

Aktivita fosfomanomutázy 2 u pacientů s podezřením na dědičnou poruchu glykosylace

Hansíková H., Ondrušková N., Honzík T., Veselá K., Horová E., Švecová Š, Tesařová M., Zeman J.

Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakulní nemocnice v Praze

SOUHRN

Cíl studie: Cílem studie bylo zavést metodu pro stanovení aktivity fosfomanomutázy 2 (PMM2) a kontrolního enzymu fosfomanoizomerázy (PMI) v izolovaných lymfocytech a kultivovaných kožních fibroblastech a využít ji jako diferenciální diagnostický krok v souboru 18 pacientů s podezřením na CDG syndrom typu I.

Typ studie: Původní práce.

Název a sídlo pracoviště: Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakulní nemocnice v Praze.

Materiál a metody: Analyzovaný soubor představuje 16 vzorků lymfocytů a 8 linií kultivovaných kožních fibroblastů od 18 pacientů z 15 nepříbuzných rodin, u kterých lékaři vyslovili vysoké podezření na CDG syndrom typu I. Kontrolní skupinu tvořilo 59 vzorků lymfocytů a 29 linií fibroblastů od pacientů, u kterých nebylo prokázáno podezření na metabolickou poruchu. Aktivity PMM2 a PMI byly měřeny spektrofotometricky při 37 °C jako redukce NADP⁺ na NADPH při 340 nm.

Výsledky: U PMM2 a PMI nebyly v lymfocytech ani kultivovaných fibroblastech nalezeny statisticky významné rozdíly aktivit v závislosti na věku či pohlaví. Aktivita PMM2 v lymfocytech u kontrolního souboru byla 0,34–2,58 nmol/min/mg (2,5% až 97,5% percentil) a ve fibroblastech 0,44–9,0 nmol/min/mg. Aktivita PMM2 v lymfocytech byla v souboru pacientů nízká (0,02–0,18 nmol/min/mg, mezikvartilové rozpětí, kontroly 0,73–1,42, $p < 0,001$). Aktivita PMM2 ve fibroblastech od pacientů byla také nízká (0,2–0,66 nmol/min/mg; kontroly 1,06–3,17, $p < 0,001$). Poměr PMM2/PMI byl u pacientů významně snížený v obou tkáních ($p < 0,001$). U všech 18 pacientů byla diagnóza PMM2-CDG potvrzena i nálezem mutací v *PMM2* genu.

Závěr: Měření aktivity PMM2 v lymfocytech nebo kultivovaných fibroblastech umožňuje rychlé stanovení diagnózy PMM2-CDG, nejčastější dědičné poruchy glykosylace typu I.

Klíčová slova: dědičné poruchy glykosylace (CDG), fosfomanomutáza (PMM2), fosfomanoizomeráza (PMI).

SUMMARY

Hansíková H., Ondrušková N., Honzík T., Veselá K., Horová E., Švecová Š, Tesařová M. Zeman J.: Activity of phosphomannomutase 2 in patients with suspected congenital disorder of glycosylation

Objective: Aim of study was to establish a method for determining the activity of phosphomannomutase 2 (PMM2) and phosphomannose isomerase (PMI) as a control enzyme in isolated lymphocytes and cultured skin fibroblasts and use it as a differential diagnostic step in a group of 18 patients with suspected CDG syndrome type I.

Design: Original paper.

Settings: Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague

Material and methods: Cohort of samples consists of 16 isolated lymphocytes and 8 cultured skin fibroblasts lines from 18 patients from 15 unrelated families with high clinical suspicion for CDG syndrome type I. Group of controls consisted of 59 lymphocytes and 29 fibroblasts cell lines from disease free patients. Activities PMM2 and PMI were measured spectrophotometrically at 37 °C as the reduction of NADP⁺ to NADPH at 340 nm.

Results: Statistically significant correlation between activity of PMM2 and PMI and age or gender in lymphocytes or cultured fibroblasts was not found. PMM2 activity in lymphocytes in the control group was from 0.34 to 2.58 nmol/min/mg (2.5% to 97.5% percentile) and in fibroblasts from 0.44 to 9.0 nmol/min/mg. PMM2 activity in lymphocytes in the group of patients was low (0.02–0.18 nmol/min/mg, interquartile range, controls 0.73–1.42 nmol/min/mg, $p < 0.001$). PMM2 activity in fibroblasts from patients was also low (0.2–0.66 nmol/min/mg, controls 1.06–3.17 nmol/min/mg, $p < 0.001$). PMM2 / PMI ratio in patients was significantly decreased in both tissues ($p < 0.001$). The diagnosis of PMM2-CDG was confirmed by finding of mutations in *PMM2* gene in all 18 patients.

