

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/um:nbn:hr:217:398430>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek**

Maja Čačića

**MUTACIJE U GENU ZA FOSFOMANOMUTAZU 2 KOJE UZROKUJU
URONENI 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 Dumi Belamari, 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 Dumi Belamari na svoju diplomskog rada i uvijek dobrodošlim savjetima, poukama i inspiraciji.

Svojim znanjem, prijedlozima, organizacijom i dobrom voljom kroz rad me nesobi no pratila, pomagala i poučava 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

Sveu ilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matemati ki fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

MUTACIJE U GENU ZA FOSFOMANOMUTAZU 2 KOJE UZROKUJU URO ENI POREME AJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia

Maja a ija
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveu ilište u Zagrebu
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kova i a 1, 10 000 Zagreb

Uro eni poreme aji glikozilacije (CDGs) skupina su autosomno recesivnih poreme aja karakteriziranih disfunkcijom središnjeg živ anog sustava i rada mnogih organa. Poreme aji su uzrokovani abnormalnom glikozilacijom glikoproteina, povezanom s mutacijama u genima uklju enim u N-glikozilacijske puteve. CDG tip I uklju uje defekte u sastavljanju lipid-vezanog oligosaharidnog prekursora i/ili u njegovom prijenosu na protein. CDG-Ia, naj eš i tip CDG-I, uzrokovani je deficijencijom enzima fosfomanomutaze 2 (PMM2) kojeg eksprimira gen *PMM2*. PMM2 izomerizira manzo-6-fosfat u manzo-1-fosfat koja prelaskom u GDP-manozu postaje donor za sintezu lipid-vezanog oligosaharidnog prekursora. Naj eš a to kasta mutacija u egzonu 5 gena *PMM2* koja uzrokuje CDG-Ia je c.422G>A, odnosno aminokiselinska zamjena R141H.

U ovom je radu analizirana u estalost 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 pripadaju ih egzonu 5 gena *PMM2* na 60 uzorka humane genomske DNA (gDNA). Cilj rada bio je odrediti u estalost pojavnosti nositelja mutacije R141H u ovom uzorku hrvatske populacije, kao i u estalost pojave nositelja polimorfizama jednog nukleotida u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadaju ih egzonu 5. Istraživanja su pokazala da su ti polimorfizmi povezani sa specifi nim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia.

Nakon izolacije humane gDNA iz pune krvi metodom Chelex®, ciljni slijed DNA veli ine 291 pb (egzon 5 sa dijelovima pripadaju ih 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 jednolan ane DNA (*eng. single-strand conformation polymorphism, SSCP*), a vrpce jednolan ane DNA (ssDNA) vizualizirane su bojanjem gela srebrom. Svaki uzorak ije su vrpce ssDNA na gelu pokazale druk iji SSCP elektroforetski obrazac usporedbi s divljim tipom i kontrolom (poznati CDG-Ia), sekvenciran je te mu je odre en slijed nukleotida na ure aju ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Rezultati rada pokazali su da u 60 analiziranih uzorka humane gDNA nema mutacije R141H u genu *PMM2*, odnosno da u ovom uzorku hrvatske populacije nema nositelja te mutacije (heterozigota za R141H). Sedam uzorka pokazalo je promijenjeni SSCP elektroforetski obrazac, razli it od DNA divljeg tipa i kontrolne DNA: u pet uzorka utvr ena je prisutnost heterozigotnog oblika polimorfizma IVS5+19T/C, te su utvr eni nositelj heterozigotnog oblika polimorfizma IVS4-58-56delATG (1) i nositelj heterozigotnog oblika polimorfizma IVS5+22T/A (1). Na temelju ovih rezultata može se zaklju iti da iako nisu utvr eni nositelji mutacije R141H, ne može se izvesti op eniti zaklju ak o u estalosti ove mutacije u hrvatskoj populaciji, budu i je istraživanje provedeno na malom broju uzorka. Rezultati se slažu sa injenicom da u Republici Hrvatskoj nema utvr enih osoba oboljelih od CDG-Ia. Tako er se može zaklju iti da je ovaj uzorak hrvatske populacije specifi an što se ti e ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na neke druge populacije, no kako bi se donio kona an zaklju ak potrebno je analizirati ve i broj uzorka bolesnika koji su oboljeli od bolesti iji 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.

Klju ne rije i: glikozilacija, CDG-Ia, gen *PMM2*, PMM2, mutacija R141H, intronski polimorfizmi

Voditelj: Dr. sc. Jerka Dumi Belamari , izvanredni profesor

Suvoditelj: Dr. sc. Mirjana Pavlica, redovni profesor

Ocenitelji: Dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek, redovni profesor

Dr. sc. Mirjana Kalafati , redovni profesor

Rad prihva en: 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 a ija

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 performed 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. URO ENI POREME AJI GLIKOZILACIJE	13
1.2.1. DIJAGNOSTIKA CDG	15
1.2.2. URO ENI POREME AJI GLIKOZILACIJE TIPA I (CDG-I)	17
1.2.3. URO ENI POREME AJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia (CDG-Ia)	22
1.2.3.1. Gen <i>PMM2</i> i uloga fosfomanomutaze 2	22
1.2.3.2. Klinička obilježja CDG-Ia.....	26
1.2.4. URO ENI POREME AJI 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-papiri i 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. LANĀNA REAKCIJA POLIMERAZE	39
2.2.3. ELEKTROFOREZA DNA U AGAROZNOM GELU.....	43

2.2.4.	ANALIZA POLIMORFIZAMA KONFORMACIJE JEDNOLAN ANE DNA	43
2.2.5.	BOJANJE GELA SREBROM.....	46
2.2.6.	ODRE IVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA UMNOŽENIH FRAGMENATA GENA <i>PMM2</i>	46
2.2.6.1.	Pro išavanje PCR produkata nakon lanane reakcije polimeraze	47
2.2.6.2.	Provjera uspješnosti pro išavanja i odreivanje koncentracije PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu	47
2.2.6.3.	Reakcija sekvenciranja	48
2.2.6.4.	Pro išavanje produkata sekvenciranja	51
2.2.6.5.	Odreivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata	51
2.2.7.	STATISTIKA OBRADA PODATAKA.....	52
3.	REZULTATI	53
3.1.	MUTACIJE I POLIMORFIZMI GENA PMM2	54
3.1.1.	SSCP ANALIZA ZA ODRE IVANJE MUTACIJE R141H	58
3.1.2.	U ESTALOST MUTACIJE R141H.....	59
3.1.3.	U ESTALOST INTRONSKIH POLIMORFIZAMA IVS5+19T/C, IVS5+22T/A I IVS4-58-56delATG GENA <i>PMM2</i>	60
4.	RASPRAVA	68
5.	ZAKLJUCI.....	73
6.	LITERATURA	75

POPIS KRATICA

AAT	antitripsin
Asn	asparagin
CDG	uroeni poremeaji glikozilacije (<i>eng.</i> congenital disorders of glycosylation)
cDNA	komplementarna DNA (<i>eng.</i> complementary DNA)
CMP-Sia	citidin monofosfat sijalinska kiselina
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> 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 (<i>eng.</i> ER associated degradation)
Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetylgalaktozamin
GalNAcT	N-acetylgalaktozamin transferaza
gDNA	genomska DNA
GDP-Man	gvanozin difosfat manoza
Glc	glukoza
GlcNAc	N-acetylglukozamin
GPI sidra	glikozil fosfatidilinozitolna sidra (<i>eng.</i> glycosylphosphatidylinositol anchors)
IEF	izoelektrično fokusiranje (<i>eng.</i> isoelectric focusing)
IVS4-58-56delATG	delecija tripla baza ATG na mjestu od -58 do -56 u dijelu (egzonu 5 pripadaju e) intronske regije 4 gena <i>PMM2</i> (nizvodno od egzona 5)

IVS5+19T/C	polimorfizam baza T/C na mjestu +19 u dijelu (egzonu 5 pripadaju e) intronske regije 5 gena <i>PMM2</i> (uzvodno od egzona 5)
IVS5+22T/A	polimorfizam baza T/A na mjestu +22 u dijelu (egzonu 5 pripadaju e) intronske regije 5 gena <i>PMM2</i> (uzvodno od egzona 5)
LLO	lipid-vezani oligosaharid (<i>eng.</i> lipide-linked oligosaccharide)
Man	manoza
mRNA	glasni ka RNA (<i>eng.</i> messenger RNA)
OST kompleks	kompleks oligosahariltransferaze (<i>eng.</i> oligosaccharyltransferase complex)
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza (<i>eng.</i> polyacrylamide gel electrophoresis)
pb	par baza
PCR	lan ana reakcija polimeraze (<i>eng.</i> polymerase chain reaction)
PMI	enzim fosfomoanoza izomeraza (<i>eng.</i> phosphomannose isomerase)
PMM2	enzim fosfomanomutaza 2 (<i>eng.</i> phosphomannomutase 2)
<i>PMM2</i>	gen za fosfomanomutazu 2
R141H	aminokiselinska zamjena arginina sa histidinom na mjestu 141
RNA	ribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> ribonucleic acid)
SDS	natrijev dodecilsulfat (<i>eng.</i> sodium dodecyl sulfate)
Ser	serin
Sia	sijalinska kiselina (<i>eng.</i> sialic acid)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (<i>eng.</i> single nucleotide polymorphism)
SSCP	polimorfizam konformacije jednolan ane DNA (<i>eng.</i> single-strand conformation polymorphism)
ssDNA	jednolan ana molekula DNA (<i>eng.</i> 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-acetylglukozamin
UDP-GalNAc	uridin difosfat N-acetilgalaktozamin
Xyl	ksiloza

1. UVOD

1.1. GLIKOZILACIJA

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

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

Za razliku od proteina ija je sinteza pod geneti kom kontrolom, raznovrsne glikanske strukture vezane na okosnici proteina nastaju kao rezultat djelovanja razli itih glikoziltransferaza. Glikozilacija se, dakle, doga a bez izravnog geneti kog uputstva (*eng. template*) te sama polipeptidna sekvenca odre uje uzorak glikozilacije. Kao rezultat toga, glikozilacija nekog proteina je specifi na za svako tkivo i stanicu u kojoj se protein sintetizira (Lis i Sharon 1993). Nastali glikoprotein može imati razli it sastav i kompoziciju glikana na istoj molekuli, a ta mu mikroheterogenost omogu uje obavljanje raznih stani nih funkcija (Voet i Voet 2004).

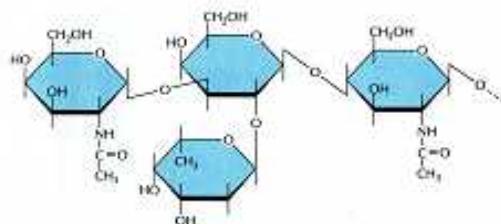
Procjenjuje se da je oko 500 gena uklju eno u glikozilacijske procese i da su polovina proteina u našem tijelu glikoproteini. Gotovo svi sekretorni i membranski proteini eukariotskih stanica se glikoziliraju, a o važnosti ove modifikacije govori i injenica da je nedostatak svih N-vezanih glikana letalan u vrstama od kvasca do sisavaca (Freeze 2006). Ve ina glikana nalazi se na vanjskoj površini stani nih i sekretornih makromolekula, a zbog heterogenosti mogu posredovati ili uskladiti razne me ustani ne interakcije klju ne za razvitak i funkciju složenih višestani nih organizama.

Znanstveno podru je molekularne biologije koje se bavi prou avanjem strukture, biosinteze i biologije prirodnih glikana zove se glikobiologija. Danas je jedna od izazovnijih i brzo razvijaju ih grana biomedicinskih znanosti.

1.1.1. ULOGE GLIKOKONJUGATA

Ugljikohidrati ili še eri jedna su od najzastupljenijih vrsta bioloških molekula i esencijalne su komponente svih živih bi a. Uloge ugljikohidrata su vrlo raznolike: služe kao pri uva energije (glikogen, škrob), gorivo i kao metaboli ki intermedijeri; še eri riboza i deoksiribozu dio su okosnice DNA i RNA; stani ne stijenke biljaka, bakterija, gljiva složene su od polisaharida (celuloza, peptidoglikani, hitin). Važnost ugljikohidrata do 1960-ih godina bila je prili no zanemarena, bili su ak smatrani i inertnim dijelovima stanice, no danas se zna da vezanjem na mnoge proteine i lipide dobivaju klju ne uloge u posredovanju interakcija izme u stanica i ostalih elemenata u stani noj okolini, te specifi ne uloge enzima, receptora, hormona, transportnih i strukturalnih proteina (Stryer i sur. 2003; Voet i Voet 2004).

Raznovrsne funkcije glikoproteina rezultat su njihove specifi ne strukture, napose strukture glikana. Osnovne gra evne jedinice ugljikohidrata su monosaharidi koji se zbog svoje kemijske gra e mogu kovalentno udruživati u ogroman broj strukturno razli itih oligosaharida ili u još ve e polisaharidne lance. Slobodni monosaharidi su aldoze ili ketoze u lan anom ili prstenastom obliku te sadrže najmanje tri ugljikova atoma. Prisutnost dvaju i više hidroksilnih grupa omogu ava da se monosaharidi me usobno povežu - ili -glikozidnim vezama na razli ite na ine, u razli ite duljine i grananja (Slika 1.1.). Osim toga, hidroksilne grupe glikana mogu se još dodatno posttranslacijski fosforilirati, sulfatirati, metilirati, O-acetilirati, acilirati. Na taj na in 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 razgranatih struktura. (Preuzeto iz Alberts i sur. 2002)

U biološkim sustavima postoji teoretski beskona no mnogo razli itih še ernih jedinica. No, u prirodnim makromolekulama še eri se pojavljuju u relativno malom broju konfiguracija i ograni enim kombinacijama, a neki od uobi ajenih monosaharida viših životinja su heksoze, deoksiheksoze, heksozamini, pentoze, uronske i sijalinske kiseline.

Glikoproteini su zbog mikroheterogenosti svojih glikana u mogu nositi obavljati razne stani ne i me ustani ne funkcije, budu i se nalaze na membranama stanica i organela, u citoplazmi, jezgri i na površini sekretornih molekula. Razli ito glikoziliranje istog proteina stvara glicoforme, s druk ijim fizikalnim i biokemijskim svojstvima te druk ijim funkcijama, ovisno o tipu stanice, tkivu i fazama rasta. Biološke uloge glikana obuhva aju cijeli spektar, od relativno nevažnih do onih klju nih u rastu, razvoju, funkciji ili preživljavanju organizma.

Razna su istraživanja pokazala da glikanske komponente glikoproteina obavljaju sljede e fizi ko-kemijske funkcije: mijenjaju topljivost, elektri ni naboj, masu, veli inu i viskoznost proteina u otopini; kontroliraju smatanje proteina (*eng. folding*); stabiliziraju proteinsku konformaciju; osiguravaju termi ku stabilnost i štite proteine od proteolize (Varki i sur. 1999).

