Mutacije u genu za fosfomanomutazu 2 koje uzrokuju urođeni poremećaj glikozilacije tipa Ia

Čačija, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:398430

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Maja Čačija

MUTACIJE U GENU ZA FOSFOMANOMUTAZU 2 KOJE UZROKUJU UROĐENI POREMEĆAJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia

Diplomski rad

Zagreb, 2008. godina

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jerke Dumić Belamarić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvala

Najljepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jerki Dumić Belamarić na vođenju diplomskog rada i uvijek dobrodošlim savjetima, poukama i inspiraciji.

Svojim znanjem, prijedlozima, organizacijom i dobrom voljom kroz rad me nesebično pratila, pomagala i poučavala dr. sc. Sandra Šupraha Goreta kojoj se od srca zahvaljujem.

Naposljetku, najviše se želim zahvaliti svojim roditeljima i bratu Igoru koji su me tijekom mog studija svesrdno podržavali, pomagali i najvažnije, vjerovali u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

MUTACIJE U GENU ZA FOSFOMANOMUTAZU 2 KOJE UZROKUJU UROĐENI POREMEĆAJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia

Maja Čačija
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDGs) skupina su autosomno recesivnih poremećaja karakteriziranih disfunkcijom središnjeg živčanog sustava i rada mnogih organa. Poremećaji su uzrokovani abnormalnom glikozilacijom glikoproteina, povezanom s mutacijama u genima uključenim u N-glikozilacijske puteve. CDG tip I uključuje defekte u sastavljanju lipid-vezanog oligosaharidnog prekursora i/ili u njegovom prijenosu na protein. CDG-Ia, najčešći tip CDG-I, uzrokovan je deficijencijom enzima fosfomanomutaze 2 (PMM2) kojeg eksprimira gen *PMM2*. PMM2 izomerizira manoza-6-fosfat u manoza-1-fosfat koja prelaskom u GDP-manozu postaje donor za sintezu lipid-vezanog oligosaharidnog prekursora. Najčešća točkasta mutacija u egzonu 5 gena *PMM2* koja uzrokuje CDG-Ia je c.422G>A, odnosno aminokiselinska zamjena R141H.

U ovom je radu analizirana učestalost mutacije R141H u egzonu 5 i polimorfizama jednog nukleotida (*eng*. single nucleotide polymorphisms, SNPs) (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) u dijelovima intronskih sljedova pripadajućih egzonu 5 gena *PMM2* na 60 uzoraka humane genomske DNA (gDNA). Cilj rada bio je odrediti učestalost pojavnosti nositelja mutacije R141H u ovom uzorku hrvatske populacije, kao i učestalost pojave nositelja polimorfizama jednog nukleotida u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadajućih egzonu 5. Istraživanja su pokazala da su ti polimorfizmi povezani sa specifičnim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia.

Nakon izolacije humane gDNA iz pune krvi metodom Chelex®, ciljni slijed DNA veličine 291 pb (egzon 5 sa dijelovima pripadajućih intronskih sljedova IVS4 i IVS5 u genu *PMM2*) umnožen je PCR reakcijom, a PCR produkti vizualizirani su etidij bromidom na agaroznoj gel elektroforezi. Prisutnost mutacija/polimorfizama ispitana je analizom polimorfizama konformacije jednolančane DNA (*eng*. single-strand conformation polymorphism, SSCP), a vrpce jednolančane DNA (ssDNA) vizualizirane su bojanjem gela srebrom. Svaki uzorak čije su vrpce ssDNA na gelu pokazale drukčiji SSCP elektroforetski obrazac u usporedbi s divljim tipom i kontrolom (poznati CDG-Ia), sekvenciran je te mu je određen slijed nukleotida na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Rezultati rada pokazali su da u 60 analiziranih uzoraka humane gDNA nema mutacije R141H u genu *PMM2*, odnosno da u ovom uzorku hrvatske populacije nema nositelja te mutacije (heterozigota za R141H). Sedam uzoraka pokazalo je promijenjeni SSCP elektroforetski obrazac, različit od DNA divljeg tipa i kontrolne DNA: u pet uzoraka utvrđena je prisutnost heterozigotnog oblika polimorfizma IVS5+19T/C, te su utvrđeni nositelj heterozigotnog oblika polimorfizma IVS4-58-56delATG (1) i nositelj heterozigotnog oblika polimorfizma IVS5+22T/A (1). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da iako nisu utvrđeni nositelji mutacije R141H, ne može se izvesti općeniti zaključak o učestalosti ove mutacije u hrvatskoj populaciji, budući je istraživanje provedeno na malom broju uzoraka. Rezultati se slažu sa činjenicom da u Republici Hrvatskoj nema utvrđenih osoba oboljelih od CDG-Ia. Također se može zaključiti da je ovaj uzorak hrvatske populacije specifičan što se tiče ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na neke druge populacije, no kako bi se donio konačan zaključak potrebno je analizirati veći broj uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se javljaju u CDG-Ia.

(83 stranice, 28 slika, 9 tablica, 86 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: glikozilacija, CDG-Ia, gen *PMM2*, PMM2, mutacija R141H, intronski polimorfizmi
Voditelj: Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić, izvanredni profesor
Suvoditelj: Dr. sc. Mirjana Pavlica, redovni profesor
Ocjenitelji: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, redovni profesor
Dr. sc. Mirjana Kalafatić, redovni profesor
Rad prihvaćen: 12. studeni 2008.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

MUTATIONS IN PHOSPHOMANNOMUTASE 2 GENE THAT CAUSE CONGENITAL DISORDER OF GLYCOSYLATION TYPE Ia

Maja Čačija
Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

Congenital disorders of glycosylation (CDGs) are autosomal recessive disorders characterized by central nervous system dysfunction and multiorgan failure due to aberrant N-glycosylation of glycoproteins. CDG type I consist of defects in the assembly of lipid-linked oligosaccharide precursor and/or its transfer to the polypeptide chain. CDG-Ia, the most prevalent CDG-I, is caused by deficiency of phosphomannomutase 2 (PMM2), which is associated with mutations in *PMM2* gene. PMM2 converts mannose 6-phosphate to mannose 1-phosphate, which then serves as GDP-mannose donor for the synthesis of lipid-linked oligosaccharide precursor. The R141H mutation (c.422G>A) is the most frequent mutation in exon 5 of *PMM2* gene, accounting for low PMM2 activity.

In this work, the allele frequencies of R141H mutation in exon 5 and single nucleotide polymorphisms (SNP) (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) in parts of introns related to exon 5 were studied on 60 samples of human genomic DNA (gDNA). The main goal was to determine the frequency of R141H heterozygotes in this sample of Croatian population, and also the frequency of polymorphisms in parts of intronic sequences IVS4 and IVS5 related to exon 5. Studies have shown that these polymorphisms are commonly related to specific mutations which cause CDG-Ia.

After human genomic DNA was isolated from whole blood using Chelex® protocol, the target 291 bp DNA fragment (exon 5 of *PMM2* gene and parts of its associated intronic sequences IVS4 and IVS5) was amplified using the PCR method and the resulting DNA bands were visualized by ethidium bromide on agarose gel. The mutation/polymorphism screening was preformed using the single-strand conformation polymorphism (SSCP) analyses; single-stranded DNA (ssDNA) bands were visualized by silver staining. Every ssDNA that showed different SSCP electrophoretic pattern compared to wild type ssDNA and control (known CDG-Ia) was sequenced and then analyzed using ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

The results of the analyses showed that in 60 analyzed human gDNA samples no R141H mutation in *PMM2* gene was found, that means that no R141H heterozygotes were found in this sample of Croatian population. Seven samples showed polymorphisms in parts of intronic sequences (IVS4, IVS5) related to exon 5 of *PMM2* gene: five IVS5+19T/C polymorphisms, one IVS4-58-56delATG and one IVS5+22T/A polymorphism were detected. However, we cannot make a general conclusion about the presence of R141H mutation in this population because of the limited number of samples. Nevertheless, the result complies with the fact that so far no CDG-Ia patients are found in Republic of Croatia. We can also make a conclusion that this sample of Croatian population is specific considering analyzed mutation/polymorphisms compared to some other populations, but to make a general conclusion it is necessary to analyze a larger set of samples from patients with disease having similar symptoms to those found in CDG-Ia patients.

(83 pages, 28 figures, 9 tables, 86 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in Central biological library.
Key words: glycosylation, CDG-Ia, *PMM2* gene, PMM2, R141H mutation, intronic polymorphisms
Supervisor: Dr. Jerka Dumić Belamarić, Assoc. Prof.
Co-supervisor: Dr. Mirjana Pavlica, Prof.
Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Prof.
Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.
Thesis accepted: 12th November 2008

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GLIKOZILACIJA 2

1.1.1. ULOGE GLIKOKONJUGATA 3

1.1.2. BIOSINTEZA GLIKOPROTEINA 4

1.1.2.1. N-glikozilacija 5

1.1.2.2. O-glikozilacija 11

1.2. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE 13

1.2.1. DIJAGNOSTIKA CDG 15

1.2.2. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE TIPA I (CDG-I) 17

1.2.3. UROĐENI POREMEĆAJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia (CDG-Ia) 22

1.2.3.1. Gen *PMM2* i uloga fosfomanomutaze 2 22

1.2.3.2. Klinička obilježja CDG-Ia 26

1.2.4. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE TIPA II (CDG-II) 28

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA 32

2. MATERIJAL I METODE 33

2.1. MATERIJAL 34

2.1.1. ISPITANICI I SAKUPLJANJE UZORAKA PUNE KRVI 34

2.1.1.1. Filter-papirići za sakupljanje uzoraka pune krvi 35

2.1.2. KEMIKALIJE 35

2.1.3. TEHNIČKA POMAGALA I PRIBOR 38

2.2. METODE 39

2.2.1. IZOLACIJA HUMANE GENOMSKE DNA METODOM CHELEX® 39

2.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE 39

2.2.3. ELEKTROFOREZA DNA U AGAROZNOM GELU 43

2.2.4. ANALIZA POLIMORFIZAMA KONFORMACIJE JEDNOLANČANE DNA 43
2.2.5. BOJANJE GELA SREBROM 46
2.2.6. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA UMNOŽENIH FRAGMENATA GENA *PMM2* 46
2.2.6.1. Pročišćavanje PCR produkata nakon lančane reakcije polimeraze 47
2.2.6.2. Provjera uspješnosti pročišćavanja i određivanje koncentracije PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu 47
2.2.6.3. Reakcija sekvenciranja 48
2.2.6.4. Pročišćavanje produkata sekvenciranja 51
2.2.6.5. Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata 51
2.2.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 52

3. REZULTATI 53

3.1. MUTACIJE I POLIMORFIZMI GENA *PMM2* 54

3.1.1. SSCP ANALIZA ZA ODREĐIVANJE MUTACIJE R141H 58
3.1.2. UČESTALOST MUTACIJE R141H 59
3.1.3. UČESTALOST INTRONSKIH POLIMORFIZAMA IVS5+19T/C, IVS5+22T/A I IVS4-58-56delATG GENA *PMM2* 60

4. RASPRAVA 68

5. ZAKLJUČCI 73

6. LITERATURA 75

POPIS KRATICA

AAT	antitripsin
Asn	asparagin
CDG	urođeni poremećaji glikozilacije (*eng*. congenital disorders of glycosylation)
cDNA	komplementarna DNA (*eng*. complementary DNA)
CMP-Sia	citidin monofosfat sijalinska kiselina
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (*eng*. deoxyribonucleic acid)
dATP/dCTP/dGTP/dTTP	deoksi -adenozin / -citozin / -gvanozin / -timidin trifosfat
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
ddATP/ddCTP/ddGTP/ddTTP	dideoksi -adenozin / -citozin / -gvanozin / -timidin trifosfat
ddNTP	dideoksinukleozid trifosfat
Dol-P / Dol-PP	dolikol fosfat / dolikol pirofosfat
Dol-P-Glc	glukoza vezana na dolikol fosfat
Dol-P-Man	manoza vezana na dolikol fosfat
EDTA	etilendiamintetraacetat
ER	endoplazmatski retikul
ERAD	degradacija vezana uz endoplazmatski retikul (*eng*. ER associated degradation)
Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GalNAcT	N-acetilgalaktozamin transferaza
gDNA	genomska DNA
GDP-Man	gvanozin difosfat manoza
Glc	glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GPI sidra	glikozil fosfatidilinozitolna sidra (*eng*. glycosylphosphatidylinositol anchors)
IEF	izoelektrično fokusiranje (*eng*. isoelectric focusing)
IVS4-58-56delATG	delecija tripleta baza ATG na mjestu od -58 do -56 u dijelu (egzonu 5 pripadajuće) intronske regije 4 gena *PMM2* (nizvodno od egzona 5)

IVS5+19T/C	polimorfizam baza T/C na mjestu +19 u dijelu (egzonu 5 pripadajuće) intronske regije 5 gena *PMM2* (uzvodno od egzona 5)
IVS5+22T/A	polimorfizam baza T/A na mjestu +22 u dijelu (egzonu 5 pripadajuće) intronske regije 5 gena *PMM2* (uzvodno od egzona 5)
LLO	lipid-vezani oligosaharid (*eng*. lipide-linked oligosaccharide)
Man	manoza
mRNA	glasnička RNA (*eng*. messenger RNA)
OST kompleks	kompleks oligosahariltransferaze (*eng*. oligosaccharyltransferase complex**)**
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza (*eng*. polyacrylamide gel electrophoresis)
pb	par baza
PCR	lančana reakcija polimeraze (*eng*. polymerase chain reaction)
PMI	enzim fosfomanoza izomeraza (*eng*. phosphomannose isomerase)
PMM2	enzim fosfomanomutaza 2 (*eng*. phosphomannomutase 2)
PMM2	gen za fosfomanomutazu 2
R141H	aminokiselinska zamjena arginina sa histidinom na mjestu 141
RNA	ribonukleinska kiselina (*eng*. ribonucleic acid)
SDS	natrijev dodecilsulfat (*eng*. sodium dodecyl sulfate)
Ser	serin
Sia	sijalinska kiselina (*eng*. sialic acid)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (*eng*. single nucleotide polymorphism)
SSCP	polimorfizam konformacije jednolančane DNA (*eng*. single-strand conformation polymorphism)
ssDNA	jednolančana molekula DNA (*eng*. single-stranded DNA)
Temed	N-N-N’-N’-tetrametilendiamin
Tf	transferin
Thr	treonin
Tris	Tris[hidroksimetil]aminometan
UDP-Gal	uridin difosfat galaktoza
UDP-GlcNAc	uridin difosfat N-acetilglukozamin
UDP-GalNAc	uridin difosfat N-acetilgalaktozamin
Xyl	ksiloza

1. UVOD

1.1. GLIKOZILACIJA

Glikozilacija je proces kojim se u eukariotskim stanicama dorađuju proteini i lipidi na način da im se enzimima kovalentno dodaje jedna ili više ugljikohidratnih skupina. Tako modificirane molekule nazivaju se glikokonjugati. S obzirom dodaje li se šećerna komponenta (glikon) na protein ili lipid (aglikon), razlikujemo glikoproteine, glikolipide i proteoglikane.

Glikozilacija je najčešća kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina u eukariotskim stanicama, a dugo vremena nije se znalo događa li se glikozilacija i u bakterijama (Szymanski i Wren 2005). Nakon sinteze, protein se smata u svoju funkcionalnu konformaciju nekovalentnim interakcijama te se većina dodatno kovalentno modificira glikozilacijom i/ili nekim drugim procesom. Osim što imaju glavnu ulogu u usmjeravanju molekula u stanične odjeljke i membrane, jedna od najvažnijih funkcija endoplazmatskog retikula (ER) i Golgijeva tijela jest glikozilacija proteina. Enzimi koji sudjeluju u glikozilaciji, odnosno kataliziraju reakciju stvaranja glikozidne veze, nazivaju se glikoziltransferaze. One su specifične s obzirom na vrstu šećera i vrstu veze koju kataliziraju (Stryer i sur. 2003).

Za razliku od proteina čija je sinteza pod genetičkom kontrolom, raznovrsne glikanske strukture vezane na okosnici proteina nastaju kao rezultat djelovanja različitih glikoziltransferaza. Glikozilacija se, dakle, događa bez izravnog genetičkog uputstva (*eng*. template) te sama polipeptidna sekvenca određuje uzorak glikozilacije. Kao rezultat toga, glikozilacija nekog proteina je specifična za svako tkivo i stanicu u kojoj se protein sintetizira (Lis i Sharon 1993). Nastali glikoprotein može imati različit sastav i kompoziciju glikana na istoj molekuli, a ta mu mikroheterogenost omogućuje obavljanje raznih staničnih funkcija (Voet i Voet 2004).

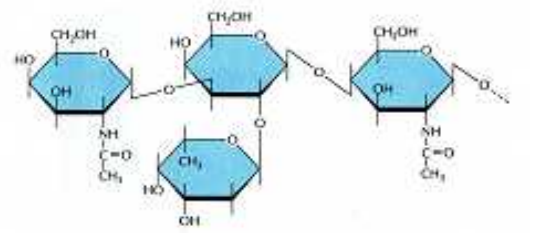
Procjenjuje se da je oko 500 gena uključeno u glikozilacijske procese i da su polovina proteina u našem tijelu glikoproteini. Gotovo svi sekretorni i membranski proteini eukariotskih stanica se glikoziliraju, a o važnosti ove modifikacije govori i činjenica da je nedostatak svih N-vezanih glikana letalan u vrstama od kvasca do sisavaca (Freeze 2006). Većina glikana nalazi se na vanjskoj površini staničnih i sekretornih makromolekula, a zbog heterogenosti mogu posredovati ili uskladiti razne međustanične interakcije ključne za razvitak i funkciju složenih višestaničnih organizama.

Znanstveno područje molekularne biologije koje se bavi proučavanjem strukture, biosinteze i biologije prirodnih glikana zove se glikobiologija. Danas je jedna od izazovnijih i brzo razvijajućih grana biomedicinskih znanosti.

1.1.1. ULOGE GLIKOKONJUGATA

Ugljikohidrati ili šećeri jedna su od najzastupljenijih vrsta bioloških molekula i esencijalne su komponente svih živih bića. Uloge ugljikohidrata su vrlo raznolike: služe kao pričuva energije (glikogen, škrob), gorivo i kao metabolički intermedijeri; šećeri riboza i deoksiriboza dio su okosnice DNA i RNA; stanične stijenke biljaka, bakterija, gljiva složene su od polisaharida (celuloza, peptidoglikani, hitin). Važnost ugljikohidrata do 1960-ih godina bila je prilično zanemarena, bili su čak smatrani i inertnim dijelovima stanice, no danas se zna da vezanjem na mnoge proteine i lipide dobivaju ključne uloge u posredovanju interakcija između stanica i ostalih elemenata u staničnoj okolini, te specifične uloge enzima, receptora, hormona, transportnih i strukturalnih proteina (Stryer i sur. 2003; Voet i Voet 2004).

Raznovrsne funkcije glikoproteina rezultat su njihove specifične strukture, napose strukture glikana. Osnovne građevne jedinice ugljikohidrata su monosaharidi koji se zbog svoje kemijske građe mogu kovalentno udruživati u ogroman broj strukturno različitih oligosaharida ili u još veće polisaharidne lance. Slobodni monosaharidi su aldoze ili ketoze u lančanom ili prstenastom obliku te sadrže najmanje tri ugljikova atoma. Prisutnost dvaju i više hidroksilnih grupa omogućava da se monosaharidi međusobno povežu α- ili β-glikozidnim vezama na različite načine, u različite duljine i grananja (Slika 1.1.). Osim toga, hidroksilne grupe glikana mogu se još dodatno posttranslacijski fosforilirati, sulfatirati, metilirati, O-acetilirati, acilirati. Na taj način kompleksni ugljikohidrati kao dijelovi glikokonjugata postaju molekule bogate informacijom (Stryer i sur. 2003; Varki i sur. 1999).



Slika 1.1. Monosaharidi se glikozidnim vezama udružuju u oligosaharide **r**azgranatih struktura. (Preuzeto iz Alberts i sur. 2002)

U biološkim sustavima postoji teoretski beskonačno mnogo različitih šećernih jedinica. No, u prirodnim makromolekulama šećeri se pojavljuju u relativno malom broju konfiguracija i ograničenim kombinacijama, a neki od uobičajenih monosaharida viših životinja su heksoze, deoksiheksoze, heksozamini, pentoze, uronske i sijalinske kiseline.

Glikoproteini su zbog mikroheterogenosti svojih glikana u mogućnosti obavljati razne stanične i međustanične funkcije, budući se nalaze na membranama stanica i organela, u citoplazmi, jezgri i na površini sekretornih molekula. Različito glikoziliranje istog proteina stvara glikoforme, s drukčijim fizikalnim i biokemijskim svojstvima te drukčijim funkcijama, ovisno o tipu stanice, tkivu i fazama rasta. Biološke uloge glikana obuhvaćaju cijeli spektar, od relativno nevažnih do onih ključnih u rastu, razvoju, funkciji ili preživljavanju organizma.

Razna su istraživanja pokazala da glikanske komponente glikoproteina obavljaju sljedeće fizičko-kemijske funkcije: mijenjaju topljivost, električni naboj, masu, veličinu i viskoznost proteina u otopini; kontroliraju smatanje proteina (*eng*. folding); stabiliziraju proteinsku konformaciju; osiguravaju termičku stabilnost i štite proteine od proteolize (Varki i sur. 1999).

Biološke funkcije glikana uključuju regulaciju unutarstaničnog prometa i lokalizaciju glikoproteina u stanici; regulaciju vremena života glikoproteina u cirkulaciji; modifikaciju imunoloških svojstava; prilagodbu aktivnosti enzima i hormona; ulogu staničnih površinskih receptora za lektine, antitijela, toksine i drugo; sudjelovanje u interakcijama između stanica (Lis i Sharon 1993). Smatra se da interakcije glikoproteina na površini zone pellucide jajne stanice te spermija imaju važnu ulogu u prepoznavanju gameta jedinki iste vrste i fertilizaciji (Rosati i sur. 2000). Na površini većine tipova stanica nalazi se gusti pokrov od raznih glikokonjugata koji se zove glikokaliks; glikanski dio štiti polipeptidni dio od proteaza ili antitijela, no istovremeno upravo te glikane prepoznaju viralni i bakterijski lektini u prvim koracima infekcije stanica domaćina (Varki i sur. 1999).

1.1.2. BIOSINTEZA GLIKOPROTEINA

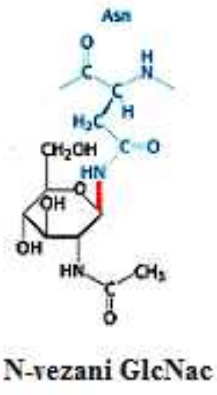
Glikoproteini nastaju enzimskim pripajanjem glikanskih struktura na proteine u nastajanju ili na već gotove, što znači da je glikozilacija kotranslacijski i/ili posttranslacijski proces. U procesu glikozilacije sudjeluje više od 100 specifičnih glikoziltransferaza, glikozidaza i transportnih proteina koji prenose nukleotid-aktivirane šećere (Trombetta 2003). Najveći dio glikoproteina nastaje u lumenu endoplazmatskog retikula (ER) i Golgijevog tijela, a neki proteini glikoziliraju se i u citoplazmi. Proteini sintetizirani na ribosomima vezanim uz ER unose se u njegov lumen, a

monosaharidi koji će se pripajati proteinima prenose se iz citoplazme u ER i Golgijevo tijelo posebnim nosačima (transporterima).

Pri glikozilaciji, oligosaharidi se općenito na proteine (ili lipide) mogu kovalentno vezati na dva načina: N-glikozidnom ili O-glikozidnom vezom, pa razlikujemo N-vezane oligosaharide (N-glikane) i O-vezane oligosaharide (O-glikane). Različito je i mjesto glikozilacije proteina: N-glikozilacija se događa u ER i Golgijevu aparatu, a O-glikozilacija u Golgiju (Varki i sur. 1999).

1.1.2.1. N-glikozilacija

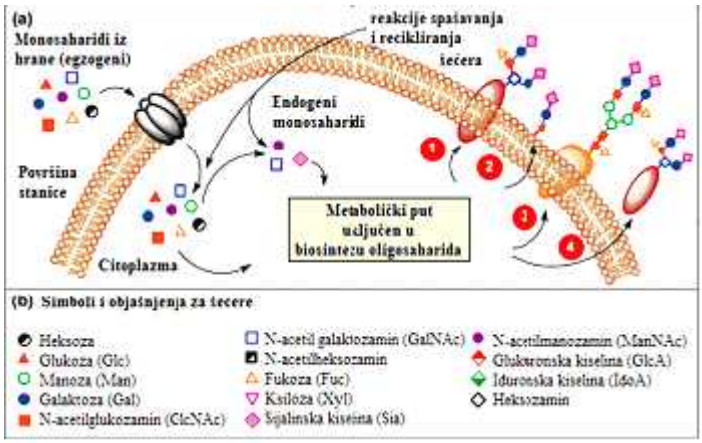
Oligosaharidi se N-glikozilacijom vežu na asparaginske ostatke (Asn) u polipeptidu. Točnije, vežu se N-acetilglukozaminom (GlcNAc) na reducirajućem kraju na N-atom bočnog lanca asparagina (GlcNAc-(β)-Asn). Pri tomu je Asn unutar konsenzusne sekvence Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (X je bilo koja aminokiselina, osim prolina) (Slika 1.2.).



Slika 1.2. N-glikozidna veza (crvena linija) između C1-atoma ugljikohidrata N-acetilglukozamina i N-atoma bočnog lanca asparagina u proteinu. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

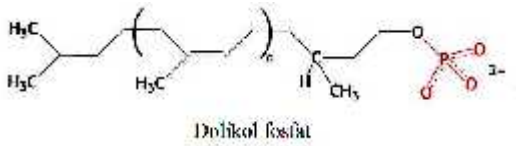
Primijećeno je da su te konsenzusne sekvence mnogo rjeđe u glikoproteinima nego u neglikoziliranim citosolnim proteinima; pretpostavlja se da su tijekom evolucije proteina selektivnim pritiskom odabrane kao mjesta glikozilacije, jer bi previše glikoziliranih mjesta ometalo pravilno smatanje glikoproteina (Voet i Voet 2004).

N-glikozilacija se najčešće događa kotranslacijski; novonastali peptid često se glikozilira dok se preostali dio još uvijek sintetizira na ribosomu veznom uz endoplazmatski retikul (zrnati ER) (Alberts i sur. 2002). Formiranje glikoproteina događa se u ER, a procesiranje glikana u razne oblike počinje u ER i završava u Golgijevom aparatu, odakle gotovi glikoproteini odlaze na svoja konačna odredišta (njihovi glikani postaju ekstracelularne komponente) (Slika 1.3.).