Conclusion: Measurement of PMM2 activity in lymphocytes or cultured fibroblasts allows to quickly diagnose PMM2-CDG, the most common congenital disorder of glycosylation

Keywords: congenital disorders of glycosylation (CDG), phosphomannomutase (PMM2), phosphomannose isomerase (PMI).

Úvod

Glykosylace je nejrozšířenější posttranslační modifikace proteinů a zahrnuje kovalentní vazbu cukerných řetězců na amidovou skupinu asparaginu (N-glykoprotein) nebo na hydroxylovou skupinu serinu nebo threo-

ninu peptidového řetězce (O-glykoprotein) [1]. Narušení glykosylačních procesů vede ke skupině závažných onemocnění, které se souhrnně označují jako CDG syndrom (Congenital Disorders of Glycosylation, CDG, dědičné poruchy glykosylace proteinů). Na molekulární úrovni již bylo identifikováno >100 různých CDG, více

než polovina z nich se týká poruch glykosylace N-glykoproteinů [2].

Biochemický screening je založen na analýze profilu sialovaných forem transferinu v séru pomocí izoelektrické fokusace (IEF), která umožňuje zachytit pacienty s některými typy poruch na úrovni syntézy (CDG typu I) nebo úpravy N-glykoproteinů (CDG typu II) [3]. Vzhledem k všudypřítomnému výskytu N-glykoproteinů v organismu, vedou poruchy na úrovni jejich biosyntézy k širokému spektru závažných klinických příznaků. Nejčastějším typem CDG syndromu je PMM2-CDG (podle starší nomenklatury CDG Ia) s autosomálně recesivním typem dědičnosti, který tvoří 80 % případů v této skupině onemocnění. V literatuře již bylo popsáno >800 pacientů a výskyt v populaci se odhaduje na cca 1: 20 000 [4].

Fosfomanomutáza (PMM2) je cytosolární enzym, který katalyzuje reverzibilní přeměnu manózy-6-fosfátu na manózu-1-fosfát (Man-1-P). Snížení enzymové aktivity vede k depleci v zásobách GDP-manózy a dolichol-P-manózy, a tím k hypoglykosylaci řady N-vázaných glykoproteinů. Porucha PMM2 vede k onemocnění, které se nazývá PMM2-CDG. Je způsobena přítomností mutací v *PMM2* genu lokalizovaném v oblasti 16p13.3.-p13.2, má 8 exonů a bylo v něm již nalezeno >110 patogenních mutací [5].

Klinicky se PMM2-CDG manifestuje již v kojeneckém věku jako multisystémové onemocnění s heterogenními klinickými příznaky. Mezi univerzální klinické a laboratorní nálezy patří neprospívání, atypické rozložení podkožního tuku v gluteální oblasti, invertované mammary, kraniofaciální dysmorfie, strabismus, hypotonický syndrom, porucha až zástava psychomotorického vývoje, hypoplázie mozečku, hepatopatie a smíšená koagulopatie [6,7]. Prognóza není příznivá, mortalita dětí s nízkou reziduální aktivitou PMM2 dosahuje až 20 % [8]. Esenciální úlohu PMM2 pro vývoj organismu podporuje i zjištění, že inaktivace genu *PMM2* u myši je embryonálně letální [9]. Léčba pacientů s PMM2-CDG není známá a ani experimentální terapie pomocí Man-1-P nebyla terapeuticky úspěšná [10].

Dosud bylo stanovení aktivity PMM2 dostupné pouze v několika specializovaných centrech ve světě zaměřených na diagnostiku poruch glykosylace, kde u pacientů s podezřením na CDG typu I je v prvním kroku obecně uznávaným a doporučovaným diagnostickým standardem měření aktivity PMM2 v izolovaných lymfocytech nebo kultivovaných kožních fibroblastech, a to z důvodu, že tento typ CDG je nejčastější.

Cílem studie byla snaha zavést metodu pro stanovení aktivity fosfomanomutázy (PMM2) a kontrolního enzymu fosfomanoizomerázy (PMI) v izolovaných lymfocytech a kultivovaných fibroblastech a využít ji jako diferenciálně-diagnostický krok v našem souboru 18 pacientů s podezřením na CDG syndrom typu I.

Materiál

Analýzovaný soubor reprezentovalo 16 vzorků izolovaných lymfocytů a 8 linií kultivovaných kožních fibroblastů od 18 pacientů (0,5-18 let), u kterých bylo

na základě klinických příznaků vysloveno podezření na CDG syndrom typu I. U všech pacientů byl pomocí IEF sérového transferinu nalezen patologický profil CDG typu I (Obr 1.). Zároveň bylo analyzováno i 9 vzorků lymfocytů od rodičů vyšetřovaných probandů (obligatorních heterozygotů) ve věku 22-41 let. Kontrolní skupinu tvořilo 59 vzorků lymfocytů a 29 linií kultivovaných fibroblastů od osob ve věku 0,5-48 let, resp. 0,5-18 let bez klinických projevů CDG syndromu.