Biološke funkcije glikana uklju uju regulaciju unutarstani nog prometa i lokalizaciju glikoproteina u stanici; regulaciju vremena života glikoproteina u cirkulaciji; modifikaciju imunoloških svojstava; prilagodbu aktivnosti enzima i hormona; ulogu stani nih površinskih receptora za lektine, antitijela, toksine i drugo; sudjelovanje u interakcijama izme u 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 ve ine 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 prepoznavaju viralni i bakterijski lektini u prvim koracima infekcije stanica doma ina (Varki i sur. 1999).

1.1.2. BIOSINTEZA GLIKOPROTEINA

Glikoproteini nastaju enzimskim pripajanjem glikanskih struktura na proteine u nastajanju ili na ve gotove, što zna i da je glikozilacija kotranslacijski i/ili posttranslacijski proces. U procesu glikozilacije sudjeluje više od 100 specifi nih glikoziltransferaza, glikozidaza i transportnih proteina koji prenose nukleotid-aktivirane še ere (Trombetta 2003). Najve i 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 opisuju 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 oстатке (Asn) u polipeptidu. To nije, vežu se N-acetilglukozaminom (GlcNAc) na reducirajućem kraju na N-atom bočnog lanca asparagina (GlcNAc-(C₁)-Asn). Pri tomu je Asn unutar konsenzusne sekvenca Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (X je bilo koja aminokiselina, osim prolina) (Slika 1.2.).

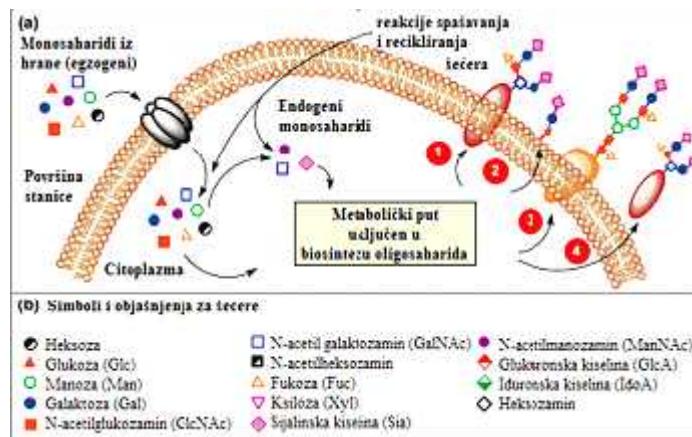


N-vezani GlcNAc

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)

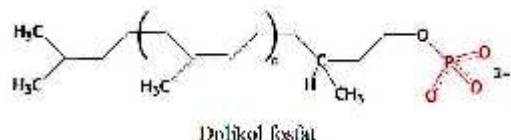
Primjer je da su te konsenzusne sekvence mnogo rjeđe u glikoproteinima nego u neglikoziliranim citosolnim proteinima; pretpostavlja se da su tijekom evolucije proteina selektivnim pritiskom odabrane kao mjesto glikozilacije, jer bi previše glikoziliranih mesta ometalo pravilno smatanje glikoproteina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

N-glikozilacija se najčešće događa kotranslacijski; novonastali peptid esto 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 kona na 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) formiraju glikokaliks. Oligosaharidi mogu biti vezani i na sekretorne proteine (4). (Prilagođeno prema Yarema i Bertozzi 2001)

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

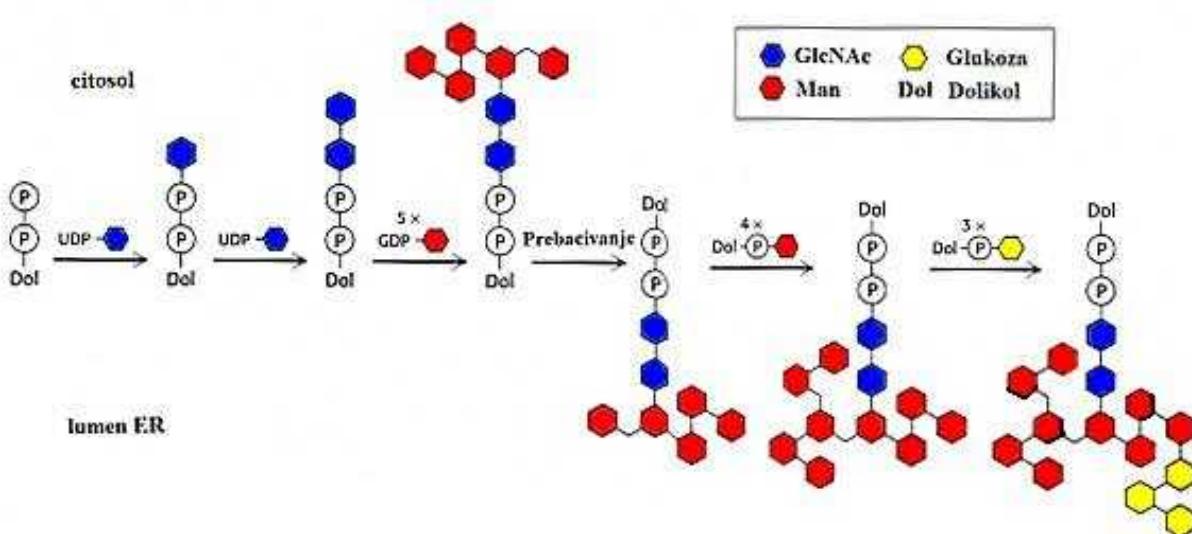


Slika 1.4. Struktura lipidne molekule dolikol fosfata u membrani ER. Broj izopreneskih jedinica (n) varira od 15 do 19, a 14-član oligosaharidni prekursor veže se na terminalnu fosfatnu grupu. (Prilagođeno prema Stryer i sur. 2003)

Po etne reakcije slaganja prekursora doga aju se sa citoplazmatske strane membrane ER: monosaharidi se kroz sedam visoko uskla enih 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-še eri (uridin difosfat N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) i gvanozin difosfat manoza (GDP-Man)). Reakcije dodavanja še era kataliziraju še er-specifi ne glikoziltransferaze: N-acetilglukozaminiltransferaza i manoziltransferaza. Sa citosolne strane nosa a nastaje tako $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, lipid-vezani oligosaharidni prekursor (*eng.* lipide-linked oligosaccharide, LLO).

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

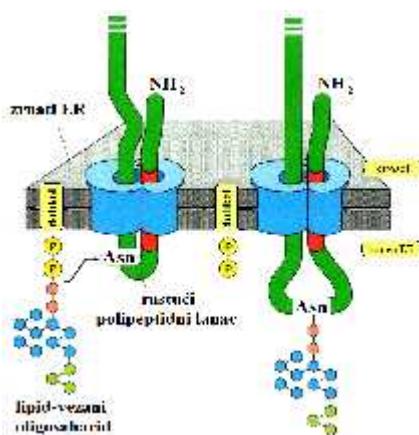
U lumenu ER nadogra uju se na $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ure enim (sekvencijalnim) slijedom reakcija prvo etiri manoze pa tri glukoze, posredovanjem etiriju specifi nih manoziltransferaza i triju glukoziltransferaza usidrenih u membrani ER. Donori še era su manoza i glukoza (Glc) vezani na dolikol fosfate (Dol-P-Man, Dol-P-Glc) koji te še ere prenose iz citoplazme u lumen ER. Ovim reakcijama nastaje kona no u lumenu ER oligosaharidni prekursor od 14 saharidnih jedinica vezanih na dolikol pirofosfat (LLO): $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ prekursor (Slika 1.5.).



Slika 1.5. Sastavljanje N-vezanog oligosaharidnog prekursora sekvencijalnim reakcijama na dolikol pirofosfatu na membrani ER. Prvi dio sinteze doga a 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 še ernih jedinica. (Prilago eno 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 komplettnog (u bloku) oligosaharidnog dijela ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) sa dolikol pirofosfata na određene asparaginske ostatke u proteinu. Nastaje $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$, neprocesirani glikoprotein (Slika 1.6.). Prijenos u lumenu ER obavlja transmembranski proteinski kompleks oligosahariltransferaza (OST kompleks).



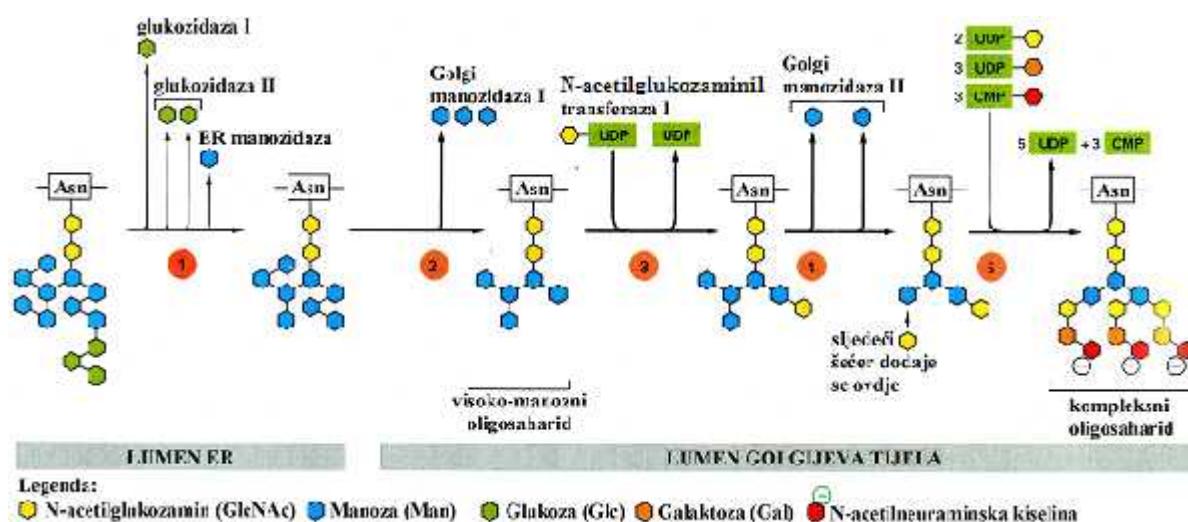
Slika 1.6. Glikozilacija proteina u zrnatom ER. Gotovo odmah po ulasku u lumen ER, polipeptidni lanac glikozilira na ciljanim asparaginskim ostacima (Asn). Lipid-vezani oligosaharidni prekursor prenosi se kao cijelina na Asn u reakciji koju katalizira oligosahariltransferaza (nije prikazana). (Prilagođeno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

Treći korak biosinteze glikoproteina uključuje niz reakcija procesiranja glikana u ER u kojima sudjeluju glukozidaze i β -manozidaza iz ER. Glukozidaza I (vezana uz membranu ER) i glukozidaza II (otopljena u lumenu ER) uklanjaju sa oligosaharida $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ jednu po jednu terminalnu glukozu, a zatim ER β -manozidaza odcijepi i jednu manozu; nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ 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, β -glukoziltransferaza iz lumeni ER ga prepoznaje i dodaje jednu glukoza, 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 provode u 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 -manozidaza I sa $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ odcepi tri manoze; nastaje visoko-manozna struktura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ 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.

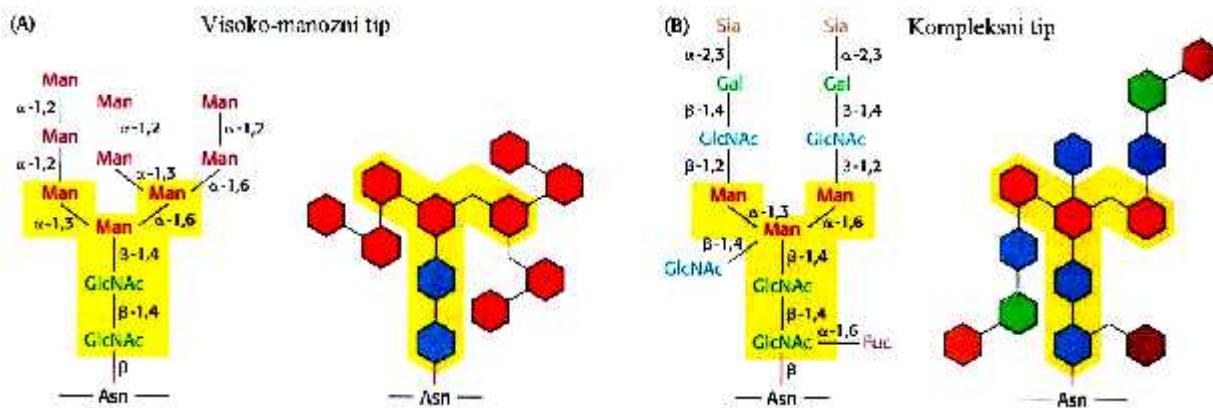


Slika 1.7. Procesiranje oligosaharida u ER i Golgijevu aparatu je visoko uređeni proces, svaki idući korak ovisi o prethodnom. Procesiranje počinje u ER uklanjanjem tri Glc i jedne Man sa oligosaharida prenesenog na protein. Ostali koraci događaju se u Golgiju. Odcepljuju se tri Man što stvara visoko-manozni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

Producen ovih sekvencijalnih reakcija je GlcNAc₁Man₃GlcNAc₂-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, ime 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 manoze vezanih na osnovicu -GlcNAc₂-Asn (Man₉₋₅GlcNAc₂-Asn). Kompleksni N-glikani na obje 3- i 6-vezane manoze vežu N-acetylglukozamin (GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-Asn), a na osnovicu -GlcNAc₂-Asn može biti vezana i fukoza (Fuc). Hibridni tip je kombinacija prethodna dva: na manoze (Man₅GlcNAc₂-Asn) može i ne mora biti vezan GlcNAc, na osnovici isto vrijedi za fukozu. Na inačici su različiti tipovi oligosaharida povezani sa svojom funkcijom i konformacijom određenim u stanici nije još u potpunosti razjašnjen; primjerice, glikoproteini u lizosomima većinom su visoko-manozni tipa, a ekstracelularni proteini većinom su kompleksnog tipa.



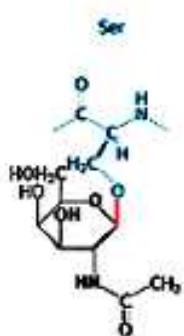
Slika 1.8. Podtipovi N-vezanih oligosaharida. Pentasaharidna jezgra (zasjenjena žuto) zajedno sa svim N-vezanim oligosaharidima i služi kao temelj za stvaranje širokog spektra N-glikana, od kojih su dva ilustrirana (simbolima i shematski): (A) visoko-manozni tip; (B) kompleksni tip. Plavo: GlcNAc; crveno: 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 Golgijeve 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 stanice i ciklus transformacije onkogenima) (Varki i sur. 1999).

Unatoč različitim itostima, 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 po etnih 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-(β)-Ser/Thr; Man-(β)-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 takođe složen.