Slika 1.3. Shematski pregled procesa glikozilacije. (a) Kompleksni ugljikohidrati nastaju biosintezom iz monosaharida egzogenog ili endogenog porijekla. Razni oligosaharidi mogu biti vezani na proteine u membrani (1 i 3) ili direktno na lipide (2). Zajedno (1, 2 i 3) čine glikokaliks. Oligosaharidi mogu biti vezani i na sekretorne proteine (4). (Prilagođeno prema Yarema i Bertozzi 2001)

Prvi korak u biosintezi N-vezanih glikoproteina je formiranje 14-članog oligosaharidnog prekursora na lipidnom dolikol fosfatu (Dol-P) (Slika 1.4.), posebnom nosaču usidrenom u membrani ER.

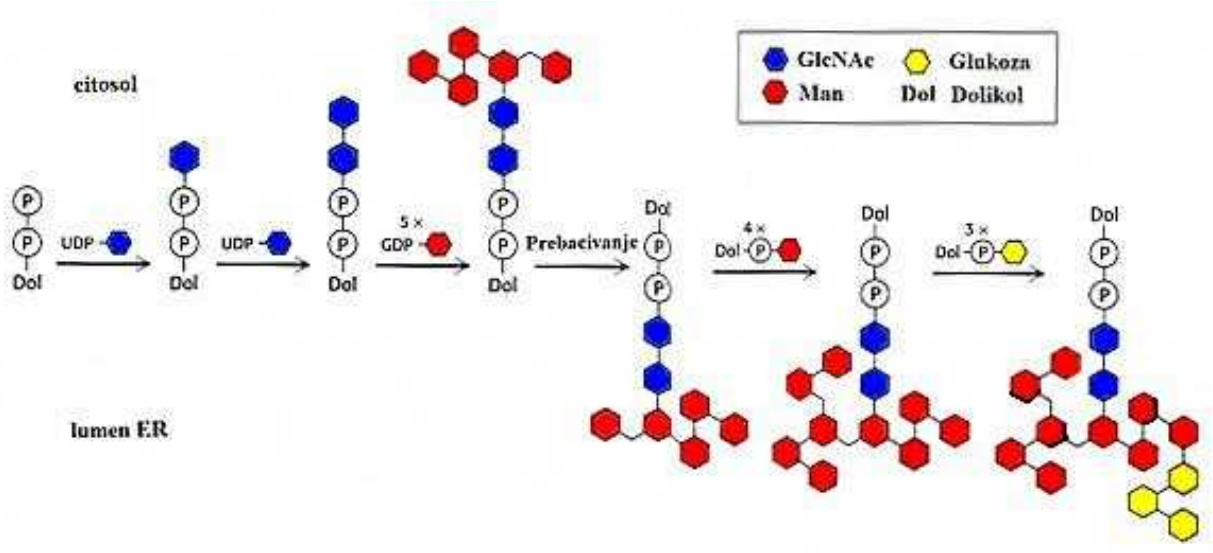


Slika 1.4. Struktura lipidne molekule dolikol fosfata u membrani ER. Broj izoprenskih jedinica (n) varira od 15 do 19, a 14-člani oligosaharidni prekursor veže se na terminalnu fosfatnu grupu. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

Početne reakcije slaganja prekursora događaju se sa citoplazmatske strane membrane ER: monosaharidi se kroz sedam visoko usklađenih reakcija jedan po jedan vežu na fosfatnu skupinu dolikol fosfata. Uvijek se vežu prvo dva N-acetilglukozamina (GlcNAc) te zatim pet manoza (Man). Donori monosaharida u citoplazmi su aktivirani nukleozid-šećeri (uridin difosfat N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) i gvanozin difosfat manoza (GDP-Man)). Reakcije dodavanja šećera kataliziraju šećer-specifične glikoziltransferaze: N-acetilglukozaminiltransferaza i manoziltransferaza. Sa citosolne strane nosača nastaje tako $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol, lipid-vezani oligosaharidni prekursor (*eng*. lipide-linked oligosaccharide, LLO).

Oligosaharid se zatim skupa sa dolikol pirofosfatom prebacuje na još nepotpuno razjašnjen način kroz membranu ER u njegov lumen. Pretpostavlja se da u procesu okretanja sudjeluju membranski proteinski translokatori, flipaze (Helenius i sur. 2002).

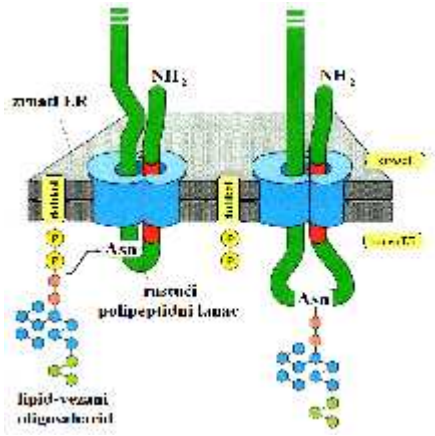
U lumenu ER nadograđuju se na $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol uređenim (sekvencijalnim) slijedom reakcija prvo četiri manoze pa tri glukoze, posredovanjem četiriju specifičnih manoziltransferaza i triju glukoziltransferaza usidrenih u membrani ER. Donori šećera su manoza i glukoza (Glc) vezani na dolikol fosfate (Dol-P-Man, Dol-P-Glc) koji te šećere prenose iz citoplazme u lumen ER. Ovim reakcijama nastaje konačno u lumenu ER oligosaharidni prekursor od 14 saharidnih jedinica vezanih na dolikol pirofosfat (LLO): $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol prekursor (Slika 1.5.).



Slika 1.5. Sastavljanje N-vezanog oligosaharidnog prekursora sekvencijalnim reakcijama na dolikol pirofosfatu na membrani ER. Prvi dio sinteze događa se u citoplazmi, a završava u lumenu ER nakon okretanja dolikol pirofosfata i vezanog oligosaharida. Oligosaharidni prekursor vezan na Dol-PP sastavljen je od 14 šećernih jedinica. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

Burda i sur. (1999) pokazali su da je za nastanak razgranate forme oligosaharidnog prekursora (LLO) ključno specifično prepoznavanje monosaharida glikoziltransferazama u ER. Specifičnost glikoziltransferaza za vlastite supstrate i međusobna kompeticija enzima imaju za posljedicu sastavljanje oligosaharidnog prekursora točno određenog monosaharidnog sastava i grananja strukture oligosaharida.

Drugi korak u biosintezi glikoproteina je prijenos kompletnog (u bloku) oligosaharidnog dijela ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol) sa dolikol pirofosfata na određene asparaginske ostatke u proteinu. Nastaje $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-Asn, neprocesirani glikoprotein (Slika 1.6.). Prijenos u lumenu ER obavlja transmembranski proteinski kompleks oligosahariltransferaza (OST kompleks).



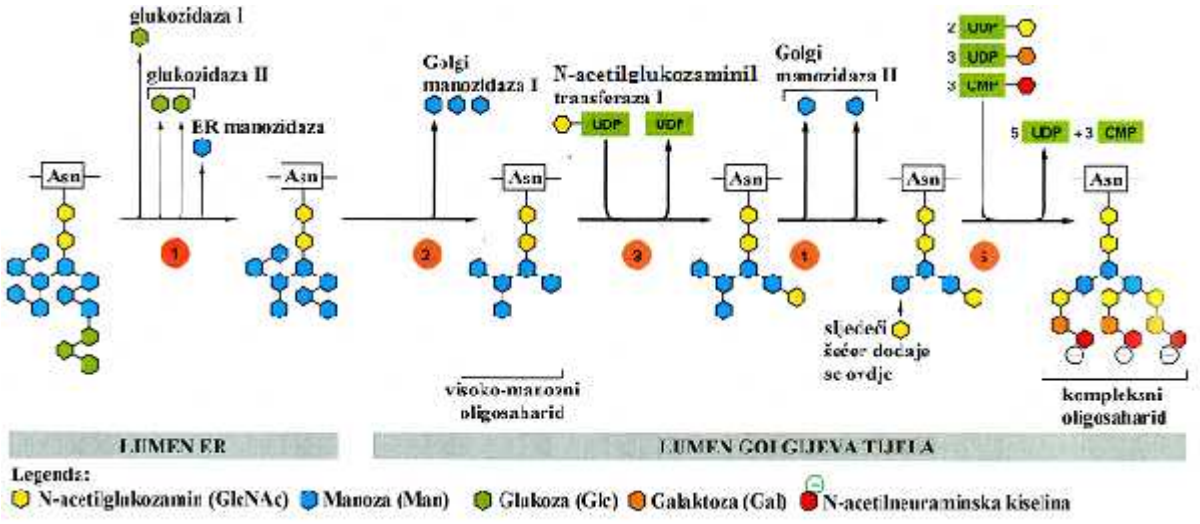
Slika 1.6. Glikozilacija proteina u zrnatom ER. Gotovo odmah po ulasku u lumen ER, polipeptidni se lanac glikozilira na ciljanim asparaginskim ostacima (Asn). Lipid-vezani oligosaharidni prekursor prenosi se kao cjelina na Asn u reakciji koju katalizira oligosahariltransferaza (nije prikazana). (Prilagođeno prema Alberts i sur. 2002)

Treći korak biosinteze glikoproteina uključuje niz reakcija procesiranja glikana u ER u kojima sudjeluju glukozidaze i α-manozidaza iz ER. Glukozidaza I (vezana uz membranu ER) i glukozidaza II (otopljena u lumenu ER) uklanjaju sa oligosaharida $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-Asn jednu po jednu terminalnu glukozu, a zatim ER α-manozidaza odcijepi i jednu manozu; nastaje $Man_8GlcNAc_2$-Asn glikoprotein koji sekretornim putem odlazi u *cis*-Golgijev aparat (Slika 1.7.).

Uklanjanje zadnje glukoze povezano je sa regulacijom pravilnog smatanja (*eng*. folding) nekih proteina: ukoliko protein nema pravilnu konformaciju iza uklanjanja terminalne glukoze, α-glukoziltransferaza iz lumena ER ga prepoznaje i dodaje jednu glukozu, a glukozidaza je kasnije, nakon pravilnog namatanja, odcjepljuje. Glukoziltransferaza i glukozidaza djeluju koordinirano na glikan sve dok glikoprotein ne zauzme pravilnu konformaciju.

U regulaciji smatanja sudjeluju i pratitelji (*eng*. chaperones) lektini kalneksin (vezan uz membranu ER) i kalretikulin (otopljen u lumenu ER). Oni prepoznaju svaki svoj set glikoproteina (Pieren i sur. 2005) koji još nisu dobili funkcionalnu konformaciju i zadržavaju ih u ER, tako što se vežu na njihovu terminalnu glukozu (prepoznaju samo monoglukozilirane N-glikane). Na taj način sprječavaju nepravilnu i preuranjenu oligomerizaciju te osiguravaju pravilno smatanje proteina u ER (Alberts i sur. 2002; Varki i sur. 1999). Tek kada se ukloni zadnja glukoza, a protein zauzme pravilnu konformaciju, glikoprotein može nastaviti u *cis*-Golgi. Neki proteini zahtijevaju N-glikozilaciju za pravilno smatanje u ER, dok drugi imaju mehanizme koji obično ne uključuju ugljikohidrate. Proteini s nepravilnom konformacijom koji ne prođu kvalitativnu kontrolu kalneksin/kalretikulin translociraju se natrag u citosol radi proteosomalne degradacije, u procesu zvanom ERAD (*eng*. ER associated degradation, degradacija vezana uz ER) (Kato i Kamiya 2007; Trombetta 2003).

Završni koraci biosinteze glikoproteina (terminalna glikozilacija) odvijaju se u lumenu Golgijeva tijela (Slika 1.7.). Prvo Golgi α-manozidaza I sa $Man_8GlcNAc_2$-Asn odcijepi tri manoze; nastaje visoko-manozna struktura $Man_5GlcNAc_2$-Asn koja postaje supstrat za diverzifikaciju, odnosno može se dalje procesirati u kompleksni tip glikana vezanjem dodatnih šećera. Na visoko-manozni glikan N-acetilglukozaminiltransferaza I dodaje jedan GlcNAc, a to omogućuje Golgi manozidazi II da makne dvije manoze.

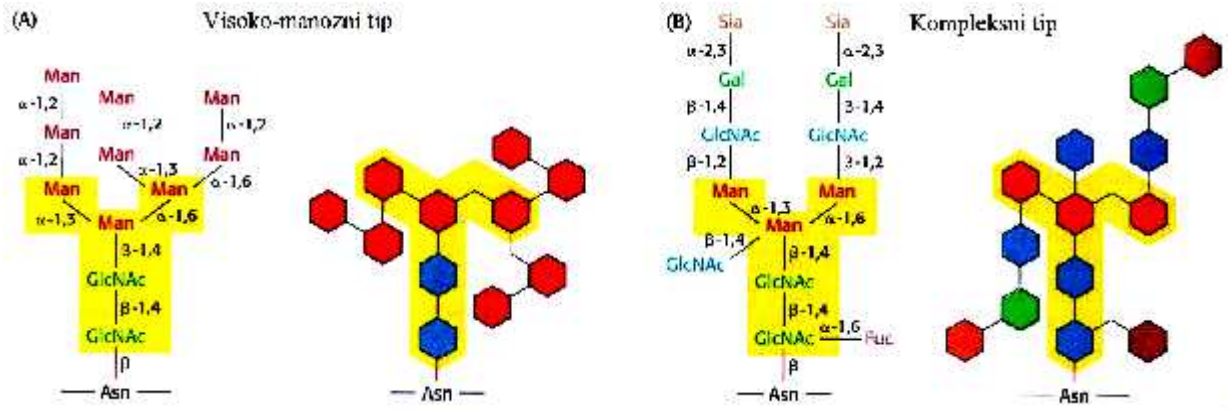


Slika 1.7. Procesiranje oligosaharida u ER i Golgijevu aparatu je visoko uređeni proces, svaki idući korak ovisi o prethodnom. Procesiranje počinje u ER uklanjanjem tri Glc i jedne Man sa oligosaharida prenesenog na protein. Ostali koraci događaju se u Golgiju. Odcjepljuju se tri Man što stvara visoko-manozni tip. Daljnjim doradama nastaje kompleksni oligosaharid razgranate strukture. Donori monosaharida u Golgiju su aktivirani nukleotid-šećeri (UDP-GlcNAc, UDP-Gal, CMP-Sia). (Prilagođeno prema Alberts i sur. 2002)

Produkt ovih sekvencijalnih reakcija je $GlcNAc_1Man_3GlcNAc_2$-Asn koji sadržava finalnu jezgru od tri manoze prisutnu u svim kompleksnim tipovima glikana. Dalje se na tu strukturu mogu vezati GlcNAc, galaktoza (Gal) i sijalinska kiselina (Sia) te stvoriti kompleksni oligosaharid razgranate strukture. Nakon terminalne glikozilacije, gotovi glikoproteini odlaze iz Golgija u lizosome, sekretorne granule ili postaju dio plazmatske membrane, čime njihovi N-glikani postaju ekstracelularne komponente (Alberts i sur. 2002).

Tipovi N-glikana

Ekstracelularni N-glikani eukariota u Golgiju se izgrađuju u jedan od tri podtipa N-glikana: visoko-manozni, hibridni ili kompleksni tip (Slika 1.8.). Visoko-manozni tip ima pet do devet manoza vezanih na osnovicu -$GlcNAc_2$-Asn ($Man_{9-5}GlcNAc_2$-Asn). Kompleksni N-glikani na obje α3- i α6-vezane manoze vežu N-acetilglukozamin ($GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$-Asn), a na osnovicu -$GlcNAc_2$-Asn može biti vezana i fukoza (Fuc). Hibridni tip je kombinacija prethodna dva: na manoze ($Man_5GlcNAc_2$-Asn) može i ne mora biti vezan GlcNAc, na osnovici isto vrijedi za fukozu. Način na koji su različiti tipovi oligosaharida povezani sa svojom funkcijom i konačnim odredištem u stanici nije još u potpunosti razjašnjen; primjerice, glikoproteini u lizosomima većinom su visoko-manoznog tipa, a ekstracelularni proteini većinom su kompleksnog tipa.



Slika 1.8. Podtipovi N-vezanih oligosaharida. Pentasaharidna jezgra (zasjenjena žuto) zajednička je svim N-vezanim oligosaharidima i služi kao temelj za stvaranje širokog spektra N-glikana, od kojih su dva ilustrirana (simbolima i shematski): (A) visoko-manozni tip; (B) kompleksni tip. Plavo: GlcNAc; crveno: Man; zeleno: Gal; smeđe: Sia. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

Koji tip N-glikana će nastati na kraju u *trans*-Golgiju ovisi o više faktora: metabolizmu monosaharida u stanici, prometu glikoproteina kroz ER i Golgi, te o sekvenci i konformaciji proteina koji se glikozilira. Jedan od važnih faktora je lokalizacija različitih glikoziltransferaza i glikozidaza duž lumena ER i Golgijeva tijela koje su u kompeticiji za glikan dok glikoprotein prolazi tim organelima. Prema tome, različita ekspresija tih enzima i njihovih regulacija rezultira različitim repertoarom N-glikana u određenom staničnom tipu i događaju (embriogenezi, morfogenezi, aktivaciji stanica, ulasku u stanični ciklus, transformaciji onkogenima) (Varki i sur. 1999).

Unatoč različitostima, svi N-glikozilirani proteini eukariota imaju istu pentasaharidnu jezgru (od dva GlcNAc i tri Man) vezanu na asparaginske ostatke proteina (Slika 1.8.), što upućuje na visoku konzerviranost početnih koraka N-glikozilacije, odnosno gena i njihovih proteinskih produkata koji u tim reakcijama sudjeluju (Stryer i sur. 2003).

1.1.2.2. O-glikozilacija

O-glikozilacijom nastaju u Golgijevom tijelu O-vezani glikoproteini kod kojih je glikan obično preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc) (Slika 1.9.), manoze ili ksiloze vezan na hidroksilnu grupu serina ili treonina u peptidu (GalNAc-(α)-Ser/Thr; Man-(α)-Ser/Thr; Xyl-(β)-Ser). Biosinteza O-glikana jednostavnija je od one N-glikana po tome što se ne stvara lipid-vezani oligosaharidni prekursor koji se prenosi na protein, ali stvaranje kompleksnih razgranatih struktura upućuje da je ovaj biosintetski put također složen.



Slika 1.9. O-glikozidna veza (crvena linija) između C1-atoma ugljikohidrata N-acetilgalaktozamina i O-atoma bočnog lanca serina u proteinu. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

U slučaju vezanja preko GalNAc, reakcije izravnog vezanja (sa UDP-GalNAc) na peptid kataliziraju peptidne GalNAc-transferaze (GalNAcT). O-αGalNAc vezane glikane nalazimo većinom na sekretornim ili vezanim mucinima epitelnih stanica (česti u probavnom sustavu) gdje služe kao lubrikanti i zaštita od patogena. O-manoza vezani glikani vežu se na protein sa donora Dol-P-Man pomoću kompleksa manoziltransferaze; oko trećina svih O-vezanih glikanskih lanaca u mozgu su vezani na proteine preko O-manoze. O-ksiloza vezani glikani poznati su kao glikozaminoglikani – heparan sulfat, heparin, hondroitin sulfat i dermatan sulfat; oni imaju ulogu u očuvanju integriteta stanica i koreceptori su za neke faktore rasta (Freeze 2006).

Funkcije O-glikana imaju jedinstvene uloge u mnogim fiziološkim sustavima i vrlo su zanimljive: imaju važnu ulogu u stvaranju antigena ABO krvnih grupa; u imunološkom odgovoru i funkciji limfocita; posreduju vezanje spermija na zonu pellucidu jajne stanice; štite epitelne stanice u crijevima i usnoj šupljini od prodora patogena, zube štite od demineralizacije organskim kiselinama. Neki O-glikani mucin-tipa sprječavaju smrzavanje živog tkiva (kod antarktičkih riba) (Varki i sur. 1999).

Osim O-(α)-vezanog GalNAc, postoje i drugi tipovi O-glikozilacije serina ili treonina u peptidu. Dugo vremena mislilo se da se glikoziliraju samo proteini koji prolaze kroz sekretorni put (endoplazmatski retikul i Golgijev aparat), no danas se zna se glikozilacija proteina događa i u citoplazmi i jezgri. Zapravo, mnogi unutarstanični proteini imaju O-(β)-vezan GlcNAc: proteini u jezgrinim porama (nukleoporini), RNA polimeraza II i transkripcijski faktori, citoskeletni proteini (Hanover 2001), tumor supresori i onkogeni, viralni proteini, fosfataze i kinaze, proteini toplinskog stresa (*eng*. heat shock proteins) (Hart i sur. 1989).

1.2. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE

Urođeni poremećaji glikozilacije (*eng*. congenital disorders of glycosylation, CDGs) predstavljaju veliku skupinu nasljednih autosomno recesivnih metaboličkih poremećaja. Osnovni uzroci poremećaja su točkaste mutacije gena uključenih u biosintetski put N-vezanih glikana, a očituju se u obliku potpuno ili djelomice nedostatne glikozilacije glikoproteina i drugih glikokonjugata. Hipoglikozilirani glikoproteini gube svoje funkcije koje im inače određuje vezana glikanska komponenta. Budući glikokonjugati imaju mnoge ključne uloge u metabolizmu - u staničnom prepoznavanju i adheziji, migraciji stanica, otpornosti na proteaze, obrani stanica od patogena, antigenom odgovoru i drugo, očito je da će abnormalna glikozilacija glikoproteina rezultirati različitim i obično teškim multisistemskim poremećajima kod bolesnika sa CDG. Stoga ne iznenađuje činjenica da sindromi CDG spadaju među najkompleksnije metaboličke bolesti koje poznajemo (Jaeken i Carchon 1993).

Oboljeli od CDG razvijaju najčešće teške neurološke, psihomotorne i razvojne poremećaje koji se javljaju od najranije životne dobi, no postoje i blaži oblici. Pretpostavlja se da je velik broj oboljelih od CDG zapravo neotkriven ili pogrešno dijagnosticiran, zahvaljujući upravo širokom spektru raznovrsnih simptoma koji se nekad poklapaju sa nekim drugim bolestima te u nekoj mjeri i nedovoljnoj upućenosti liječnika u ovaj poremećaj. Do danas je otkriveno oko tisuću bolesnika oboljelih od CDG diljem svijeta (Freeze 2006).

Naziv urođeni poremećaji glikozilacije ili CDG uveden je 1999. godine (First International Workshop on CDGS, Leuven, Belgija) kako bi okupio ovu sve širu skupinu poremećaja koji su se do tada nazivali sindromima ugljikohidrat-deficijentnih glikoproteina (*eng*. carbohydrate deficient glycoprotein syndromes, također kratica CDG) (Freeze 2006).

Prema klasifikaciji CDG se dijele na dvije grupe: CDG tip I (CDG-I) i CDG tip II (CDG-II). CDG-I skupina obuhvaća poremećaje u sastavljanju oligosaharidnog prekursora vezanog na dolikol pirofosfat na membrani ER i/ili defekte u njegovom prijenosu na protein; u ove je reakcije uključeno oko 30 gena (njihovih produkata). Trenutno grupa CDG-I broji 14 podtipova koji se obilježavaju CDG-Ia do CDG-In. Mala slova abecede označavaju različite podtipove u kronološkom slijedu otkrića defektnog gena. Skupina CDG-II uključuje poremećaje u procesiranju N-vezanih glikana na glikoproteinu, što zahtijeva sudjelovanje još oko 20 gena. Do sada je utvrđeno 8 podtipova, CDG-IIa do CDG-IIh. Postoji i skupina urođenih poremećaja glikozilacije kojima još nije utvrđen uzrok te se oni sve do utvrđivanja točnog genetskog defekta obilježavaju kao CDG-x (Freeze 2001; Grünewald i Matthijs 2000; Marklová i Albahri 2007).

Ovakav sustav klasifikacije CDG nije zasigurno sveobuhvatan: iako je mnogo novih podtipova CDG-I i CDG-II otkriveno u zadnjih desetak godina, vrlo je vjerojatno otkrivanje novih zbog velikog broja gena uključenih u glikozilacijske procese. Trenutno je identificirano gotovo 30 defektnih gena koji uzrokuju poremećenu glikozilaciju proteina (Freeze 2006). Osim toga, ova klasifikacija ne obuhvaća važne poremećaje biosinteze O-vezanih glikana, proteoglikana ili glikozil fosfatidilinozitolnih sidra (Freeze 2001); u najnovije vrijeme CDG skupina proširila i na poremećaje u O-glikozilaciji, ali u kombinaciji sa N-glikozilacijskim defektima (CDG tipovi IIc, IIe/Cog7, IIf, IIg/Cog1 i IIh/Cog8) (Marklová i Albahri 2007).

Klasifikacija sindroma CDG odnosi se dakle samo na poremećaje N-glikozilacije, iako urođeni poremećaji glikozilacije obuhvaćaju i N- i O-glikozilacijske putove biosinteze glikokonjugata. Kod ljudi, većinu CDG čine N-glikozilacijski poremećaji, dok je O-glikozilacijskih poremećaja poznato svega nekoliko slučajeva (Jaeken 2003). Do danas su identificirana ukupno 22 poremećaja N-glikozilacije, od čega je 14 uzrokovano poremećenom biosintezom glikana prije prijenosa na protein (CDG-Ia-In), a 8 poremećenim procesiranjem glikana nakon prijenosa na protein (CDG-IIa-IIh). Također, otkrivena su i četiri poremećaja O-glikozilacije: dva su posljedica poremećene sinteze O-ksilozilglikana, a druga dva poremećene sinteze O-manozilglikana.

Prvi slučaj CDG otkrio je belgijski liječnik Jaak Jaeken 1980. godine tijekom liječenja 19-mjesečnih jednojajčanih blizanki sa psihomotornom retardacijom i celebelarnom hipoplazijom, ali nepoznatom etiologijom same bolesti. U njihovoj krvi otkrio je specifične abnormalnosti proteina poput snižene razine globulina koji veže tiroksin i povećane aktivnosti arilsulfataze A (Jaeken 2003). No, tek nakon četiri godine Jaeken je zaključio da je bolest povezana sa N-glikozilacijom serumskih proteina, uz pomoć tada nove metode izoelektričnog fokusiranja serumskog transferina (*eng*. isoelectric focusing, IEF) uočio je da serumski transferin kod ovih bolesnica pokazuje katodni pomak zbog nedostatka sijalinske kiseline. To je bilo ključno zapažanje koje je ujedno postavilo metodu IEF kao temeljnu u detekciji poremećaja N-glikozilacije povezanih sa nedostatkom sijalinske kiseline (Jaeken 2003). Nakon 15 godina od kliničkog opisa bolesti, Van Schaftingen i Jaeken (1995) zaključili su da je u ovom slučaju uzrok abnormalne glikozilacije proteina smanjena aktivnost enzima fosfomanomutaze 2, a gen *PMM2* koji enzim eksprimira utvrđen je 1997. godine (Matthijs i sur. 1997). Ovaj prvi otkriveni poremećaj N-glikozilacije, koji se nekada nazivao i Jaekenovim sindromom, obilježen je danas kao CDG-Ia.