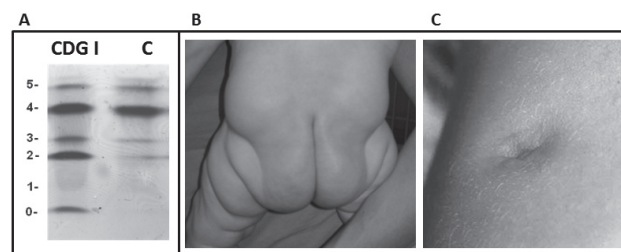


Figure 1. A. Isoelectric focusing analysis of serum transferrin demonstrating typical pathological profile of CDG type I (A). Positions of sialic transferrin isoforms are marked at left. CDG I – patient with PMM2-CDG, C-control; typical clinical symptoms in patients with PMM2-CDG, abnormal fat distribution in gluteal region (B); inverted nipples (C).

Chemikálie

Histopaque®1077, Hepes, DTT, KCl, leupeptin a pepstatin, fosfomanoizomeráza, $MgCl_2$, manóza-1-P, manóza-6-P (Sigma), glukóza-6-P-dehydrogenáza, fosfoglukózaizomeráza, NADP (dvojsodná sůl) (Roche), manóza-1,6-di-P byla připravena podle Van Schaftingen [11].

Metody

Lymfocyty byly izolovány ze 7 ml periferní krve s přidavkem EDTA gradientovou centrifugací (Histopaque®1077, Sigma). Kožní fibroblasty byly kultivovány v D-MEM mediu s 10% obsahem fetálního bovinního séra v 5% CO_2 . Fibroblasty v množství $2 \times 75 \text{ cm}^2$ o konfluenci 80 % byly sklizeny trypsinizací. Peleta obou typů buněk byla zamrazena a uchovávána při -80°C .

Příprava vzorku

Peleta lymfocytů nebo fibroblastů byla rozmrazena a homogenizována při 4°C v 300 μl homogenizačního pufru (20 mmol/l Hepes pH 7,1, 1 mmol/l DTT, 25 mmol/l KCl, leupeptin a pepstatin 10 mg/l) v homogenizátoru sklo-sklo. Poté byl homogenát sonikován (3x8 s, amplituda 20, při 4°C) a směs byla centrifugována při 1550 g, 8 min, při 4°C . Supernatant byl uschován při -80°C přes noc. Druhý den byla rozmrazená suspenze centrifugována při 9000 g, 5 min, 4°C a výsledný supernatant byl použit pro stanovení aktivity enzymu. Na jedno měření bylo používáno 50 μl supernatantu (koncentrace proteinu se pohybovala okolo 3-5 g/l).

Enzymové aktivity

Aktivita PMM2 a PMI byla měřena spektrofotometricky jako přeměna $NADP^+$ na NADPH při 340 nm po dobu 5 min při 37°C v kyvetách o optické dráze 1 cm

v celkovém objemu 0,5 ml. Každé měření bylo provedeno 2x. Aktivita byla vyjádřena jako nmol/min/mg proteinu s použitím molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{340}=6,22$ (l/mmol/cm). Měření bylo provedeno podle Van Schaftingen (11) s mírnými úpravami uvedenými níže.

Reakční směs pro spektrofotometrické stanovení PMM2 obsahovala: 50 mmol/l Hepes pH 7,1, fosfoglukózaizomeráza (10 g/l), fosfomanoizomeráza (3,5 g/l), glukóza-6-P-dehydrogenáza (10 g/l), 1 mmol/l manóza-1,6-di-P, 0,25 mmol/l NADP, 50 mmol/l $MgCl_2$, 3 mmol/l manóza-1-P. Reakce byla startována přidavkem 50 μ l vzorku. Referenční kviveta neobsahovala manózu-1-P.

Reakční směs pro spektrofotometrické stanovení aktivity PMI obsahovala: 50 mmol/l Hepes pH 7,1, fosfoglukózaizomeráza (10 g/l), glukóza-6-P-dehydrogenáza 4 g/l, 15 mmol/l NADP, 50 mmol/l $MgCl_2$, 5 mmol/l manóza-6-P, reakce byla startována přidavkem 50 μ l vzorku. Referenční kviveta neobsahovala substrát - manózu-6-P. Aktivita PMI sloužila jako kontrolní enzym k vypočítání poměru PMM2/PMI.

Koncentrace proteinu ve vzorku byla stanovena dle Lowryho [12].

Molekulárně-genetická analýza

Celková DNA byla izolována metodou fenolové extrakce. Všechny exony genu PMM2 (ENSG00000140650, ENST00000268261) a jejich přilehlé intronové oblasti byly analyzovány metodou přímého sekvenování na genetickém analyzátoru ABI 3500xL (Applied Biosystems). Mutace zjištěné u probanda byly vždy potvrzeny i u obou rodičů analýzou jejich DNA.