O-vezani GalNAc

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-GalNAc vezane glikane nalazimo većinom na sekretornim ili vezanim mucinima epitelnih stanica (esti u probavnom sustavu) gdje služe kao lubrikanti i zaštita od patogena. O-manoza vezani glikani vežu se na protein sa donora Dol-P-Man pomoći u 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 antiga 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-(β)-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 unutarstani ni proteini imaju O-(β)-vezan GlcNAc: proteini u jezgrinim porama (nukleoporini), RNA polimeraza II i transkripcijski faktori, citoskeletalni 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. URO ENI POREME AJI GLIKOZILACIJE

Uro eni poreme aji glikozilacije (*eng. congenital disorders of glycosylation, CDGs*) predstavljaju veliku skupinu nasljednih autosomno recesivnih metaboli kih poreme aja. Osnovni uzroci poreme aja su to kaste mutacije gena uklju enih u biosintetski put N-vezanih glikana, a o ituju se u obliku potpuno ili djelomice nedostatne glikozilacije glikoproteina i drugih glikokonjugata. Hipoglikozilirani glikoproteini gube svoje funkcije koje im ina e odre uje vezana glikanska komponenta. Budu i glikokonjugati imaju mnoge klju ne uloge u metabolizmu - u stani nom prepoznavanju i adheziji, migraciji stanica, otpornosti na proteaze, obrani stanica od patogena, antigenom odgovoru i drugo, o ito je da e abnormalna glikozilacija glikoproteina rezultirati razli itim i obi no teškim multisistemskim poreme ajima kod bolesnika sa CDG. Stoga ne iznena uje injenica da sindromi CDG spadaju me u najkompleksnije metaboli ke bolesti koje poznajemo (Jaeken i Carchon 1993).

Oboljeli od CDG razvijaju naj eš e teške neurološke, psihomotorne i razvojne poreme aje 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, zahvaljuju i upravo širokom spektru raznovrsnih simptoma koji se nekad poklapaju sa nekim drugim bolestima te u nekoj mjeri i nedovoljnoj upu enosti lije nika u ovaj poreme aj. Do danas je otkriveno oko tisu u bolesnika oboljelih od CDG diljem svijeta (Freeze 2006).

Naziv uro eni poreme aji glikozilacije ili CDG uveden je 1999. godine (First International Workshop on CDGS, Leuven, Belgija) kako bi okupio ovu sve širu skupinu poreme aja koji su se do tada nazivali sindromima ugljikohidrat-deficijentnih glikoproteina (*eng. carbohydrate deficient glycoprotein syndromes*, tako er 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 obuhva a poreme aje u sastavljanju oligosaharidnog prekursora vezanog na dolikol pirofosfat na membrani ER i/ili defekte u njegovom prijenosu na protein; u ove je reakcije uklju eno oko 30 gena (njihovih produkata). Trenutno grupa CDG-I broji 14 podtipova koji se obilježavaju CDG-Ia do CDG-In. Mala slova abecede ozna avaju razli ite podtipove u kronološkom slijedu otkri a defektnog gena. Skupina CDG-II uklju uje poreme aje u procesiranju N-vezanih glikana na glikoproteinu, što zahtijeva sudjelovanje još oko 20 gena. Do sada je utvr eno 8 podtipova, CDG-IIa do CDG-IIh. Postoji i skupina uro enih poreme aja glikozilacije kojima još nije utvr en uzrok te se oni sve do utvr ivanja to nog 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 uklju enih u glikozilacijske procese. Trenutno je identificirano gotovo 30 defektnih gena koji uzrokuju poreme enu glikozilaciju proteina (Freeze 2006). Osim toga, ova klasifikacija ne obuhva a važne poreme aje biosinteze O-vezanih glikana, proteoglikana ili glikozil fosfatidilinozitolnih sidra (Freeze 2001); u najnovije vrijeme CDG skupina proširila i na poreme aje 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 poreme aje N-glikozilacije, iako uro eni poreme aji glikozilacije obuhva aju i N- i O-glikozilacijske putove biosinteze glikokonjugata. Kod ljudi, ve inu CDG ine N-glikozilacijski poreme aji, dok je O-glikozilacijskih poreme aja poznato svega nekoliko slu ajeva (Jaeken 2003). Do danas su identificirana ukupno 22 poreme aja N-glikozilacije, od ega je 14 uzrokovano poreme enom biosintezom glikana prije prijenosa na protein (CDG-Ia-In), a 8 poreme enim procesiranjem glikana nakon prijenosa na protein (CDG-IIa-IIh). Tako er, otkrivena su i etiri poreme aja O-glikozilacije: dva su posljedica poreme ene sinteze O-ksilosilglikana, a druga dva poreme ene sinteze O-manozilglikana.

Prvi slu aj CDG otkrio je belgijski lije nik Jaak Jaeken 1980. godine tijekom lije enja 19-mjese nih jednojaj anih blizanki sa psihomotornom retardacijom i celebelarnom hipoplazijom, ali nepoznatom etiologijom same bolesti. U njihovoj krvi otkrio je specifi ne abnormalnosti proteina poput snižene razine globulina koji veže tiroksin i pove ane aktivnosti arilsulfataze A (Jaeken 2003). No, tek nakon etiri godine Jaeken je zaklju io da je bolest povezana sa N-glikozilacijom serumskih proteina, uz pomo tada nove metode izoelektri nog fokusiranja serumskog transferina (*eng. isoelectric focusing, IEF*) uo io je da serumski transferin kod ovih bolesnica pokazuje katodni pomak zbog nedostatka sijalinske kiseline. To je bilo klju no zapažanje koje je ujedno postavilo metodu IEF kao temeljnu u detekciji poreme aja N-glikozilacije povezanih sa nedostatkom sijalinske kiseline (Jaeken 2003). Nakon 15 godina od klini kog opisa bolesti, Van Schaftingen i Jaeken (1995) zaklju ili su da je u ovom slu aju uzrok abnormalne glikozilacije proteina smanjena aktivnost enzima fosfomanomutaze 2, a gen *PMM2* koji enzim eksprimira utvr en je 1997. godine (Matthijs i sur. 1997). Ovaj prvi otkriveni poreme aj N-glikozilacije, koji se nekada nazivao i Jaekenovim sindromom, obilježen je danas kao CDG-Ia.

Simptomi CDG su vrlo raznoliki, što je posljedica poreme aja svestranih funkcija glikoproteina u itavom ljudskom tijelu. Primjerice, naju estaliji CDG, CDG-Ia (poglavlje 1.2.3.), poga a živ ani sustav i mnoge druge organe te se manifestira ve inom vrlo teškim simptomima poput psihomotorne retardacije i neuroloških poreme aja. Za razliku od ovog sindroma, CDG-Ib na

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

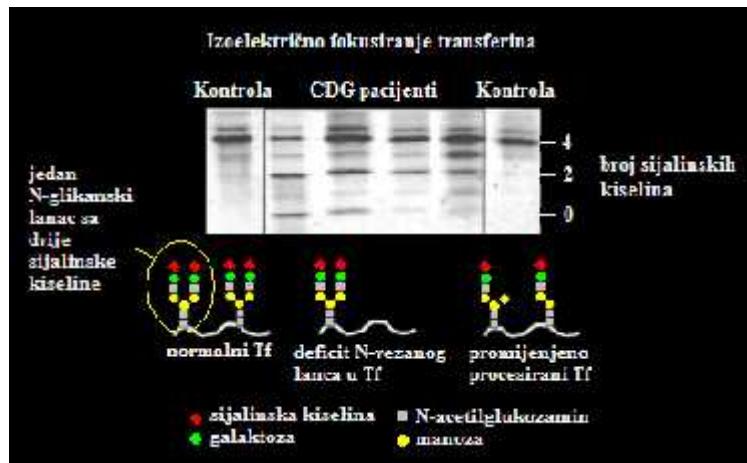
Simptomi CDG tipa II (poglavlje 1.2.4.) slični su onima CDG-I, uključuju također mentalnu retardaciju, poreme aje u razvoju, epilepsiju i drugo. Bolesti koje se ti u poreme aja u O-glikozilaciji oituju se uglavnom miši nom distrofijom, abnormalnostima u strukturi oka, moždanim malformacijama i psihomotornom retardacijom. Defekti sinteze O-ksilosilglikana manifestiraju se kao progeroidna varijanta Ehlers-Danlos sindroma i multipli egzostozni sindrom, a defekti sinteze O-manozilglikana kao Walker-Warburg sindrom i miši no-o na-moždana bolest (Jaeken 2003).

1.2.1. DIJAGNOSTIKA CDG

Kod CDG, poreme ena 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 poreme aji u N- i O-glikozacijskim 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 izoelektricitetna točka je pri pH 5,4. Kod poreme aja N-glikozilacije, elektroforetski obrazac IEF pokazuje katodni pomak sijalotransferina na dva osnovna nivoa (Slika 1.10.). Obrazac tipa 1 (kod CDG-I) pokazuje povećanje glikoformi Tf kojima nedostaje jedan (disijalotransferin, izoelektricitetna 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), ukazuju i 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 povezanje disijalo- i asijalotransferina, uslijed nedostatka jednog ili oba N-glikanska lanca; prikazan je shematski u sredini dolje. Kod CDG-II obrazac Tf ima povezanje 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 tako 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-IIIf (Freeze 2006). U tom slučaju, potrebna je primjena drugih dijagnostičkih metoda i detaljnja molekularna analiza gena.

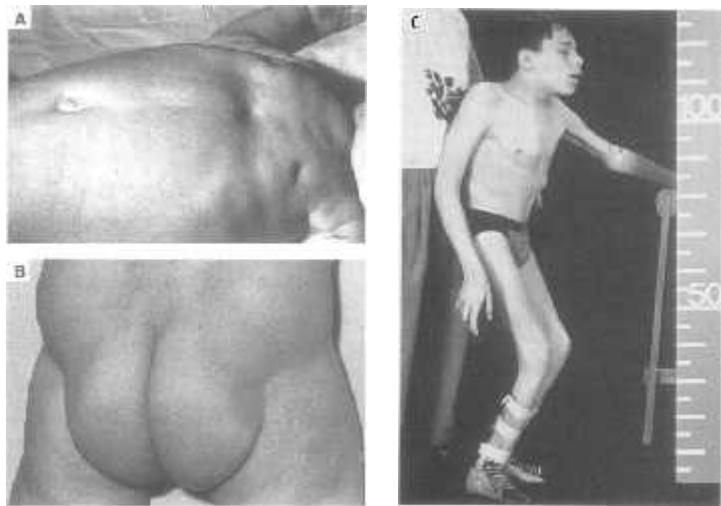
Druge metode za dijagnostiku CDG razvijene su zbog injenice da IEF Tf razdvaja glikoforme na temelju ukupnog negativnog naboja molekule, izgleda se ne vidi kako je to u strukturalno promijenjen glikanski lanac, niti gdje je defekt u biosintetskom putu. Metoda masene spektrometrije (MS) otkrila je 1992. 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 takođe su vrlo osjetljive i brze, omogućuju automatizaciju analize i mogu detektirati defekte u strukturi glikanskih lanaca i koraku glikozilacijskog puta. Primjerice, osjetljivost denaturirajuće visoko-tla ne tekuće kromatografije (*eng.* denaturing 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. UROĀNI POREME AJI GLIKOZILACIJE TIPA I (CDG-I)

Poreme aji 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 u 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 neonatalnoj dobi najizraženije su neurološke abnormalnosti (poglavitna aksijalna hipotonija, psihomotorna retardacija, abnormalni pokreti očiju, strabizam i hiporefleksija), razne dismorfije (najtipičniji su abnormalna distribucija adipoznog tkiva: na stražnjici, trbušu, debele ruke i stopala, izgled „naranih kora“, te retrakcija bradavica, Slika 1.11.) i poteškoće u hranjenju koje onemogućuju normalno napredovanje i rast.



Slika 1.11. Tipi ne zna ajke sindroma CDG-I kod novorođenih i djece: 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 štitnja e normalna (Ferrari i sur. 2001).

Bolest često zahvaća više organa u obliku insuficijencije jetre, bubrega, srca i drugih organa. Upravo kao posljedica teških infekcija, poremećaji 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).

Najčešći oblik CDG-I jest CDG-Ia; ak 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 uzrokovani 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, opskrblijuju i na taj na in 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), klini ka slika ove bolesti bitno je drugačija od CDG-Ia. Klasični simptomi CDG-Ib vezani su uz hepato-intestinalne probleme; javlja se enteropatija sa gubitkom proteina, urođena fibroza jetre, ali i koagulopatija, površanje i hipoglikemija. Vrlo je bitna rana dijagnoza bolesti, jer je ovaj oblik CDG za sada jedini lječivo i to oralnom primjenom manoze (Nehues i sur. 1998). Bolesnici ne pokazuju neurološke poremećaje; nema mentalne retardacije, neuropatijski ili ataksije. Sindrom CDG-Ib otkriven je 1998. godine gotovo istovremeno od strane dvije grupe istraživača (Jaeken i sur. 1998; Nehues 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 takođe 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 1-3 glukoziltransferaze koji se u citosolne strane ER dodaje prvu glukozu sa Dol-P-Glc na Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. Nastaju neglukozilirani LLO prekursori koji se nakupljaju se u stanici jer su slabi supstrati za OST kompleks (Schachter 2001). Najučestalije mutacije koje pogoduju gen *ALG6* su teške mutacije Y131H i A333V (pogodjuju 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 poremećaja aktivnosti enzima 1-3 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 callosum (Denecke i sur. 2005). Enzim 1-3 manoziltransferaza u lumenu ER katalizira prijenos manoze sa Dol-P-Man na Man₅GlcNAc₂-PP-Dol, oblik koji se kod defektne funkcije enzima nakuplja u

fibroblastima oboljelih (Körner i sur. 1999). Budu i 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 pove anje disijalotransferina, a pove anja asijalotransferina nema (Jaeken 2003).

CDG-Ie

Bolest uzrokuje defektna funkcija kataliti ke podjedinice Dol-P-Man sintaza-1 (GDP-Man:Dol-P manoziltransferaza) koju eksprimira gen *DPM1*. Kod dvoje oboljelih otkrivenе su u tom genu mutacije R92G i 628delC (Imbach i sur. 2000). Sli no kao i kod CDG-Id, nakuplja se $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol u fibroblastima te IEF serumskog transferina pokazuje sli an uzorak. Do danas je otkriveno pet pacijenata. Klini ka slika sindroma pokazuje teške neurološke poreme aje, uglavnom psihomotornu retardaciju, epilepsiju i mikrocefaliju (Jaeken 2003).

CDG-If

Ovaj sindrom uzrokovan je nedostatnom aktivnoš u proteina lec35, koji ima važnu ulogu u iskorištavanju Dol-P-Man i Dol-P-Glc. Mutacijama pogo eni gen je *MPDU1* (Kranz i sur. 2001). U fibroblastima oboljelih nakuplja se $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol i $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol sa malo glukoziliranih oblika, što govori da je nedostatak proteina lec35 kompenziran nekim drugim putem (Schachter 2001). Bolesnici pokazuju tešku encefalopatiju, miši nu hipotoniju, o nu atrofiju, este napade i celebelarnu atrofiju (Freeze 2001).