Simptomi CDG su vrlo raznoliki, što je posljedica poremećaja svestranih funkcija glikoproteina u čitavom ljudskom tijelu. Primjerice, najučestaliji CDG, CDG-Ia (poglavlje 1.2.3.), pogađa živčani sustav i mnoge druge organe te se manifestira većinom vrlo teškim simptomima poput psihomotorne retardacije i neuroloških poremećaja. Za razliku od ovog sindroma, CDG-Ib na

primjer, ima puno blaži fenotip i ne pokazuje neurološke nego hepato-intestinalne poremećaje i za sada je jedini oblik CDG koji se može liječiti oralnom primjenom manoze (Niehues i sur. 1998). Svi do sada dijagnosticirani oblici CDG-I opisani su u poglavlju 1.2.2.

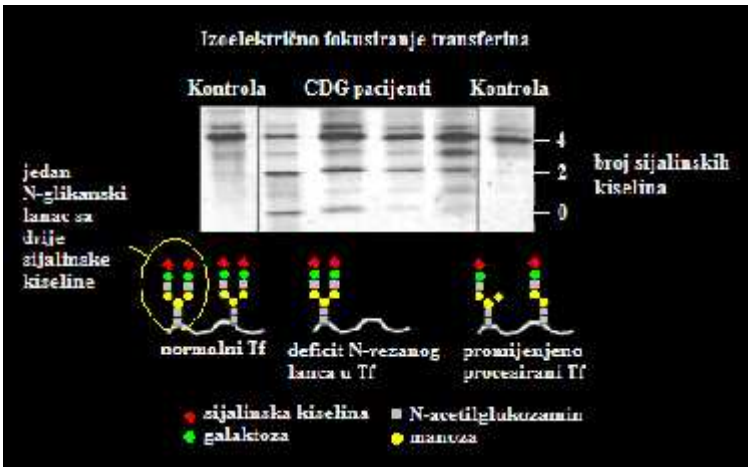
Simptomi CDG tipa II (poglavlje 1.2.4.) slični su onima CDG-I, uključuju također mentalnu retardaciju, poremećaje u razvoju, epilepsiju i drugo. Bolesti koje se tiču poremećaja u O-glikozilaciji očituju se uglavnom mišićnom distrofijom, abnormalnostima u strukturi oka, moždanim malformacijama i psihomotornom retardacijom. Defekti sinteze O-ksilozilglikana manifestiraju se kao progeroidna varijanta Ehlers-Danlos sindroma i multipli egzostozni sindrom, a defekti sinteze O-manozilglikana kao Walker-Warburg sindrom i mišićno-očna-moždana bolest (Jaeken 2003).

1.2.1. DIJAGNOSTIKA CDG

Kod CDG, poremećena glikozilacija glikoproteina rezultira ili potpunim nedostatkom glikanskih lanaca (CDG-I) ili njihovom abnormalnom strukturom (CDG-II), što se biokemijskim testovima može utvrditi. CDG se identificiraju najviše analizom stupnja glikozilacije transferina (Tf), glikoproteina (iz jetre) kojega ima mnogo u serumu krvi. Njegove abnormalne glikoforme sa manjkom glikana služe kao biokemijski markeri za dijagnostiku CDG. Analize se mogu obaviti raznim metodama, a izoelektrično fokusiranje (IEF) serumskog transferina i danas je najčešća metoda za preliminarnu dijagnozu CDG. CDG-Ia biokemijski je prvi CDG identificiran pomoću metode IEF (Jaeken 2003). No, neki tipovi CDG ne mogu se otkriti na ovaj način te je potrebno primijeniti i druge metode, poput IEF plazmatskog proteina ApoC-III. Ovom kombinacijom mogu se otkriti poremećaji u N- i O-glikozilacijskim putevima.

Analiza serumskog Tf metodom IEF kod dijagnostike CDG temelji se na prisutnosti određenog broja sijalinskih kiselina. Normalni Tf ima četiri negativno nabijene sijalinske kiseline (po dvije vezane na svaki od dva N-glikanska lanca transferina) te se naziva tetrasijalotransferin; njegova izoelektrična točka je pri pH 5,4. Kod poremećaja N-glikozilacije, elektroforetski obrazac IEF pokazuje katodni pomak sijalotransferina na dva osnovna načina (Slika 1.10.). Obrazac tipa 1 (kod CDG-I) pokazuje povećanje glikoformi Tf kojima nedostaje jedan (disijalotransferin, izoelektrična točka pri pH 5,7) ili oba (asijalotransferin, pri pH 5,9) N-glikanska lanca. Elektroforetski obrazac tipa 2 (kod CDG-II) pokazuje povećanje trisijalotransferina (pri pH 5,6) i monosijalotransferina (pri pH

5,8), ukazujući na prisustvo «krnjih» glikana, to jest na defekt u njihovom procesiranju (Stibler i Jaeken 1990).



Slika 1.10. Izoelektrično fokusiranje serumskog Tf kod zdravih osoba (kontrole) i oboljelih od CDG. Vrpce Tf kod kontrole pokazuju dominantni tetrasijalotransferin (normalni Tf), prikazan shematski dolje lijevo (na oba N-glikanska lanca vezane po dvije sijalinske kiseline). Obrazac Tf specifičan za CDG-I pokazuje povećanje disijalo- i asijalotransferina, uslijed nedostatka jednog ili oba N-glikanska lanca; prikazan je shematski u sredini dolje. Kod CDG-II obrazac Tf ima povećanje trisijalo- i monosijalotransferina zbog nedostatka jedne ili tri sijalinske kiseline. Shematski prikaz dolje desno pokazuje da disijalotransferin može nastati i drugim mutacijama koje uzrokuju abnormalno procesiranje N-glikana. (Prilagođeno prema Freeze 2001)

Iako je metoda IEF serumskog Tf i danas prvi izbor probira (*eng*. screening) za dijagnozu CDG, postoje određeni problemi. Naime, stanja poput alkoholizma, nekontrolirane galaktozemije i netolerancije na fruktozu također mijenjaju glikozilaciju serumskog Tf. Analiza IEF antitripsina (AAT) kod potvrđenih CDG-Ia bolesnika starih nekoliko tjedana pokazuje katodni pomak za serumski AAT (iz jetre), ali ne i za AAT iz fibroblasta, što ukazuje da je za ranu dijagnostiku CDG-Ia bolje vršiti IEF transferina (Dupré i sur. 2000). Osim toga, ne pokazuju svi tipovi CDG katodni pomak Tf pri IEF, primjerice CDG-IIb, CDG-IIc i CDG-IIf (Freeze 2006). U tom slučaju, potrebna je primjena drugih dijagnostičkih metoda i detaljna molekularna analiza gena.

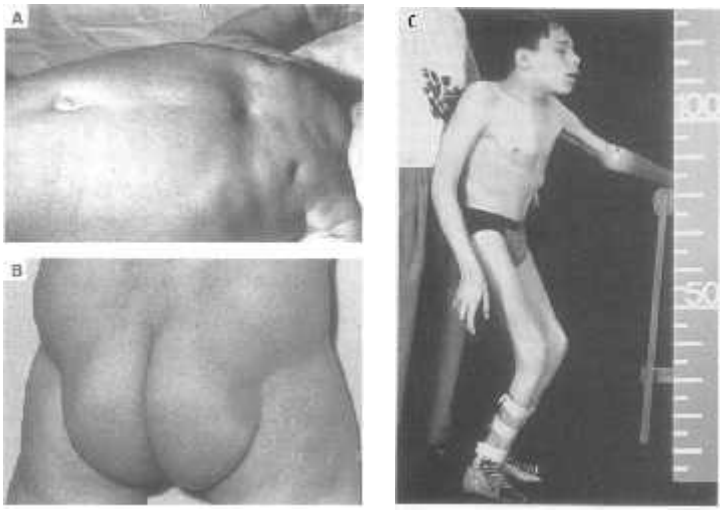
Druge metode za dijagnostiku CDG razvijene su zbog činjenice da IEF Tf razdvaja glikoforme na temelju ukupnog negativnog naboja molekule, iz čega se ne vidi kako je točno strukturno promijenjen glikanski lanac, niti gdje je defekt u biosintetskom putu. Metoda masene spektrometrije (MS) otkrila je 1992. godine da je defekt CDG-I u ranom putu glikozilacije. Danas je MS vrlo osjetljiva metoda sa centralnom ulogom u laboratorijskoj dijagnozi CDG-I (Wada 2006), u kombinaciji sa elektrosprej-ionizacijom (*eng*. electrospray ionisation - mass spectroscopy, ESI-MS) i

laserskom desorpcijom/ionizacijom potpomognutom matriksom (*eng*. matrix-assisted laser desorption/ionisation - mass spectroscopy, MALDI-MS). Ostale metode za probir CDG također su vrlo osjetljive i brze, omogućuju automatizaciju analize i mogu detektirati defekte u strukturi glikanskih lanaca i koraku glikozilacijskog puta. Primjerice, osjetljivost denaturirajuće visoko-tlačne tekuće kromatografije (*eng*. denaturating high-pressure liquid chromatography, DHPLC) je gotovo 100% u detekciji mutacija gena vezanih uz nastanak CDG (Schollen 2002). U svojim istraživanjima Butler i sur. (2003) detaljnom su analizom povezali abnormalne strukture glikana (serumskih glikoproteina oboljelih od CDG) sa specifičnim defektima u koracima glikozilacijskog puta, koristeći se metodama MALDI-MS i HPLC (*eng*. high-pressure liquid chromatography).

1.2.2. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE TIPA I (CDG-I)

Poremećaji koji uzrokuju defektnu N-biosintezu oligosaharidnog prekursora na dolikol pirofosfatu na membrani ER i/ili defektan prijenos istog na protein, svrstavaju se u grupu CDG tipa I (Grünewald i Matthijs 2000). No, posljedica ovih poremećaja je da uslijed smanjene glikozilacije nastaju defektni glikoproteini sa hipoglikoziliranim mjestima. Po tome bi se dalo pretpostaviti da bi svi oboljeli od CDG-I trebali imati sličan fenotip, no to nije slučaj. Upravo suprotno, za skupinu CDG-I karakteristični su mnogi različiti simptomi, što predstavlja poteškoću pri dijagnozi bolesti.

CDG-I je multisistemska bolest koja zahvaća razne tjelesne sustave i organe. Oboljeli već u najranoj dobi pokazuju umjerene do teške neurološke poremećaje, karakteristične dismorfije tijela i zaostajanje u razvoju. Bolesnici imaju donekle različite prezentacije sindroma prema starosnoj dobi. U neonatalno doba najizraženije su neurološke abnormalnosti (poglavito aksijalna hipotonija, psihomotorna retardacija, abnormalni pokreti očiju, strabizam i hiporefleksija), razne dismorfije (najtipičniji su abnormalna distribucija adipoznog tkiva: na stražnjici, trbuhu, debele ruke i stopala, izgled «narančine kore», te retrakcija bradavica, Slika 1.11.) i poteškoće u hranjenju koje onemogućuju normalno napredovanje i rast.



Slika 1.11. Tipične značajke sindroma CDG-I kod novorođenčadi: A) invertirane bradavice, B) abnormalna distribucija adipoznog tkiva (Iz Jaeken i sur. 1997). C) dječak (16 godina) sa naglašenom dismorfijom tijela (Iz Stibler i sur. 1994).

Nakon neonatalnog doba neurološki poremećaji postaju dominantni. Starija djeca razvijaju izraženu psihomotornu retardaciju, celebelarnu ataksiju i perifernu neuropatiju. Mentalna retardacija prisutna je kod svih CDG-I podtipova, osim CDG-Ib, sa kvocijentom inteligencije uglavnom između 40 i 60. Vrlo često razvija se retinis pigmentosa i epilepsija. Od ostalih simptoma kod bolesnika prisutna je atrofija i kontrakcija udova, posebice nogu, te deformacije toraksa. Javlja se i hipogonadizam, pogotovo u ženskih bolesnika, poremećaji koagulacije i razne infekcije. Analize glikoproteinskih hormona poput TSH (folikul stimulirajući hormon) otkrivaju da su hipoglikozilirani, ali im biološka uloga nije narušena, jer je kod oboljelih od CDG-I funkcija štitnjače normalna (Ferrari i sur. 2001).

Bolest često zahvaća više organa u obliku insuficijencije jetre, bubrega, srca i drugih organa. Upravo kao posljedica teških infekcija, poremećaja u radu srca i insuficijencije jetre, kod oboljelih od CDG-I smrtnost je oko 20% i to poglavito do šeste godine života (de Lonlay i sur. 2001; Jaeken i Carchon 1993; Jaeken i sur. 1997; Schachter 2001; Stibler i sur. 1994).

Najučestaliji oblik CDG-I jest CDG-Ia; čak 70% oboljelih spada u tu skupinu. Ostali tipovi CDG-I relativno su rijetki; nekih tipova CDG-I otkriveno je svega nekoliko slučajeva. Sindrom CDG-Ia opisan je pobliže u poglavlju 1.2.3., a za ostale tipove CDG-I poznato je sljedeće:

CDG-Ib

Sindrom CDG-Ib uzrokovan je mutacijama u genu *PMI*, što rezultira nedostatnom funkcijom enzima fosfomanoza izomeraze (PMI). Taj enzim katalizira konverziju fruktoza-6-fosfata u manoza-6-fosfat u citosolu, opskrbljujući na taj način stanicu derivatima D-manoze, poput GDP-Man i Dol-P-Man koji sudjeluju u sintezi lipid-vezanog oligosaharidnog (LLO) prekursora. Iako PMI katalizira reakciju koja je jedan korak ispred reakcije koju katalizira PMM2 (konverzija manoza-6-fosfata u manoza-1-fosfat; deficit PMM2 uzrokuje CDG-Ia), klinička slika ove bolesti bitno je drukčija od CDG-Ia. Klasični simptomi CDG-Ib vezani su uz hepato-intestinalne probleme; javlja s enteropatija sa gubitkom proteina, urođena fibroza jetre, ali i koagulopatija, povraćanje i hipoglikemija. Vrlo je bitna rana dijagnoza bolesti, jer je ovaj oblik CDG za sada jedini lječiv i to oralnom primjenom manoze (Niehues i sur. 1998). Bolesnici ne pokazuju neurološke poremećaje; nema mentalne retardacije, neuropatije ili ataksije. Sindrom CDG-Ib otkriven je 1998. godine gotovo istovremeno od strane dvije grupe istraživača (Jaeken i sur. 1998; Niehues i sur. 1998), a do 2005. godine bilo je poznato oko 20 oboljelih od CDG-Ib u svijetu (Sparks i Krasnewich 2005a).

CDG-Ic

Ovaj poremećaj otkriven je također 1998. godine (Körner i sur. 1998), a poznato je oko 30-ak oboljelih (Jaeken 2003). CDG-Ic je drugi je po učestalosti od svih poznatih sindroma CDG. Mutacije u humanom genu *ALG6* uzrokuju deficit u aktivnosti enzima α1-3 glukoziltransferaze koji sa citosolne strane ER dodaje prvu glukozu sa Dol-P-Glc na $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol. Nastaju neglukozilirani LLO prekursori koji se nakupljaju se u stanici jer su slabi supstrati za OST kompleks (Schachter 2001). Najučestalije mutacije koje pogađaju gen *ALG6* su teške mutacije Y131H i A333V (pogađa više od polovine oboljelih od CDG-Ic) (Westphal i sur. 2003). Klinički, simptomi CDG-Ic slični su blažim simptomima CDG-Ia: pacijenti su mentalno retardirani i imaju napade, no nema celebelarne hipoplazije, strabizma i tipične dismorfije tijela (uvrnute bradavice i abnormalno odlaganje masnog tkiva) (Freeze 2001).

CDG-Id

Do danas je utvrđeno svega četiri slučaja poremećene aktivnosti enzima α1-3 manoziltransferaze, uzrokovane mutacijama u humanom genu *ALG3*, iako je klinički bolest uočena još 1995. godine. Oboljeli pokazuju posebno teške neurološke sindrome sa gotovo odsutnim psihomotornim razvojem, postnatalnom mikrocefalijom, epilepsijom, očnom atrofijom te atrofijom mozga i corpus callosuma (Denecke i sur. 2005). Enzim α1-3 manoziltransferaza u lumenu ER katalizira prijenos manoze sa Dol-P-Man na $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol, oblik koji se kod defektne funkcije enzima nakuplja u

fibroblastima oboljelih (Körner i sur. 1999). Budući se ipak stvara LLO u punoj duljini, mutacije u genu *ALG3* ne ukidaju u potpunosti aktivnost enzima (na primjer, mutacija G118D) (Schachter 2001). Obrazac IEF serumskog transferina pokazuje povećanje disijalotransferina, a povećanja asijalotransferina nema (Jaeken 2003).

CDG-Ie

Bolest uzrokuje defektna funkcija katalitičke podjedinice Dol-P-Man sintaza-1 (GDP-Man:Dol-P manoziltransferaza) koju eksprimira gen *DPM1*. Kod dvoje oboljelih otkrivene su u tom genu mutacije R92G i 628delC (Imbach i sur. 2000). Slično kao i kod CDG-Id, nakuplja se $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol u fibroblastima te IEF serumskog transferina pokazuje sličan uzorak. Do danas je otkriveno pet pacijenata. Klinička slika sindroma pokazuje teške neurološke poremećaje, uglavnom psihomotornu retardaciju, epilepsiju i mikrocefaliju (Jaeken 2003).

CDG-If

Ovaj sindrom uzrokovan je nedostatnom aktivnošću proteina lec35, koji ima važnu ulogu u iskorištavanju Dol-P-Man i Dol-P-Glc. Mutacijama pogođeni gen je *MPDU1* (Kranz i sur. 2001). U fibroblastima oboljelih nakuplja se $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol i $Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol sa malo glukoziliranih oblika, što govori da je nedostatak proteina lec35 kompenziran nekim drugim putem (Schachter 2001). Bolesnici pokazuju tešku encefalopatiju, mišićnu hipotoniju, očnu atrofiju, česte napade i celebelarnu atrofiju (Freeze 2001).

CDG-Ig

Kod ovog sindroma deficit enzima manoziltransferaze VIII (Dol-P-Man:$Man_7GlcNAc_2$-PP-Dol α-6-manoziltransferaza) onemogućuje prijenos zadnje manoze na $Man_7GlcNAc_2$-PP-Dol prekursor. Poremećaj je uzrokovan mutacijama u humanom genu *ALG12*, poput mutacije c.571T>G (F142V) (Chantret i sur. 2002). Do sada su otkrivena tri pacijenta sa CDG-Ig koja pokazuju dismorfiju lica, hipotoniju, psihomotornu retardaciju i progresivnu mikrocefaliju (Jaeken 2003).

CDG-Ih

CDG-Ih je uzrokovan mutacijama u humanom genu *ALG8* koji eksprimira enzim glukoziltransferazu II (Dol-P-Glc:Glc_1-Man_9-$GlcNAc_2$-PP-Dol glukoziltransferaza). Taj enzim dodaje u lumenu ER drugu po redu glukozu na rastući LLO. Pri poremećenoj funkciji enzima u fibroblastima bolesnika nakuplja se $Glc_1Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol (Chantret i sur. 2003). Oboljeli pokazuju simptome slične

onima CDG-Ib: enteropatiju, hepatomegaliju, hipoalbuminemiju, edeme te također ne pokazuju neurološke poremećaje (Jaeken 2003).

CDG-Ii

Oboljeli od CDG-Ii rađaju se kao normalna novorođenčad. No, kroz nekoliko mjeseci ili kasnije razvijaju sljedeće simptome: hepatomegaliju, hipomijelinizaciju, mentalnu retardaciju, zaostajanje u razvoju, iris colobomas, koagulopatije. Bolest je uzrokovana mutacijama u humanom genu *ALG2* koji eksprimira manoziltransferazu II (GDPMan:Man_1-$GlcNAc_2$-PP-Dol manoziltranferaza). Ovo je prvi otkriveni poremećaj glikoziltransferaze koja sa citosolne strane ER dodaje drugu po redu manozu sa GDP-manoze na rastući LLO prekursor (Thiel i sur. 2003).

CDG-Ij

Sindrom CDG-Ij posljedica je mutacija u humanom genu *DPAGT1* koji eksprimira enzim UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-1-P transferazu (GPT). GPT u početnim koracima N-glikozilacije prenosi drugi po redu GlcNAc sa UDP-GlcNAc na rastući LLO. Do danas je otkriven samo jedan bolesnik koji je pokazivao tešku mentalnu retardaciju, napade, mikrocefaliju, hipotoniju i egzotropiju. Utvrđena je mutacija c.660A>G (Y170C) u visoko očuvanoj domeni gena *DPAGT1* (Wu i sur. 2003).

CDG-Ik

CDG-Ik je uzrokovan mutacijama u humanom genu *ALG1* koji eksprimira enzim manoziltransferazu I (GDPMan:$GlcNAc_2$-PP-Dol manoziltransferaza); enzim u citosolu dodaju prvu manozu na Dol-PP-vezani oligosaharidni prekursor. Do danas su otkrivena dva oboljela koja su umrla u ranom djetinjstvu. Njihova klinička slika pokazivala je tešku psihomotornu retardaciju, stečenu mikrocefaliju, hipotoniju, napade, kardiomiopatiju, koagulopatiju i povišenu temperaturu. Kod pacijenta je otkrivena homozigotna mutacija c.773C>T (S258L) (Schwarz i sur. 2004).

CDG-IL

Klinička slika ovog sindroma slična je prethodno opisanima: prisutni su ozbiljna mikrocefalija, napadi, hipotonija i hepatomegalija. Bolest je uzrokovana mutacijama (poput E523K) u humanom genu *ALG9* koji eksprimira enzim α1,2-manoziltransferazu Dol-P-Man:Man_6- i Man_8-$GlcNAc_2$-PP-Dol manoziltransferaza. Enzim u lumenu ER dodaje sedmu i devetu manozu na rastući LLO prekursor (Frank i sur. 2004).

CDG-Im

Ovaj nedavno otkriveni poremećaj uzrokovan je mutacijama u humanom genu *DK1* koji eksprimira enzim dolikol kinazu (DK1). Taj je enzim bitan u zadnjem koraku *de novo* biosinteze dolikol fosfata koji pak sudjeluje u raznim reakcijama glikozilacije, poput N-glikozilacije, C- i O-manozilacije te biosinteze glikozil fosfatidilinozitolnih sidra. Poremećaj je svrstan u skupinu CDG-I budući se deficijencija dolikol kinaze može otkriti pomoću IEF serumskog transferina. Klinički simptomi ovog sindroma vrlo su teški: hipotonija, mikrocefalija, kardiomiopatija, tetraplegija, gubitak kose i hiperkeratoza. Oboljeli zbog težine bolesti umiru u vrlo ranom djetinjstvu. Utvrđene su homozigotne mutacije u genu *DK1*: c.295T>A (C99S) i c.1322A>C (Y441S) (Kranz i sur. 2007).

CDG-In

Posljednji otkriveni CDG-I je CDG-In. Kod pacijenta je utvrđena homozigotna mutacija c.199C>T (R67C) u visoko očuvanoj domeni humanog gena *RFT1* koji eksprimira protein Rft1. Taj je enzim uključen u translokaciju $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol prekursora sa citosolne u luminalnu stranu ER, a ukoliko je enzim mutiran, spomenuti nedovršeni prekursor nakuplja se u stanicama. Oboljeli je pokazivao simptome česte za skupinu CDG-I: psihomotornu retardaciju, hipotoniju, napade, zaostajanje u razvoju, hepatomegaliju i koagulopatiju (Haeuptle i sur. 2008).

1.2.3. UROĐENI POREMEĆAJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia (CDG-Ia)

Urođeni poremećaj glikozilacije tipa Ia (CDG-Ia, MIM 212065) najučestaliji je oblik urođenih poremećaja glikozilacije te čini čak 70% svih do sada otkrivenih slučajeva sindroma CDG. U svijetu je trenutno dijagnosticirano oko 500 oboljelih od CDG-Ia (Freeze 2006), iako se temeljem broja heterozigota procjenjuje da je oboljelih vjerojatno puno više (do 1/20000) (Schollen i sur. 2000). CDG-Ia je N-glikozilacijski poremećaj uzrokovan mutacijama u genu *PMM2* koji eksprimira enzim fosfomanomutazu 2. Uslijed poremećaja, mnogi serumski glikoproteini su hipoglikozilirani, čime im je narušena normalna funkcija u čitavom tijelu.

1.2.3.1. Gen *PMM2* i uloga fosfomanomutaze 2

Humani gen *PMM2* eksprimira enzim fosfomanomutazu 2 (PMM2, EC 5.4.2.8, Slika 1.12.). Taj enzim u citosolu stanice katalizira reakciju izomerizacije manoza-6-fosfata u manoza-1-fosfat, koji je pak izravni prekursor za stvaranje GDP-manoze. U početnim koracima N-glikozilacije proteina GDP-manoza je aktivirani donor manoze na rastući lipid-vezani oligosaharidni prekursor (poglavlje 1.1.2.1.). Smanjena aktivnost PMM2 uzrokovana mutacijama u genu *PMM2* reducira sadržaj manoza-1-fosfata, GDP-manoze i cjelovitog LLO prekursora u stanici pa mnogim glikoproteinima nedostaju čak cijeli lanci N-vezanih glikana.



Slika 1.12. Trodimenzionalni prikaz (pomoću vrpci) enzima fosfomanomutaze 2 (PMM2). (Preuzeto sa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)

Prvi klinički slučaj CDG-Ia dijagnosticirao je 1980. godine Jaeken i sur. Nakon što su japanski istražitelji (Yamashita i sur. 1993) pomogli otkrićem serumskih transferina sa nedostatkom čitavih N-glikanskih lanaca, Van Schaftingen i Jaeken (1995) biokemijski su utvrdili prvi poremećaj N-glikozilacije, odnosno deficijenciju enzima PMM2. Aktivnost PMM2 u fibroblastima, jetri i leukocitima oboljelih bila je ≤ 10% normalne aktivnosti, a kod njihovih zdravih roditelja (nositelja mutacija, heterozigota) 50%. Slične rezultate dobili su Körner i sur (1998) istražujući aktivnost PMM2 u fibroblastima oboljelih od CDG-Ia: smanjena aktivnost PMM2 rezultirala je smanjenjem količine manoza-1-fosfata i GDP-manoze u stanicama te prijenosom «krnjih» oligosaharida na glikoprotein.

Matthijs i sur. (1997) klonirali su drugi humani gen *PMM2* smješten na kromosomu 16p13 i utvrdili prve mutacije prisutne u tom genu. Isti grupa otkrila je ranije i homologni gen *PMM1* (kromosom 22q13) koji eksprimira izoenzim PMM1. Samo deficijencija PMM2 uzrokuje CDG-Ia. Osim toga, PMM2 se eksprimira u većini tkiva, a PMM1 ima najviše u mozgu i plućima. Funkcija proteina PMM1 nije još u potpunosti razjašnjena, ali se zna da on ne može zamijeniti funkciju

defektnog PMM2; mutacije u genu *PMM1* nisu do danas nađene kod oboljelih od CDG-Ia (Freeze, 2006). Humani PMM2 je homodimer od 60 kDa i ima 57% sličnosti sa fosfomanomutazom iz kvasca, što govori o visokoj konzerviranosti gena *PMM2* i važnosti njegove uloge u glikozilaciji (Matthijs i sur. 1997).

