

## Charakterizácia glykoprofilu pacienta s defektom v galaktozylácii

Rebeka Kodríková<sup>1</sup>, Maroš Krchňák<sup>1</sup>, Zuzana Pakanová<sup>1</sup>, Marek Nemčovič<sup>1</sup>, Anna Šalingová<sup>2</sup>, Ján Mucha<sup>1</sup>, Peter Baráth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika; chemrkod@savba.sk

<sup>2</sup>Národný Ústav Detských Chorôb, Centrum Dedičných Metabolických Porúch, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

### Abstract

Glycoprofile characterization of patient with defect in galactosylation

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a group of rare inherited disorders caused by defects in glycosylation. Most of these disorders are caused by defect in protein N-glycosylation. A patient with positive screening test for CDG, isoelectric focustion of serum transferrin and with genetically confirmed mutation in gene *SLC35A2*, causing CDG II<sub>m</sub>, underwent a detailed analysis of blood serum transferrin and whole N-glycoprofile by MALDI-TOF mass spectrometry. Analysis of patient's serum N-glycans and serum transferrin by MALDI-TOF revealed abnormal glycoprofile with increased presence of agalactosylated and monogalactosylated glycans. In total serum two significantly increased abberant glycans lacking galactose and sialic acid (m/z 1661,8357 Da, m/z 2227,1091 Da), common for this type of CDG, were identified There was also significantly increased third glycan (m/z 1906,962 Da) that can serve with other two as biomarker for this type of CDG.

**Keywords:** galactose transporter; congenital disorders of glycosylation; MALDI-TOF MS

### Úvod

Vrodené dedičné metabolické ochorenia vznikajú v dôsledku poruchy v metabolizme, komplexnom sete chemických reakcií organizmov. Väčšina prípadov týchto ochorení je spôsobená mutáciami v génoch kódujúcich enzýmy metabolických dráh, deficitom alebo zníženou aktivitou enzýmov. Ochorenia sú často sprevádzané akumuláciou metabolitov alebo absenciou výsledných produktov [1]. Medzi vrodené metabolické ochorenia patrí aj rozrastajúca sa skupina vrodených porúch glykozylácie (CDG, z angl. congenital disorders of glycosylation), ktorých príčinou vzniku je defekt v procese glykozylácie, post-translačnej modifikácie proteínov. Ide o ochorenia vznikajúce najčastejšie v dôsledku zníženej aktivity enzýmov glykozylačného procesu alebo mutáciou v kódujúcich génoch. Najpočetnejšie zastúpenie majú CDG spojené s poruchami v procese N-glykozylácie, ktoré rozdeľujeme na dva základné typy : CDG typu I, o ktorom hovoríme v prípade defektu pri tvorbe lipid-viazaného oligosacharidového prekursoru (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) a jeho prenosu na aminokyselinu a CDG typu II, vznikajúce ako dôsledok defektu v modifikácii a úprave glykánov [2].

V práci prezentujeme pacienta s pozitívnym skriningovým výsledkom na báze izoelektrickej fokusácie transferínu, ktorá bola vykonaná v Centre dedičných metabolických porúch NÚDCH a potvrdenou mutáciou v gène *SLC35A2*, kódujúcom transmembránový proteín, ktorého úlohou je transport UDP-galaktózy z cytosolu do lúmenu Golgiho aparátu, kde slúži ako glykozylový donor galaktózy pre glykozyltransferázy. Transport galaktózy do Golgiho aparátu je nevyhnutný pre tvorbu komplexných sialovaných glykánov. Mutácie v tomto gène spôsobujú CDG ochorenie typu II, označované ako CDG II<sub>m</sub> alebo SLC35A2-CDG [3 – 4] U pacienta bola diagnostikovaná celoexómovým sekvenovaním missense mutácia v gène *SLC35A2*: ChrX, na pozícii 48905448.