CDG-Ig

Kod ovog sindroma deficit enzima manoziltransferaze VIII (Dol-P-Man: $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol -6-manziltransferaza) onemogu uje prijenos zadnje manoze na $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol prekursor. Poreme aj 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: $\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ -PP-Dol glukoziltransferaza). Taj enzim dodaje u lumenu ER drugu po redu glukozi na rastu i LLO. Pri poreme enoj funkciji enzima u fibroblastima bolesnika nakuplja se $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol (Chantret i sur. 2003). Oboljeli pokazuju simptome sli ne

onima CDG-Ib: enteropatiju, hepatomegaliju, hipoalbuminemiju, edeme te tako da ne pokazuju neurološke poremeće aje (Jaeken 2003).

CDG-Ii

Oboljeli od CDG-Ii rade aju se kao normalna novorođenici. 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:Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol manoziltransferaza). Ovo je prvi otkriveni poremećaj glikoziltransferaze koja sa citosolne strane ER dodaje drugu po redu manozu sa GDP-manoze na rastu i 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 rastu i 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 uzrokovana mutacija u humanom genu *ALG1* koji eksprimira enzim manoziltransferazu I (GDPMAN:GlcNAc₂-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, stećenu mikrocefaliju, hipotoniju, napade, kardiomiopatiju, koagulopatiju i povišenu temperaturu. Kod pacijenta je otkrivena homozigotna mutacija c.773C>T (S258L) (Schwarz i sur. 2004).

CDG-II

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 1,2-manziltransferazu Dol-P-Man:Man₆-i Man₈-GlcNAc₂-PP-Dol manoziltransferaza. Enzim u lumenu ER dodaje sedmu i devetu manozu na rastu i LLO prekursor (Frank i sur. 2004).

CDG-Im

Ovaj nedavno otkriveni poreme aj uzrokovani 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. Poreme aj je svrstan u skupinu CDG-I budu i se deficijencija dolikol kinaze može otkriti pomo u IEF serumskog transferina. Klini ki simptomi ovog sindroma vrlo su teški: hipotonija, mikrocefalija, kardiomiopatija, tetraplegija, gubitak kose i hiperkeratoza. Oboljeli zbog težine bolesti umiru u vrlo ranom djetinjstvu. Utvr ene 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 utvr ena homozigotna mutacija c.199C>T (R67C) u visoko o uvanoj domeni humanog gena *RFT1* koji eksprimira protein Rft1. Taj je enzim uklju en u translokaciju $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ prekursora sa citosolne u luminalnu stranu ER, a ukoliko je enzim mutiran, spomenuti nedovršeni prekursor nakuplja se u stanicama. Oboljeli je pokazivao simptome este za skupinu CDG-I: psihomotornu retardaciju, hipotoniju, napade, zaostajanje u razvoju, hepatomegaliju i koagulopatiju (Haeuptle i sur. 2008).

1.2.3. URO ENI POREME AJ GLIKOZILACIJE TIPA Ia (CDG-Ia)

Uro eni poreme aj glikozilacije tipa Ia (CDG-Ia, MIM 212065) naju estaliji je oblik uro enih poreme aja glikozilacije te ini ak 70% svih do sada otkrivenih slu ajeva 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 poreme aj uzrokovani mutacijama u genu *PMM2* koji eksprimira enzim fosfomanomutazu 2. Uslijed poreme aja, mnogi serumski glikoproteini su hipoglikozilirani, ime im je narušena normalna funkcija u itavom 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 po etnim koracima N-glikozilacije proteina GDP-manoza je aktivirani donor manoze na rastu i 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 ak cijeli lanci N-vezanih glikana.



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

Prvi klini ki slu aj CDG-Ia dijagnosticirao je 1980. godine Jaeken i sur. Nakon što su japanski istražitelji (Yamashita i sur. 1993) pomogli otkri em serumskih transferina sa nedostatkem itavih N-glikanskih lanaca, Van Schaftingen i Jaeken (1995) biokemijski su utvrdili prvi poreme aj 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%. Sli ne rezultate dobili su Körner i sur (1998) istražuju i aktivnost PMM2 u fibroblastima oboljelih od CDG-Ia: smanjena aktivnost PMM2 rezultirala je smanjenjem koli ine 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 ve ini tkiva, a PMM1 ima najviše u mozgu i plu ima. 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, i taj 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 najveći i duljine (116 pb) (Bjursell i sur. 2000). Prisutnost mutacija u genu *PMM2* potvrđena je kod svih osam egzona; mutacije su većinom nesintonimne (*eng. missense*), a prisutni su i pomaci u okviru itanja (*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 povređenu termolabilnost, slab afinitet za supstrat ili potpunu deaktivaciju mutiranog enzima (Freeze 2006). Najčešća je to kasta 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, ograničen u ograničenoj ekspresiji 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 ranjoj embriogenezi (Matthijs i sur. 1998), odnosno da dovodi do pobađaja. Homozigoti za neke druge mutacije gena *PMM2* su utvrđeni.

Kod nekih mutacija, koje uzrokuju blaži oblik CDG-Ia, uobičajeno 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

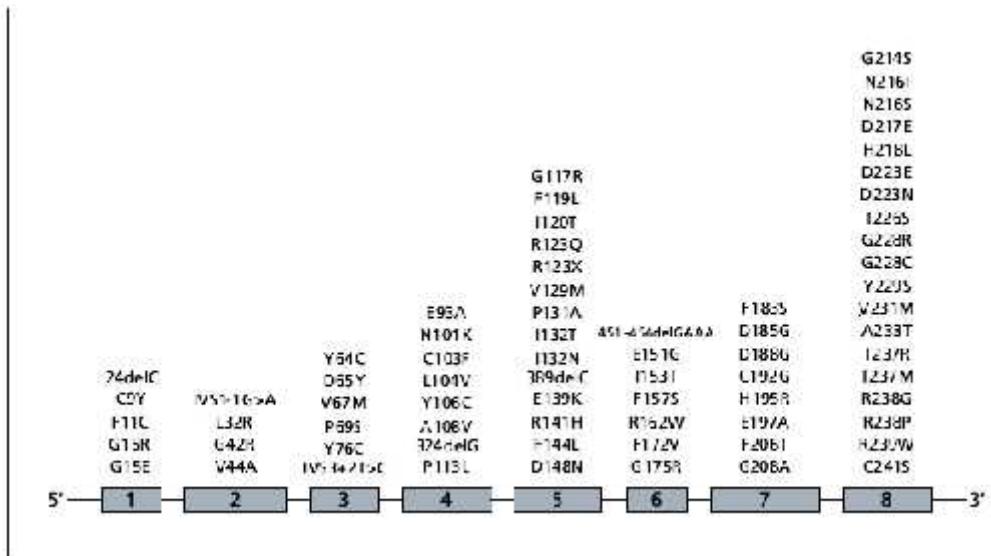
fenotipa vidljiva je u populacijama Sjeverne Europe, gdje naj eš a mutacija R141H uzrokuje teški poreme aj) (Freeze 2006).

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

Druga po u estalosti, posebice u Skandinavskim zemljama (Bjursell i sur. 2000), to kasta je mutacija F119L (c.357C>A) u egzonu 5 gena *PMM2*. esto se javlja zajedno sa drugim mutacijama, no naj eš a je u kombinaciji sa R141H; takav bolesnik je složeni heterozigot za F119L/R141H. Upravo je taj genotip naj eš i kod oboljelih od CDG-Ia i predstavljen je teškim poreme ajima (Matthijs i sur. 2000; Vuillaume-Barrot 2000). Mutacije R141H i F119L ine ak 88% svih mutacija koje uzrokuju CDG-Ia u Danskoj populaciji (Kjærgaard i sur. 1998). Mutacija F119L je utvr ena u homozigotnom obliku, što govori da je puno blaža od mutacije R141H (Matthijs i sur. 1998). Ostale mutacije na ene 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) na eni 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 utvr eno da se pojavljuju zajedno sa nekim specifi nim 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 utvr ena 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) na en 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 tako er specifi ni 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 podvu ene su dvije naj eš e mutacije, R141H i F119L u egzonu 5, povezane sa nastankom CDG-Ia. (Prilago eno prema Kjærgaard 2004)

1.2.3.2. Klini ka obilježja CDG-Ia

Sindrom CDG-Ia naj eš i je oblik CDG op enito, uzrokovanih mutacijama u genu *PMM2* koje dovode do smanjene aktivnosti enzima PMM2. Budu i se *PMM2* eksprimira u gotovo svim tkivima, bolest je naj eš e multiorganskog karaktera sa esto vrlo naglašenim neurološkim implikacijama. Težina simptoma varira ovisno o genotipu; pacijenti CDG-Ia uglavnom su teško bolesni, ali ima i blažih oblika. Poreme aj se primarno o ituje unutar prve godine života, iako su neki slu ajevi 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 ega opada (Freeze 2001; Kjærgaard 2004).

Sindrom CDG-Ia relativno je teško prepoznati pri klini kom pregledu, budu i cijeli repertoar simptoma esto pedijatre navede na druge zaklju ke. Klasi ni 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 novorođenih i djece 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 skrašenog tijela i udova), hipogonadizam i retinits pigmentosa, uz ustaljenu psihomotornu retardaciju (Jaeken 2003; Sparks i Krasnewich 2005b). Neki od kliničkih znakova su i visoko evidentni, velike uši te tanka gornja usna (de Lonlay i sur. 2001), a kod jedne 50-godišnje bolesnice uočeno je preuranjeno starenje (Stibler 1994).

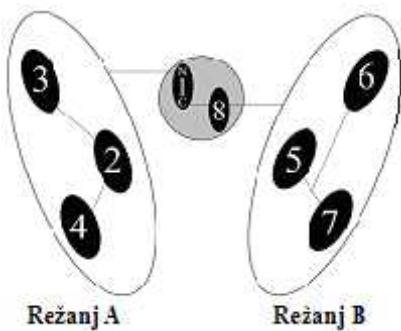
U prvim kliničkim dijagnozama, estetički dismorfni simptomi izokrenutih bradavica te nepravilnog odlaganja masnog tkiva (posebice na stražnjici, trbuhi, rukama i stopalima) bili su gotovo sigurni znakovi CDG-Ia. No kasnije, mnogi jednako teški slučajevi CDG-Ia nisu uopće pokazivali te znake (Jaeken 2003). 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 u inak 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 manzo-1-fosfata i GDP-manoze u stanicama dodatkom egzogenog manoze, ali *in vivo* manzo-1-fosfat iz krvi teško ulazi u stanice jer je visoko polarna. Razvijanje derivata manzo-1-fosfata (poput netoksičnih acetoksimetil estera i hidrofobnih manzo-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. URO ENI POREME AJI GLIKOZILACIJE TIPA II (CDG-II)

Uro eni poreme aji glikozilacije tipa II predstavljaju poreme aje u procesiranju N-vezanih glikana na glikoproteinu. Dorada glikanskih struktura doga a se u ER i Golgijevu aparatu, a uklju uje razne specifi ne glikozidaze i glikoziltransferaze koje «oblikuju» glikan dok glikoprotein prolazi kroz te organele. No, ne dovode samo poreme aji u funkciji tih enzima do nepravilnog procesiranja glikana u ER i Golgiju; razne mutacije koje poga aju gene uklju ene u biosintezu transporteru nukleotid-aktiviranih še era i mutacije gena za podjedinice visoko o uvanog oligomernog Golgijeva (COG) kompleksa dovode do raznih sindroma CDG-II.

Kompleks COG (*eng. conserved oligomeric Golgi complex*) sastoji se od osam podjedinica koje ine 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 še ernih transporteru duž Golgijeva tijela, ali i izme u Golgija i drugih stani nih kompartimenata.



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

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

defekte u razliitim 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 uzrokovani su mutacijama u humanom genu *MGAT2* koji eksprimira enzim GlcNAc transferazu 2 (GnT II ili UDP-GlcNAc: -6-D-manozid 1,2-N-acetilglukozaminiltransferazu II) (Jaeken i sur. 1994). U katalitičkim domenima enzima otkrivene su mutacije poput S290F i H262R. GnT II u Golgijevu katalizira korak prelaska hibridnog u kompleksni tip N-glikan. 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 pomoći u IEF serumskog Tf pokazuje uglavnom samo disialotransferin. 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). Novorođenac 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 bio u pravilu pronalaskom abnormalnih oligosaharida u urinu (tetrasaharida, [Glc(1-2)Glc(1-3)Glc(1-3)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 našla mutacija 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 CDG-IIc 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 transporter ne unosi efektno GDP-fukozu u Golgi te nastaju hipofukozilirani glikoproteini (Lübke i

sur. 1999). Hipofukozilacija neutrofila onemoguava 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 α -1,4-galaktoziltransferaze I (4GalT I) (izoenzim 1) uslijed mutacija u genu *B4GALT1*. Utvrđena je homozigotna mutacija: insercija jednog nukleotida (1031-1032insC) koja uzrokuje nastanak «krnjeg» enzima. Enzim 4GalT I prenosi galaktozu sa UDP-Gal na terminalne GlcNAc-ostatke kompleksnih glikana na glikoproteinu u Golgiju. Kod CDG-IIId 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 tetrasijalotransferina (Han ke 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 transporteru 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 transporteru 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 onemoguila nastanak sijaloglikoproteina. U krvi jedinog otkrivenog oboljelog nađeni su trombociti sa abnormalnim membranama; detektirani su trombocitopenija i umjerena neutropenija te masovna plastrica na 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 pogo en humani gen *COG1*; utvr ena je homozigotna insercija jednog nukleotida (2659–2660insC) kojom nastaje «krnji» COG1 protein, što rezultira dezintegracijom itavog kompleksa COG. Ovo je tako er miješani poreme aj N- i O- glikozilacijskih puteva. Kod bolesnika je primije ena blaga mentalna retardacija i celebelarna atrofija, hipotonija, dismorfizam i spori razvoj (Foulquier i sur. 2006).

CDG-IIh

Sli no sindromima CDG-IIe i CDG-IIg, poreme aj CDG-IIh ili CDG-II/COG8 posljedica je mutacija u humanom genu za podjedinicu COG8 kompleksa COG. Radi se o genu *COG8* ije mutacije uzrokuju stvaranje «krnjeg» proteina COG8; to dovodi do dezintegracije dimera COG1-COG8, što pak remeti itav kompleks COG. Kao posljedica njegove nefunkcionalnosti, poreme ena je regulacija transporta glikozidaza i glikoziltransferaza u Golgiju pa je ovo tako er miješani poreme aj 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 slu ajevi CDG kojima još nije utvr en to an geneti ki defekt ozna avaju se kao CDG-x. Budu i je CDG velika grupa glikozilacijskih poreme aja koji se o ituju i kroz N- i kroz O-glikozilacijske puteve te uklju uje mnogo gena, otkrivanje novih poreme aja u stalnom je porastu. Klini ke slike neklasificiranih CDG su raznolike, sa blagim do teškim simptomima. Javljuju se hipotonija, napadi, mikrocefalija, dismorphija, gastrointestinalni problemi te esto rana smrt (Grünewald i sur. 2002).