Mutacije u genu *PMM2*

Gen *PMM2* (MIM 601785) ima osam egzona, čija se mRNA sa 738 pb translatira u protein PMM2 od 246 aminokiselina (Kjærgaard 2004; Schollen 1998). Egzon 1 je najmanje (66 pb), a egzon 7 najveće duljine (116 pb) (Bjursell i sur. 2000). Prisutnost mutacija u genu *PMM2* potvrđena je kod svih osam egzona; mutacije su većinom nesinonimne (*eng*. missense), a prisutni su i pomaci u okviru čitanja (*eng*. frameshift) odnosno delecije jedne ili nekoliko parova baza, te besmislene mutacije (*eng*. nonsense) (Kjærgaard 2004).

U genu *PMM2* otkriveno je preko 90 mutacija koje uzrokuju povećanu termolabilnost, slab afinitet za supstrat ili potpunu deaktivaciju mutiranog enzima (Freeze 2006). Najčešća točkasta mutacija koja pogađa egzon 5 gena *PMM2* je mutacija R141H.

Mutacija R141H uzrokovana je tranzicijom CGC→CAC, odnosno heterozigotnim oblikom zamjene jedne baze G>A na položaju 422 u cDNA (c.422G>A). Ta promjena na aminokiselinskom nivou rezultira zamjenom arginina sa histidinom na položaju kodona 141, što praktički inaktivira PMM2. Mutacija R141H je teška mutacija, jer se događa u visoko očuvanoj sekvenci gena *PMM2* i rezultira zamjenom aminokiseline koja je bitna za katalitičku aktivnost enzima (Kjærgaard 2004).

Većina oboljelih od CDG-Ia su složeni heterozigoti (*eng*. compound heterozygotes) za ovu mutaciju (422G>A u kombinaciji sa drugim alelom) te se pretpostavlja da je njihov fenotip, uz nefunkcionalnu mutaciju R141H, određen ograničenom ili disfunkcionalnom ekspresijom drugog alela (Erlandson i sur. 2001). Homozigoti za mutaciju R141H do danas nisu otkriveni; pretpostavlja se da je mutacija u homozigotnom obliku letalna već u ranijoj embriogenezi (Matthijs i sur. 1998), odnosno da dovodi do pobačaja. Homozigoti za neke druge mutacije gena *PMM2* su utvrđeni.

Kod nekih mutacija, koje uzrokuju blaži oblik CDG-Ia, uočeno je da u fibroblastima postoji rezidualna aktivnost enzima ≤ 30% kontrolne (u leukocitima i jetri nije uočena), dok neke mutacije (poput R141H) inaktiviraju enzim u potpunosti (aktivnost ≤ 5% kontrolne) i dovode do teških poremećaja (Matthijs i sur. 1998). Ova ovisnost težine fenotipa bolesti i aktivnosti enzima nije potvrđena kao pravilo, jer je uočena na manjem broju bolesnika CDG-Ia (jaka povezanost genotipa i

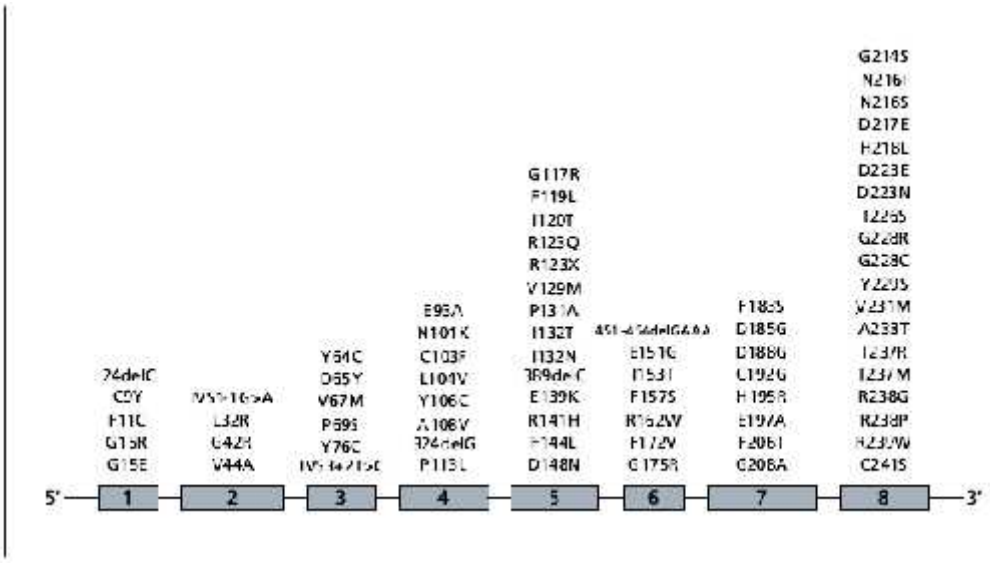
fenotipa vidljiva je u populacijama Sjeverne Europe, gdje najčešća mutacija R141H uzrokuje teški poremećaj) (Freeze 2006).

Mutacija R141H značajno smanjuje staničnu aktivnost PMM2 u usporedbi sa kontrolom; kod zdravih osoba nositelja mutacije (heterozigoti) ta je aktivnost oko 50% kontrolne, što je očito dovoljno, jer ne dovodi do razvoja simptoma CDG-Ia. Također, aktivnost PMM2 kod nositelja teške mutacije R141H je značajno manja u usporedbi sa drugim heterozigotima (nositeljima drugih mutacija) (Barnier i sur. 2002; Sparks i Krasnewich 2005b).

Druga po učestalosti, posebice u Skandinavskim zemljama (Bjursell i sur. 2000), točkasta je mutacija F119L (c.357C>A) u egzonu 5 gena *PMM2*. Često se javlja zajedno sa drugim mutacijama, no najčešća je u kombinaciji sa R141H; takav bolesnik je složeni heterozigot za F119L/R141H. Upravo je taj genotip najčešći kod oboljelih od CDG-Ia i predstavljen je teškim poremećajima (Matthijs i sur. 2000; Vuillaumier-Barrot 2000). Mutacije R141H i F119L čine čak 88% svih mutacija koje uzrokuju CDG-Ia u Danskoj populaciji (Kjærgaard i sur. 1998). Mutacija F119L je utvrđena u homozigotnom obliku, što govori da je puno blaža od mutacije R141H (Matthijs i sur. 1998). Ostale mutacije nađene u egzonima gena *PMM2* prikazane su na Slici 1.13. Najviše mutacija gena *PMM2* otkriveno je u egzonu 5 i egzonu 8.

Osim u egzonima, mutacije gena *PMM2* javljaju se i u njegovim intronskim regijama. Poznati su polimorfizmi jednog nukleotida (*eng*. single nucleotide polymorphism, SNP) nađeni u susjednim intronskim sljedovima (*eng*. intervening sequence, IVS) IVS4 i IVS5 egzona 5 gena *PMM2*.

U intronskoj sekvenci nizvodno od egzona 5 (IVS5) nalaze su polimorfizmi IVS5+19T/C i IVS5+22T/A za koje je utvrđeno da se pojavljuju zajedno sa nekim specifičnim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia. Rijetki alel IVS5+19C pojavljuje se zajedno sa mutacijom E139K (c.415G>A, egzon 5) (Le Bizec i sur. 2005), a za alel IVS5+22A je utvrđena vezana neravnoteža (*eng*. linkage disequilibrium) sa mutacijom R141H (Bjursell i sur. 2000; Erlandson i sur. 2001; Le Bizec i sur. 2005; Matthijs i sur. 2004). U intronskoj sekvenci uzvodno od egzona 5 (IVS4) nađen je polimorfizam delecije tri nukleotida, IVS4-58-56delATG (Bjursell i sur. 2000; Matthijs i sur. 2000). Uz mnoge druge mutacije koje uzrokuju CDG-Ia otkriveni su također specifični polimorfizmi; na primjer, polimorfizam A108A (c.324G>A, intron 4) javlja se zajedno sa mutacijom R123Q (c.368G>A, egzon 5) (Le Bizec i sur. 2005; Matthijs i sur. 1998).



Slika 1.13. Položaji mutacija prikazani na svih osam egzona gena *PMM2*. Crvenim crtama podvučene su dvije najčešće mutacije, R141H i F119L u egzonu 5, povezane sa nastankom CDG-Ia. (Prilagođeno prema Kjærgaard 2004)

1.2.3.2. Klinička obilježja CDG-Ia

Sindrom CDG-Ia najčešći je oblik CDG općenito, uzrokovan mutacijama u genu *PMM2* koje dovode do smanjene aktivnosti enzima PMM2. Budući se PMM2 eksprimira u gotovo svim tkivima, bolest je najčešće multiorganskog karaktera sa često vrlo naglašenim neurološkim implikacijama. Težina simptoma varira ovisno o genotipu; pacijenti CDG-Ia uglavnom su teško bolesni, ali ima i blažih oblika. Poremećaj se primarno očituje unutar prve godine života, iako su neki slučajevi CDG-Ia dijagnosticirani tek u adolescentnoj dobi (de Lonlay i sur. 2001).

Teži oblici bolesti dovode do rane smrti: uslijed teških infekcija, krvarenja ili prestanka rada mnogih organa (zatajenje jetre, kardiomiopatija), smrtnost unutar prvih par godina života je oko 20%, nakon čega opada (Freeze 2001; Kjærgaard 2004).

Sindrom CDG-Ia relativno je teško prepoznati pri kliničkom pregledu, budući cijeli repertoar simptoma često pedijatre navede na druge zaključke. Klasični sindrom CDG-Ia karakteriziran je teškom psihomotornom retardacijom, hipotonijom, celebelarnom hipoplazijom, epilepsijom, koagulopatijom i zaostajanjem u razvoju. Pri pojavi tih simptoma valja posumnjati na CDG-Ia.

Od ostalih simptoma kod novorođenčadi često su prisutne dismorfne značajke (subkutana lipodistrofija), disfunkcija jetre, poremećaji u hranjenju, ezotropija i strabizam, a kod odraslih bolesnika do izražaja dolazi i periferna neuropatija, osteopenija (koja uzrokuje teže dismorfije skeleta, poput skraćenog tijela i udova), hipogonadizam i retinis pigmentosa, uz ustaljenu psihomotornu retardaciju (Jaeken 2003; Sparks i Krasnewich 2005b). Neki od kliničkih značajki su i visoko čelo, velike uši te tanka gornja usna (de Lonlay i sur. 2001), a kod jedne 50-godišnje bolesnice uočeno je preuranjeno starenje (Stibler 1994).

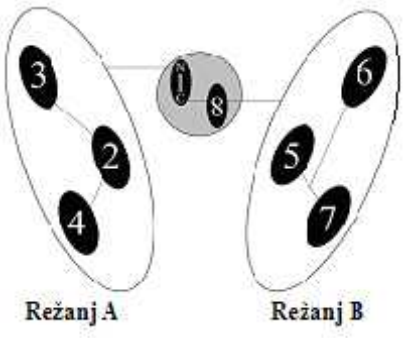
U prvim kliničkim dijagnozama, česti dismorfni simptomi izokrenutih bradavica te nepravilnog odlaganja masnog tkiva (posebice na stražnjici, trbuhu, rukama i stopalima) bili su gotovo sigurni znakovi CDG-Ia. No kasnije, mnogi jednako teški slučajevi CDG-Ia nisu uopće pokazivali te značajke (Jaeken 2003). Kod blažih oblika bolesti većina simptoma je prisutna, ali nisu toliko izraženi. Utvrđeni su bolesnici CDG-Ia u odrasloj dobi, sa blagom mentalnom retardacijom, koji su se mogli kretati uz potporu (Stibler 1994).

Oralna terapija manozom kod bolesnika oboljelih od CDG-Ia nije pokazala pozitivan učinak kao što je to u slučaju sindroma CDG-Ib (Kjærgaard 2004). Rush i sur. (2000) u svojim su *in vitro* istraživanjima na PMM2-deficijentnim fibroblastima postigli povećanje količine manoza-1-fosfata i GDP-manoze u stanicama dodatkom egzogene manoze, ali *in vivo* manoza-1-fosfat iz krvi teško ulazi u stanice jer je visoko polarna. Razvijanje derivata manoza-1-fosfata (poput netoksičnih acetoksimetil estera i hidrofobnih manoza-1-fosfata) koji ulaze u stanicu (Eklund i sur. 2005; Schultz i sur. 1993) pokazuje novi put ka razvijanju potencijalne terapije za CDG-Ia.

1.2.4. UROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE TIPA II (CDG-II)

Urođeni poremećaji glikozilacije tipa II predstavljaju poremećaje u procesiranju N-vezanih glikana na glikoproteinu. Dorada glikanskih struktura događa se u ER i Golgijevu aparatu, a uključuje razne specifične glikozidaze i glikoziltransferaze koje «oblikuju» glikan dok glikoprotein prolazi kroz te organele. No, ne dovode samo poremećaji u funkciji tih enzima do nepravilnog procesiranja glikana u ER i Golgiju; razne mutacije koje pogađaju gene uključene u biosintezu transportera nukleotid-aktiviranih šećera i mutacije gena za podjedinice visoko očuvanog oligomernog Golgijeva (COG) kompleksa dovode do raznih sindroma CDG-II.

Kompleks COG (*eng*. conserved oligomeric Golgi complex) sastoji se od osam podjedinica koje čine heterooligomer oblikovan u dva režnja povezana dimerom COG1-COG8 (Slika 1.14.). Kompleks je smješten u lumenu Golgija uz membranu i visoko je konzerviran (Ungar i sur. 2002). Smatra se da kompleks COG ima višestruke uloge u regulaciji (retrogradnog) transporta (*eng*. trafficking) glikoziltransferaza, glikozidaza i nukleotidnih šećernih transportera duž Golgijeva tijela, ali i između Golgija i drugih staničnih kompartimenata.



Slika 1.14. Modelni prikaz kompleksa COG. Režanj A čine podjedinice COG2-4, a režanj B podjedinice COG5-7. Režnjevi A i B su međusobno povezani dimerom COG1-COG8. (Prilagođeno prema Foulquier i sur. 2006)

Nefunkcionalnost kompleksa COG dovodi do višestrukih glikozilacijskih poremećaja, odnosno nastaju miješani poremećaji N- i O-glikozilacije. Danas su poznati defekti u podjedinicama COG1 (CDG-IIg), COG7 (CDG-IIe) i COG8 (CDG-IIh), no u budućnosti možemo očekivati pronalazak poremećaja ostalih podjedinica, pogotovo kod neklasificiranih CDG-II pacijenata koji pokazuju

defekte u različitim putevima glikozilacije (Foulquier i sur. 2006). Trenutno je poznato osam podtipova CDG-II (CDG-IIa do CDG-IIh) za koje je utvrđeno sljedeće:

CDG-IIa

Poremećaj CDG-IIa uzrokovan je mutacijama u humanom genu *MGAT2* koji eksprimira enzim GlcNAc transferazu 2 (GnT II ili UDP-GlcNAc:α-6-D-manozid β1,2-N-acetilglukozaminiltransferaza II) (Jaeken i sur. 1994). U katalitičkoj domeni enzima otkrivene su mutacije poput S290F i H262R. GnT II u Golgijevu katalizira korak prelaska hibridnog u kompleksni tip N-glikana. Sinteza i prijenos gotovog lipid-vezanog oligosaharida na protein u ER su normalni, ali uslijed defektnog GnT II u Golgiju nastaju monoantenski glikanski lanci. Uzorak analiziran pomoću IEF serumskog Tf pokazuje uglavnom samo disijalotransferin. Do 2005. godine bila su poznata samo 4 slučaja CDG-IIa (Sparks i Krasnewich 2005a). Klinička slika ovog sindroma je široka; pokazuje tešku psihomotornu retardaciju, ali bez celebelarne hipoplazije i periferne neuropatije; epilepsiju, stereotipno ponašanje, kraniofacijalni dismorfizam, intestinalne poremećaje, koagulopatije i zaostajanje u rastu (Freeze 2001; Jaeken 2003; Schachter 2001).

CDG-IIb

Do 2005. godine otkriven je samo jedan slučaj CDG-IIb (Sparks i Krasnewich 2005a). Novorođenče je pokazivalo teški razvojni poremećaj, mišićnu hipotoniju, hepatomegaliju, epilepsiju, hipoventilaciju i tjelesnu dismorfiju te je umrlo nakon 74 dana. Uzorak IEF serumskog Tf bio je normalan. Glikozilacijski poremećaj je uočen pronalaskom abnormalnih oligosaharida u urinu (tetrasaharida, [Glc(α1-2)Glc(α1-3)Glc(α1-3)Man)], što je ukazalo na defekt ER enzima glukozidaze I koji nije uspio u prvom koraku procesiranja maknuti terminalnu glukozu sa glikoproteina u ER. Kod oboljele se nađene mutacije R486T i F652L u genu *GLS1* koji eksprimira ER glukozidazu I (De Praeter i sur. 2000; Schachter 2001).

CDG-IIc

Poremećaj CDG-IIc ili CDG-IIc/LAD II karakteriziraju teška razvojna i psihomotorna retardacija, hipotonija, mikrocefalija, tjelesna dismorfija i perzistentne infekcije sa povišenim brojem leukocita periferne krvi (Sparks i Krasnewich 2005a). Bolest se naziva još i LAD II: poremećaj adhezije leukocita tipa II (*eng*. leukocyte adhesion deficiency type II). Tri do sada opisana pacijenta imala su razvojnu i mentalnu retardaciju, kratko tijelo i udove, kraniofacijalni dismorfizam. Otkrivene su mutacije u genu *FUCT1* koji eksprimira specifični transporter GDP-fukoze (Freeze 2001); defektni transporteri ne unose efektno GDP-fukozu u Golgi te nastaju hipofukozilirani glikoproteini (Lübke i

sur. 1999). Hipofukozilacija neutrofila onemogućava njihovo okupljanje na mjestu infekcije. Uzorak IEF sijalotransferina oboljelih bio je normalan. Samo kod jednog pacijenta oralna primjena fukoze popravila je poremećaj fukozilacije i dovela do poboljšanja zdravstvenog stanja (Jaeken 2003).

CDG-IId

Kod dječaka sa psihomotornom retardacijom, makrocefalijom, miopatijom, krvarenjima i Dandy-Walker malformacijom otkrivena je deficijencija enzima β-1,4-galaktoziltransferaze I (β4GalT I) (izoenzim 1) uslijed mutacija u genu *B4GALT1*. Utvrđena je homozigotna mutacija: insercija jednog nukleotida (1031-1032insC) koja uzrokuje nastanak «krnjeg» enzima. Enzim β4GalT I prenosi galaktozu sa UDP-Gal na terminalne GlcNAc-ostatke kompleksnih glikana na glikoproteinu u Golgiju. Kod CDG-IId većini serumskih glikoproteina nedostaju galaktoze, ali i sijalinske kiseline vezane na galaktoze. Sukladno, IEF obrazac serumskog Tf kod oboljelog bio je abnormalan i pokazivao je prisustvo asijalo- i monosijalotransferina te gotovo potpuno odsustvo tetrasijalo-transferina (Hanβke i sur. 2002).

CDG-IIe

Poremećaj CDG-IIe ili CDG-II/COG7 uzrokovan je mutacijama u humanom genu *COG7* koji je odgovoran za stvaranje podjedinice COG7 visoko očuvanog oligomernog Golgijevog kompleksa. Otkrivene homozigotne mutacije c.169+4A>C ili mutacije u mjestu isjecanja introna (*eng*. splice-site mutations) gena *COG7* uzrokuju poremećaje nekoliko glikozilacijskih puteva tako što remete normalan put mnogih glikoziltransferaza i nukleotidnih šećernih transportera u Golgijevom aparatu; to je miješani poremećaj N- i O- glikozilacijskih puteva. Oboljeli su pokazivali hipotoniju, epilepsiju, dismorfizam, hepatomegaliju, perzistentne infekcije te zastoj rada srca što je dovelo do rane smrti (Morava i sur. 2007).

CDG-IIf

CDG-IIf je poremećaj u biosintezi transportera CMP-sijalinske kiseline koji istu unosi u Golgijev aparat. Otkrivena je mutacija u mjestu isjecanja introna humanog gena *SLC35A1* za transporter CMP-sijalinske kiseline, koja je onemogućila nastanak sijaloglikoproteina. U krvi jedinog otkrivenog oboljelog nađeni su trombociti sa abnormalnim membranama; detektirani su trombocitopenija i umjerena neutropenija te masovna plućna krvarenja i infekcije koji su na kraju doveli do rane smrti; oboljeli nije pokazivao neurološke poremećaje (Martinez-Duncker i sur. 2005).

CDG-IIg

Defekti u biosintezi podjedinice COG1 kompleksa COG dovode do sindroma CDG-IIg ili CDG-II/COG1. Mutacijama je pogođen humani gen *COG1*; utvrđena je homozigotna insercija jednog nukleotida (2659–2660insC) kojom nastaje «krnji» COG1 protein, što rezultira dezintegracijom čitavog kompleksa COG. Ovo je također miješani poremećaj N- i O- glikozilacijskih puteva. Kod bolesnika je primijećena blaga mentalna retardacija i celebelarna atrofija, hipotonija, dismorfizam i spori razvoj (Foulquier i sur. 2006).

CDG-IIh

Slično sindromima CDG-IIe i CDG-IIg, poremećaj CDG-IIh ili CDG-II/COG8 posljedica je mutacija u humanom genu za podjedinicu COG8 kompleksa COG. Radi se o genu *COG8* čije mutacije uzrokuju stvaranje «krnjeg» proteina COG8; to dovodi do dezintegracije dimera COG1-COG8, što pak remeti čitav kompleks COG. Kao posljedica njegove nefunkcionalnosti, poremećena je regulacija transporta glikozidaza i glikoziltransferaza u Golgiju pa je ovo također miješani poremećaj N- i O- glikozilacijskih puteva. Serumski glikoproteini pokazuju nedostatak jednog lanca sijalinske kiseline. Bolesnici imaju mikrocefaliju, tešku psihomotornu retardaciju, zaostajanje u razvoju i netoleranciju na žitarice (Kranz i sur. 2007).

CDG-x

Svi slučajevi CDG kojima još nije utvrđen točan genetički defekt označavaju se kao CDG-x. Budući je CDG velika grupa glikozilacijskih poremećaja koji se očituju i kroz N- i kroz O-glikozilacijske puteve te uključuje mnogo gena, otkrivanje novih poremećaja u stalnom je porastu. Kliničke slike neklasificiranih CDG su raznolike, sa blagim do teškim simptomima. Javljaju se hipotonija, napadi, mikrocefalija, dismorfija, gastrointestinalni problemi te često rana smrt (Grünewald i sur. 2002).

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDGs) velika su skupina poremećaja uzrokovanih mutacijama u genima koji sudjeluju u N- i O-glikozilaciji proteina. Najučestaliji tip CDG općenito je CDG-Ia, uzrokovan mutacijama u genu za fosfomanomutazu 2. Najčešća mutacija, R141H, uzrokuje smanjenu aktivnost enzima PMM2 pa su početni koraci N-glikozilacije poremećeni i nastaju hipoglikozilirani glikoproteini. Posljedica takve abnormalne glikozilacije glikoproteina uglavnom su teški multiorganski i neurološki poremećaji kod osoba oboljelih od CDG-Ia.

Sindrom CDG-Ia je rijedak metabolički poremećaj (oko 500 dijagnosticiranih oboljelih od CDG-Ia danas u svijetu), iako se procjenjuje da bi prema broju heterozigota oboljelih trebalo biti puno više (do 1/20000). Bolest je posebice učestala u populacijama Sjeverne Europe, gdje ima i najviše nositelja (1/70) najčešće mutacije koja uzrokuje CDG-Ia, mutacije R141H (Schollen i sur. 2000). Za područje Jugoistočne Europe nema podataka o učestalosti nositelja mutacije R141H u tim populacijama. U Republici Hrvatskoj do danas nije zabilježen niti jedan slučaj CDG-Ia, iako to ne isključuje postojanje oboljelih od CDG-Ia u hrvatskoj populaciji, kod kojih je moguće da su nedijagnosticirani ili krivo dijagnosticirani.

Glavni cilj istraživanja ovog diplomskog rada bio je ispitati postoje li nositelji poznate mutacije R141H (c.422G>A) na uzorku zdrave hrvatske populacije koju je činilo ukupno 60 uzoraka iz Šibensko-kninske i Dubrovačko-neretvanske županije. Drugim riječima, cilj je bio ispitati i odrediti učestalost genotipova i alela za nositelje mutacije R141H (heterozigoti) u egzonu 5 gena *PMM2*.

Prijašnja istraživanja pokazuju da se sa mutacijama vezanim uz nastanak CDG-Ia često javljaju specifični polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) u intronskim sljedovima (IVS4 i IVS5) pripadajućim egzonu 5 gena *PMM2*. Stoga se u ovom radu mogla očekivati pojava sljedećih poznatih polimorfizama gena *PMM2*: IVS4-58-56delATG, IVS5+19T/C i IVS5+22T/A. Prema tome, na istom uzorku hrvatske populacije (N=60) cilj je bio odrediti učestalost nositelja tih intronskih polimorfizama, odnosno utvrditi učestalost pojave genotipova i alela za nositelje navedenih polimorfizama gena *PMM2*.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. ISPITANICI I SAKUPLJANJE UZORAKA PUNE KRVI

Skupinu zdravih ispitanika na kojima je provedeno istraživanje činilo je 60 ispitanika (18 žena te 42 muškaraca, prosječne starosne dobi 44 godine) koji nisu u krvnom srodstvu. Njihovi uzorci pune krvi prikupljeni su na slijedeći način: 30 uzoraka sakupljeno je u Zavodu za transfuzijsku medicinu Opće bolnice Šibenik u Šibeniku (Šibensko-kninska županija) te 30 uzoraka u Zavodu za transfuziologiju Opće bolnice Dubrovnik u Dubrovniku (Dubrovačko-neretvanska županija). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etička povjerenstva Općih bolnica Šibenik i Dubrovnik u kojima su uzorci sakupljani. Svi ispitanici ispunili su obrazac, sastavljen po pravilima Helsinške deklaracije, koji predstavlja anonimni informirani pristanak. Istraživanje je bilo potpuno anonimno, a ispitanici su krv dali dobrovoljno.

Uzorci pune krvi ispitanika prikupljeni su kapanjem nekoliko kapi krvi na označeno mjesto na filter-papirićima za sakupljanje uzoraka pune krvi (Blood Stain Cards®, Whatman™, UK). Krv je dobivena ili venepunkcijom (uz etilen-diamin-tetraacetat (EDTA) kao antikoagulans) ili iz jagodice prsta. Prikupljena krv na filter-papirićima za sakupljanje uzoraka pune krvi osušena je desetak minuta na zraku (pri sobnoj temperaturi) i pohranjena do uporabe na $+4^{\circ}$ C.