Statistická analýza

Vzhledem k tomu, že pozorovaná data nemají normální rozdělení, byly použity neparametrické statistické metody. Rozdíly mezi pacienty a kontrolami (resp. mezi heterozygoty a kontrolami) byly testovány Wilcoxonovým dvouvýběrovým testem. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů nižší než 5%. Analýzy byly provedeny ve statistickém software R verze 3.1.2, R Core Team (2014).

Etika

Všechny odběry a biochemické i molekulární analýzy byly prováděny po informovaném souhlasu rodičů. Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací Světové lékařské asociace a byla schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Výsledky

U PMM2 a PMI nebyly v lymfocytech a v kultivovaných fibroblastech nalezeny statisticky významné rozdíly v aktivitách v závislosti na věku či pohlaví. Rozmezí kontrolních hodnot (2,5 % až 97,5 % kvantil) pro PMM2 v lymfocytech a fibroblastech uvádí obr. 2 a 3. Aktivity kontrolního enzymu PMI v lymfocytech a fibroblastech jsou uvedeny na obr. 4.

Průměrná aktivita PMM2 a poměr PMM2/PMI v lymfocytech a fibroblastech pacientů byly významně sniženy ($p<0,001$) ve srovnání s kontrolním souborem (obr. 2, 3). Medián pro aktivitu PMM2 v lymfocytech vyšetřovaných pacientů odpovídal 6 % mediánu kontrol ($p<0,001$) (obr. 2, 3). Významně snižená aktivita PMM2 v lymfocytech pod 10 % mediánu kontrolní skupiny byla nalezena u 10 pacientů, středně snižená aktivita mezi 10-30 % u tří pacientů a u tří pacientů byla aktivita PMM2 do hodnoty 71 % mediánu kontrol (Tabulka 1). Nebyl nalezen významný rozdíl mezi skupinou heterozygotů a kontrolním souborem. Medián pro aktivitu PMM2 ve fibroblastech odpovídal 30 % mediánu kontrol ($p<0,001$). Významně snižená aktivita PMM2 pod 10 % mediánu kontrolní skupiny byla ve fibroblastech nalezena u tří pacientů, středně snižená mezi 10-30 % u jednoho pacienta a u tří byla aktivita PMM2 do hodnoty 69 % mediánu kontrol (Tabulka 1).

Aktivita kontrolního enzymu PMI byla v lymfocytech pacientů vyšší než u kontrolního souboru, zatímco ve fibroblastech nebyly rozdíly statisticky významné (obr. 4).

Posléze byla u všech 18 pacientů diagnóza PMM2-CDG potvrzena i na molekulárně genetické úrovni. Nalezené mutace v PMM2 jsou uvedeny v Tabulce 1. Všichni pacienti jsou složení heterozygoti, přičemž nejčastějšími mutacemi jsou mutace c.422G>A a c.338C>T, které vedou k záměně aminokyseliny R141H a P113L, respektive.

Diskuse

V naší studii jsme v souboru 18 pacientů s klinickým podezřením na CDG syndrom analyzovali aktivitu PMM2, jejíž porucha podporuje diagnózu PMM2-CDG, nejčastějšího typu CDG syndromu. Ačkoliv až u 18 % publikovaných pacientů s PMM2-CDG byla v izolovaných lymfocytech a/nebo kultivovaných fibroblastech nalezena normální aktivita PMM2 [13,14], u většiny našich pacientů jsme prokázali významně sniženou aktivitu PMM2 pod 10 % kontrolních hodnot nebo alespoň středně sniženou aktivitu PMM2 na úroveň 10 až 30 % kontrolních hodnot. Pouze u jednoho pacienta z našeho souboru (P13) dosahovala aktivita PMM2 v lymfocytech 71 % mediánu kontrolních hodnot. Diagnózu PMM2-CDG u pacienta 13 potvrdilo molekulární vyšetření *PMM2* genu, které ukázalo přítomnost dvou mutací c.[24delC]+[338C>T]. Delece nukleotidu na jedné alele vede ke vzniku předčasného stop-kodónu, zatímco „missence“ mutace na druhé alele vede k záměně prolinu za lysin na pozici 113, která sice ovlivňuje stabilitu diméru nativního proteinu, ale přímo nezasahuje do aktivního místa PMM2, takže patří mezi mutace s mírnějším dopadem na funkci enzymu [15]. Ve prospěch enzymatické diagnostiky u pacienta 13 svědčí i snížený poměr mezi PMM2 a kontrolním enzymem PMI.