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uro eni poreme aji glikozilacije (CDGs) velika su skupina poreme aja uzrokovanih mutacijama u genima koji sudjeluju u N- i O-glikozilaciji proteina. Naju estaliji tip CDG op enito je CDG-Ia, uzrokovan mutacijama u genu za fosfomanomutazu 2. Naj eš a mutacija, R141H, uzrokuje smanjenu aktivnost enzima PMM2 pa su po etni koraci N-glikozilacije poreme eni i nastaju hipoglikozilirani glikoproteini. Posljedica takve abnormalne glikozilacije glikoproteina uglavnom su teški multiorganski i neurološki poreme aji kod osoba oboljelih od CDG-Ia.

Sindrom CDG-Ia je rijedak metaboli ki poreme aj (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 u estala u populacijama Sjeverne Europe, gdje ima i najviše nositelja (1/70) naj eš e mutacije koja uzrokuje CDG-Ia, mutacije R141H (Schollen i sur. 2000). Za podru je Jugoisto ne Europe nema podataka o u estalosti nositelja mutacije R141H u tim populacijama. U Republici Hrvatskoj do danas nije zabilježen niti jedan slu aj CDG-Ia, iako to ne isklju uje postojanje oboljelih od CDG-Ia u hrvatskoj populaciji, kod kojih je mogu e 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 inilo ukupno 60 uzoraka iz Šibensko-kninske i Dubrova ko-neretvanske županije. Drugim rije ima, cilj je bio ispitati i odrediti u estalost 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 esto javljaju specifi ni polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) u intronskim sljedovima (IVS4 i IVS5) pripadaju im egzonu 5 gena *PMM2*. Stoga se u ovom radu mogla o ekivati pojave sljede ih 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 u estalost nositelja tih intronskih polimorfizama, odnosno utvrditi u estalost 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 inilo je 60 ispitanika (18 žena te 42 muškaraca, prosje ne starosne dobi 44 godine) koji nisu u krvnom srodstvu. Njihovi uzorci pune krvi prikupljeni su na slijede i na in: 30 uzoraka sakupljeno je u Zavodu za transfuzijsku medicinu Op e bolnice Šibenik u Šibeniku (Šibensko-kninska županija) te 30 uzoraka u Zavodu za transfuziologiju Op e bolnice Dubrovnik u Dubrovniku (Dubrova ko-neretvanska županija). Istraživanje je odobrilo Eti ko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveu ilišta u Zagrebu te Eti ka povjerenstva Op ih bolnica Šibenik i Dubrovnik u kojima su uzorci sakupljeni. 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 ozna eno mjesto na filter-papiri ima za sakupljanje uzoraka pune krvi (Blood Stain Cards[®], WhatmanTM, UK). Krv je dobivena ili venepunkcijom (uz etilen-diamin-tetraacetat (EDTA) kao antikoagulans) ili iz jagodice prsta. Prikupljena krv na filter-papiri ima za sakupljanje uzoraka pune krvi osušena je desetak minuta na zraku (pri sobnoj temperaturi) i pohranjena do uporabe na +4 C.

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

2.1.2. FILTER-PAPIRI I ZA SAKUPLJANJE UZORAKA PUNE KRVI

- Blood Stain Cards[®] (WhatmanTM, UK)



Ovi filter-papiri i služe op enito za sakupljanje i transport uzoraka pune krvi te tjelesnih tek u ina (Slika 2.1.). Sakupljanje je u inkovito jer upijaju i filter-papir služi kao zaštitni sloj koji pomaže sušenju uzoraka i sprje ava izravni kontakt. Budu i su namijenjeni kratkotrajnom rukovanju, uzorci prikupljeni na ovim filter-papirima imaju uvaju se na +4 °C do daljnje uporabe.

Slika 2.1. Filter-papiri i 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 CaCl₂ (Sigma, SAD)
50% glicerol (Kemika, Hrvatska)
destilirana voda

- korištene u lan anoj reakciji polimeraze:

- 10 x PCR pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3) (Sigma, SAD)
 - MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, SAD)

- nizvodne ishodnice za R141H (*IntU2*) (12,9 µM)
5'-GCACAGAGCTGAGAACATT-3' (Invitrogen, SAD)
- uzvodne ishodnice za R141H (*R141H*) (13,7 µM)
5'-GGCCATATCTTATTCCATA-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:**

- agaroha (Sigma, SAD)
- *1 x TAE-pufer, pH 8,3:* 40 mM Tris acetat (Sigma, SAD)
1 mM EDTA (Roth, Njema ka)
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 molekulske masa DNA:
DNA Mass RulerTM 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 H₃BO₃ (Roth, Njema ka)
 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 H₃BO₃ (Roth, Njema ka)
 1 mM EDTA (Roth, Njema ka)
 destilirana voda
 - *SSCP-pufer za denaturaciju i nanošenje uzorka:*
 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 uzorka nedenaturirane dvolan ane 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% AgNO₃ (Sigma, SAD)
- 2,5% Na₂CO₃ (Sigma, SAD)
- 0,02% formaldehid (37%) (Sigma, SAD)

• **korištene pri pro išavanju PCR produkata nakon lan ane reakcije polimeraze:**

- QIAquick 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 prošavanju 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

- Vortex-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 lanjanje reakciju polimeraze (GeneAmp®PCR System 2007, Applied Biosystems, SAD)
- Elektronska vaga (Electronic Balance Model 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 ozna enog mesta filter-papiri a za sakupljanje uzoraka pune krvi izrezan je komadi 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 stavljenе na centrifugiranje 3 minute pri 15 700 x g. Nakon centrifugiranja pažljivo je odba eno 950 µl supernatanta te je u epruvetu dodano 150 µl *otopine Chelex* i 50 µl *otopine proteinaze K* (do kona ne koncentracije 2 mg/ml). Tko prire ene epruvete odmah su stavljenе 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) oslobo ene lizom krvnih stanica.

Nakon inkubacije epruvete su kratko promiješane na Vortex-miješalici i opet inkubirane na kupelji 8 minuta na 95 C, ime je inaktivirana Proteinaza K. U završnom koraku izolacije genomske DNA, epruvete su centrifugirane 3 minute pri 15 700 x g ime 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.

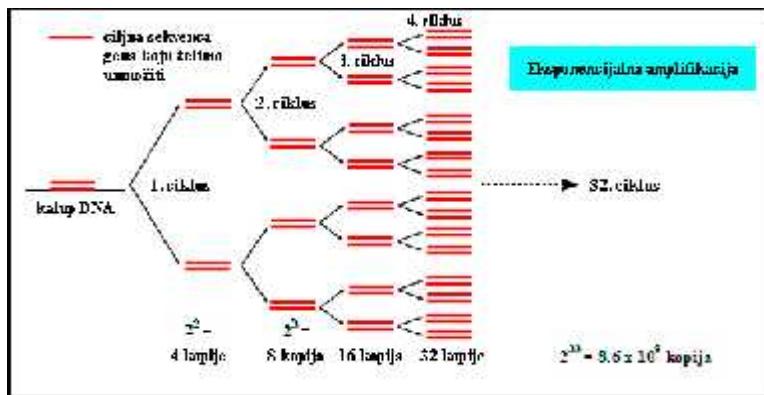
2.2.2. LAN ANA REAKCIJA POLIMERAZE

Nakon izolacije humane genomske DNA metodom Chelex®, iz uzoraka je bilo potrebno umnožiti fragment DNA od interesa u genu *PMM2*, to no odre ene veli ine (291 pb). U tu svrhu uzorci su umnoženi lan anom 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 dijagnosti ke procedure temeljene na DNA (na primjer forenzika) gotovo su

nezamislive bez uporabe metode PCR, budu i je njome mogu e iz ekstremno male koli ine DNA u kratko vrijeme dobiti dovoljno DNA za daljnja istraživanja.

Opis metode lan ana reakcija polimerazom (metoda PCR)

Lan ana reakcija polimeraze (PCR) je reakcija koju ine tri elementa: 1) denaturacija dvolan ane DNA povišenom temperaturom, 2) sljepljivanje (*eng. annealing*) komplementarnih oligonukleotidnih ishodnica (*eng. primers*) na ciljne sekvene jednolan ane DNA i 3) produživanje ishodnica vezanih na DNA koje katalizira termostabilna DNA polimeraza, na primjer *Taq* DNA polimeraza. Ta tri elementa ine jedan ciklus PCR reakcije. Svrha metode jest da se ponavljanjem ciklusa (obi no 25-35 ciklusa) u PCR reakciji umnoži željena sekvena DNA (Slika 2.2.). Nakon svakog ciklusa umnoži se (otprilike) dvostruko više DNA jer svaki DNA fragment umnožen u prethodnom ciklusu daje u idu em (nakon denaturacije) dva kalupa za sintezu DNA. Prema tome, PCR reakcija rezultira eksponencijalnim akumuliranjem specifi nog DNA fragmenta. Na primjer, PCR reakcija od 32 ciklusa daje oko 8.6×10^9 kopija specifi ne sekvene DNA.



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

Denaturacija dvolan ane 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 doga a sljepljivanje ishodnica na ciljne sekvene jednolan ane DNA je kriti na. Pri previsokoj temperaturi ishodnice se slabo vežu na DNA (mali prinos umnožene DNA), a pri preniskoj može do i do nespecifi nih vezivanja (umnoži se i neželjene sekvene DNA).

Najbolja temperatura sljepljivanja je obično 3-5 °C niža od temperature disocijacije ishodnica sa kalupu DNA. Za uspješnu PCR reakciju vrlo su bitne sekvence 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 Mg²⁺ 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, velike 291 pb, u genu *PMM2*: egzona 5 sa dijelovima pripadaju ih 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, MgCl₂, 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 Mg²⁺ 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.

Po etnim 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 velike 291 pb, PCR produkti) odmah su ohlađeni na +4° C do daljnje uporabe.

Tablica 2.1. Sastav reakcijskih smjesa za lan anu reakciju polimeraze.

Sastojak	Kona na 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 (veli ina 291 pb) gena PMM2.

Ishodnica	Nukleotidni slijed	T _m	Veli ina PCR produkta
nizvodna za R141H	5'-GCACAGAGCTGAGAACATT-3'	54° C	291 pb
uzvodna za R141H	5'-GGCCATATCTTATTCCATA-3'	54° C	291 pb

Tablica 2.3. Reakcijski uvjeti za umnažanje ciljnog fragmenta DNA (veli ina 291 pb) gena PMM2 lan anom reakcijom polimeraze.

Reakcija	T _m	Vrijeme trajanja reakcija	Broj ciklusa
po etna denaturacija	94° C	1 minuta	
denaturacija	94° C	1 minuta	
sljepljivanje	54° C	1 minuta	32 ciklusa
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 lan anom reakcijom polimeraze valjalo je provjeriti elektroforezom u gelu agaroze. Primjenom elektri nog polja možemo u gelu razdvojiti molekule DNA na temelju njihove veli ine i zatim razdvojene vrpce DNA vizualizirati etidij bromidom koji se interkalira u strukturu DNA i fluorescira nakon pobude UV-svjetlom.

Prije en 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 pe nici dok se sva agaraza nije otopila. Tikvica sa vru om otopinom agaroze odmah je stavljena u staklenu ašu napunjenu hladnom vodom radi hla enja i termometrom je pra en pad temperature. Otopina ohla ena na 56°C izlivena je u kalup te ostavljena da se gel stvrdne.

Uzorci za elektroforezu pripremljeni su tako da je svakom uzorku DNA (produkt lan ane 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*.

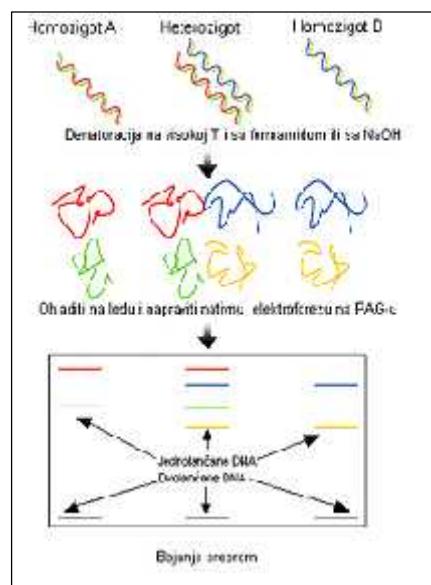
Elektroforeza je provedena pri elektri nom polju jakosti 5-7 V/cm dok tamnoplavo obojani uzorci DNA nisu prešli 2/3 gela (7x7 cm). Po završetku elektroforeze, gel je inkubiran u *otopini etidij bromida* radi vizualizacije vrpci DNA u gelu u trajanju od 30 minuta (gel se bojao u kutijici sa *otopinom etidij bromida* oko pola sata u mra noj prostoriji, budu i se etidij bromid raspada na obi nom 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 veli ine 291 pb. Gelovi su slikani fotoaparatom.

2.2.4. ANALIZA POLIMORFIZAMA KONFORMACIJE JEDNOLAN ANE DNA

Nakon umnažanja ciljnog fragmenta DNA veli ine 291 pb lan anom 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 obra eni analizom polimorfizama konformacije jednolan ane DNA (*eng. single-strand conformation polymorphism, SSCP*).

Opis analize polimorfizama konformacije jednolan ane DNA (metoda SSCP)

Analiza polimorfizama konformacije jednolan ane DNA (metoda SSCP) temelji se na usporedbi jednolan ane DNA divlje tipa i mutirane DNA koje se analiziraju nedenaturiraju om gel elektroforezom pri neutralnom pH. Metodu ine tri koraka: 1) umnažanje ciljnog fragmenta DNA lan anom reakcijom polimeraze, 2) denaturacija PCR produkta (umnoženog fragmenta DNA) i 3) elektroforeza jednolan anih DNA u poliakrilamidnom gelu pri neutralnom pH. Jednolan ane molekule DNA smataju se u kompleksne trodimenzionalne strukture uslijed unutarlan anih sparivanja baza (Slika 2.3.). Jednolan ane DNA iste duljine ali razli itih sekvenci stvarat e razli ite strukture (konformere) koje se razlikuju u elektroforetskoj mobilnosti. Prema tome, promjena jedne baze u sekvenci DNA može promijeniti sekundarnu strukturu molekule te e takva mutirana DNA putovati druk ijom brzinom u gelu od one divlje tipa i do i e do njihova razdvajanja. Upravo tu razliku u mobilnosti DNA divlje i mutiranog tipa koristi metoda SSCP.