Kao kontrole u istraživanju korištene su genomske DNA izolirane iz krvi nositelja mutacija, heterozigota za mutaciju R141H. Kontrolne uzorke genomske DNA korištene u ovom radu dobio je Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zahvaljujući prof. dr. sc. H. H. Freeze sa Burnham Institute, San Diego, California, SAD.

2.1.2. FILTER-PAPIRIĆI ZA SAKUPLJANJE UZORAKA PUNE KRVI

- Blood Stain Cards® (Whatman™, UK)



Ovi filter-papirići služe općenito za sakupljanje i transport uzoraka pune krvi te tjelesnih tekućina (Slika 2.1.). Sakupljanje je učinkovito jer upijajući filter-papir služi kao zaštitni sloj koji pomaže sušenju uzoraka i sprječava izravni kontakt. Budući su namijenjeni kratkotrajnom rukovanju, uzorci prikupljeni na ovim filter-papirićima čuvaju se na +4° C do daljnje uporabe.

Slika 2.1. Filter-papirići za sakupljanje uzoraka pune krvi (Preuzeto sa https://new.fishersci.com/wps/)

2.1.3. KEMIKALIJE

- **korištene za izolaciju humane genomske DNA:**
  - *otopina Chelex*: 5% Chelex® (Bio-Rad, SAD)
    10 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma, SAD)
    destilirana voda
  - *otopina proteinaze K*: 10 mg/ml proteinaza K (Invitrogen, SAD)
    10 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma, SAD)
    20 mM $CaCl_2$ (Sigma, SAD)
    50% glicerol (Kemika, Hrvatska)
    destilirana voda

- **korištene u lančanoj reakciji polimeraze:**
  - 10 x PCR pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3) (Sigma, SAD)
  - $MgCl_2$ (50 mM) (Invitrogen, SAD)

- nizvodne ishodnice za R141H (*IntU2*) (12,9 μM)
  5'-GCACAGAGCTGAGAAACATT-3' (Invitrogen, SAD)
- uzvodne ishodnice za R141H (*R141H*) (13,7 μM)
  5'-GGCCATATCTTATTTCCATA-3' (Invitrogen, SAD)
- smjesa dNTP (10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP) (Invitrogen, SAD)
- *Platinum*® *Taq* polimeraza (5 U/μl) (Invitrogen, SAD)
- sterilna voda

- **korištene pri elektroforezi DNA na agaroznom gelu:**

  - agaroza (Sigma, SAD)
  - *1 x TAE-pufer, pH 8,3*: 40 mM Tris acetat (Sigma, SAD)
    1 mM EDTA (Roth, Njemačka)
    destilirana voda
  - *6 x pufer za nanošenje uzoraka DNA, pH 6,8*:
    30% glicerol (Kemika, Hrvatska)
    0,25% bromfenol plavo (Sigma, SAD)
    0,25% ksilen cijanol (Sigma, SAD)
    destilirana voda
  - *otopina etidij bromida*: 5 x 10^{-5} % etidij bromid (Sigma, SAD)
    destilirana voda
  - standard molekulskih masa DNA:
    DNA Mass Ruler^{TM} SMO 383 (Fermentas, Litva)

- **korištene pri analizi polimorfizama konformacije jednolančane DNA (SSCP):**

  - *6% gel za razdvajanje*: 6% akrilamid/bisakrilamid miks 37,5:1 (30%) (Sigma, SAD)
    0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 (Sigma, SAD)

3 mM H_3BO_3 (Roth, Njemačka)
0,10% amonijev persulfat (Sigma, SAD)
0,05% Temed (Sigma, SAD)
5 x TBE-pufer, pH 8,3
destilirana voda

- *5 x TBE-pufer, pH 8,3*: 45 mM Tris-HCl
  45 mM H_3BO_3 (Roth, Njemačka)
  1 mM EDTA (Roth, Njemačka)
  destilirana voda

- *SSCP-pufer za denaturaciju i nanošenje uzoraka*:
  90% formamid (Sigma, SAD)
  10 mM NaOH (Sigma, SAD)
  0,25% bromfenol plavo (Sigma, SAD)
  0,25% ksilen cijanol (Sigma, SAD)

- *SSCP-pufer za nanošenje uzoraka nedenaturirane dvolančane DNA*:
  40% saharoza (Sigma, SAD)
  0,25% bromfenol plavo (Sigma, SAD)
  0,25% ksilen cijanol (Sigma, SAD)

- **korištene pri bojanju agaroznog gela srebrom:**

  - 50% metanol (Kemika, Hrvatska)
  - 10% etanol (96%) (Kemika, Hrvatska)
  - 10%, 7% i 1% octena kiselina (Kemika, Hrvatska)
  - 0,1% $AgNO_3$ (Sigma, SAD)
  - 2,5% Na_2CO_3 (Sigma, SAD)
  - 0,02% formaldehid (37%) (Sigma, SAD)

- **korištene pri pročišćavanju PCR produkata nakon lančane reakcije polimeraze:**

  - QIAqiuck PCR Purification Kit (using a microcentrifuge) (Qiagen, SAD)

- **korištene pri reakciji sekvenciranja:**
    - ABI PRISM® BigDye™Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq®DNA Polymerase (Applied Biosystems, SAD)

- **korištene pri pročišćavanju produkata sekvenciranja:**
    - Centri-Sep Spin Columns (Princeton Preparations, SAD)

- **korištene pri određivanju nukleotidnog slijeda DNA:**
    - Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, SAD)

2.1.4. TEHNIČKA POMAGALA I PRIBOR

- Vorteks-miješalica (Vortex-Genie™, Scientific Industries Inc., SAD)
- Centrifuga (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Njemačka)
- Termostatirana kupelj (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka)
- Hladnjak (+4°C) (Gorenje, Slovenija)
- Uređaj za lančanu reakciju polimeraze (GeneAmp®PCR System 2007, Applied Biosystems, SAD)
- Elektronska vaga (Electronic BalanceMmodel KB 10000-1, Kern, Njemačka)
- Mikrovalna pećnica (Microwave Oven RE-578D, Samsung, Južna Koreja)
- Oprema za elektroforezu (BioRad, SAD)
- UV transiluminator (UviTec, UK)
- Digitalni fotoaparat (Kodak DC 290 Zoom Digital Camera, Kodak, SAD)
- Oprema za SSCP elektroforezu: uspravna HoeferTM SE 600 Ruby elektroforezna jedinica (Pharmacia, Švedska), jedinica za hlađenje MultiTemp III (Amersham Biosciences, UK)
- Vakumska centrifuga (Speed Vac, Christ, Osterode, Germany)
- Automatski sekvenator (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD)

2.2. METODE

2.2.1. IZOLACIJA HUMANE GENOMSKE DNA METODOM CHELEX®

Sa označenog mjesta filter-papirića za sakupljanje uzoraka pune krvi izrezan je komadić sa nakapanom krvi, dimenzija oko 2x2 mm, te je stavljen u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. U istu epruvetu dodano je 1000 µl sterilne destilirane vode te je sadržaj ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi radi inkubacije (zbog prisustva vode dolazi do lize krvnih stanica), uz povremeno miješanje epruvete na Vortex-miješalici (radi što uspješnije lize).

Epruvete su nakon inkubacije stavljene na centrifugiranje 3 minute pri 15 700 x *g*. Nakon centrifugiranja pažljivo je odbačeno 950 µl supernatanta te je u epruvetu dodano 150 µl *otopine Chelex* i 50 µl *otopine proteinaze K* (do konačne koncentracije 2 mg/ml). Tko priređene epruvete odmah su stavljene na inkubaciju 3 sata na termostatiranoj kupelji pri 56° C. Prilikom inkubacije, Chelex kuglice iz *otopine Chelex* vezale su na sebe komponente raspadnutih stanica (membrane i proteine/proteinske komplekse) pa su u otopini ostale samo slobodne nukleinske kiseline (DNA, RNA), a Proteinaza K iz *otopine proteinaze K* brzo je inaktivirala endogene nukleaze (DNaze i RNaze) oslobođene lizom krvnih stanica.

Nakon inkubacije epruvete su kratko promiješane na Vortex-miješalici i opet inkubirane na kupelji 8 minuta na 95° C, čime je inaktivirana Proteinaza K. U završnom koraku izolacije genomske DNA, epruvete su centrifugirane 3 minute pri 15 700 x *g* čime se Chelex istaložio, a dobiven supernatant sadržavao je DNA. Epruvete sa sakupljenim supernatantom u kojem je izolat DNA pohranjene su na +4° C do daljnje uporabe.

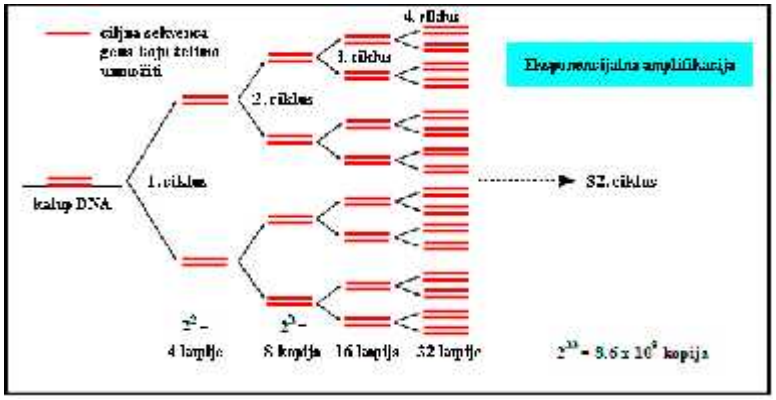
2.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Nakon izolacije humane genomske DNA metodom Chelex®, iz uzoraka je bilo potrebno umnožiti fragment DNA od interesa u genu *PMM2*, točno određene veličine (291 pb). U tu svrhu uzorci su umnoženi lančanom reakcijom polimeraze (*eng*. polymerase chain reaction, PCR), *in vitro* metodom za enzimatsko sintetiziranje definiranih sekvenci DNA. Metodu je 1983. godine osmislio Kary Mullis te je 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Današnja istraživanja u molekularnoj biologiji i dijagnostičke procedure temeljene na DNA (na primjer forenzika) gotovo su

nezamislive bez uporabe metode PCR, budući je njome moguće iz ekstremno male količine DNA u kratko vrijeme dobiti dovoljno DNA za daljnja istraživanja.

Opis metode lančana reakcija polimerazom (metoda PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je reakcija koju čine tri elementa: 1) denaturacija dvolančane DNA povišenom temperaturom, 2) sljepljivanje (*eng*. annealing) komplementarnih oligonukleotidnih ishodnica (*eng*. primers) na ciljne sekvence jednolančane DNA i 3) produljivanje ishodnica vezanih na DNA koje katalizira termostabilna DNA polimeraza, na primjer *Taq* DNA polimeraza. Ta tri elementa čine jedan ciklus PCR reakcije. Svrha metode jest da se ponavljanjem ciklusa (obično 25-35 ciklusa) u PCR reakciji umnoži željena sekvenca DNA (Slika 2.2.). Nakon svakog ciklusa umnoži se (otprilike) dvostruko više DNA jer svaki DNA fragment umnožen u prethodnom ciklusu daje u idućem (nakon denaturacije) dva kalupa za sintezu DNA. Prema tome, PCR reakcija rezultira eksponencijalnim akumuliranjem specifičnog DNA fragmenta. Na primjer, PCR reakcija od 32 ciklusa daje oko 8.6 x 10^9 kopija specifične sekvence DNA.



Slika 2.2. Princip umnažanja željenog slijeda DNA lančanom reakcijom polimerazom. (Preuzeto sa http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

Denaturacija dvolančane DNA odvija se pri temperaturi od 94-95° C, što je najviša temperatura koju enzim *Taq* polimeraza podnosi tijekom 30 i više ciklusa PCR reakcije.

Temperatura pri kojoj se događa sljepljivanje ishodnica na ciljne sekvence jednolančane DNA je kritična. Pri previsokoj temperaturi ishodnice se slabo vežu na DNA (mali prinos umnožene DNA), a pri preniskoj može doći do nespecifičnih vezivanja (umnože se i neželjene sekvence DNA).

Najbolja temperatura sljepljivanja je obično 3-5° C niža od temperature disocijacije ishodnica sa kalupa DNA. Za uspješnu PCR reakciju vrlo su bitne sekvenca i koncentracija ishodnica.

Produljivanje ishodnica vezanih na kalup DNA katalizira termostabilna DNA polimeraza. Najčešće se koristi *Taq* DNA polimeraza izolirana iz termofilne eubakterije *Thermus Aquaticus*. *Taq* polimeraza je visoko procesivna 5'→3' DNA polimeraza koja koristi Mg^{2+} ione kao kofaktore u katalizi i ima 5'→3' egzonukleaznu aktivnost. Produljivanje ishodnica odvija se pri temperaturi od 72-78° C, optimalnoj za funkciju *Taq* DNA polimeraze (pri 72° C ugrađuje oko 60 dNTP u sekundi).

Lančana reakcija polimeraze

Humane genomske DNA (iz izolata dobivenih izolacijom genomske DNA metodom Chelex®) korištene su u lančanoj reakciji polimeraze (PCR reakciji) radi umnažanja željene sekvence DNA, veličine 291 pb, u genu *PMM2*: egzona 5 sa dijelovima pripadajućih intronskih sekvenci (IVS4, IVS5).

Izolati su prije PCR reakcije centrifugirani 3 minute pri 15 700 x *g* (da Chelex bude sigurno u talogu, a DNA u supernatantu). Za PCR reakciju napravljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 µl (Tablica 2.1). U smjesu je dodana prvo sterilna voda, pufer, $MgCl_2$, smjesa dNTP i ishodnice, a na kraju *Taq* polimeraza i 5 µl genomske DNA koja je vrlo pažljivo uzeta sa površine supernatanta izolata kako se ne bi kontaminirala Chelexom istaloženim na dnu epruvete. Chelex, osim što veže Mg^{2+} ione, može inhibirati *Taq* polimerazu, a time i cijelu PCR reakciju. Ishodnice koje se koriste za mutaciju R141H navedene su u Tablici 2.2.

Epruvete sa pripremljenom PCR reakcijskom smjesom centrifugirane su kratko (pet sekundi) na 300 x *g* i zatim stavljene u uređaj za lančanu reakciju polimeraze, GeneAmp®PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD). Na uređaju su namješteni uvjeti za odvijanje lančane reakcije polimerazom prema Tablici 2.3.

Početnim zagrijavanjem PCR reakcijske smjese na 94° C osigurana je potpuna denaturacija dvolančane DNA za kasnije sljepljivanje ishodnica, a završnim produljivanjem tijekom 7 minuta dovršetak produljivanja lanaca molekule DNA. Nakon završene PCR reakcije, uzorci (ciljni umnoženi fragmenti DNA veličine 291 pb, PCR produkti) odmah su ohlađeni na +4° C do daljnje uporabe.

Tablica 2.1. Sastav reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimeraze.

Sastojak	Konačna koncentracija	Volumen
10 x PCR Pufer (50 mM KCl, 100 mM Tris-HCL, pH 8,3)	1 x	5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 mM	1,5 µl
nizvodne ishodnice	0,5 µM	1,93 µl
uzvodne ishodnice	0,5 µM	1,82 µl
smjesa dNTP (10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP)	0,2 mM	1 µl
Platinum® Taq polimeraza (5 U/µl)	0,05 U/µl	0,5 µl
otopina DNA		5 µl
sterilna voda		33,25 µl
Reakcijska smjesa ukupno		50 µl

Tablica 2.2. Ishodnice za umnažanje ciljnog fragmenta DNA (veličine 291 pb) gena *PMM2*.

Ishodnica	Nukleotidni slijed	T_m	Veličina PCR produkta
nizvodna za R141H	5'-GCACAGAGCTGAGAAACATT-3'	54° C	291 pb
uzvodna za R141H	5'-GGCCATATCTTATTTCCATA-3'	54° C	291 pb

Tablica 2.3. Reakcijski uvjeti za umnažanje ciljnog fragmenta DNA (veličine 291 pb) gena *PMM2* lančanom reakcijom polimeraze.

Reakcija	T_m	Vrijeme trajanja reakcija	Broj ciklusa
početna denaturacija	94° C	1 minuta	
denaturacija	94° C	1 minuta	32 ciklusa
sljepljivanje	54° C	1 minuta	
produljivanje	72° C	1 minuta	
završno produljivanje	72° C	7 minuta	

2.2.3. ELEKTROFOREZA DNA U AGAROZNOM GELU

Uspješnost izolacije genomske DNA metodom Chelex® i umnažanja željenog fragmenta DNA lančanom reakcijom polimeraze valjalo je provjeriti elektroforezom u gelu agaroze. Primjenom električnog polja možemo u gelu razdvojiti molekule DNA na temelju njihove veličine i zatim razdvojene vrpce DNA vizualizirati etidij bromidom koji se interkalira u strukturu DNA i fluorescira nakon pobude UV-svjetlom.

Priređen se 1,8% agarozni gel otapanjem 0,54 g krute agaroze u 30 ml *1 x TAE pufera* te je smjesa zagrijana do vrenja u mikrovalnoj pećnici dok se sva agaroza nije otopila. Tikvica sa vrućom otopinom agaroze odmah je stavljena u staklenu čašu napunjenu hladnom vodom radi hlađenja i termometrom je praćen pad temperature. Otopina ohlađena na 56^{o} C izlivena je u kalup te ostavljena da se gel stvrdne.

Uzorci za elektroforezu pripremljeni su tako da je svakom uzorku DNA (produkt lančane reakcije polimeraze ili PCR produkt) dodana 1/5 volumena *6x pufera za nanošenje uzoraka, pH 6,8.* Kao standardni uzorak nanijeto je 5 µl komercijalno pribavljenog standarda molekulskih masa DNA (DNA Mass Ruler™ SMO 383, Fermentas, Litva). Nakon što se gel stvrdnuo, u kadicu za elektroforezu izliven je *1 x TAE pufer* da pokrije gel i u jažice je nanesen standard i pripremljeni uzorci DNA sa *6 x puferom za nanošenje uzoraka*.

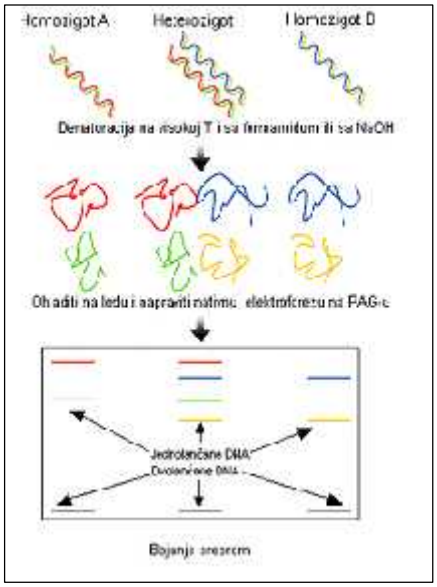
Elektroforeza je provedena pri električnom polju jakosti 5-7 V/cm dok tamnoplavo obojani uzorci DNA nisu prešli 2/3 gela (7x7 cm). Po završetku elektroforeze, gel je inkubiran u *otopini etidij bromida* radi vizualizacije vrpci DNA u gelu u trajanju od 30 minuta (gel se bojao u kutijici sa *otopinom etidij bromida* oko pola sata u mračnoj prostoriji, budući se etidij bromid raspada na običnom svjetlu). Gel je promatran na transiluminatoru uz UV-svjetlost valne duljine 312 nm. Pojava vrpci u gelu dokaz je da je iz izolirane genomske DNA uspješno umnožen željeni fragment DNA veličine 291 pb. Gelovi su slikani fotoaparatom.

2.2.4. ANALIZA POLIMORFIZAMA KONFORMACIJE JEDNOLANČANE DNA

Nakon umnažanja ciljnog fragmenta DNA veličine 291 pb lančanom reakcijom polimeraze, u sekvenci DNA PCR produkta trebalo je utvrditi prisutnost promjena u slijedu DNA, odnosno mutacija i polimorfizama. U tu svrhu, PCR produkti su obrađeni analizom polimorfizama konformacije jednolančane DNA (*eng*. single-strand conformation polymorphism, SSCP).

Opis analize polimorfizama konformacije jednolančane DNA (metoda SSCP)

Analiza polimorfizama konformacije jednolančane DNA (metoda SSCP) temelji se na usporedbi jednolančane DNA divljeg tipa i mutirane DNA koje se analiziraju nedenaturirajućom gel elektroforezom pri neutralnom pH. Metodu čine tri koraka: 1) umnažanje ciljnog fragmenta DNA lančanom reakcijom polimeraze, 2) denaturacija PCR produkta (umnoženog fragmenta DNA) i 3) elektroforeza jednolančanih DNA u poliakrilamidnom gelu pri neutralnom pH. Jednolančane molekule DNA smataju se u kompleksne trodimenzionalne strukture uslijed unutarlančanih sparivanja baza (Slika 2.3.). Jednolančane DNA iste duljine ali različitih sekvenci stvarat će različite strukture (konformere) koje se razlikuju u elektroforetskoj mobilnosti. Prema tome, promjena jedne baze u sekvenci DNA može promijeniti sekundarnu strukturu molekule te će takva mutirana DNA putovati drukčijom brzinom u gelu od one divljeg tipa i doći će do njihova razdvajanja. Upravo tu razliku u mobilnosti DNA divljeg i mutiranog tipa koristi metoda SSCP.



Slika 2.3. Shematski prikaz analize polimorfizama konformacije jednolančane DNA (metoda SSCP); (PAG – poliakrilamidni gel).

SSCP je vrlo učinkovita metoda za detekciju točkastih mutacija i polimorfizama te u dobro optimiranim elektroforetskim uvjetima (određena temperatura, postotak gela, napon struje) može detektirati gotovo 100% mutacija. Točna kontrola temperature tijekom elektroforeze bitna je za

očuvanje konformacijskih struktura jednolančanih DNA. Najoptimalnija veličina fragmenata DNA za razlučivanje SSCP elektroforezom je oko 150-250 nukleotida.

Prednosti metode su relativno jednostavno izvođenje (PCR, denaturacija DNA i elektroforeza), visoka osjetljivost (detekcija točkastih mutacija i polimorfizama) i cijena (nije potrebna dodatna oprema). Nedostatak je smanjenje osjetljivosti metode povećanjem veličine umnoženih fragmenata DNA (PCR produkata). Danas je metoda SSCP najčešće korištena metoda za utvrđivanje mutacija jedne baze u raznim genskim bolestima, odnosno ima najveću primjenu u brzim i preliminarnim analizama velikog seta uzoraka, radi određivanja frekvencija pojavnosti poznatih mutacija i/ili polimorfizama.

Analiza polimorfizama konformacije jednolančane DNA (metoda SSCP)

Nakon umnažanja ciljnog fragmenta DNA veličine 291 pb lančanom reakcijom polimeraze, PCR produkte potrebno je razdvojiti na poliakrilamidnom gelu radi detekcije prisutnosti mutacija i polimorfizama. Pošto se metodom SSCP mogu otkriti promjene u jednoj bazi u sekvenci DNA razdvajanjem DNA na poliakrilamidnom gelu, metoda je pogodna za detekciju točkastih mutacija i polimorfizama ciljne regije gena *PMM2* (egzon 5 sa dijelovima pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5, veličine 291 pb). Budući se razdvajaju fragmenti DNA duljine 291 pb, rađen je 6% poliakrilamidni gel. Uvjeti elektroforeze optimirani su u sklopu ranijih istraživanja (Šupraha Goreta 2007).

Prije SSCP elektroforeze, složena su stakla za ulijevanje gela (16 x 8 cm sa razmakom od 10 mm), multitemp 3 vodena kupelj namještena je na 15^{o} C te je napravljena dovoljna količina *1 x TBE pufera* (4-5 litara) u kojem se odvija elektroforeza. Za pravljenje 35 ml *6% gela za razdvajanje*, u 7 ml *5 x TBE pufera* dodano je 21 ml sterilne vode, 350 µl 0,10% amonijevog persulfata, 7 ml 30% otopine akrilamid/bisakrilamid miksa (37,5:1) (dodati pažljivo jer je akrilamid neurotoksin) i u digestoru je dodano 35 µl Temed-a (katalizira polimerizaciju akrilamida u gel). Poliakrilamidni gel može se napraviti i dan ranije. Kada je gel sa nosačem namješten u kadicu za SSCP elektroforezu, dodano je oko 2 L *1 x TBE pufera* (da razina pufera bude ispod jažica).

Uzorci koji se analiziraju (umnoženi PCR produkti) pripremljeni su tako da je u 10-25 µl PCR produkta doda *SSCP-pufer za denaturaciju i nanošenje uzoraka* (sadrži formamid i NaOH za denaturaciju DNA te boje bromfenol plavo i ksilen cijanol) u volumnom omjeru 1:2; smjesa je zagrijana na 94^{o} C tijekom 6 minuta i naglo ohlađena na ledu. Pripremljena je i kontrola putovanja dvolančane DNA miješanjem sa *SSCP-puferom za nanošenje uzoraka nedenaturirane dvolančane DNA* (sadrži saharozu i boje).

Nakon što su u jažice redom naneseni standard molekulskih masa DNA (DNA Mass Ruler^{TM} SMO 383, 5 µl), pozitivna kontrola za mutaciju R141H (heterozigot za mutaciju R141H), kontrolna dvolančana DNA divljeg tipa (od zdrave osobe, bez mutacija) i denaturirani uzorci, *1 x TBE pufer* je nadolijevan do vrha kadice. Razdvajanje DNA SSCP elektroforezom provedeno je pri temperaturi od 15^{o} C i naponu struje od 100 V, 30 mA tijekom 5 sati i 30 minuta. Nakon završetka elektroforeze, gel je bojan srebrom radi vizualizacije vrpci DNA.

2.2.5. BOJANJE GELA SREBROM

Bojanje poliakrilamidnog gela srebrom provedeno je prema sljedećem protokolu:. gel je prvo 30 minuta fiksiran u 50% metanol/10% octena kiselina, nakon toga inkubiran tijekom noći u 10% etanol/7% octena kiselina, zatim dva puta opran po 10 minuta u 10% etanol/7% octena kiselina, ispran pet puta po 5 minuta u redestiliranoj vodi i konačno bojan u 0,1% otopini $AgNO_3$ tijekom 30 minuta. Nakon bojanja, gel je kratko ispran u redestiliranoj vodi i inkubiran u otopini 2,5% Na_2CO_3/0,02% formaldehid do pojave obojanih vrpci DNA. Reakcija je zaustavljena ispiranjem gela u 1% octenoj kiselini tijekom nekoliko minuta. Pojavom vrpci DNA možemo vidjeti da li je u uzorcima bila prisutna tražena mutacija.

