fukóza).



Záver

V diagnostike zriedkavých ochorení nachádza spolupráca medzi vedeckými inštitúciami a diagnostickými pracoviskami veľké uplatnenie. Pokročilé analytické metódy ako hmotnostná spektrometria a kvapalinová chromatografia môžu byť napriek svojej technickej náročnosti optimalizované a automatizované do vysokopriepustných formátov a rozšíriť tak možnosti tzv. personalizovanej diagnostiky s individuálnym prístupom ku každému pacientovi. Práve dôkladná korelácia výsledkov štruktúrnej analýzy biomarkerov a klinických, biochemických a genetických vyšetrení môže pomôcť objasniť molekulárnu podstatu týchto raritných ochorení.

Konflikt záujmov

Autori deklarujú, že nemajú žiadny konflikt záujmov a zároveň čestne vyhlasujú, že práca nebola publikovaná v inom periodiku.

LITERATÚRA

1. Moffett S, Shiao TC, Mousavifar L, et al. Aberrant glycosylation patterns on cancer cells: Therapeutic opportunities for glycodendrimers/metalloendrimers oncology. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2021;13(1):e1659.
2. Shafi S, Singh A, Gupta P, et al. Deciphering the Role of Aberrant Protein Post-Translational Modification in the Pathology of Neurodegeneration. *CNS Neurol Disord – Drug Targets* 2021;20(1):54–67.
3. Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis *J Neuroimmune Pharmacol*. Publikované online 03. máj 2021. doi:10.1007/s11481-021-09996-1
4. Lekka DE, Brucknerova J, Salingova A, et al. Congenital disorders of glycosylation – an umbrella term for rapidly expanding group of rare genetic metabolic disorders – importance of physical investigation. *Bratislava Med J* 2021;122(03):190–195.
5. Morena-Barrio ME, Sabater M, Morena-Barrio B, et al. ALG12-CDG: An unusual patient without intellectual disability and facial dysmorphism, and with a novel variant. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8(8):e1304.
6. Jones MA, Bhide S, Chin E, et al. Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation. *Genet Med* 2011;13(11):921–932.
7. Ziburová J, Nemčovič M, Šesták S, et al. A novel homozygous mutation in the human ALG12 gene results in an aberrant profile of oligomannose N-glycans in patient's serum. *Am J Med Genet Part A* 2021;185(11):3494–3501.
8. Marquardt T, Bzduch V, Högbe M, et al. SLC37A4-CDG: Mislocalization of the glucose-6-phosphate transporter to the Golgi causes a new congenital disorder of glycosylation. *Mol Genet Metab Reports* 2020;25:100636.
9. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. *J Inherit Metab Dis* 2015;38(3):511–519.

Podakovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, grantom č. 2/0060/21 Slovenskej grantovej agentúry pre vedu VEGA. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a MZ ČR-RVO-VFN64165 Autori tohto článku sú členmi Európskej referenčnej siete pre zriedkavé metabolické poruchy (European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders, MetabERN – Project ID No 739543).

Ing. Zuzana Pakanová, PhD.

Chemický ústav SAV

Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

e-mail:zuzana.pakanova@savba.sk