Ve fibroblastech jsme závažné snížení aktivity PMM2 pod 10 % zaznamenali pouze u tří z osmi námi testovaných pacientů. Také literární údaje uvádějí poměrně vysokou residuální aktivitu PMM2 ve fibroblastech

Table 1. Clinical, biochemical and molecular data in 18 patients with PMM2-CDG

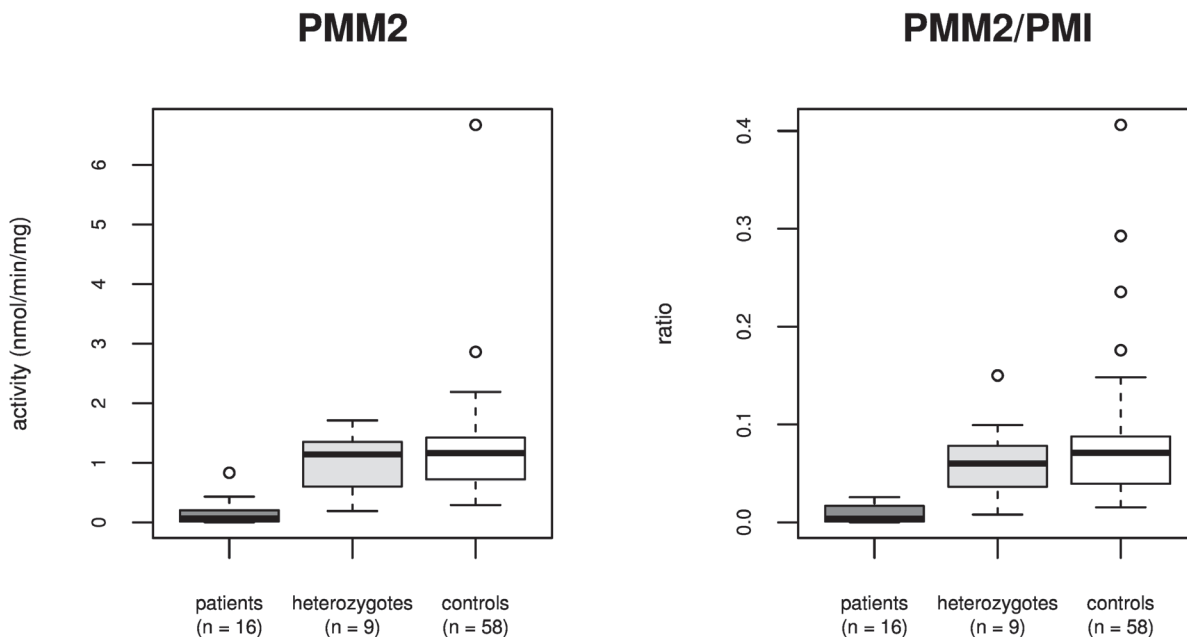
Patient	Age [Y]	Gender	Phenotype	Lymphocytes		Fibroblasts		Genotype
				PMM2*	%#	PMM2*	%#	
P1	2	M	moderate	0.23	19	0.03	2	c.[395T>C];[422G>A]
P2	5	F	moderate	0.17	14	0.07	5	c.[338C>T];[422G>A]
P3	5	F	moderate	0.08	6	NA	NA	c.[338C>T];[422G>A]
P4	13	F	moderate	0.37	31	NA	NA	c.[338C>T];[422G>A]
P5	3	M	moderate	0.013	1	NA	NA	c.[338C>T];[422G>A]
P6	2m	M	severe	NA	NA	0.12	8	c.[422G>A];[691G>A]
P7	8	F	moderate	0.05	4	0.84	55	c.[338C>T];[422G>A]
P8	7	F	moderate	0.43	37	0.40	26	c.[338C>T];[422G>A]
P9	1,5	M	severe	0.12	10	1.05	69	c.[357C>A];[422G>A]
P10	10	F	severe	NA	NA	0.50	32	c.[357C>A];[422G>A]
P11	1	F	severe	0.002	<1	NA	NA	c.[338C>T];[696delA]
P12	11m	M	severe	0.016	1	NA	NA	c.[338C>T];[710C>G]
P13	3	F	moderate	0.83	71	NA	NA	c.[24delC];[338C>T]
P14	6	F	moderate	0.02	2	NA	NA	c.[24delC];[677C>T]
P15	6m	F	moderate	0.01	<1	NA	NA	c.[357C>A];[422G>A]
P16	13	M	severe	0.01	<1	0.60	39	c.[178+3A>T];[422G>A]
P17	15	M	moderate	0.11	9	NA	NA	c.[338C>T];[422G>A]
P18	4m	F	severe	0.02	2	NA	NA	c.[422G>A];[691G>A]
Controls	median 1 st Q-3 rd Q			1,16 0,73-1,42 N=58		1,52 1,06-3,17 N=28		0,14 0,09-0,21 N=28