2.2.6. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA UMNOŽENIH FRAGMENATA GENA *PMM2*

Rezultati SSCP elektroforeze vidljivi su nakon bojanja gela srebrom. Svaka promjena (točkasta mutacija i/ili polimorfizam) u nukleotidnom slijedu istraživane sekvence gena *PMM2* (DNA fragment veličine 291 pb) uz pravilno provedenu i optimiranu SSCP elektroforezu rezultirat će drukčijim elektroforetskim uzorkom putovanja istraživane jednolančane DNA od jednolančane DNA divljeg tipa. Iako tada mutacije/polimorfizme možemo uočiti, ne znamo točno o kakvoj se promjeni radi i na kojem mjestu unutar sekvence DNA. Iz tog razloga svim umnoženim ciljnim fragmentima DNA (291 pb), koji su se u SSCP elektroforezi razdvojili drukčije od jednolančane DNA divljeg tipa moramo odrediti točan slijed nukleotida i utvrditi o kakvoj se promjeni radi. U tu svrhu, određivanje nukleotidnog slijeda DNA metodom sekvenciranja radi se u nekoliko koraka:

1) pročišćavanje PCR produkata nakon lančane reakcije polimeraze
2) provjera uspješnosti pročišćavanja i određivanje koncentracije PCR produkata agaroznom gel elektroforezom
3) reakcija sekvenciranja
4) pročišćavanje produkata sekvenciranja
5) određivanje nukleotidnog slijeda razdvajanjem produkata sekvenciranja na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD)

2.2.6.1. Pročišćavanje PCR produkata nakon lančane reakcije polimeraze

Lančanom reakcijom polimeraze dobiveni su umnoženi fragmenti DNA (291 pb) u reakcijskoj smjesi koja osim DNA sadrži soli, ishodnice, smjesu dNTP i *Taq* DNA polimerazu (Tablica 2.1.). Da bi mogli određenom genskom fragmentu odrediti nukleotidni slijed, iz reakcijske smjese uklanjaju se sve navedene tvari kako bi se dobila čista genomska DNA.

Pročišćavanje PCR produkata napravljeno je uz uporabu komercijalnog kompleta QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, SAD) na slijedeći način: u jedan volumen PCR produkta dodano je pet volumena *pufera PB*, zatim je smjesa promiješana i nanesena na QIAquick kolonu stavljenu na epruvetu (2 ml) za sakupljanje filtrata. Nakon centrifugiranja 60 sekundi pri 10 000 x *g* pri sobnoj temperaturi, filtrat je odbačen, a DNA je vezana na kolonu. QIAquick kolona je isprana s 0,75 ml *pufera PE* za ispiranje DNA i centrifugirana dva puta na prethodno opisani način. QIAquick kolona je premještena u čistu epruvetu od 1,5 ml, te je na sredinu kolone dodano 50 µl *pufera EB* (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) za ispiranje DNA. Nakon centrifugiranja kolone u trajanju od 1 minute pri 10 000 x *g*, dobiveni eluat koji sadrži pročišćene PCR produkte je sakupljen.

2.2.6.2. Provjera uspješnosti pročišćavanja i određivanje koncentracije PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu

Nakon pročišćavanja ciljnih fragmenata DNA iz PCR reakcijske smjese, potrebno je provjeriti uspješnost pročišćavanja razdvajanjem DNA elektroforezom na agaroznom gelu i odrediti koncentraciju DNA. Elektroforeza se vrši na sličan način opisan u poglavlju 2.2.3.

Pripremljen je 1,8% agarozni gel grijanjem 0,54 g agaroze u 30 ml *1 x TAE pufera* do vrenja. Nakon hlađenja do 56^{o} C otopina agaroze izlivena je u kadicu za elektroforezu i stvrdnuta. U 10 µl pročišćenog PCR produkta dodano je 1/5 *6 x pufera za nanošenje uzoraka DNA* (2 µl) te su pripremljeni uzorci naneseni se u jažice gela. Kao standardni uzorak nanijeto je 5 µl komercijalno pribavljenog standarda molekulskih masa DNA (DNA Mass Ruler^{TM} SMO 383, Fermentas, Litva).

Elektroforeza je provedena pri električnom polju jakosti 5-7 V/cm dok tamnoplavo obojani uzorci DNA nisu prešli 2/3 gela (7x7 cm). Po završetku elektroforeze, gel je inkubiran u otopini etidij bromida radi vizualizacije vrpci DNA u gelu u trajanju od 30 minuta i nakon toga promatran na transiluminatoru uz UV-svjetlost valne duljine 312 nm. Približna koncentracija DNA (PCR produkta) određena je usporedbom intenziteta fluorescencije vrpce koja odgovara PCR produktu sa intenzitetom fluorescencije vrpce koja je približno jednake veličine i sadrži poznatu količinu DNA (standard molekulskih masa DNA). Izračunat je volumen otopine PCR produkata koji sadrži približno 5 ng DNA. Gelovi su slikani fotoaparatom.

2.2.6.3. Reakcija sekvenciranja

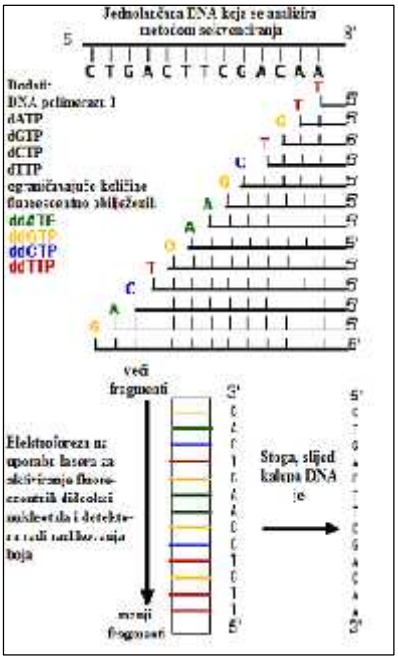
Nakon što su ciljni fragmenti DNA (291 pb) umnoženi lančanom reakcijom polimeraze, pročišćeni te im je određena koncentracija, radi se reakcija sekvenciranja kojom želimo dobiti fluorescentno obilježene fragmente DNA koji se razlikuju u duljini za jednu bazu. Sekvenciranjem DNA na taj se način dobiju produkti različitih veličina koji se mogu razdvojiti kapilarnom elektroforezom (na automatskom sekvenatoru) i čijom se detekcijom može odrediti slijed nukleotida.

Opis metode reakcije sekvenciranja

Frederick Sanger razvio je 1975. godine dideoksi metodu sekvenciranja DNA i za to je 1980. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Dideoksi metoda ili Sangerova metoda sekvenciranja DNA koristi dideoksinukleotide (ddNTP) pri reakciji sinteze komplementarnog lanca na jednolančanom kalupu DNA. Budući ddNTP nemaju 3'-OH skupinu na deoksiribozi, njihovom ugradnjom doći će do preuranjenog prestanka sinteze DNA jer se ne može stvoriti fosfodiesterska veza sa slijedećim nukleotidom (dNTP). Dideoksi metoda (*eng*. chain-termination method) temelji se na četiri zasebne lančane reakcije polimerazom. Svaka zahtijeva iste jednolančane DNA kao kalup i radioaktivno obilježene ishodnice, DNA polimerazu, pufer, smjesu dNTP i po jedan od četiri

radioaktivno obilježenih ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Lančanom reakcijom polimeraze nastaju u svakoj reakciji fragmenti DNA različitih veličina jer im je daljnja sinteza preuranjeno zaustavljena ugradnjom ddNTP korištenog u reakciji. Fragmenti DNA iz sve četiri reakcijske smjese razdvoje se po veličini elektroforezom na istom gelu i vizualiziraju autoradiografijom. Sekvenca koja se čita od dna gela prema gore komplementarna je originalnoj sekvenci (kalupu DNA).

Danas se češće koristi modificirana dideoksi metoda gdje su ddNTP obilježeni različitim fluorescentnim bojama. Princip metode je isti, no prikladnija je iz razloga što ne koristi radioaktivni materijal. Umjesto četiri zasebne reakcijske smjese radi se jedna koja sadrži kalup DNA, DNA polimerazu I, dNTP, neobilježene ishodnice te ddNTP obilježene različitim fluorescentnim bojama. Lančanom reakcijom polimeraze nastaju fragmenti DNA koji se razlikuju jedan od drugoga u veličini za točno jedan nukleotid (Slika 2.4.).



Slika 2.4. Shema metode reakcije sekvenciranja jednolančane DNA u jednoj reakcijskoj smjesi. (Prilagođeno prema http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/ BiologyPages/D/DNAsequencing.html)

PCR produkti razdvajaju se kapilarnom elektroforezom na automatiziranom sekvenatoru koji pri kraju kapilare za elektroforezu ima detekcijski prozor koji osvjetljava laser. Budući se fragmenti razdvajaju elektroforezom na temelju veličine i budući svaka fluorescentna boja emitira svjetlo svojom valnom duljinom nakon eksitacije laserom, moguće je očitati nukleotidni slijed DNA (kraći

fragmenti detektiraju se prvi). Kamera snima emisiju svjetla nakon pobude laserom, a podaci o slijedu nukleotida računalno se obrade u elektroferogram. Sekvenca nukleotida očitana sa gela komplementarna je kalupu DNA korištenom u reakciji sekvenciranja, te se slijed jednolančane DNA koja se analizirala može prema tome lako odrediti.

Reakcija sekvenciranja

Sekvenciranje pročišćenih PCR produkata na temelju dideoksi metode provedeno je uporabom komercijalnog kompleta ABI PRISM® BigDye™Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq®DNA Polymerase (Applied Biosystems, SAD) koji sadrži pufer, DNA polimerazu, dNTP, te ddNTP obilježene četirima različitim rodaminskim fluorescentnim bojama (ddATP obilježen bojom dR6G, ddCTP obilježen bojom dROX, ddGTP obilježen bojom dR110 i ddTTP obilježen bojom dTAMRA). Priređena je reakcijska smjesa od 10 µl miješanjem odgovarajućeg volumena pročišćenog PCR produkta (koji sadrži približno 5 µg PCR produkta) sa 4 µl Ready Reaction Mix, odgovarajućim volumenom otopina ishodnica (količine 1,6 pmol) i vodom. Epruveta sa reakcijskom smjesom promiješana je kratko na Vorteks-miješalici, centrifugirana par sekundi pri 1000 x *g* i stavljena u uređaj za lančanu reakciju polimeraze (GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems, SAD). Reakcija sekvenciranja se odvijala u uređaju za lančanu reakciju polimeraze pri reakcijskim uvjetima koji su navedeni u Tablici 2.4.

Tablica 2.4. Reakcijski uvjeti za reakciju sekvenciranja pročišćenog PCR produkta.

Reakcija	T_m	Vrijeme trajanja reakcija	Broj ciklusa
početna denaturacija	95 °C	4 minute	
denaturacija	95 °C	30 sekundi	25 ciklusa
sljepljivanje	50 °C	15 sekundi	
produljivanje	60 °C	4 minute	
hlađenje	4 °C	beskonačno	

2.2.6.4. Pročišćavanje produkata sekvenciranja

Produkti sekvenciranja moraju se prije razdvajanja kapilarnom elektroforezom pročistiti od viška ddNTP obilježenih fluorescentnim bojama i viška ishodnica. Pročišćavanje je provedeno uporabom komercijalnog kompleta CentriSep Spin Kit (Princeton Preparations, SAD).

Nakon reakcije sekvenciranja, u reakcijsku smjesu dodano je 1 µl 2,2% SDS radi boljeg pročišćavanja te je promiješana na Vorteks-miješalici. Smjesa je inkubirana na vodenoj kupelji 5 minuta pri 98^{o} C i zatim 10 minuta pri 25^{o} C. Nakon inkubacije i hlađenja, reakcijska smjesa je nanijeta na Centri Sep Spin kolonu. Kolona je priređena na način da je na kolonu dodano 0,8 ml destilirane vode te je takva kolona ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je skinut poklopac sa kolone i čep sa dna kolone (pri tome je bili potrebno paziti da gel ostane slegnut) te je pušteno da slobodno iscuri sva voda iz kolone. Kolona je stavljena na epruvetu, centrifugirana dvije minute pri 750 x *g* i prebačena na novu epruvetu za sakupljanje eluata. Na kolonu je pažljivo nanesena reakcijska smjesa sa produktima sekvenciranja te je smjesa zatim centrifugirana dvije minute pri 750 x *g*. Dobiveni eluat koji sadrži pročišćene produkte sekvenciranja osušen je na vakumskoj centrifugi (Speed Vac, Christ, Germany) tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi.

2.2.6.5. Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata

Pročišćenim produktima sekvenciranja koji sadrže fluorescentno obilježene fragmente DNA određuje se slijed nukleotida kapilarnom elektroforezom u uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (automatski sekvenator, Applied Biosystems, SAD).

Upareni pročišćeni produkti sekvenciranja otopljeni su u 17 µl reagensa Template Suppression Reagent (TSR, Applied Biosystems, SAD), promiješani na Vorteks-miješalici te kratko centrifugirani da se sva tekućina spusti sa stijenke epruvete na dno. Uslijedila je inkubacija na 95^{o} C (denaturacija) i hlađenje na ledu. Uzorci su ponovo promiješani na Vorteks-miješalici i kratko centrifugirani (držani su na ledu do uporabe). Priređena smjesa stavljana je na kapilarnu elektroforezu u uređaj za automatizirano sekvenciranje. Elektroforeza je provedena tijekom 120 minuta korištenjem modula Seq POP 6 (1 ml) E uz vrijeme injektiranja uzorka 30 sekundi, voltaži struje tijekom elektroforeze 12.2 kV te temperaturi polimera POP 6 50^{o} C. Nukleotidni slijed uzoraka određen je primjenom programa Sequencing Analysis Software.

2.2.7. Statistička obrada podataka

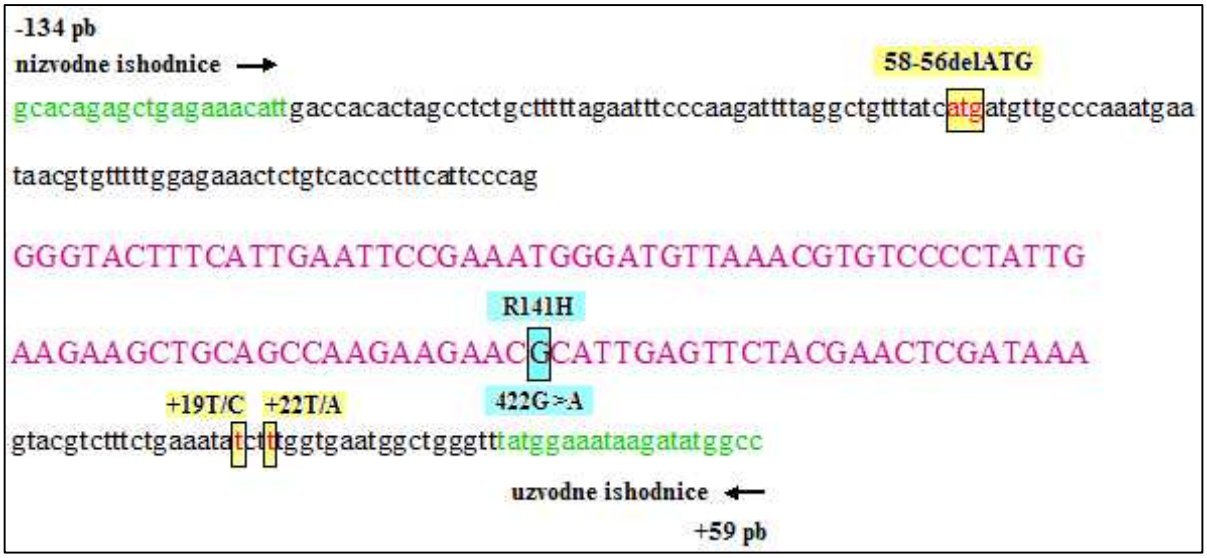
Učestalost ili frekvencija genotipova i alela u uzorcima određena je ručnim prebrojavanjem. Statistička značajnost u razlici distribucije između dobivene i očekivane frekvencije alela određena je pomoću χ^2 testa kojim se želi utvrditi da li je populacija za određene frekvencije alela u skladu sa Hardy-Weinberg ravnotežom. Za populaciju se smatra da je u Hardy-Weinberg ravnoteži ako se u njoj pojavljuju sva tri genotipa (AA, Aa, aa) sa frekvencijama p^2, 2pq, q^2.

Podaci su statistički obrađeni pomoću računalnog programa SigmaStat® 3.0, Systat Software Inc. Odstupanja su smatrana statistički značajnima ukoliko je P bio manji od 0,05 ($P<0,05$).

3. REZULTATI

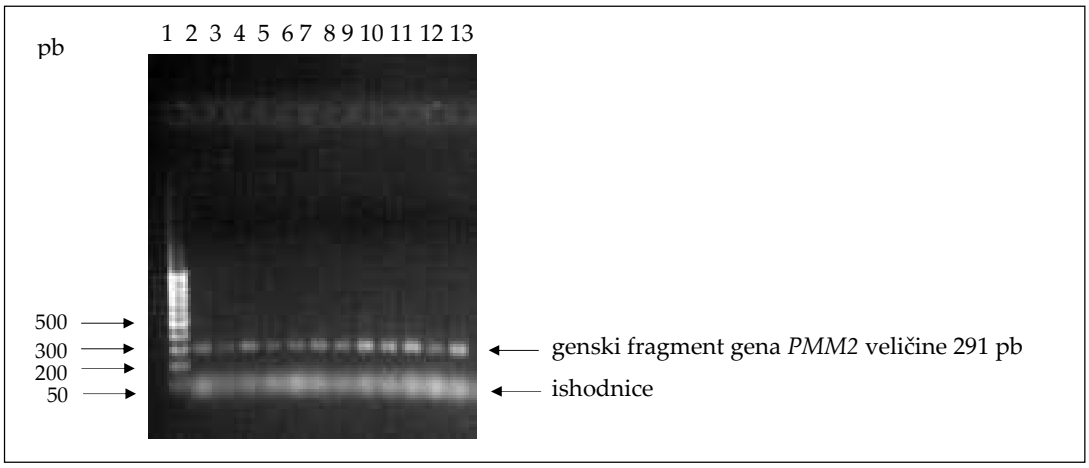
3.1. MUTACIJE I POLIMORFIZMI GENA *PMM2*

Mutacija R141H, kao i većina od 90 poznatih mutacija u genu *PMM2* smještene su u egzonu 5, pa je stoga u ovom radu analiziran upravo taj egzon (Freeze, 2006). Pojavnost i učestalost aminokiselinske zamjene R141H koja je uzrokovana točkastom mutacijom c.422G>A, ispitane su na 60 uzoraka. Razlog odabiru upravo navedene mutacije je njihova relativno visoka učestalost u nekim europskim populacijama (1⁄70 do 1⁄150). Nadalje, zbog pojavnosti velikog broja polimorfizama u egzonu 5 gena *PMM2* i njegovim pripadajućim intronskim sljedovima, IVS4 i IVS5, analiziran je genski fragment prikazan na Slici 3.1 koji obuhvaća upravo te dijelove gena *PMM2*. U tu je svrhu korištena analiza polimorfizama konformacije jednolančanih fragmenata (SSCP), jer je na taj način bilo moguće detektirati i ostale eventualne mutacije i polimorfizme prisutne u tom fragmentu gena.



Slika 3.1 Nukleotidni slijed egzona 5 i dijelova intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2*. Prikazani nukleotidni slijed dijela gena *PMM2* obuhvaća egzon 5 te pripadajuće intronske regije IVS4 (-134 pb) i IVS5 (+59 pb). Položaj mutacije R141H obilježen je svijetlo plavom bojom, a polimorfizmi IVS5+19T/C i IVS5+22T/A obilježeni su žutom bojom. Mjesto delecije IVS4-58-56delATG obilježeno je crvenom bojom i uokvireno crnom bojom. Egzon 5 (100 pb) otisnut je ružičastom bojom, a sljedovi ishodnica otisnuti su zelenom bojom.

Uzorci pune krvi 60 dobrovoljnih davatelja sakupljeni su na papirićima za sakupljanje krvi (poglavlje 2.1.1.), a genomska je DNA izolirana metodom Chelex® (poglavlje 2.2.1.). Ovim postupcima sakupljanja uzoraka i izolacije dobiva se vrlo mala količina DNA (~0,2-1 ng/µl izolata), pa nije bilo moguće odrediti spektrofotometrijski koncentracije gDNA. Koncentracija izolirane genomske DNA (gDNA) procijenjena je na temelju usporedbe količine umnoženih fragmenata nakon elektroforetskog razdvajanja sa standardima DNA poznatih molekulskih masa (Slika 3.2).

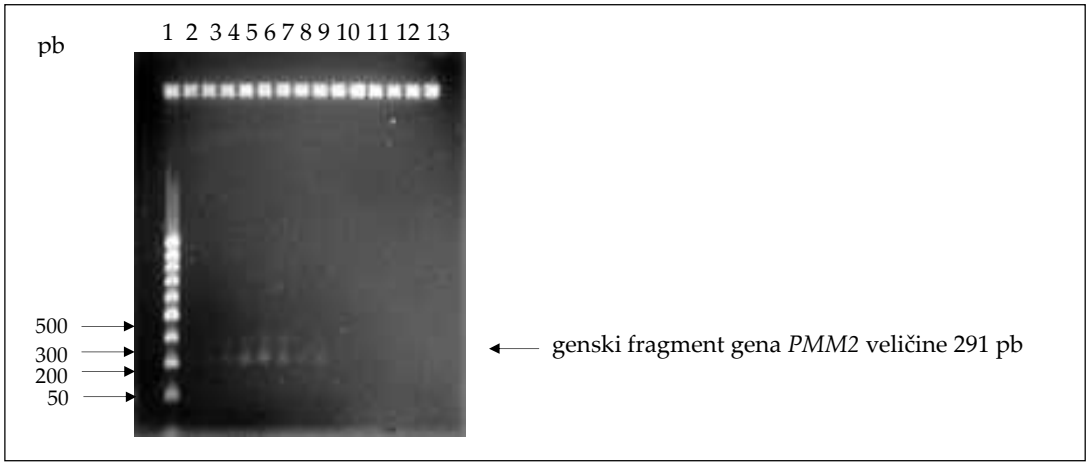


Slika 3.2 Elektroforeza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2*. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani elektroforezom u 1,8% agaroznom gelu. 1: standard molekulskih masa DNA. 2-13: PCR produkti nastali umnažanjem 12 različitih uzoraka gDNA. Položaji PCR produkata veličine 291 pb (nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija gena *PMM2)* i položaji ishodnica označeni su strelicom. Količina PCR produkata procijenjena je prema standardu DNA.

Na temelju prethodno optimiranih rezultata (Šupraha Goreta 2007) utvrđeno je da 5 µl dobivenog izolata tijekom 32 ciklusa umnažanja uz koncentraciju ishodnica 0,5 µM omogućuje nastajanje dovoljne količine (~50 ng) PCR produkata za analizu SSCP.

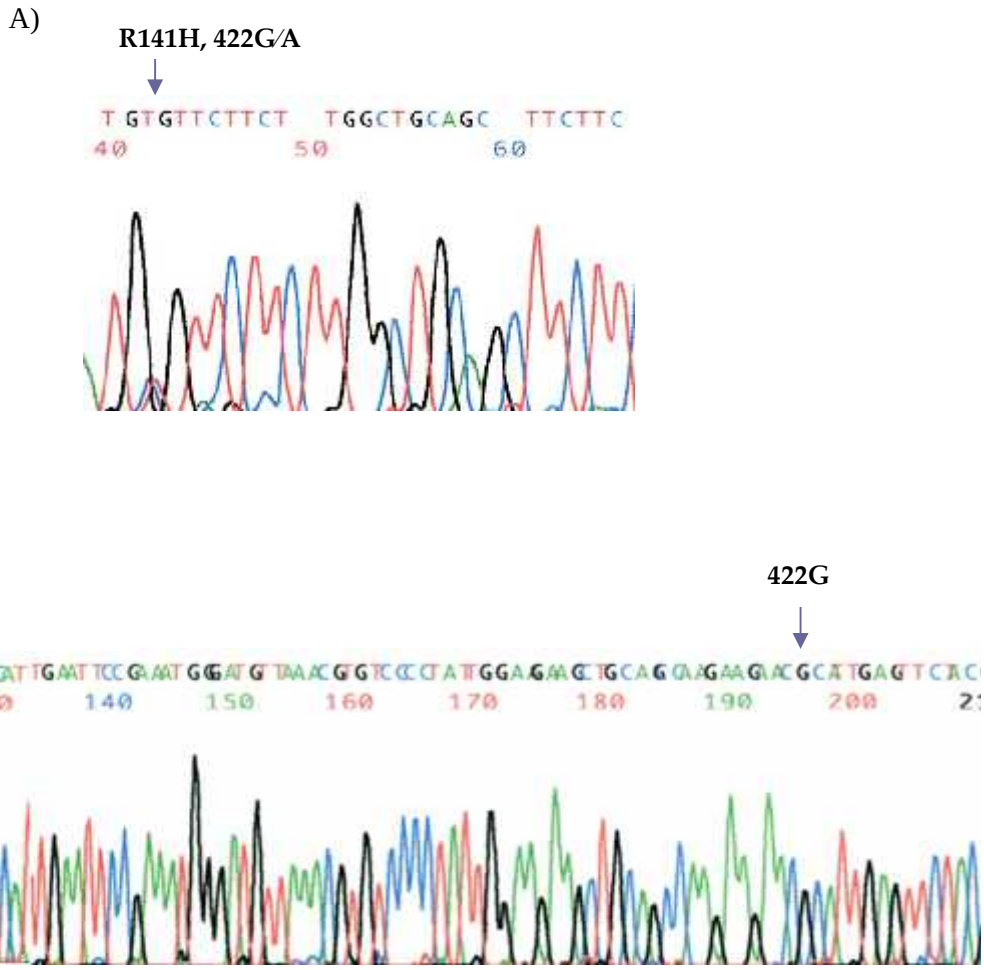
Uspješnost i točnost umnažanja PCR produkata lančanom reakcijom polimerazom potvrđena je određivanjem nukleotidnog slijeda umnoženog fragmenta. PCR produkti (3-10 ng) dobiveni umnažanjem pozitivne kontrole (genomske DNA dobivene izolacijom iz krvi bolesnika oboljelih od CDG-Ia) te PCR produkti dobiveni umnažanjem dijela genomske DNA izolirane iz krvi zdravih osoba (divlji tip), uz prethodno navedene optimirane uvjete, pročišćeni su te podvrgnuti reakciji sekvenciranja. Nakon uklanjanja zaostalih fluorescentno obilježenih nukleotida i viška ishodnica, nukleotidni je slijed PCR produkata određen analizom produkata sekvenciranja razdvojenih kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD). Analiza je provedena korištenjem programa Sequencing Analysis Software, a rezultati su pokazali da nukleotidni sljedovi PCR produkata u potpunosti odgovaraju nukleotidnom slijedu egzona 5 gena *PMM2* i njegovih pripadajućih intronskih sljedova. Spomenuti produkt (291 pb) ujedno je i jedini produkt lančane reakcije polimeraze te se pokazalo da su uvjeti pri kojima se odvijala lančana reakcija polimeraze zadovoljavajući.

Na Slici 3.3. prikazani su genski fragmenti gena *PMM2* veličine 291 pb dobiveni od nositelja mutacija R141H, te zdrave osobe (divlji tip, bez mutacija) dobivenih nakon pročišćavanja pomoću komercijalnog kompleta QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, SAD). Genomske DNA tih osoba služile su kao pozitivna kontrola pri optimiranju metode SSCP.