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

SSCP je vrlo uinkovita metoda za detekciju to kastih mutacija i polimorfizama te u dobro optimiranim elektroforetskim uvjetima (odre ena temperatura, postotak gela, napon struje) može detektirati gotovo 100% mutacija. To na kontrola temperature tijekom elektroforeze bitna je za

o uvanje konformacijskih struktura jednolan anih DNA. Najoptimalnija veli ina fragmenata DNA za razlu ivanje SSCP elektroforezom je oko 150-250 nukleotida.

Prednosti metode su relativno jednostavno izvo enje (PCR, denaturacija DNA i elektroforeza), visoka osjetljivost (detekcija to kastih mutacija i polimorfizama) i cijena (nije potrebna dodatna oprema). Nedostatak je smanjenje osjetljivosti metode pove anjem veli ine umnoženih fragmenata DNA (PCR produkata). Danas je metoda SSCP naj eš e korištena metoda za utvr ivanje mutacija jedne baze u raznim genskim bolestima, odnosno ima najve u primjenu u brzim i preliminarnim analizama velikog seta uzorka, radi odre ivanja frekvencija pojavnosti poznatih mutacija i ili polimorfizama.

Analiza polimorfizama konformacije jednolan ane DNA (metoda SSCP)

Nakon umnažanja ciljnog fragmenta DNA veli ine 291 pb lan anom 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 to kastih mutacija i polimorfizama ciljne regije gena *PMM2* (egzon 5 sa dijelovima pripadaju ih intronskih regija IVS4 i IVS5, veli ine 291 pb). Budu i se razdvajaju fragmenti DNA duljine 291 pb, ra en 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 namještена je na 15° C te je napravljena dovoljna koli ina 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 nosa em 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 uzorka* (sadrži formamid i NaOH za denaturaciju DNA te boje bromfenol plavo i ksilen cijanol) u volumnom omjeru 1:2; smjesa je zagrijana na 94° C tijekom 6 minuta i naglo ohla ena na ledu. Pripremljena je i kontrola putovanja dvolan ane DNA miješanjem sa *SSCP-puferom za nanošenje uzorka nedenaturirane dvolan ane DNA* (sadrži saharozu i boje).

Nakon što su u jažice redom naneseni standard molekulskih masa DNA (DNA Mass RulerTM SMO 383, 5 µl), pozitivna kontrola za mutaciju R141H (heterozigot za mutaciju R141H), kontrolna dvolan ana 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°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 AgNO₃ tijekom 30 minuta. Nakon bojanja, gel je kratko ispran u redestiliranoj vodi i inkubiran u otopini 2,5% Na₂CO₃/0,02% 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 (to kasta mutacija i/ili polimorfizam) u nukleotidnom sljedu istraživane sekvence gena *PMM2* (DNA fragment veličine 291 pb) uz pravilno provedenu i optimiranu SSCP elektroforezu rezultirat će drugi različiti elektroforetskim uzorkom putovanja istraživane jednolanane DNA od jednolanane 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 drugi od jednolanane DNA divljeg tipa moramo odrediti točan slijed nukleotida i utvrditi o kakvoj se promjeni radi. U tu svrhu, određivanje nukleotidnog sljeda DNA metodom sekvenciranja radi se u nekoliko koraka:

- 1) provjera uspješnosti pro išavanja i određivanje koncentracije PCR produkata agaroznom gel elektroforezom
- 2) provjera uspješnosti pro išavanja i određivanje koncentracije PCR produkata agaroznom gel elektroforezom
- 3) reakcija sekvenciranja
- 4) provjera uspješnosti pro išavanja i određivanje koncentracije PCR produkata agaroznom gel elektroforezom
- 5) određivanje nukleotidnog slijeda razdvajanjem produkata sekvenciranja na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD)

2.2.6.1. Pro išavanje PCR produkata nakon lanane reakcije polimeraze

Lanom 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 odrediti enom genskom fragmentu odrediti nukleotidni slijed, iz reakcijske smjese uklanjuju se sve navedene tvari kako bi se dobila ista genomska DNA.

Pro išavanje 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 *pufere 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 *pufere PE* za ispiranje DNA i centrifugirana dva puta na prethodno opisani način. QIAquick kolona je premještena u istu epruvetu od 1,5 ml, te je na sredinu kolone dodano 50 µl *pufere 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 prošene PCR produkte je sakupljen.

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

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

Pripremljen je 1,8% agarozni gel grijanjem 0,54 g agaroze u 30 ml *1 x TAE pufera* do vrenja. Nakon hla enja do 56° C otopina agaroze izlivena je u kadicu za elektroforezu i stvrdnuta. U 10 µl pro iš enog 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™ SMO 383, Fermentas, Litva).

Elektroforeza je provedena pri elektri nom 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 vrpcí DNA u gelu u trajanju od 30 minuta i nakon toga promatran na transiluminatoru uz UV-svetlost valne duljine 312 nm. Približna koncentracija DNA (PCR produkta) odre ena je usporedbom intenziteta fluorescencije vrpce koja odgovara PCR produktu sa intenzitetom fluorescencije vrpce koja je približno jednake veli ine i sadrži poznatu koli inu DNA (standard molekulskih masa DNA). Izra unat je volumen otopine PCR produkata koji sadrži približno 5 ng DNA. Gelovi su slikani fotoaparatom.

2.2.6.3. Reakcija sekvenciranja

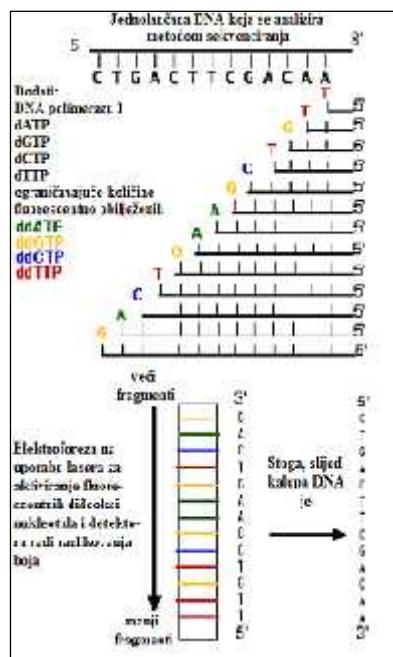
Nakon što su ciljni fragmenti DNA (291 pb) umnoženi lan anom reakcijom polimeraze, pro iš eni te im je odre ena koncentracija, radi se reakcija sekvenciranja kojom želimo dobiti fluorescentno obilježene fragmente DNA koji se razlikuju u duljini za jednu bazu. Sekvenciranjem DNA na taj se na in dobiju produkti razli itih veli ina koji se mogu razdvojiti kapilarnom elektroforezom (na automatskom sekvenatoru) i ijom 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 jednolan anom kalupu DNA. Budu i ddNTP nemaju 3'-OH skupinu na deoksiribozu, njihovom ugradnjom do i e do preuranjenog prestanka sinteze DNA jer se ne može stvoriti fosfodiesterska veza sa slijede im nukleotidom (dNTP). Dideoksi metoda (*eng. chain-termination method*) temelji se na etiri zasebne lan ane reakcije polimerazom. Svaka zahtijeva iste jednolan ane DNA kao kalup i radioaktivno obilježene ishodnice, DNA polimerazu, pufer, smjesu dNTP i po jedan od etiri

radioaktivno obilježenih ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Lan anom reakcijom polimeraze nastaju u svakoj reakciji fragmenti DNA razli itih veli ina jer im je dalnja sinteza preuranjeno zaustavljena ugradnjom ddNTP korištenog u reakciji. Fragmenti DNA iz sve etiri reakcijske smjese razdvoje se po veli ini elektroforezom na istom gelu i vizualiziraju autoradiografijom. Sekvencna koja se ita od dna gela prema gore komplementarna je originalnoj sekvenci (kalupu DNA).

Danas se eš e koristi modificirana dideoksi metoda gdje su ddNTP obilježeni razli itim fluorescentnim bojama. Princip metode je isti, no prikladnija je iz razloga što ne koristi radioaktivni materijal. Umjesto etiri zasebne reakcijske smjese radi se jedna koja sadrži kalup DNA, DNA polimerazu I, dNTP, neobilježene ishodnice te ddNTP obilježene razli itim fluorescentnim bojama. Lan anom reakcijom polimeraze nastaju fragmenti DNA koji se razlikuju jedan od drugoga u veli ini za to no jedan nukleotid (Slika 2.4.).



Slika 2.4. Shema metode reakcije sekvenciranja jednolanane 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 da svaka fluorescentna boja emitira svjetlo svojom valnom duljinom nakon eksitacije laserom, moguće je odati nukleotidni slijed DNA (kao i

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

Reakcija sekvenciranja

Sekvenciranje proišenih 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 etirima razliitim rodaminskim fluorescentnim bojama (ddATP obilježen bojom dR6G, ddCTP obilježen bojom dROX, ddGTP obilježen bojom dR110 i ddTTP obilježen bojom dTAMRA). Priredna je reakcijska smjesa od 10 µl miješanjem odgovarajućeg volumena proišenog 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 Vortex-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 proišenog PCR produkta.

Reakcija	T _m	Vrijeme trajanja reakcija	Broj ciklusa
po etičnoj denaturaciji	95 °C	4 minute	
denaturacija	95 °C	30 sekundi	
sljepljivanje	50 °C	15 sekundi	25 ciklusa
produljivanje	60 °C	4 minute	
hlačenje	4 °C	beskonačno	

2.2.6.4. Pro iš avanje produkata sekvenciranja

Produkti sekvenciranja moraju se prije razdvajanja kapilarnom elektroforezom pro istiti od viška ddNTP obilježenih fluorescentnim bojama i viška ishodnica. Pro iš avanje 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 pro iš avanja te je promiješana na Vorteks-miješalici. Smjesa je inkubirana na vodenoj kupelji 5 minuta pri 98° C i zatim 10 minuta pri 25° C. Nakon inkubacije i hla enja, reakcijska smjesa je nanijeta na Centri Sep Spin kolonu. Kolona je priređena 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 ep sa dna kolone (pri tome je bilo 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 prebađena 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 pro išene produkte sekvenciranja osušen je na vakumskoj centrifugiji (Speed Vac, Christ, Germany) tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi.

2.2.6.5. Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata

Pro išenim 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 pro išeni 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. Usljedila je inkubacija na 95° C (denaturacija) i hlađenje na ledu. Uzorci su ponovo promiješani na Vorteks-miješalici i kratko centrifugirani (držani su na ledu do uporabe). Priredena 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° C. Nukleotidni slijed uzorka određen je primjenom programa Sequencing Analysis Software.

2.2.7. Statistička obrada podataka

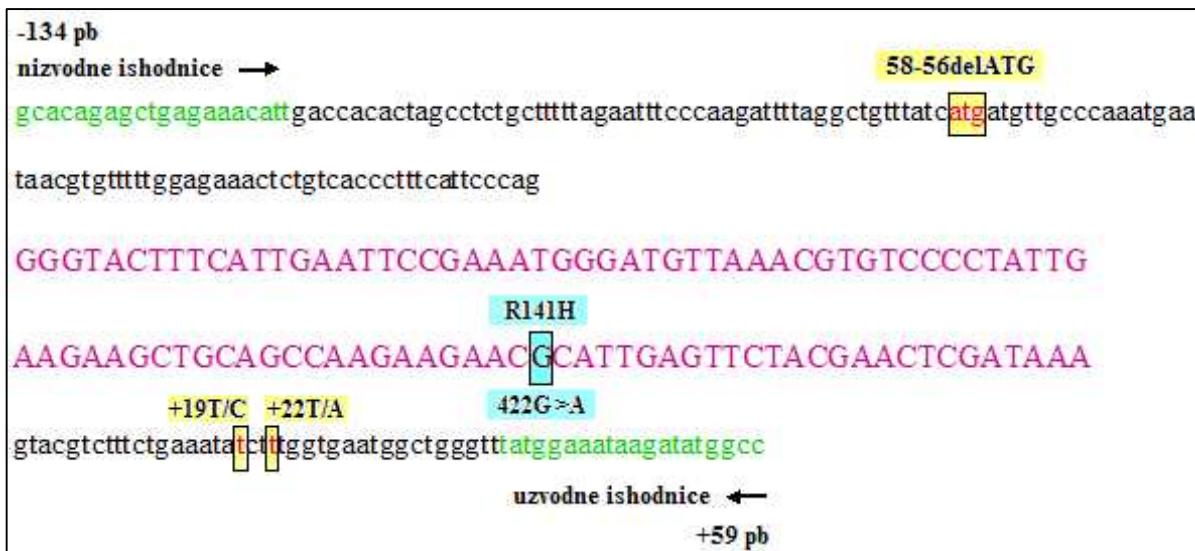
U estalost ili frekvencija genotipova i alela u uzorcima određena je putem prebrojavanjem. Statistička značajnost u razlici distribucije između dobivene i očekivane frekvencije alela određena je pomoću χ^2 testa kojim se želi utvrditi da li je populacija za određene frekvencije alela u skladu sa Hardy-Weinberg 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 ravnog 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

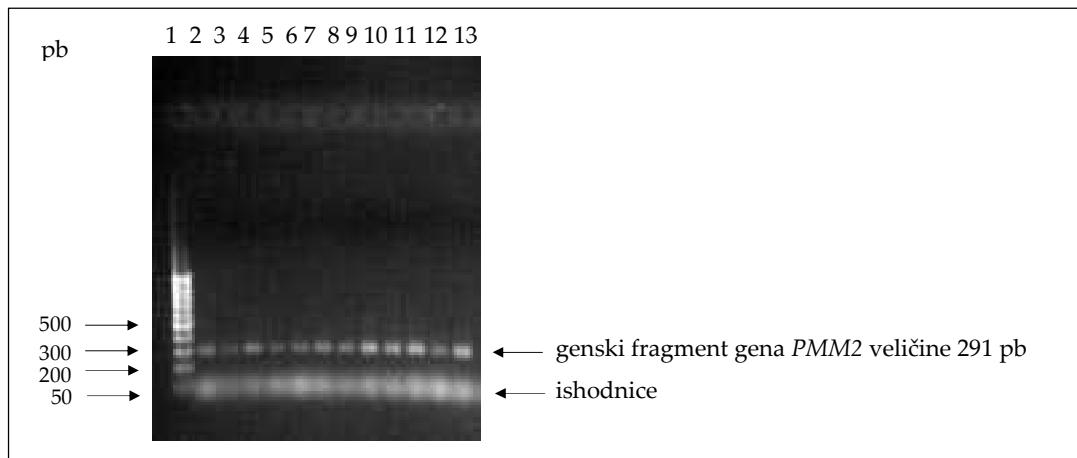
3.1. MUTACIJE I POLIMORFIZMI GENA PMM2

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 tokom 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 jednolanih fragmenata (SSCP), jer je na taj način 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 svjetlo 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 ishodnice otisnuti su zelenom bojom.