*activity of PMM2 expressed as nmol/min/mg

#% of median of controls

Y-year, m- month

NA- not analysed



PMM2

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	16.00	0.16	0.22	0.07	0.01	0.68	0.02	0.18
heterozygotes	9.00	0.98	0.55	1.14	0.21	1.68	0.60	1.35
controls	58.00	1.24	0.91	1.16	0.34	2.58	0.73	1.42

patients vs. controls Wilcoxon test: $p < 0.001$

heterozygotes vs. controls Wilcoxon test: $p = 0.456$

PMM2/PMI

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	16.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02
heterozygotes	9.00	0.06	0.04	0.06	0.01	0.14	0.04	0.08
controls	58.00	0.08	0.07	0.07	0.02	0.27	0.04	0.09

patients vs. controls Wilcoxon test: $p < 0.001$

heterozygotes vs. controls Wilcoxon test: $p = 0.445$

Age

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	17.00	5.41	5.73	3.28	0.22	16.72	1.16	6.95
heterozygotes	9.00	32.94	5.70	33.18	23.43	40.97	30.91	34.58
controls	55.00	16.82	12.17	16.36	0.89	38.91	7.05	25.26

Fig. 2. Activity of phosphomannomutase (PMM2) and ratio to control enzyme phosphomannose isomerase (PMM2/PMI) measured in isolated lymphocytes in group of patients, heterozygotes and controls. Due to non-normality of the observed data, non-parametric statistical methods were used. Differences between patients and controls (resp. heterozygotes and controls) were subject to Wilcoxon two sample tests. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant. Analyses were conducted using R statistical package, version 3.1.2, R Core Team (2014).

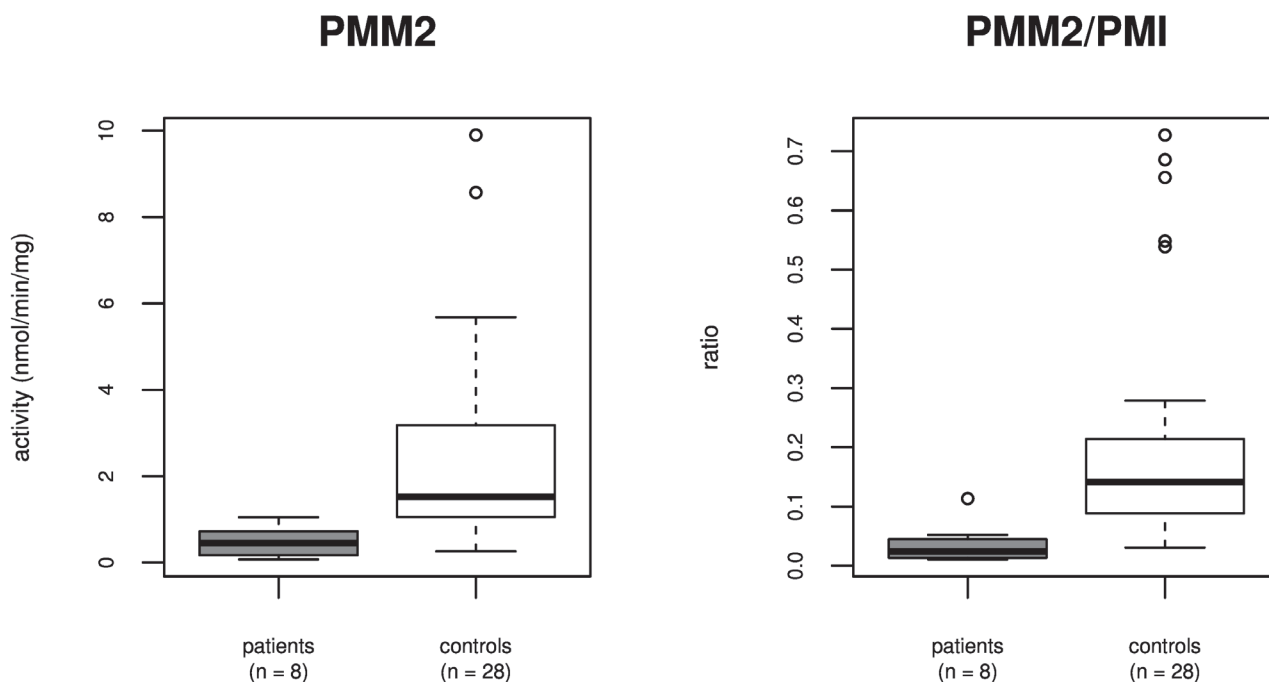
pacientů, což při enzymatickém vyšetření zvyšuje riziko falešně negativního výsledku [16].

Nesoulad mezi residuální aktivitou PMM2 v lymfocytech a fibroblastech ukazuje na tkáňově specifické rozdíly. Studie na mutantních proteinech prokázaly narušenou kinetiku enzymu a sníženou stabilitu mutantního proteinu ve srovnání s kontrolním vzorkem [17]. Residuální aktivita je vyšší ve fibroblastech také díky tomu, že fibroblast je rychle se dělicí buňka s aktivní proteosyntézou ve srovnání s lymfocyty. Navíc tento fakt může být doprovázen i možností selektivní výhody podmínek kultivace u fibroblastů [16].