Slika 3.3. **Elektroforeza PCR produkata veličine 291 pb nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* nakon pročišćavanja.** PCR produkti nastali su umnažanjem egzona 5 gena *PMM2* i pripadajućih intronskih regija pomoću komercijalnog kompleta QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, SAD).

Na Slici 3.4. prikazani su nukleotidni sljedovi genskih fragmenata gena *PMM2* dobiveni od nositelja mutacije R141H, te zdrave osobe (divlji tip, bez mutacija). Genomske DNA tih osoba služile su kao pozitivna kontrola pri optimiranju metode SSCP.

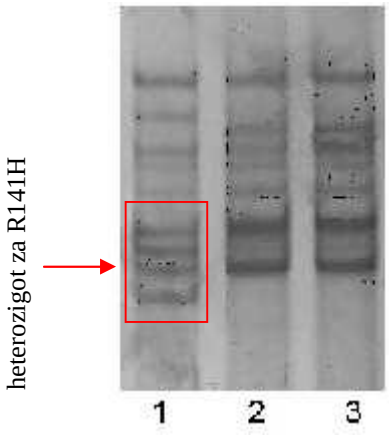


Slika 3.4. Dijelovi nukleotidnih sljedova PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* genomske DNA izolirane iz A) bolesnika oboljelog od CDG-Ia i B) zdrave osobe. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produktima je određen nukleotidni slijed analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyzer. A) Položaj mutacije R141H označen je plavom strelicom (nukleotidni slijed određen s uzvodnom ishodnicom). B) Nukleotidni slijed PCR produkta koji predstavlja divlji tip za mutaciju R141H (nukleotidni slijed određen sa nizvodnom ishodnicom).

3.1.1. SSCP ANALIZA ZA ODREĐIVANJE MUTACIJE R141H

Za probir mutacije R141H gena *PMM2* korištena je SSCP analiza. Uvjeti su optimirani u prethodnim istraživanjima (Bjursell i sur. 2000; Matthijs i sur. 1998; Šupraha Goreta 2007). Za analizu su korištene aparature: uspravna HoeferTM SE 600 Ruby elektroforezna jedinica te jedinica za hlađenje MultiTemp III (Pharmacia, Švedska; Amersham Biosciences, UK).

Uzorci gDNA izolirane iz bolesnika oboljelog od CDG-Ia (nositelj mutacije R141H – R141H heterozigotna pozitivna kontrola) i iz zdravih osoba (divlji tip, bez mutacija) razdvajani su u 6% poliakrilamidnom gelu, a elektroforeza je provedena tijekom 5 sati i 30 minuta strujom snage 3W (100 V, 30 mA). Elektroforezom koja je provedena pri 15° C postignuto je potpuno razdvajanje četiriju vrpci u uzorcima pozitivnih kontrola (CDG-Ia) (Slika 3.5., linija 1).



Slika 3.5. SSCP analiza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* provedena pri temperaturi od 15° C. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani metodom SSCP u 6% poliakrilamidnom gelu pri 15° C. Uzorak 1: CDG-Ia heterozigot za mutaciju R141H, uzorci 2 i 3: homozigoti-divlji tip. Crvenim pravokutnikom su označeni položaji vrpci PCR produkata, a strelicom jasno razdvojene četiri vrpce.

3.1.2. UČESTALOST MUTACIJE R141H

Od sakupljenih i analiziranih 60 uzoraka sa područja Šibensko-kninske te Dubrovačko-neretvanske županije, sedam uzoraka pokazalo je SSCP analizom promijenjene elektroforezne obrasce koji, međutim, nisu odgovarali pozitivnoj kontroli (heterozigot za R141H, Slika 3.5., linija 1). Navedenim uzorcima (N=7), kao i nasumično odabranim uzorcima s normalnim elektroforeznim obrascem (N=20) nukleotidni je slijed određen reakcijom sekvenciranja.

U analiziranim uzorcima nije utvrđena prisutnost mutacije R141H. (Tablica 3.1). Međutim, pokazano je da su svi uzorci s promijenjenim obrascem (Slika 3.6.) nositelji jednog ili više polimorfizama (IVS5+19T/C, IVS4-58-56delATG ili IVS5+22T/A), dok je za sve uzorke s normalnim obrascem potvrđeno da su divljeg tipa za sve ciljne mutacije/polimorfizme. Time je potvrđeno da je uz odabrane uvjete SSCP analize moguće jasno prepoznati nositelje ciljnih mutacija/polimorfizama divljeg tipa.

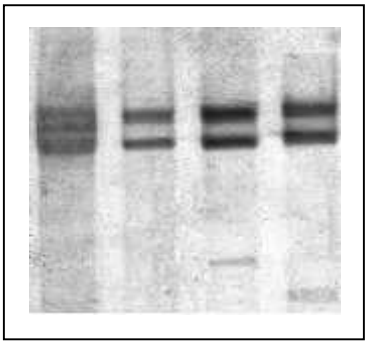
Tablica 3.1. Učestalost genotipova i alela R141H (c.422G>A) u genu *PMM2* u uzorku hrvatske populacije (N=60).

R141H (c.422G>A)	**Dobiveni**	
	N	**%**
422G/G	60	100
422G/A	0	0
422A/A	0	0
alel G	120	100
alel A	0	0

3.1.3. UČESTALOST INTRONSKIH POLIMORFIZAMA IVS5+19T/C, IVS5+22T/A i IVS4-58-56delATG GENA *PMM2*

Intronski polimorfizmi jedne baze IVS5+19T/C i IVS5+22T/A smješteni su u susjednom intronskom slijedu egzona 5 (IVS5). Pokazano je da su povezani sa specifičnim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia (Bjursell i sur., 2000; Matthijs i sur., 2000). Alel IVS5+19C najčešće se pojavljuje zajedno s mutacijom E139K (c.415G>A), smještenom u egzonu 5 gena *PMM2* (Le Bizec i sur., 2005), dok je između alela IVS5+22A i mutacije R141H potvrđena vezana neravnoteža (*engl*. linkage disequilibrium) (Bjursell i sur., 2000; Erlandson i sur., 2001; Matthijs i sur., 2004).

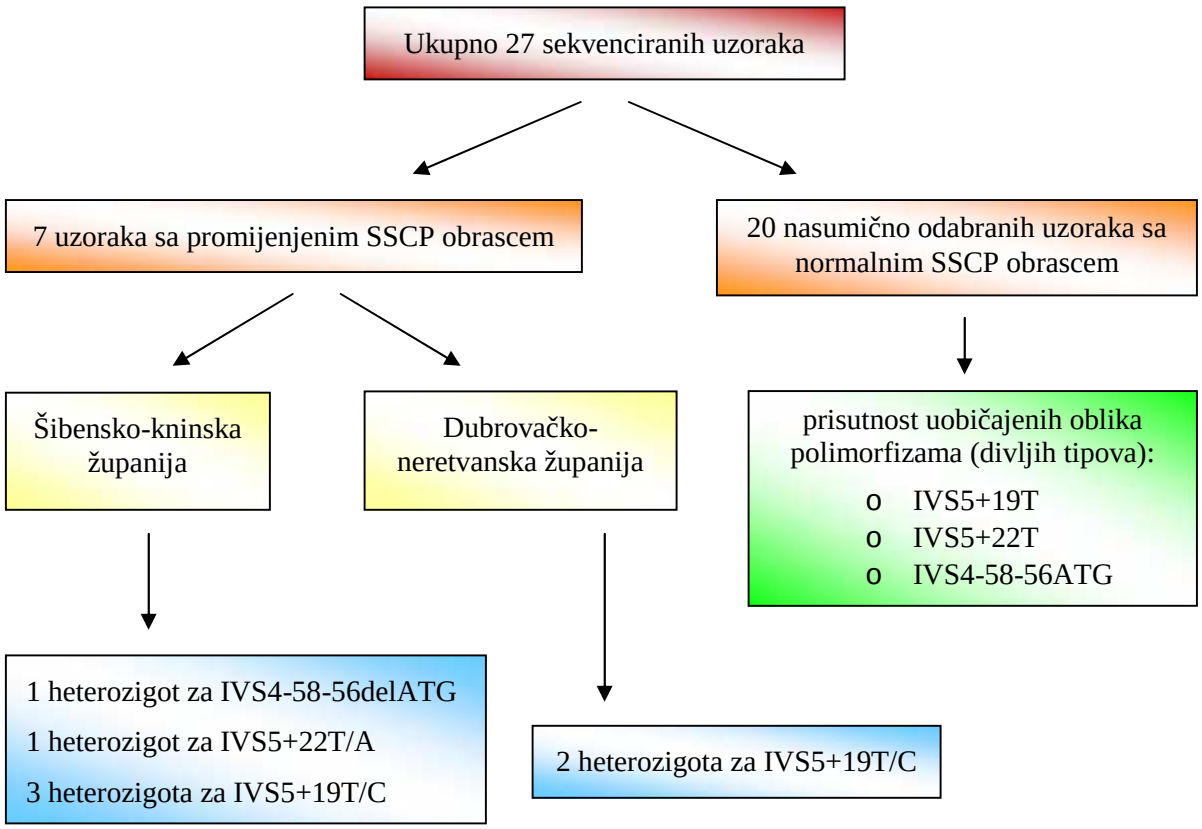
Kako bi se odredila učestalost gore navedenih polimorfizama, određen je nukleotidni slijed 27 uzoraka sekvenciranjem (7 uzoraka s promijenjenim SSCP elektroforetskim obrascem te 20 nasumično odabranih uzoraka s normalnim obrascem) (Slika 3.6.).



1 2 3 4

Slika 3.6. Analiza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* metodom SSCP. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani metodom SSCP u 6% poliakrilamidnom gelu pri 15° C (linija 1: pozitivna kontrola - CDG-Ia heterozigot za R141H, linija 2: homozigot – divlji tip, linija 3 i linija 4: uzorci s promijenjenim obrascem).

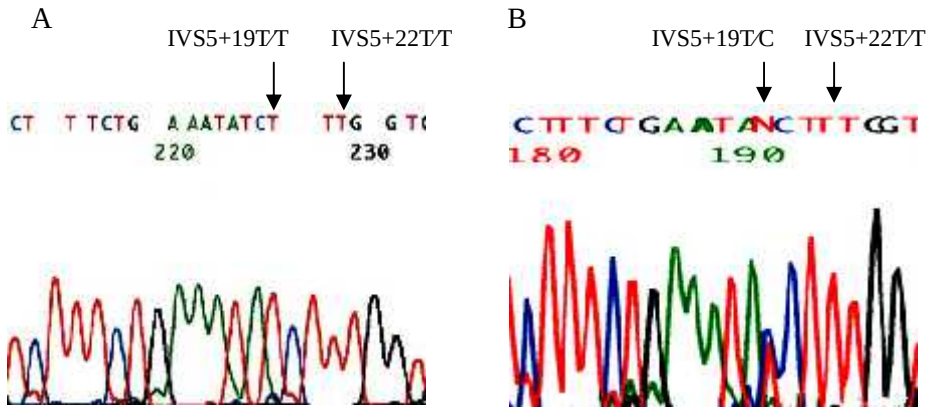
Za 20 nasumično odabranih uzoraka s normalnim SSCP elektroforetskim obrascem potvrđena je prisutnost uobičajenih oblika polimorfizama (divljih tipova: IVS5+19T, IVS5+22T i IVS4-58-56ATG). Za 5 od 7 uzoraka s promijenjenim SSCP obrascem utvrđena je prisutnost heterozigotnog oblika za polimorfizam IVS5+19T/C. Jedan od uzoraka s promijenjenim elektroforeznim obrascem je heterozigot za IVS5+22T/A, a jedan uzorak je heterozigot za polimorfizam IVS4-58-56delATG (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Shematski prikaz rezultata dobivenih određivanjem nukleotidnog slijeda 7 uzoraka s promijenjenim i 20 uzoraka s normalnim SSCP elektroforetskim obrascem po odabranim regijama.

Polimorfizam IVS5+19T/C

U intronskom slijedu nakon egzona 5 (IVS5) smješten je polimorfizam – IVS5+19T/C (Vuillaumier-Barrot i sur. 2000). Za pet uzoraka koji su dali promijenjen SSCP elektroforetski obrazac potvrđena je sekvenciranjem heterozigotna promjena za polimorfizam IVS5+19T/C u intronu 5 (Slika 3.8.). Procijenjena je učestalost alela intronskog SNP IVS5+19T/C u hrvatskoj populaciji: učestalost alela T (IVS5+19T) iznosi 0,958 (95,83%), a alela C (IVS5+19C) 0,042 (4,17%). Možemo reći da je učestalost alela za polimorfizam IVS+19T/C izražena na 60 ispitanika reprezentativna za odabrane regije.



Slika 3.8. Analiza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* metodom sekvenciranja. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani metodom sekvenciranja na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyzer (prikazani su dijelovi nukleotidnih sljedova dvaju različitih uzoraka; A) položaji polimorfizama IVS5+19T/C i IVS5+22T/A divlji tipovi i B) položaj polimorfizma IVS5+19T/C (heterozigot) označeni su strelicama).

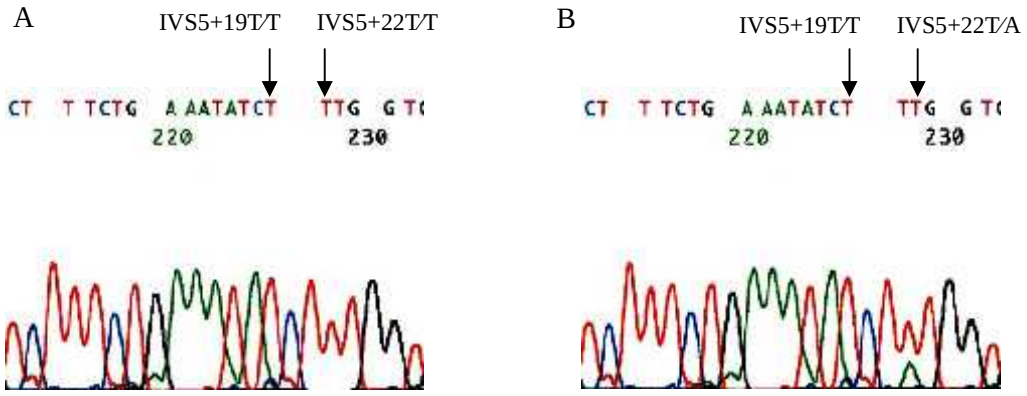
Učestalost nositelja ovog polimorfizma (heterozigoti), procijenjena na 60 uzoraka, iznosi 0,083 (8,33%) Rezultati procijenjene učestalosti u hrvatskoj populaciji na 60 ispitanika te po odabranim regijama prikazani su u Tablici 3.2.

Tablica 3.2 Učestalost genotipova i alela IVS5+19T/C u genu *PMM2* u uzorku hrvatske populacije (N=60).

IVS5+19T/C	Dobiveni	
	N	%
IVS5+19T/T	55	91,67
IVS5+19C/C	0	0,00
IVS5+19T/C	5	8,33
alel T	115	95,83
alel C	5	4,17

Polimorfizam IVS5+22T/A

Analiza prisutnosti alela intronskog SNP IVS5+22T/A u uzorcima 60 ispitanika, pokazala je da su 59 od 60 osoba nositelji homozigotnog oblika (IVS5+22T/T), dok je samo jedan od ukupnog broja ispitanika kojima je određen nukleotidni slijed heterozigot za IVS+22T/A (Slika 3.9.).



Slika 3.9. Dio nukleotidnog slijeda PCR produkta (291 pb) nastalog umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* s utvrđenim heterozigotnim oblikom IVS5+22T/A. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produktima je određen nukleotidni slijed analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyzer. Položaj polimorfizma IVS5+22T/T divljeg tipa (A) i heterozigotnog oblika IVS5+22T/A (B) označeni su strelicama.

Na temelju ovih rezultata procijenjena je učestalost alela sa bazom T na tom položaju i ona iznosi 0,992 (99,17%), a alela s bazom A iznosi 0,008 (0,83%). Učestalost heterozigota iznosi 0,017 (1,67%) (Tablica 3.3.).

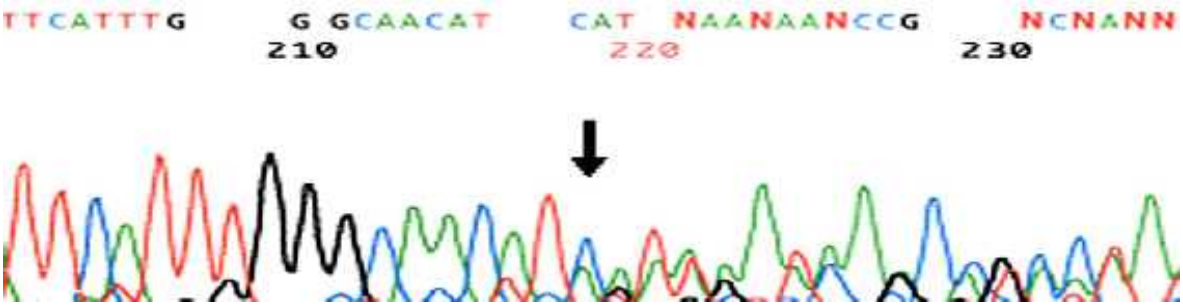
Tablica 3.3. Učestalost genotipova i alela IVS5+22T/A u genu *PMM2* u uzorku hrvatske populacije (N=60).

IVS5+22T/A	Dobiveni	
	N	%
IVS5+22T/T	59	98,33
IVS5+22A/A	0	0,00
IVS5+22T/A	1	1,67
alel T	119	99,17
alel A	1	0,83

Polimorfizam IVS4-58-56delATG

U intronskom slijedu koji prethodi egzonu 5 (IVS4) smješten je polimorfizam - delecija 3 baze (ATG) na položaju -58 (IVS4-58-56delATG) (Vuillaumier-Barrot i sur. 2000).

Za jedan od uzoraka koji su dali promijenjen obrazac SSCP potvrđena je sekvenciranjem heterozigotna promjena za deleciju 3 pb (ATG) na položaju -58 u intronu 4 (IVS4-58-56delATG) (Slika 3.10.).



Slika 3.10. Dio nukleotidnog slijeda PCR produkta (291 pb) nastalog umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadajućih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena *PMM2* s utvrđenim heterozigotnim oblikom IVS4-58-56delATG. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lančane reakcije polimeraze, PCR produktima je određen nukleotidni slijed analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyzer uz uporabu uzvodnih ishodnica. Položaj heterozigota IVS4-58-56delATG označen je crnom strelicom.

Procijenjena učestalost za alel IVS4-58-56delATG na uzorku hrvatske populacije (N=60) iznosi 0,008 (0,83%).

Učestalost nositelja ove delecije (procijenjena na 60 uzoraka) iznosi 0,017 (1,67%) (Tablica 3.4.).

Tablica 3.4. Učestalost genotipova i alela IVS4-58-56delATG u genu *PMM2* u uzorku hrvatske populacije (N=60).

IVS4-58-56ATG	Dobiveni	
	N	%
IVS4-58-56ATG (homo)	59	98,33
IVS4-58-56delATG (homo)	0	0,00
IVS4-58-56delATG(hetero)	1	1,67
alel (IVS4-58-56ATG)	119	99,17
alel (IVS4-58-56delATG)	1	0,83

Premda odsutnost mutacije R141H kao i procijenjene učestalosti alela intronskih SNP IVS5+19T/C i IVS4-58-56delATG (Tablica 3.5.) upućuju na specifičnost hrvatske populacije što se tiče ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na druge populacije, kako bi se donio konačan zaključak potrebno je analizirati veću seriju uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljuju u CDG-Ia.

Tablica 3.5. Učestalost polimorfizama i mutacija u genu *PMM2* u hrvatskoj populaciji (N=60).

Gen	Genska regija	Polimorfizam/ mutacija	Učestalost homozigota divljeg tipa u hrvatskoj populaciji	Učestalost heterozigota u hrvatskoj populaciji	Učestalost homozigota nositelja mutacija u hrvatskoj populaciji
PMM2	egzon 5	R141H (c.422G>A)	60/60 (100,00%)	0/60 (0,00%)	0/60 (0,00%)
	intron 4	IVS4-58-56delATG	59/60 (98,33%)	1/60 (1,67%)	0/60 (0,00%)
	intron 5	IVS5+19T>C	55/60 (91,67%)	5/60 (8,33%)	0/60 (0,00%)
	intron 5	IVS5+22T>A	59/60 (98,33%)	1/60 (1,67%)	0/60 (0,00%)

4. RASPRAVA

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDG) predstavljaju široku skupinu složenih metaboličkih poremećaja koji su posljedica mutacija u genima uključenim u N- i O-glikozilacijske procese. Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno. Glikozilacija proteina i drugih glikokonjugata od iznimne je važnosti za normalan razvoj i funkcioniranje organizma, a procjenjuje se da je čak oko 500 gena uključeno u glikozilacijske procese (Freeze 2006).

Sindromi CDG najčešće su multisistemske bolesti i prezentiraju se poremećajima u raznim tjelesnim sustavima i organima. Oboljeli već u najranoj dobi pokazuju uglavnom umjerene do teške neurološke poremećaje, karakteristične dismorfije tijela i zaostajanje u razvoju. U prvim godinama života vrlo je visoka smrtnost oboljelih od CDG (oko 20%) kao posljedica teških infekcija i zatajenja rada organa poput jetre i srca. Klinička slika poremećaja CDG je raznolika, što stvara probleme kod njihove dijagnoze, jer su neki simptomi slični simptomima drugih bolesti. Postoji stoga mogućnost da su neki slučajevi CDG krivo dijagnosticirani ili obilježeni kao «bolest nepoznate etiologije».

Urođeni poremećaj glikozilacije tipa Ia (CDG-Ia) najčešći je CDG u svijetu, sa oko 500 dijagnosticiranih oboljelih osoba (Freeze 2006). Poremećaj je uzrokovan mutacijama u genu za fosfomanomutazu 2 koja je uključena u početne korake N-glikozilacije glikoproteina. Iako je u genu *PMM2* pronađeno više od 90 različitih mutacija (Freeze 2006), najčešća mutacija koja uzrokuje CDG-Ia je R141H (c.422G>A); prisutna je u oko 75% oboljelih pacijenata bjelačke populacije (Kjærgaard i sur. 2001). U najvećem broju slučajeva CDG-Ia ta mutacija dovodi do teškog fenotipa bolesti.

Mutacija R141H vrlo je česta u bjelačkoj populaciji (Matthijs i sur. 1998), posebice na području Sjeverne Europe, gdje su čak 1/60 do 1/79 normalnih osoba nositelji te mutacije (heterozigoti za R141H) (Schollen i sur. 2000). Većina oboljelih od CDG-Ia su složeni heterozigoti (*eng*. compound heterozygotes) za ovu mutaciju (422G>A u kombinaciji sa drugim alelom), pri čemu je genotip R141H/F119L najčešći genotip u Skandinavskim zemljama (Matthijs i sur. 2000; Vuillaumier-Barrot 2000) i predstavlja težak oblik bolesti. Navedene mutacije čine primjerice 88% svih mutacija koje uzrokuju CDG-Ia u Danskoj populaciji (Kjærgaard i sur. 1998). Smatra se da su mutacije R141H i F119L temeljne mutacije (*eng*. founder mutations) u populacijama Skandinavije.

Prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, očekuje se pojava homozigotnog oblika genotipa R141H/R141H u 45% do 60% oboljelih od CDG-Ia (Schollen i sur. 2000). No, u dosadašnjim istraživanjima homozigoti za R141H nisu nikada utvrđeni te se pretpostavlja da je mutacija u tom obliku letalna u ranoj embriogenezi (Matthijs i sur. 1998). Zbog izostanka pojave homozigota,

učestalost heterozigotnog oblika mutacije R141H (frekvencija nositelja) veća je (1/10000) od očekivane frekvencije pojave bolesti (1/20000) (Schollen i sur. 2000).

Iako je poremećaj CDG-Ia vezan primarno uz bjelačke populacije Europe, otkriveni su slučajevi diljem svijeta (Sjeverna i Južna Amerika, Velika Britanija, Japan (Kondo i sur. 1999), Indija (Goraya i sur. 2001)), te prvi slučajevi CDG-Ia među Afričko-američkom populacijom (Tayebi i sur. 2002). Rezultati (nepopulacijskih) istraživanja na temelju procjene učestalosti oboljelih od CDG-Ia pokazuju da je frekvencija najučestalijih mutacija R141H i F119L najviša u zemljama Skandinavije, Zapadne Europe i SAD (35%-50% alela) (de Lonlay i sur. 2001; Erlandson i sur. 2001), dok se primjerice u Portugalu i Španjolskoj pojavljuju sa nižom frekvencijom (Schollen i sur. 2000). Istraživanja provedena na 26 osoba oboljelih od CDG-Ia u Španjolskoj pokazuju manju učestalost mutacije R141H (25% alela), dok mutacija F119L nije uopće utvrđena, što je pomalo začuđujuće s obzirom na njihovu učestalost u zemljama Sjeverne Europe (Briones i sur. 2002). Također, i u Portugalu je mutacija R141H prisutna u oboljelih od CDG-Ia u manjoj mjeri (43%-50% bolesnika) nego u drugim zemljama (75% oboljelih). Oboljeli od CDG-Ia u te dvije zemlje pokazuju značajnu genetičku heterogenost koja dovodi do raznolikih i puno blažih fenotipskih prezentacija bolesti u odnosu na druge populacije (Pancho i sur. 2005). Za neke mutacije vezane uz nastanak CDG-Ia uočeno je da su geografski ili etnički specifične za određene populacije. Primjerice, česta mutacija D65Y (c.193G>T) u genu *PMM2* pronađena je samo u oboljelih podrijetlom sa Pirinejskog poluotoka (Quelhas i sur. 2006), a česta mutacija E139K (c.415G>A) samo kod oboljelih u Francuskoj (Le Bizec i sur. 2005). Navedene mutacije javljaju se zajedno sa R141H (složeni heterozigoti).

Smatra se da je mutacija R141H stara mutacija koja se održava stoljećima, jer je nađena u geografski različitim bjelačkim populacijama. Iako je u nekim, napose Skandinavskim zemljama, učestalost nositelja velika, ni danas nije potpuno jasna prednost nošenja ove mutacije (Freeze 2001). Pretpostavlja se da bi nositelji ove mutacije mogli imati selektivnu prednost. Virusi, poput hepatitisa B i C, vežu se prilikom umnažanja na membranu domaćina preko N-glikoziliranih receptora. Ukoliko su receptori hipoglikozilirani, prihvaćanje virusa je onemogućeno.