Cieľom našej práce bola štruktúrna analýza sérového transferínu a podrobná analýza N-glykoprotínu pacienta s vrodenou poruchou glykozylácie CDG II<sub>m</sub>, na úrovni N-glykozylácie prostredníctvom laserovej desorpčnej ionizačnej hmotnostnej spektrometrie s analyzátorom doby letu (MALDI-TOF/TOF, z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, výsledok ktorej môže byť v budúcnosti použitý pri monitorovaní priebehu ochorenia a terapie.

## **Materiál a metódy**

Príprava vzorky pre hmotnostnú analýzu N-glykoprotínu pacienta : K 10 µl krvného séra sa pridalo 40µl roztoku – 10 mM Tris-HCl, 0,1% SDS s výsledným pH 7,5. Následne sa vzorky (triplikáty krvného séra) inkubovali 10 minút pri teplote 98 °C. Po ochladení vzoriek sa k nim pridalo 0,5 µl PNGázy F a nechali sa inkubovať cez noc pri 37 °C. Po enzymatickom odštiepení glykánov od glykoproteínov nasledovala ich chromatografická separácia, na ktorú boli použité 1 mL PGC kolónky (PGC, z angl. *porous graphic carbon*, ENVI-Carb, Supelco). Na finálnu elúciu neutrálnych aj kyslých glykánov bol použitý roztok 60 % ACN s 0,1 % TFA. Glykány purifikované z krvného séra pacienta boli zmrazené pri -80 °C a cez noc vysušené lyofilizáciou.

Pre stabilizáciu komplexných oligosacharidových štruktúr v iónovom zdroji sme glykány modifikovali permetyláciou. Ku zlyofilizovaným vzorkám bolo pridaných 150 µl zmesi DMSO/NaOH, ktorá bola predtým dôkladne roztrápaná vo vysušenej trecej miske. Následne bol k vzorkám pridaný alikvótny objem metylačného činidla, jódmetánu a zmes sa 50 min inkubovala za stáleho trepania na rotačnej trepačke (25 °C, 2000 rpm). Po inkubácii bola chemická reakcia zastavená postupným pridávaním ľadovej vody (100-500 µl), čím došlo k rozpusteniu stuhnutej zmesi. Permetylované glykány sa v ďalšom kroku extrahovali do

chloroformu, pričom sa organická fáza neutralizovala premývaním s H<sub>2</sub>O. Vyeluované glykány (cca 500 µl) boli následne vysušené cez noc.

Pre izoláciu transferínu zo 100 µl séra bola pripravená imunoafinitná kolóna naviazaním zajačích polyklonálnych anti-transferínových protilátok na HiTrap NHS kolónu. Naväzovanie transferínu ako aj premývanie kolóny prebiehalo v roztoku PBS (0,14 M NaCl + 2,7 mM KCl + 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Ako elučné činidlo bol použitý 0,1 M glycín-HCl, pH 2,7, pričom eluáty boli ihneď neutralizované pre dosiahnutie neutrálneho pH. Pre získanie glykánov z vyzolovaného transferínu bol použitý rovnaký protokol ako pri izolácii glykánov z krvného séra.