Uzorci pune krvi 60 dobrovoljnih davatelja sakupljeni su na papiri im 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 koli ina DNA (~0,2-1 ng/ μ l izolata), pa nije bilo moguće odrediti spektrofotometrijski koncentracije gDNA. Koncentracija izolirane genomske DNA (gDNA) procijenjena je na temelju usporedbe koli ina umnoženih fragmenata nakon elektroforetskog razdvajanja sa standardima DNA poznatih molekulskih masa (Slika 3.2).

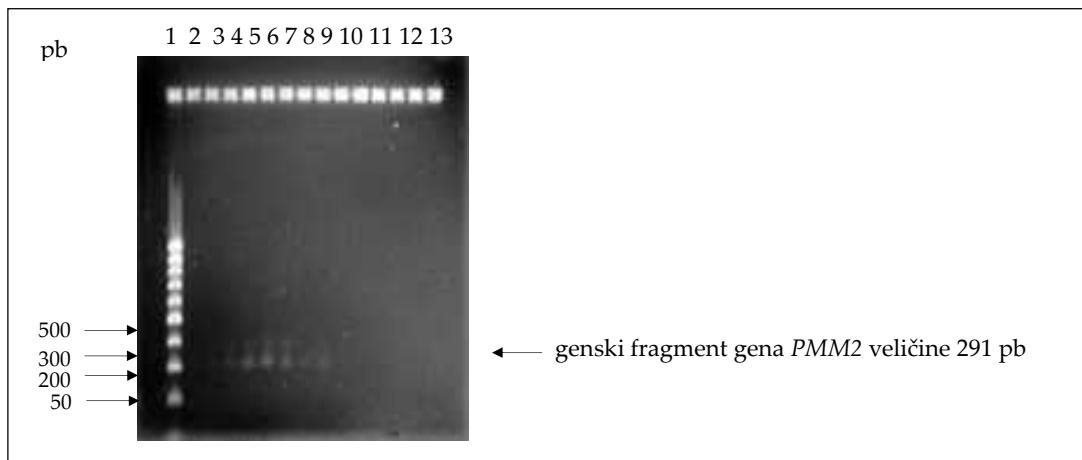


Slika 3.2 Elektroforeza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadaju ih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena PMM2. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lanane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani elektroforezom u 1,8% agaroznom gelu. 1: standard molekulskih masa DNA. 2-13: PCR produkti nastali umnažanjem 12 različitih uzoraka gDNA. Položaji PCR produkata veličine 291 pb (nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadaju ih 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 μ l dobivenog izolata tijekom 32 ciklusa umnažanja uz koncentraciju ishodnica 0,5 μ M omoguće nastajanje dovoljne količine (~50 ng) PCR produkata za analizu SSCP.

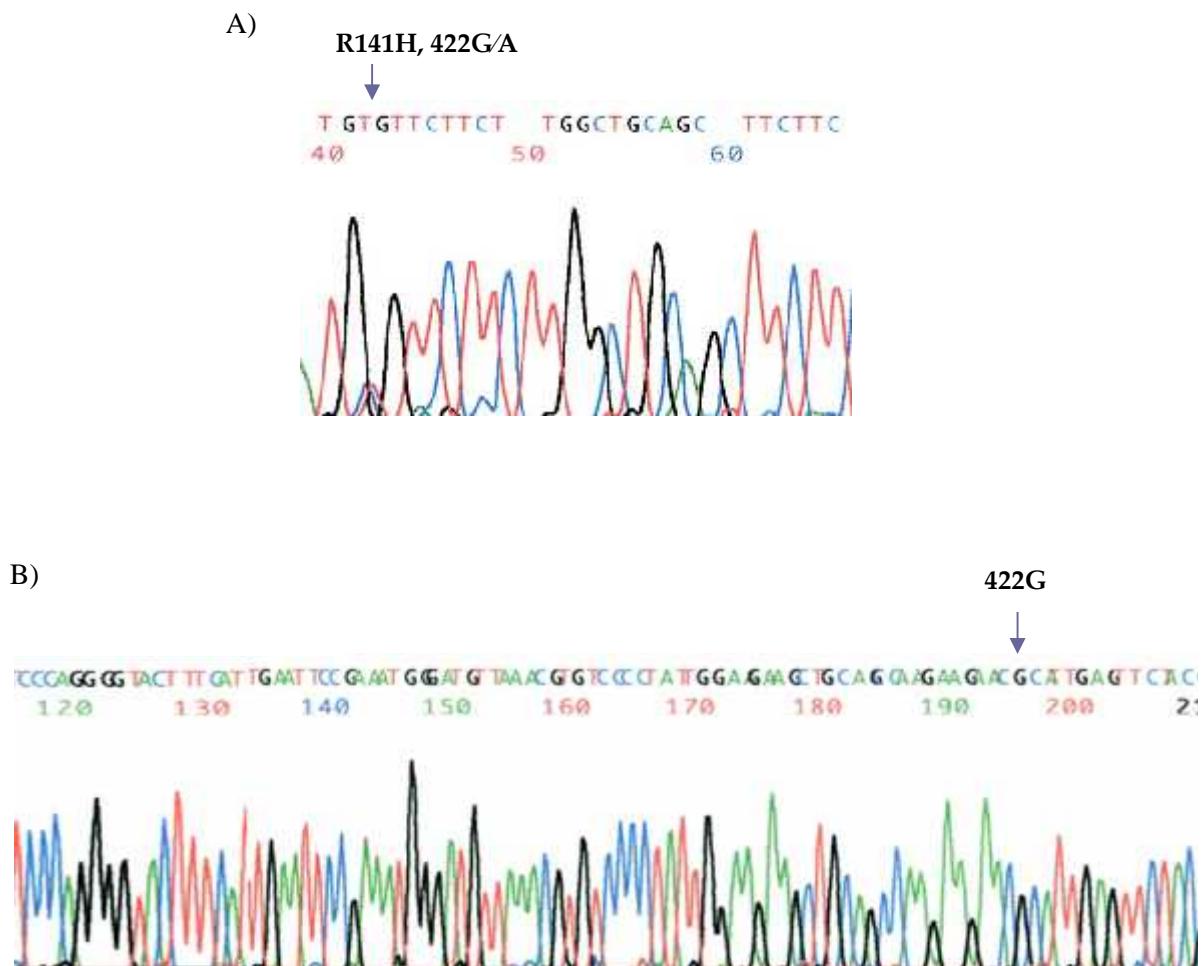
Uspješnost i točnost umnažanja PCR produkata lančanom reakcijom polimerazom potvrđena je određivanjem nukleotidnog slijeda umnoženog fragmenta. PCR produkti (3-10 ng) dobiveni umnažanjem pozitivne kontrole (genomske DNA dobivene izolacijom iz krvi bolesnika oboljelih od CDG-Ia) te PCR produkti dobiveni umnažanjem dijela genomske DNA izolirane iz krvi zdravih osoba (divlji tip), uz prethodno navedene optimirane uvjete, provođeni 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 ABI Prism 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 provođenja pomoći u 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 provođenja avanja. PCR produkti nastali su umnažanjem egzona 5 gena *PMM2* i pripadajućih intronskih regija pomoći u 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.

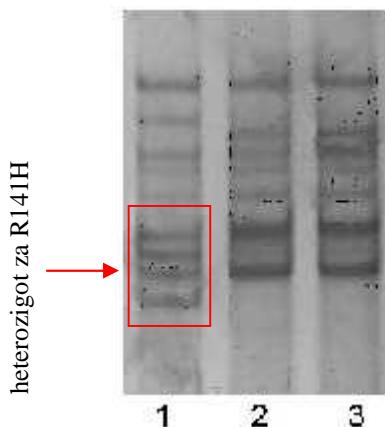


Slika 3.4. Dijelovi nukleotidnih sljedova PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadaju ih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena PMM2 genomske DNA izolirane iz A) bolesnika oboljelog od CDG-Ia i B) zdrave osobe. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lanane reakcije polimeraze,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

3.1.1. SSCP ANALIZA ZA ODRE IVANJE 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 hla enje 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 etiriju vrpcu 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 pripadaju ih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena PMM2 provedena pri temperaturi od 15° C. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krv i lanane 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 oznaeni položaji vrpcu PCR produkata, a strelicom jasno razdvojene etiri vrpce.

3.1.2. U ESTALOST MUTACIJE R141H

Od sakupljenih i analiziranih 60 uzoraka sa podru ja Šibensko-kninske te Dubrova koneretvanske županije, sedam uzoraka pokazalo je SSCP analizom promijenjene elektroforezne obrasce koji, me utim, nisu odgovarali pozitivnoj kontroli (heterozigot za R141H, Slika 3.5., linija 1). Navedenim uzorcima (N=7), kao i nasumi no odabranim uzorcima s normalnim elektroforeznim obrascem (N=20) nukleotidni je slijed odre en reakcijom sekvenciranja.

U analiziranim uzorcima nije utvr ena prisutnost mutacije R141H. (Tablica 3.1). Me utim, 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 uzorce s normalnim obrascem potvr eno da su divljeg tipa za sve ciljne mutacije/polimorfizme. Time je potvr eno da je uz odabrane uvjete SSCP analize mogu e jasno prepoznati nositelje ciljnih mutacija/polimorfizama divljeg tipa.

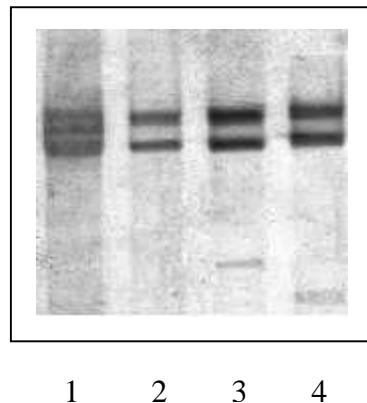
Tablica 3.1. U estalost genotipova i alela R141H (c.422G>A) u genu *PMM2* u uzorku hrvatske populacije (N=60).

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

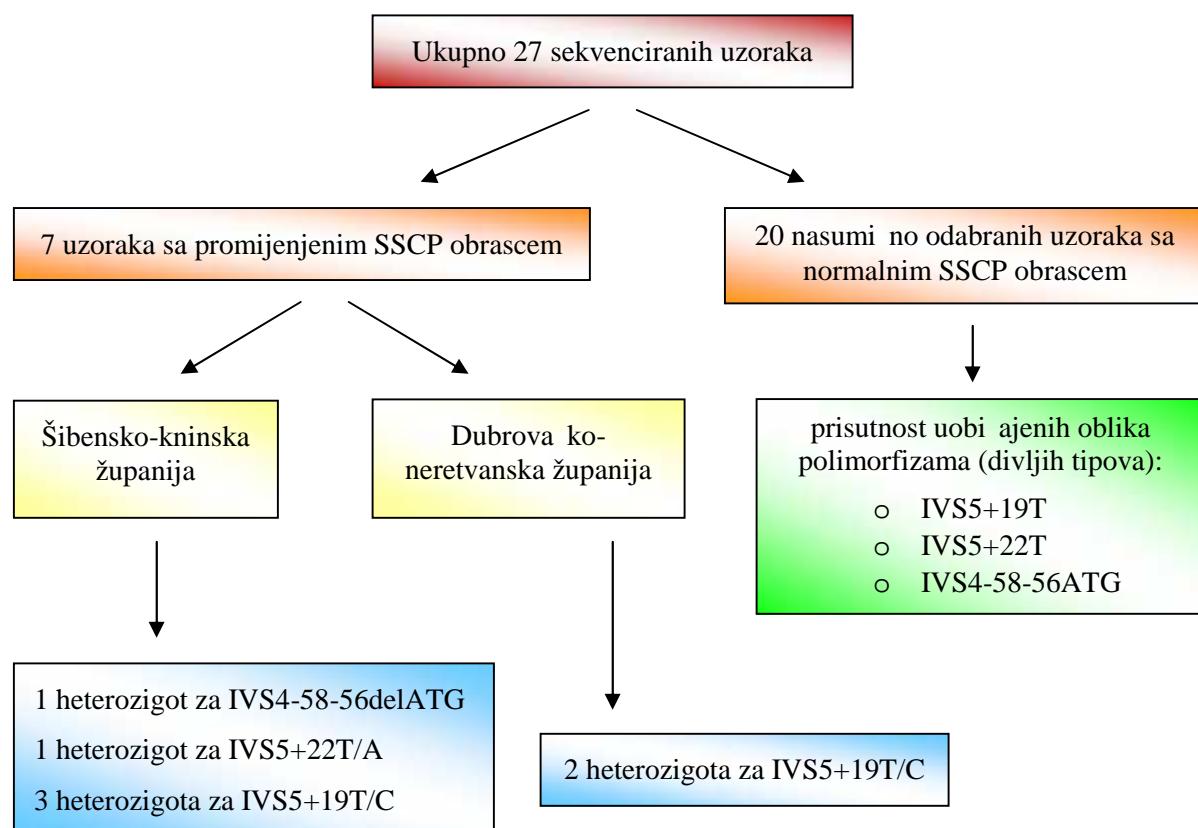
Intronski polimorfizmi jedne baze IVS5+19T/C i IVS5+22T/A smješteni su u susjednom intronskom slijedu egzona 5 (IVS5). Pokazano je da su povezani sa specifičnim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia (Bjursell i sur., 2000; Matthijs i sur., 2000). Alel IVS5+19C najčešće se pojavljuje zajedno s mutacijom E139K (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 nasumićno odabranih uzoraka s normalnim obrascem) (Slika 3.6.).



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 puno krvnih lanci 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).

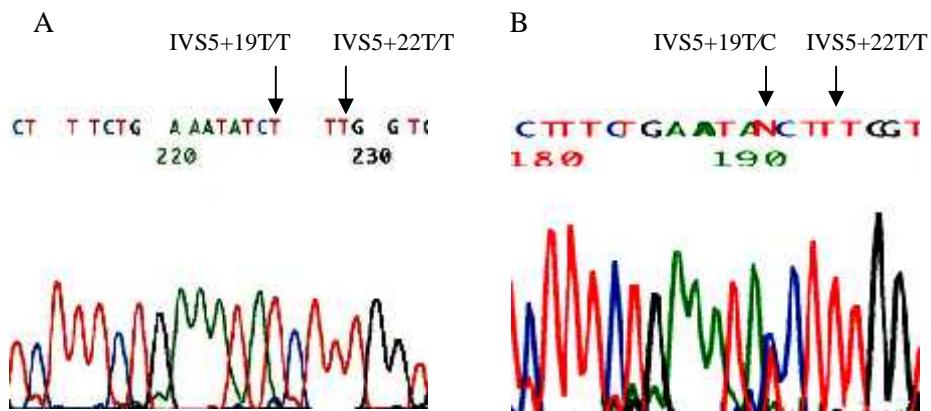
Za 20 nasumi no odabranih uzoraka s normalnim SSCP elektroforetskim obrascem potvrđena je prisutnost uobičajenih oblika polimorfizama (divljih tipova: IVS5+19T, IVS5+22T i IVS4-58-56ATG). Za 5 od 7 uzoraka s promijenjenim SSCP obrascem utvrđena je prisutnost heterozigotnog oblika za polimorfizam IVS5+19T/C. 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 u stalost alela intronskog SNP IVS5+19T/C u hrvatskoj populaciji: u stalost alela T (IVS5+19T) iznosi 0,958 (95,83%), a alela C (IVS5+19C) 0,042 (4,17%). Možemo reći da je u stalost alela za polimorfizam IVS5+19T/C izražena na 60 ispitanika reprezentativna za odabrane regije.