V souladu s literárními údaji jsme u našich pacientů s PMM2-CDG nezjistili významnější korelaci mezi

jejich fenotypem, genotypem a residuální aktivitou PMM2 v obou tkáních. Většina pacientů s PMM2-CDG jsou složeni heterozygoti, přičemž nejfrekventovanější mutace R141H, která se vyskytuje cca u 40 % pacientů, ovlivňuje vazbu Man-1-P do aktivního místa enzymu. Jej dopad na aktivitu PMM2 je natolik zásadní, že dosud nebyla nalezena v homozygotní formě [15]. Deset z 16 pacientů našeho souboru má mutaci P113L, která ovlivňuje stabilitu diméru nativního enzymu a patří k mutacím s mírnějším dopadem [15].

Vzhledem k tomu, že je již známo více než 50 různých dědičných poruch glykosylace na úrovni syntézy N-glykoproteinů a že již byli popsáni i PMM2-CDG pacienti s normálním profilem transferinu při IEF [18],



PMM2

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	8.00	0.47	0.35	0.45	0.08	1.01	0.20	0.66
controls	28.00	2.69	2.63	1.52	0.44	9.00	1.06	3.17

patients vs. controls Wilcoxon test: $p < 0.001$

PMM2/PMI

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	8.00	0.04	0.03	0.02	0.01	0.10	0.01	0.04
controls	28.00	0.22	0.21	0.14	0.04	0.70	0.09	0.21

patients vs. controls Wilcoxon test: $p < 0.001$

Age

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	8.00	7.49	6.07	5.80	0.58	17.11	3.60	11.62
controls	29.00	4.41	5.02	2.78	0.23	16.69	0.65	4.93

Fig. 3. Activity of phosphomannomutase (PMM2) and ratio to control enzyme phosphomannose isomerase (PMM2/PMI) analyzed in cultivated fibroblasts in group of patients and controls. Due to non-normality of the observed data, non-parametric statistical methods were used. Differences between patients and controls (resp. heterozygotes and controls) were subject to Wilcoxon two sample tests. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant. Analyses were conducted using R statistical package, version 3.1.2, R Core Team (2014).

je stanovení aktivity PMM2 v izolovaných lymfocytech nebo kultivovaných fibroblastech i přes řadu svých omezení významným přínosem při diferenciální diagnostice poruch glykosylace.

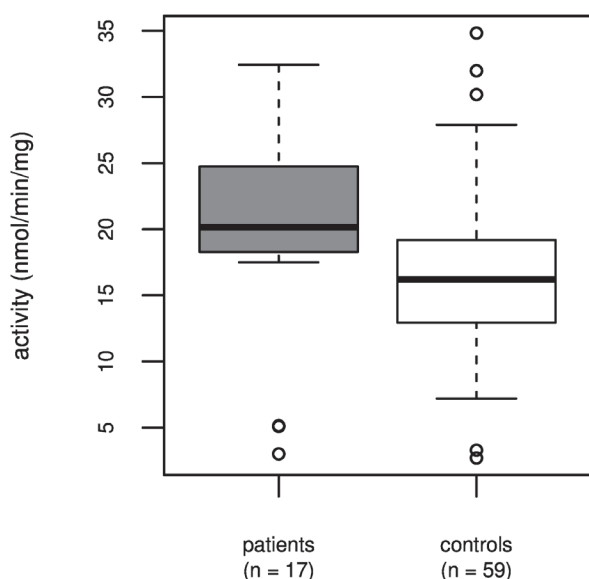
Závěr

Byla zavedena metoda měření aktivity PMM2 v izolovaných lymfocytech a kultivovaných fibroblastech a bylo stanoveno rozmezí hodnot u kontrol pro tyto dva typy tkání. Metoda je úspěšně využívána v diferenciální diagnostice při podezření na PMM2-CDG.

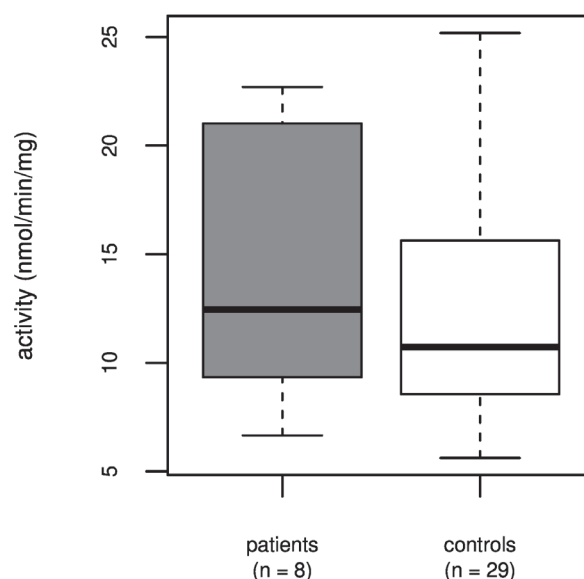
Zkratky

PMM2	fosfomanomutáza
PMI	fosfomanoizomeráza
IEF	izoelektrická fokusace
Man-1-P	manóza-1-fosfát