Procijenjeno je da u Europi i Sjevernoj Americi od CDG-Ia oboli oko 200 novorođenčadi godišnje. Schollen i sur. (2000) procijenili su na temelju broja složenih heterozigota (R141H/druga mutacija) učestalost pojave bolesti na 1/18000 do 1/20000, što je puno više nego uočena učestalost od 1/40000 u Danskoj i 1/80000 u ostalim Europskim zemljama. To navodi na zaključak da je bolest vjerojatno nedijagnosticirana. Do danas u Republici Hrvatskoj nije zabilježen ni jedan oboljeli od CDG-Ia, što je neobično s obzirom na učestalost ove bolesti u drugim zemljama Europe. Prva

istraživanja pojavnosti i učestalosti mutacije R141H i intragenskih polimorfizama gena *PMM2* u hrvatskoj populaciji (Šupraha Goreta 2007) nisu otkrila nositelje mutacije R141H, ali su utvrđeni karakteristični polimorfizmi za koje se smatra da su vezani uz nastanak CDG-Ia.

U ovom diplomskom radu analizirana je na uzorku hrvatske populacije (N=60) učestalost pojave nositelja mutacije R141H u genu *PMM2*, odgovorne za nastanak CDG-Ia, te učestalost pojave nositelja poznatih polimorfizama jednog nukleotida (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadajućih egzonu 5 gena *PMM2*. Istraživanje je provedeno na uzorcima krvi dobivenim od dobrovoljnih davatelja, no s obzirom na spol, dob i zdravstveno stanje, ne predstavljaju reprezentativan uzorak hrvatske populacije. Uzorci su prikupljani u Šibensko-kninskoj i Dubrovačko-neretvanskoj županiji (30 uzoraka iz svake županije).

Ovim istraživanjem u navedenim uzorcima hrvatske populacije (N=60) nije potvrđena mutacija R141H, odnosno, nije utvrđen ni jedan nositelj ove mutacije (heterozigot za R141H), što se slaže sa podatkom da do sada nije zabilježena osoba oboljela od CDG-Ia u Republici Hrvatskoj. Iako ni u prijašnjem istraživanju (Šupraha Goreta 2007) na puno većem uzorku hrvatske populacije (N=800) oboljeli od CDG-Ia nisu utvrđeni, ipak je moguće da takvi bolesnici postoje u hrvatskoj populaciji, jer se fenotipski ova bolest prezentira nizom simptoma koji mogu biti i blagi. Primjerice, druga istraživanja pokazala su da je u nekih utvrđenih bolesnika rezidualna aktivnost enzima PMM2 začuđujuće visoka (blizu 50% kontrolne), a bolesnici su pokazivali blage simptome bolesti (Westphal i sur. 2001). S obzirom na to, moguće je da u hrvatskoj populaciji oboljeli postoje, ali nisu dijagnosticirani kao CDG-Ia, već su moguće krivo dijagnosticirani ili navedeni pod «bolest nepoznate etiologije». Osim toga, zdravi nositelji (heterozigoti za R141H, roditelji oboljelih) imaju rezidualnu aktivnost PMM2 također oko 50% kontrolne, ali ne pokazuju simptome bolesti. To se objašnjava time da je sindrom CDG-Ia uzrokovan mutacijama koje se uglavnom javljaju u obliku složene heterozigotnosti, što dovodi do fenotipskog ispoljavanja bolesti (pojave simptoma CDG-Ia) te da je moguće da malo ispod razine aktivnosti PMM2 od 50% postoji oštra granica koja dijeli simptomatski i nesimptomatski fenotip heterozigota za R141H (Westphal i sur. 2001).

U ovom radu također je analizirana učestalost nositelja poznatih intronskih polimorfizama IVS5+19T/C i IVS5+22T/A, za koje je utvrđeno da se pojavljuju zajedno sa nekim specifičnim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia. Rezultati rada pokazali su da je učestalost alela IVS5+19T 0.958 (95.83%), a alela IVS5+19C 0.042 (4.17%) (poglavlje 3.1.3., Tablica 3.2.). Ovi podaci značajno se razlikuju od frekvencija navedenih polimorfizama u primjerice francuskoj populaciji, gdje frekvencija alela IVS5+19T iznosi 0.562 (56.2%), a alela IVS5+19C 0.474 (47.4%) (Le Bizec i sur. 2005).

Izračunate frekvencije za intronski polimorfizam IVS5+22T/A (poglavlje 3.1.3., Tablica 3.3.), za uzorak hrvatske populacije (N=60), iznose za alel IVS5+22T 0.992 (99.17%), a za alel IVS5+22A 0.008 (0.83%) te se približno slažu sa podacima za francusku populaciju (alel T 100%) (Le Bizec i sur. 2005). U prijašnjim istraživanjima utvrđena vezana neravnoteža (*eng*. linkage disequilibrium) između mutacije R141H i alela IVS5+22A (Bjursell i sur. 2000; Erlandson i sur. 2001; Le Bizec i sur. 2005; Matthijs i sur. 2004) primjenjiva je i na ovom uzorku hrvatske populacije. Iako mutacija R141H nije utvrđena, u analiziranim uzorcima pronađen je jedan heterozigot za polimorfizam IVS5+22T/A, sa učestalošću 0.017 (1.67%).

U analiziranom uzorku hrvatske populacije utvrđen je i jedan heterozigot za polimorfizam IVS4-58-56delATG, pronađen i u prijašnjim istraživanjima od strane Bjursell i sur. (2000) te Matthijs i sur. (2000). Učestalost alela IVS4-58-56delATG (procijenjena na 60 uzoraka) iznosi 0.008 (0.83%), a učestalost nositelja ove delecije iznosi 0.017 (1.67%) (poglavlje 3.1.3., Tablica 3.4.). Ovi rezultati razlikuju se od onih koje su dobili Bjursell i sur. (2000) na sličnom broju uzoraka, gdje je učestalost alela IVS4-58-56delATG 0.049 (4.92%), odnosno učestalost nositelja heterozigotnog oblika IVS4-58-56delATG 0.098 (9.83%).

Premda odsutnost mutacije R141H kao i procijenjene učestalosti alela intronskog SNP IVS5+19T/C i IVS4-58-56delATG upućuju na specifičnost hrvatske populacije što se tiče ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na druge populacije, kako bi se donio konačan zaključak potrebno je analizirati puno veći broj uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljuju u CDG-Ia. Na taj način mogla bi se steći obuhvatnija slika pojavnosti i učestalosti mutacija i polimorfizama vezanih uz nastanak CDG-Ia u hrvatskoj populaciji.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je pojavnost i učestalost genotipova i alela za nositelje mutacije R141H (heterozigoti za R141H) egzona 5 gena *PMM2*, te učestalost pojave nositelja polimorfizama jednog nukleotida (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadajućih egzonu 5 gena *PMM2*, koji se smatraju povezanim sa nastankom CDG-Ia.

Istraživanje je provedeno na 60 uzoraka (humane genomske DNA iz pune krvi dobrovoljnih zdravih davatelja koji nisu u srodstvu) prikupljenih iz Šibensko-kninske i Dubrovačko-neretvanske županije.

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1) U analiziranim uzorcima hrvatske populacije (N=60) nije pronađena mutacija R141H (c.422G>A) u egzonu 5 gena *PMM2*, odnosno nije utvrđen ni jedan nositelj - heterozigot za R141H, što je u skladu sa činjenicama da je ovo istraživanje provedeno na zdravim ispitanicima te da u Republici Hrvatskoj nije do danas zabilježen ni jedan slučaj sindroma CDG-Ia.

2) Učestalosti istraživanih poznatih polimorfizama gena *PMM2* upućuju na specifičnost analiziranog dijela hrvatske populacije: polimorfizmi IVS5+19T/C i IVS4-58-56delATG pojavili su se mnogo manjom frekvencijom nego u nekim drugim europskim populacijama: alel IVS5+19C sa mnogo manjom frekvencijom, a alel IVS4-58-56delATG sa malo manjom frekvencijom u usporedbi sa nekim europskim populacijama.

3) Rezultati učestalosti intronskog polimorfizma IVS5+22T/A gena *PMM2* upućuju da je njegova frekvencija slična onima u drugim europskim populacijama.

4) U prijašnjim istraživanjima utvrđena vezana neravnoteža između mutacije R141H i alela IVS5+22A primjenjiva je i na ovom uzorku hrvatske populacije. Iako mutacija R141H nije utvrđena, u analiziranim uzorcima pronađen je jedan heterozigot za polimorfizam IVS5+22T/A.

5) Za donošenje konačnog zaključka o pojavnosti i učestalosti mutacija i polimorfizama vezanih uz nastanak CDG-Ia u hrvatskoj populaciji, trebalo bi analizirati mnogo veći broj uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljuju u CDG-Ia.

6. LITERATURA

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): Molecular biology of the cell, Fourth edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

2. Barnier A., Dupré T., Cuer M., Vuillaumier-Barrot S., Durand G., Seta N. (2002): Leukocyte phosphomannomutase activity in diagnosis of congenital disorder of glycosylation Ia. Clinical Chemistry **48**(6): 934-936.

3. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2003): Biochemistry, Fifth edition. W. H. Freeman and Company, New York.

4. Bjursell C., Erlandson A., Nordling M., Nilsson S., Wahlström J., Stibler H., Kristiansson B., Martinsson T. (2000): PMM2 mutation spectrum, including 10 novel mutations, in a large CDG type 1A family material with a focus on Scandinavian families. Human Mutation **16**: 395-400.

5. Briones P., Vilaseca M.A., Schollen E., Ferrer I., Maties M., Busquets C., Artuch R., Gorti L., Marco M., Van Schaftingen E., Matthijs G., Jaeken J., Chaba A. (2002): Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. J. Inherit. Metab. Dis. **25**: 635-646.

6. Burda P., Jakob C.A., Beinhauer J., Hegemann J.H., Aebi M. (1999): Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. Glycobiology **9**: 617-625.

7. Butler M., Quelhas D., Critchley A.J., Carchon H., Hebestreit H.F., Hibbert R.G., Vilarinho L., Teles E., Matthijs G., Schollen E., Argibay P., Harvey D.J., Dwek R.A., Jaeken J., Rudd P.M. (2003): Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. Glycobiology **13**(9): 601-622.

8. Chantret I., Dancourt J., Dupré T., Delenda C., Bucher S., Vuillaumier-Barrot S., Ogier de Baulny H., Peletan C., Danos O., Seta N., Durand G., Oriol R., Codogno P., Moore S.E.H. (2003): A deficiency in dolichyl-P-glucose:$Glc_1Man_9GlcNAc_2$-PP-dolichyl 3-glucosyltransferase defines a new subtype of Congenital Disorders of Glycosylation. The Journal of Biological Chemistry **278**(11): 9962–9971.

9. Chantret I., Dupré T., Delenda C., Bucher S., Julia Dancourt J., Barnier A., Charollais A., Heron D., Bader-Meunier B., Danos O., Seta N., Durand G., Oriol R., Codogno P., Moore S.E.H. (2002): Congenital disorders of glycosylation type Ig is defined by a deficiency in dolichyl-P-mannose:$Man_7GlcNAc_2$-PP-dolichyl mannosyltransferase. The Journal of Biological Chemistry **277**(28): 25815–25822.

10. de Lonlay P., Seta N., Barrot S., Chabrol B., Drouin V., Gabriel B.M., Journel H., Kretz M., Laurent J., Le Merrer M., Leroy A., Pedespan D., Sarda P., Villeneuve N., Schmitz J., van Schaftingen E., Matthijs G., Jaeken J., Korner C., Munnich A., Saudubray J.M., Cormier-Daire V. (2001): A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. J Med Genet **38**: 14–19.

11. Denecke J., Kranz C., Von Kleist-Retzow J.C., Bosse K., Herkenrath P., Debus O., Harms E., Marquardt T. (2005): Congenital disorder of glycosylation type Id: clinical phenotype,

molecular analysis, prenatal diagnosis, and glycosylation of fetal proteins. Pediatric Research **58**(2): 248-253.

12. De Praeter C.M., Gerwig G.J., Bause E., Nuytinck L.K., Vliegenthart J.F.G., Breuer W., Kamerling J.P., Espeel M.F., Martin J.R., De Paepe A.M., Wen Chun Chan N., Dacremont G.A., Van Coster R.N. (2000): A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. Am. J. Hum. Genet. **66**: 1744–1756.

13. Dupré T., Barnier A., de Lonlay P., Cormier-Daire V., Durand G., Codogno P., Seta N. (2000): Defect in N-glycosylation of proteins is tissue-dependent in Congenital Disorders of Glycosylation Ia. Glycobiology **10**(12): 1277-1281.

14. Eklund E.A., Merbouh N., Ichikawa M., Nishikawa A., Clima J.M., Dorman J.A., Norberg T., Freeze H.H. (2005): Hydrophobic Man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. Glycobiology **15**(11): 1084–1093.

15. Erlandson A., Bjursell C., Stibler H., Kristiansson B., Wahlström J., Martinsson T. (2001): Scandinavian CDG-Ia patients: genotype/phenotype correlation and geographic origin of founder mutations. Hum Genet **108**: 359–367.

16. Ferrari M.C., Parini R., Di Rocco M., Radetti G., Beck-Peccoz P., Persani L. (2001): Lectin analyses of glycoprotein hormones in patients with congenital disorders of glycosylation. European Journal of Endocrinology **144**: 409-416.

17. Foulquier F., Vasile E., Schollen E, Callewaert N., Raemaekers T., Quelhas D., Jaeken J., Mills P., Winchester B., Krieger M., Annaert W., Matthijs G. (2006): Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. Proc. Natl. Acad. Sci USA **103**(10): 3764–3769.

18. Frank C.G., Grubenmann C.E., Eyaid W., Berger E.G., Aebi M., Hennet T. (2004): Identification and functional analysis of a defect in the human *ALG9* gene: definition of Congenital Disorder of Glycosylation Type I*L*. Am. J. Hum. Genet. **75**: 146–150.

19. Freeze H.H. (2001): Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. Mini review. Glycobiology **11**(12): 129R-143R.

20. Freeze H.H. (2006): Genetic defects in the human glycome. Nature Reviews Genetics **7**: 537-551.

21. Goraya J.S., Mehta S., Basu S., Poddar B., Parmar V.R. (2001): Carbohydrate-Deficient Glycoprotien Syndrome (CDGS) 1a. Indian Pediatrics **38**: 919-922.

22. Grünewald S., Matthijs G. (2000): Congenital Disorders of Glycosylation (CDG): A rapidly expanding group of neurometabolic disorders. Neuropediatrics **31**: 57-59.

23. Grünewald S., Matthijs G., Jaeken J. (2002): Congenital Disorder of Glycosylation: A Review. Pediatric Research **52**(5): 618-624.

24. Haeuptle M.A., Pujol F.M., Neupert C., Winchester B., Kastaniotis A.J., Aebi M., Hennet T. (2008): Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. Am. J. Hum. Genet. **82**: 600-606.

25. Hanover J.A. (2001): Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. The FASEB Journal **15**: 1865-1876.

26. Hanβke B., Thiel C., Lübke T., Hasilik M., Höning S., Peters V., Heidemann P.H., Hoffmann G.F., Berger E.G., von Figura K., Körner C. (2002): Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine β-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId. J. Clin. Invest. **109**: 725–733.

27. Hart G.W., Kreppel L.K., Comer F.I., Arnold C.S., Snow D.M., Ye Z., Cheng X., DellaManna D., Caine D.S., Earles B.J., Akimoto Y., Cole R.N., Hayes B.K. (1996): O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. Glycobiology **6**: 711-716.

28. Helenius J., Ng D.T., Marolda C.L., Walter P., Valvano M.A., Aebi M. (2002): Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature **415**(6870): 447-450.

29. Imbach T., Schenk B., Schollen E., Burda P., Stutz A., Grünewald S., Bailie N.M., King M.D., Jaeken J., Matthijs G., Berger E.G., Aebi M., Hennet T. (2000): Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. J. Clin. Invest. **105**: 233–239.

30. Jaeken J. (2003): Congenital disorders of glycosylation (CDG): It's all in it! Komrower lecture. J. Inherit. Metab. Dis. **26**: 99-118.

31. Jaeken J., Carchon H. (1993): The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: An Overview. J. Inher. Metab. Dis. **16**: 813-820.

32. Jaeken J., Matthijs G., Barone R., Carchon H. (1997): Carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) syndrome type I. J Med Genet **34**: 73-76.

33. Jaeken J., Matthijs G., Saudubray J., Dionisi-Vici C., Bertini E., de Lonlay P., Henri H., Carchon H., Schollen E., Van Schaftingen E. (1998): Phosphomannose isomerase deficiency: a carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with hepatic-intestinal presentation. Am. J. Hum. Genet. **62**: 1535–1539.

34. Jaeken J., Schachter H., Carchon H., De Cock P., Coddeville B., Spik G. (1994): Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. Archives of Disease in Childhood **71**: 123-127.

35. Kato K., Kamiya Y. (2007): Structural views of glycoprotein-fate determination in cells. Glycobiology 17(10): 1031-1044.

36. Kjærgaard S. (2004): Congenital disorders of glycosylation type Ia and Ib. Dan Med Bull **51**(4): 350-363.

37. Kjærgaard S., Schwartz M., Skovby F. (2001): Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. Arch Dis Child **85**: 236-239.

38. Kjærgaard S., Skovby F., Schwartz M. (1998): Absence of homozygosity for predominant mutations in *PMM*2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. European Journal of Human Genetics **6**: 331–336.

39. Kondo I., Mizugishi K., Yoneda Y., Hashimoto T., Kuwajima K., Yuasa I., Shigemoto K., Kuroda Y. (1999): Missense mutations in phosphomannomutase 2 gene in two Japanese families with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. Clin genet **55**: 50-54.

40. Körner C., Knauer R., Holzbach U., Hanefeld F., Lehle L., von Figura K. (1998): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: Deficiency of dolichyl-P-Glc:$Man_9GlcNAc_2$-PP-dolichyl glucosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 13200-13205.

41. Körner C., Knauer R., Stephani U., Marquardt T., Lehle L., von Figura K. (1999): Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:$Man_5GlcNAc_2$-PP-dolichyl mannosyltransferaze. The EMBO Journal **18**(23): 6816-6822.

42. Körner C., Lehle L., von Figura K. (1998): Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. Glycobiology **8**(2): 165–171.

43. Kranz C., Denecke J., Lehrman M.A., Ray S., Kienz P., Kreissel G., Sagi D., Peter-Katalinic J., Freeze H.H., Thomas Schmid T., Jackowski-Dohrmann S., Harms E., Marquardt T. (2001): A mutation in the human *MPDU1* gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If). J. Clin. Invest. **108**: 1613–1619.

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

45. Kranz C., Ng B.G., Sun L., Sharma V., Eklund E.A., Miura Y., Ungar D., Lupashin V., Winkel R.D., Cipollo J.F., Costello C.E., Loh E., Hong W., Freeze H.H. (2007): COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. Human Molecular Genetics **16**(7): 731–741.

46. Le Bizec C., Vuillaumier-Barrot S., Barnier A., Dupré T., Durand G., Seta N. (2005): A new insight into PMM2 mutations in the French population. Human Mutation **25**(5): 504-505.

47. Lis H., Sharon N. (1993): Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Review. Eur. J. Biochem. **15**; 218(1): 1-27.

48. Lübke T., Marquardt T., von Figura K., Christian Körner (1999): A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the Golgi. The Journal of Biological Chemistry **274**(37): 25986–25989.

49. Marklová E., Albahri Z. (2007): Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. Clinica Chimica Acta **385**: 6-20.

50. Martinez-Duncker I., Dupré T., Piller V., Piller F., Candelier J., Trichet C., Tchernia G., Oriol R., Mollicone R. (2005): 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**(7): 2671-2676.

51. Matthijs G., Schollen E., Bjursell C., Erlandson A., Freeze H.H., Imtiaz F., Kjærgaard S., Martinsson T., Schwartz H., Seta N., Vuillaumier-Barrot S., Westphal V., Winchester B. (2000): Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia**)**. Human Mutation **16**(5): 386-394.

52. Matthijs G., Schollen E., Pardon E., Veiga-Da-Cunha M., Jaeken J., Cassiman J., Van Schaftingen E. (1997): Mutations in *PMM2*, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). Nature Genetics **16**: 88-92.

53. Matthijs G., Schollen E., Van Schaftingen E. (2004): The prenatal diagnosis of congenital disorders of glycosylation. Prenatal Diagnosis **24**(2): 114-116.

54. Matthijs G., Schollen E., Van Schaftingen E., Cassiman J., Jaeken J. (1998): Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome Type 1A. Am. J. Hum. Genet. **62**: 542–550.

55. Morava E., Zeevaert R., Korsch E., Huijben K., Wopereis S., Matthijs G., Keymolen K., Lefeber D.J., De Meirleir L., Wevers R.A. (2007): A common mutation in the COG7 gene with a consistent phenotype including microcephaly, adducted thumbs, growth retardation, VSD and episodes of hyperthermia. European Journal of Human Genetics **15**: 638–645.

56. Niehues R., Hasilik M., Alton G., Körner C., Schiebe-Sukumar M., Koch H.G., Zimmer K., Wu R., Harms E., Reiter K., von Figura K., Freeze H.H., Harms H.K., Marquardt T. (1998): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome Type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. J. Clin. Invest. **101**(7): 1414–1420.

57. Pancho C., Garcia-Cazorla A., Varea V., Artuch R., Ferrer I., Vilaseca M.A., Briones P., Campistol J. (2005): Congenital Disorder of Glycosylation Type Ia revealed by hypertransaminasemia and failure to thrive in a young boy with normal neurodevelopment. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **40**:230-232.

58. Pieren M., Galli C., Denzel A., Molinari M. (2005): The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins. J. Biol. Chem. **280**(31): 28265-28271.

59. Quelhas D., Quental R., Vilarinho L., Amorim A., Azevedo L. (2006): Congenital Disorder of Glycosylation Type Ia: searching for the origin of common mutations in *PMM2*. Annals of Human Genetics **70**: 1-6.

60. Rosati F., Capone A., Giovampaola C.D., Brettoni C., Focarelli R. (2000): Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. Int. J. Dev. Biol. **44**(6): 609-618.

61. Rush J.S., Panneerselvam K., Waechter C.J., Freeze H.H. (2000): Mannose supplementation corrects GDP-mannose deficiency in cultured fibroblasts from some patients with Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). Glycobiology **10**(8): 829-835.

62. Schachter H. (2001): Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. Review. Cell. Mol. Life Sci. **58**: 1085–1104.

63. Schollen E., Kjærgaard S., Legius E., Schwartz M., Matthijs G. (2000): Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent *PMM2* mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). European Journal of Human Genetics **8**: 367–371.

64. Schollen E., Martens K., Geuzens E., Matthijs G. (2002): DHPLC analysis as a platform for molecular diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG). European Journal of Human Genetics **10**: 643-648.

65. Schollen E., Pardon E., Heykants L., Renard J., Norman A. Doggett N.A., Callen D.F., Cassiman J., Matthijs G. (1998): Comparative analysis of the phosphomannomutase genes PMM1, PMM2 and PMM2ψ: the sequence variation in the processed pseudogene is a reflection of the mutations found in the functional gene. Human Molecular Genetics **7**(2): 157-164.

66. Schultz C., Vajanaphaniche M., Harootunian A.T., Sammak P.J., Barrett K.E., Tsien R.Y. (1993): Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP. The Journal of Biological Chemistry **268**(9): 6316-6322.

67. Schwarz M., Thiel C., Lübbehusen J., Dorland B., de Koning T., von Figura K., Lehle L., Körner C. (2004): Deficiency of GDP-Man:$GlcNAc_2$-PP-dolichol mannosyltransferase causes Congenital Disorder of Glycosylation Type Ik. Am. J. Hum. Genet. **74**: 472–481.

68. Sparks S.E., Krasnewich D.M. (2005a): Congenital Disorders of Glycosylation Overview. GeneReviews. NCBI Bookshelf. Članak je dio web stranice: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cdg#cdg.

69. Sparks S.E., Krasnewich D.M. (2005b): Congenital Disorders of Glycosylation Type 1a. GeneReviews. NCBI Bookshelf. Članak je dio web stranice: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cdg-1a.

70. Stibler H., Blennow G., Kristiansson B., Lindehammer H., Hagberg B. (1994): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: clinical expression in adults with a new metabolic disease. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry **57**: 552-556.

71. Stibler H., Jaeken J. (1990): Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome. Archives of Disease in Childhood **65**: 107-111.

72. Szymanski C.M., Wren B.W. (2005): Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. Nat. Rev. Microbiol. **3**(3): 225-37.

73. Šupraha Goreta S. (2007): Urođeni poremećaji glikozilacije Ia i Ic u hrvatskoj populaciji: polimorfizmi alela i mutacije gena *PMM2* i *ALG6*. Doktorska dizertacija. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

74. Tayebi N., Andrews D.Q., Park J.K., Orvisky E., McReynolds J., Sidransky E., Krasnewich D.M. (2002): A deletion-insertion mutation in the Phosphomannomutase 2 gene in an African American patient with Congenital Disorders of Glycosylation-Ia. American Journal of Medical Genetics **108**: 241-246.

75. Thiel C., Schwarz M., Peng J., Grzmil M., Hasilik M., Braulke T., Kohlschütter A., von Figura K., Lehle L., Körner C. (2003): A new type of Congenital Disorders of Glycosylation (CDG-Ii) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry **278**(25): 22498–22505.

76. Trombetta E.S. (2003): The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. Glycobiology **13**(9): 77R-91R.

77. Ungar D., Oka T., Brittle E.E., Vasile E., Lupashin V.V., Chatterton J.E., Heuser J.E., Krieger M., Gerard Waters M. (2002): Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. The Journal of Cell Biology **157**(3): 405–415.

78. Van Schaftingen E., Jaeken J. (1995): Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. FEBS Letters **377**: 318-320.

79. Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999): Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

80. Voet D., Voet J.G. (2004): Biochemistry, Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.

81. Vuillaumier-Barrot S., Bizec C.L, Durand G., Grandchamp B., Seta N (2000): Identification of a IVS4-58delATG polymorphism in the human phosphomannomutase 2 (PMM2) gene. Human Mutation **15**(5): 486.

82. Wada Y. (2006): Mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **840**(2): 146.

83. Westphal V., Peterson S., Peterson M., Tournay A., Blumenthal A., Treacy E.P., Freeze H.H. (2001): Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. Genetics in Medicine **3**(6): 393-398.

84. Westphal V., Xiao M., Kwok P., Freeze H.H. (2003): Identification of a frequent variant in *ALG6*, the cause of congenital disorder of glycosylation-Ic. Human Mutation **22**(5): 420-421.

85. Wu X., Rush J.S., Karaoglu D., Krasnewich D., Lubinsky M.S., Waechter C.J., Gilmore R., Freeze H.H. (2003): Deficiency of UDP-GlcNAc:dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1 phosphate transferase (DPAGT1) causes a novel Congenital Disorder of Glycosylation Type Ij. Human Mutation **22**(2): 144-150.

86. Yamashita K., Ideo H., Ohkura T., Fukushima K., Yuasa I., Ohno K., Takeshita K. (1993): Sugar chains of serum transferrin from patients with Carbohydrate Deficient Glycoprotein syndrom. Evidence of asparagine N-linked oligosaccharide transfer deficiency. The Journal of Biological Chemistry **268**(8): 5783-5789.

Elektronički izvori:

https://new.fishersci.com/wps

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html

http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/