Slika 3.8. Analiza PCR produkata (291 pb) nastalih umnažanjem egzona 5 i dijelova pripadaju ih intronskih regija IVS4 i IVS5 gena PMM2 metodom sekvenciranja. Nakon izolacije genomske DNA iz pune krvi i lanane reakcije polimeraze, PCR produkti su analizirani metodom sekvenciranja na uređaju ABI Prism 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).

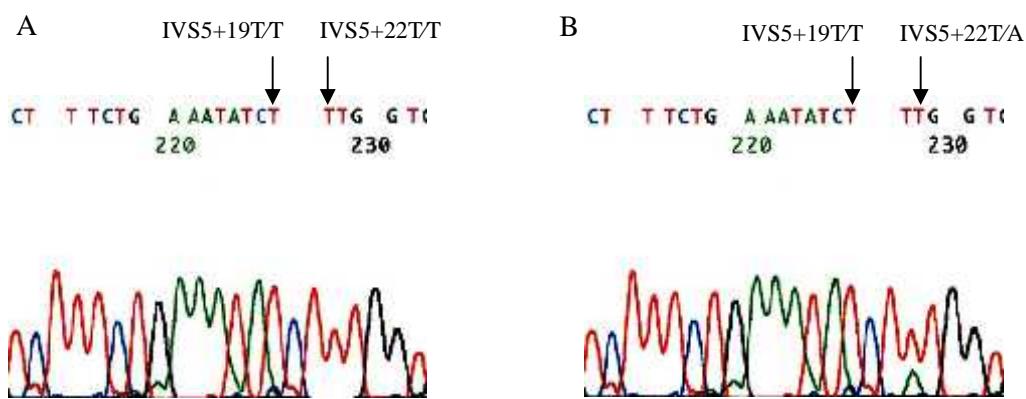
U stalost nositelja ovog polimorfizma (heterozigoti), procijenjena na 60 uzoraka, iznosi 0,083 (8,33%) Rezultati procijenjene u stalosti u hrvatskoj populaciji na 60 ispitanika te po odabranim regijama prikazani su u Tablici 3.2.

Tablica 3.2 Ustalost 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 pripadaju ih 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 ABI Prism 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 u estalost alela sa bazom T na tom položaju i ona iznosi 0,992 (99,17%), a alela s bazom A iznosi 0,008 (0,83%). U estalost heterozigota iznosi 0,017 (1,67%) (Tablica 3.3.).

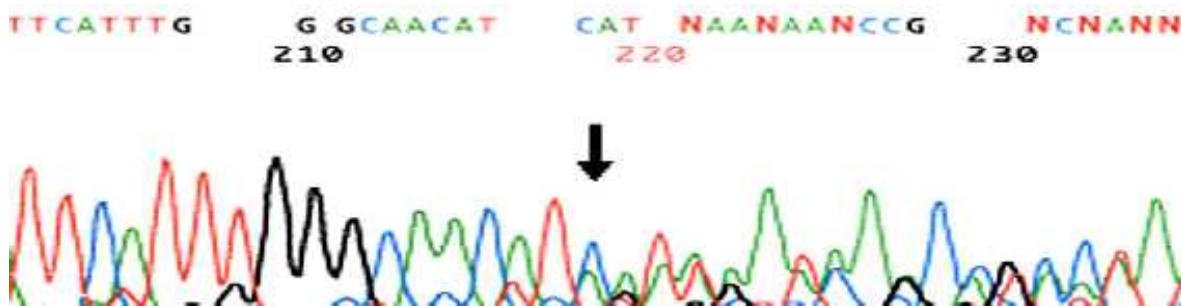
Tablica 3.3. Ustalost genotipova i alela IVS5+22T/A u genu PMM2 u uzorku hrvatske populacije (N=60).

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 pripadaju ih 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 ABI Prism 310 Genetic Analyzer uz uporabu uzvodnih ishodnica. Položaj heterozigota IVS4-58-56delATG označen je crnom strelicom.

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

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

Tablica 3.4. Ustalost 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 u ustalosti alela intronskih SNP IVS5+19T/C i IVS4-58-56delATG (Tablica 3.5.) upuju na specifičnost hrvatske populacije što se tiče ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na druge populacije, kako bi se donio konstan zaključak potrebno je analizirati veću seriju uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti i čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljuju u CDG-Ia.

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

Gen	Genska regija	Polimorfizam/ mutacija	Ustalost homozigota divljeg tipa u hrvatskoj populaciji	Ustalost heterozigota u hrvatskoj populaciji	Ustalost 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

Uro eni poreme aji glikozilacije (CDG) predstavljaju široku skupinu složenih metaboli kih poreme aja koji su posljedica mutacija u genima uklju enim u N- i O-glikozilacijske procese. Bolest se naslje uje autosomno recessivno. Glikozilacija proteina i drugih glikokonjugata od iznimne važnosti za normalan razvoj i funkcioniranje organizma, a procjenjuje se da je ak oko 500 gena uklju eno u glikozilacijske procese (Freeze 2006).

Sindromi CDG naj eš e su multisistemske bolesti i prezentiraju se poreme ajima u raznim tjelesnim sustavima i organima. Oboljeli ve u najranoj dobi pokazuju uglavnom umjerene do teške neurološke poreme aje, karakteristi ne 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. Klini ka slika poreme aja CDG je raznolika, što stvara probleme kod njihove dijagnoze, jer su neki simptomi sli ni simptomima drugih bolesti. Postoji stoga mogu nost da su neki slu ajevi CDG krivo dijagnosticirani ili obilježeni kao «bolest nepoznate etiologije».

Uro eni poreme aj glikozilacije tipa Ia (CDG-Ia) naj eš i je CDG u svijetu, sa oko 500 dijagnosticiranih oboljelih osoba (Freeze 2006). Poreme aj je uzrokovana mutacijama u genu za fosfomanomutazu 2 koja je uklju ena u po etne korake N-glikozilacije glikoproteina. Iako je u genu *PMM2* prona eno više od 90 razli itih mutacija (Freeze 2006), naj eš a mutacija koja uzrokuje CDG-Ia je R141H (c.422G>A); prisutna je u oko 75% oboljelih pacijenata bjela ke populacije (Kjærgaard i sur. 2001). U najve em broju slu ajeva CDG-Ia ta mutacija dovodi do teškog fenotipa bolesti.

Mutacija R141H vrlo je esta u bjela koj populaciji (Matthijs i sur. 1998), posebice na podru ju Sjeverne Europe, gdje su ak 1/60 do 1/79 normalnih osoba nositelji te mutacije (heterozigoti za R141H) (Schollen i sur. 2000). Ve ina oboljelih od CDG-Ia su složeni heterozigoti (eng. compound heterozygotes) za ovu mutaciju (422G>A u kombinaciji sa drugim alelom), pri emu je genotip R141H/F119L naj eš i genotip u Skandinavskim zemljama (Matthijs i sur. 2000; Vuillaumier-Barrot 2000) i predstavlja težak oblik bolesti. Navedene mutacije ine 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, o ekuje 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 utvr eni te se prepostavlja da je mutacija u tom obliku letalna u ranoj embriogenezi (Matthijs i sur. 1998). Zbog izostanka pojave homozigota,

u estalost heterozigotnog oblika mutacije R141H (frekvencija nositelja) ve a je (1/10000) od o ekivane frekvencije pojave bolesti (1/20000) (Schollen i sur. 2000).

Iako je poreme aj CDG-Ia vezan primarno uz bjela ke populacije Europe, otkriveni su slu ajevi diljem svijeta (Sjeverna i Južna Amerika, Velika Britanija, Japan (Kondo i sur. 1999), Indija (Goraya i sur. 2001)), te prvi slu ajevi CDG-Ia me u Afri ko-ameri kom populacijom (Tayebi i sur. 2002). Rezultati (nepopulacijskih) istraživanja na temelju procjene u estalosti oboljelih od CDG-Ia pokazuju da je frekvencija nazu estalijih 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 u estalost mutacije R141H (25% alela), dok mutacija F119L nije uop e utvr ena, što je pomalo za u uju e s obzirom na njihovu u estalost u zemljama Sjeverne Europe (Briones i sur. 2002). Tako er, 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 zna ajnu geneti ku 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 uo eno je da su geografski ili etni ki specifi ne za odre ene populacije. Primjerice, esta mutacija D65Y (c.193G>T) u genu *PMM2* prona ena je samo u oboljelih podrijetlom sa Pirinejskog poluotoka (Quelhas i sur. 2006), a esta 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 stolje ima, jer je na ena u geografski razli itim bjela kim populacijama. Iako je u nekim, napose Skandinavskim zemljama, u estalost 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 doma ina preko N-glikoziliranih receptora. Ukoliko su receptori hipoglikozilirani, prihva anje virusa je onemogu eno.

Procijenjeno je da u Europi i Sjevernoj Americi od CDG-Ia oboli oko 200 novoro en adi godišnje. Schollen i sur. (2000) procijenili su na temelju broja složenih heterozigota (R141H/druga mutacija) u estalost pojave bolesti na 1/18000 do 1/20000, što je puno više nego uo ena u estalost od 1/40000 u Danskoj i 1/80000 u ostalim Europskim zemljama. To navodi na zaklju ak da je bolest vjerojatno nedijagnosticirana. Do danas u Republici Hrvatskoj nije zabilježen ni jedan oboljeli od CDG-Ia, što je neobi no s obzirom na u estalost ove bolesti u drugim zemljama Europe. Prva

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

U ovom diplomskom radu analizirana je na uzorku hrvatske populacije (N=60) u estalost pojave nositelja mutacije R141H u genu *PMM2*, odgovorne za nastanak CDG-Ia, te u estalost pojave nositelja poznatih polimorfizama jednog nukleotida (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadaju ih 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 prikupljeni u Šibensko-kninskoj i Dubrova ko-neretvanskoj županiji (30 uzoraka iz svake županije).

Ovim istraživanjem u navedenim uzorcima hrvatske populacije (N=60) nije potvr ena mutacija R141H, odnosno, nije utvr eni 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 ve em uzorku hrvatske populacije (N=800) oboljeli od CDG-Ia nisu utvr eni, ipak je mogu e 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 utvr enih bolesnika rezidualna aktivnost enzima PMM2 za u uju e visoka (blizu 50% kontrolne), a bolesnici su pokazivali blage simptome bolesti (Westphal i sur. 2001). S obzirom na to, mogu e je da u hrvatskoj populaciji oboljeli postoje, ali nisu dijagnosticirani kao CDG-Ia, ve su mogu e krivo dijagnosticirani ili navedeni pod «bolest nepoznate etiologije». Osim toga, zdravi nositelji (heterozigoti za R141H, roditelji oboljelih) imaju rezidualnu aktivnost PMM2 tako er 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 mogu e 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 tako er je analizirana u estalost nositelja poznatih intronskih polimorfizama IVS5+19T/C i IVS5+22T/A, za koje je utvr eno da se pojavljuju zajedno sa nekim specifi nim mutacijama koje uzrokuju CDG-Ia. Rezultati rada pokazali su da je u estalost alela IVS5+19T 0.958 (95.83%), a alela IVS5+19C 0.042 (4.17%) (poglavlje 3.1.3., Tablica 3.2.). Ovi podaci zna ajno 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).

Izra unate 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 utvr ena vezana neravnoteža (*eng. linkage disequilibrium*) izme u 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 utvr ena, u analiziranim uzorcima prona en je jedan heterozigot za polimorfizam IVS5+22T/A, sa u estaloš u 0.017 (1.67%).

U analiziranom uzorku hrvatske populacije utvr en je i jedan heterozigot za polimorfizam IVS4-58-56delATG, prona en i u prijašnjim istraživanjima od strane Bjursell i sur. (2000) te Matthijs i sur. (2000). U estalost alela IVS4-58-56delATG (procijenjena na 60 uzoraka) iznosi 0.008 (0.83%), a u estalost nositelja ove delekcije 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 sli nom broju uzoraka, gdje je u estalost alela IVS4-58-56delATG 0.049 (4.92%), odnosno u estalost nositelja heterozigotnog oblika IVS4-58-56delATG 0.098 (9.83%).

Premda odsutnost mutacije R141H kao i procijenjene u estalosti alela intronskog SNP IVS5+19T/C i IVS4-58-56delATG upu uju na specifi nost hrvatske populacije što se ti e ispitivanih mutacija/polimorfizama u odnosu na druge populacije, kako bi se donio kona an zaklju ak potrebno je analizirati puno ve i broj uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti iji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljuju u CDG-Ia. Na taj na in mogla bi se ste i obuhvatnija slika pojavnosti i u estalosti mutacija i polimorfizama vezanih uz nastanak CDG-Ia u hrvatskoj populaciji.

5. ZAKLJU CI

U ovom radu ispitana je pojavnost i u estalost genotipova i alela za nositelje mutacije R141H (heterozigoti za R141H) egzona 5 gena *PMM2*, te u estalost pojave nositelja polimorfizama jednog nukleotida (IVS5+19T/C, IVS5+22T/A, IVS4-58-56delATG) u dijelovima intronskih sljedova IVS4 i IVS5 pripadaju ih 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 Dubrova ko-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 injenicama da je ovo istraživanje provedeno na zdravim ispitanicima te da u Republici Hrvatskoj nije do danas zabilježen ni jedan slučaj sindroma CDG-Ia.
- 2) U estalosti 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 evropskim populacijama: alel IVS5+19C sa mnogo manjom frekvencijom, a alel IVS4-58-56delATG sa malo manjom frekvencijom u usporedbi sa nekim evropskim populacijama.
- 3) Rezultati u estalosti intronskog polimorfizma IVS5+22T/A gena *PMM2* upućuju da je njegova frekvencija slična onima u drugim evropskim 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 u estalosti mutacija i polimorfizama vezanih uz nastanak CDG-Ia u hrvatskoj populaciji, trebalo bi analizirati mnogo veći broj uzoraka bolesnika koji su oboljeli od bolesti i čiji simptomi odgovaraju simptomima koji se pojavljaju 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:Glc₁Man₉GlcNAc₂-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:Man₇GlcNAc₂-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 IL. *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 Glycoprotein 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. Hanke 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 -1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IIId. *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. Inher. 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 *PMM2* 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:Man₉GlcNAc₂-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:Man₅GlcNAc₂-PP-dolichyl mannosyltransferase. *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., Lefever D.J., De Meirlier 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. Pieron 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 *PMM2* : 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): Acetoxyethyl 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:GlcNAc₂-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. Imač 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. Imač 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): Uro eni poreme aji 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.

Elektroni ki 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/>