PMI in lymphocytes



PMI in fibroblasts



Lymphocytes

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	17.00	20.02	8.69	20.14	3.85	32.08	18.29	24.74
controls	59.00	16.94	6.40	16.21	5.06	31.17	12.95	19.18

patients vs. controls Wilcoxon test: $p < 0.05$

Fibroblasts

	N	mean	SD	median	2,5% q.	97,5% q.	1st Q.	3rd Q.
patients	8.00	14.37	6.46	12.46	7.12	22.51	9.38	20.73
controls	29.00	12.65	5.89	10.72	5.62	25.08	8.56	15.63

patients vs. controls Wilcoxon test: $p = 0.386$

Fig. 4. Activity of phosphomannose isomerase (PMI) in isolated lymphocytes and cultivated fibroblasts in patients and in controls. Due to non-normality of the observed data, non-parametric statistical methods were used. Differences between patients and controls (resp. heterozygotes and controls) were subject to Wilcoxon two sample tests. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant. Analyses were conducted using R statistical package, version 3.1.2, R Core Team (2014).

Literatura

- Schachter, H., Freeze, H. H.** Glycosylation diseases: quo vadis? *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1792 (9): p. 925-30
- Hennet, T., Cabalzar, J.** Congenital disorders of glycosylation: a concise chart of glycoalyx dysfunction. *Trends Biochem Sci.* 2015, 40 (7): p. 377-84.
- Aebi, M., Helenius, A., Schenk, B. et al.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J.* 1999, 16 (11): p. 669-71.
- Hauptle, M. A., Hennet, T.** Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum Mutat.* 2009, 30 (12): p. 1628-41.
- Matthijs, G., Schollen, E., Pardon, E. et al.** Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genet.* 1997, 16: p. 88-92.
- Honzík, T., Malonová, E., Hansíková, H. et al.** Congenital disorder of type Ia protein glycosylation: clinical, biochemical and molecular characteristics in 2 siblings with cerebellar hypoplasia. *Cas. Lek. Cesk.,* 2003, 142 (5): p. 276-9.
- Honzík, T., Magner, M., Krijt, J. et al.** Clinical picture of S-adenosyl-homocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol. Genet. Metab.,* 2012, 107 (3): p. 611-3.
- Matthijs, G., Schollen, E., Bjursell, C. et al.** Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat.* 2000, 16 (5): p. 386-94.
- Thiel, C., Lübke, T., Matthijs, G., von Figura, K., Körner, C.** Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.,* 2006, 26 (15): p. 5615-20
- Higashidani, A., Bode, L., Nishikawa, A., Freeze, H. H.** Exogenous mannose does not raise steady state mannose-6-phosphate pools of normal or N-glycosylation-deficient human fibroblasts. *Mol. Genet. Metab.,* 2009, 96 (4): p. 268-72
- Van Schaftingen, E., Jaeken, J.** Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.* 1995, 377: p. 318-320

12. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.*, 1951, 193: p. 265-275.
 13. **Jaeken, J., Artigas, J., Barone, R. et al.** Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectrofocusing pattern of serum sialotransferrins. *J Inherit Metab. Dis.*, 1997, 20 (3): p. 447-9.
 14. **Westphal, V., Peterson, S., Patterson, M. et al.** Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genet. Med.*, 2001, 3 (6): p. 393-8.
 15. **Vega, A. I., Pérez-Cerdá, C., Abia, D. al.** Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *J Inherit. Metab. Dis.*, 2011, 34 (4): p. 929-39.
 16. **Grünwald, S., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Jaeken, J., Matthijs, G.** High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *Am. J Hum. Genet.*, 2001, 68 (2): p. 347-54.
 17. **Kjaergaard, S., Skovby, F., Schwartz, M.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A.: expression and characterisation of wild type and mutant PMM2 in *E. coli*. *Eur J Hum. Genet.*, 1999, 7 (8): p. 884-8
 18. **Fletcher, J. M., Matthijs, G., Jaeken, J., Van Schaftingen, E., Nelson, P. V.** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: beyond the screen. *J Inherit. Metab. Dis.*, 2000, 23 (4): p. 396-8.
- Práce byla podporována IGA MZ NT12166-5/2011.*
- Do redakce došlo 25. 1. 2016

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Hana Hansíková, CSc.
1. LF UK a VFN v Praze
Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch
Klinika dětského a dorostového lékařství
Ke Karlovu 2
128 08 Praha 2
email: hana.hanskova@lf1.cuni.cz