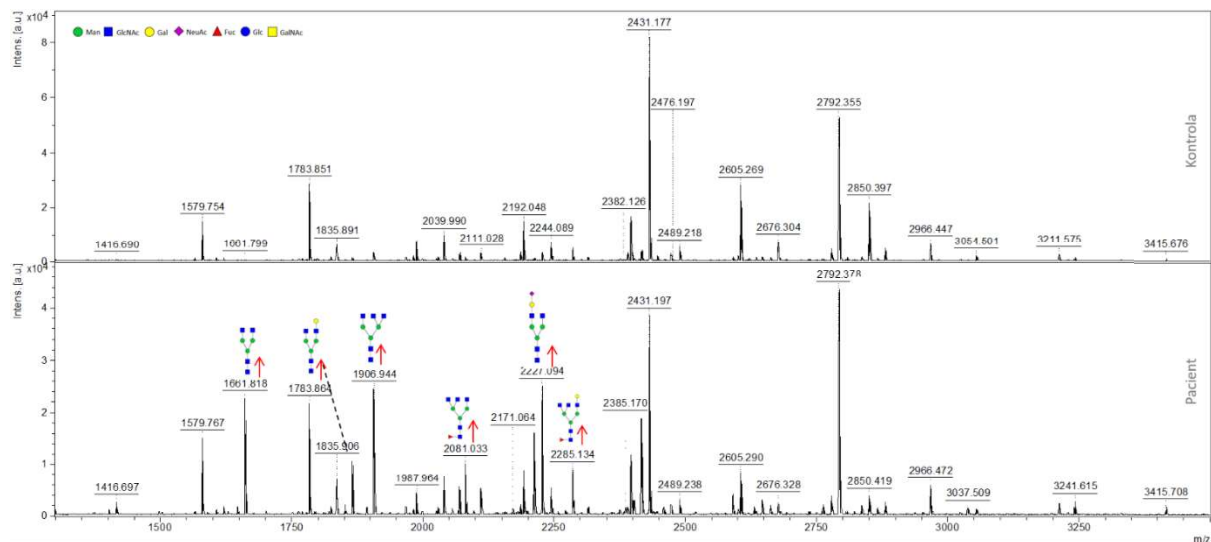
Pre MALDI-TOF analýzu boli vysušené permetylované vzorky sa rozpustené v 7 µL 50% metanolu. Na platničku (Groundsteel, Bruker Daltonics, USA) bol nanesený 1 µL matrice - kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (DHB) a 1 µl vzorky. Zmes vzorky a matrice, vysušená pri laboratórnej teplote bola následne analyzovaná hmotnostným spektrometrom MALDI-TOF UltrafleXtreme II (Bruker Daltonics, Germany) v reflektónovom pozitívnom iónovom móde. Výsledné hmotnostné spektrá boli spracované v softvéri FlexAnalysis 3.4 (BrukerDaltonics, Germany) a vyhodnotené pomocou programu GlycoWorkbench ([www.eurocarbdb.org](http://www.eurocarbdb.org)), pomocou ktorého sme k signálom. Ako negatívna kontrola slúžil tzv. „pool“ krvných sér desiatich zdravých jedincov (5 žien, 5 mužov), ktorá bola spracovaná rovnakým spôsobom ako vzorka pacienta.

## Výsledky a diskusia

Na základe pozitívneho výsledku izoelektrickej fokusácie sérového transferínu, a celoexómového sekvenovania bola našim cieľom bližšia charakterizácia N-glykoprotílu a štruktúrna analýza sérového transferínu pacienta hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF.

Hmotnostná analýza identifikovala vo vzorke sérových N-glykánov pacienta (enzymaticky uvoľnených z krvného séra PNGázou F) zmeny v zastúpení galaktozylovaných glykánov v porovnaní s kontrolným sérom. U pacienta boli v porovnaní s kontrolnou vzorkou opakovane identifikované zvýšené hladiny agalaktozylovaných N-glykánov (m/z 1661,8357 Da, m/z 1906,962 Da, m/z 2081,0512 Da) a monogalaktozylovaných N-glykánov (m/z 1865,9355 Da, m/z 2227,1091 Da, m/z 2285,151 Da), vid' Obr.1. Výpočet a porovnanie relatívneho percentuálneho zastúpenia agalaktozylovaných a monogalaktozylovaných glykánov nameraných v celkovom glykoprotíle pacienta oproti kontrolnej vzorke (Obr. 1) poukázal na ich niekoľko násobné zvýšenie, vid' Tab.1. Výrazný rozdiel pozorujeme v prípade monogalaktozylovaného glykánu (m/z 2227,1019 Da), ktorého zastúpenie je 10-krát vyššie ako

v kontrolnej vzorke a agalaktozylovaného glykánu (m/z 1661,8357 Da) a 5-krát vyšším zastúpením.

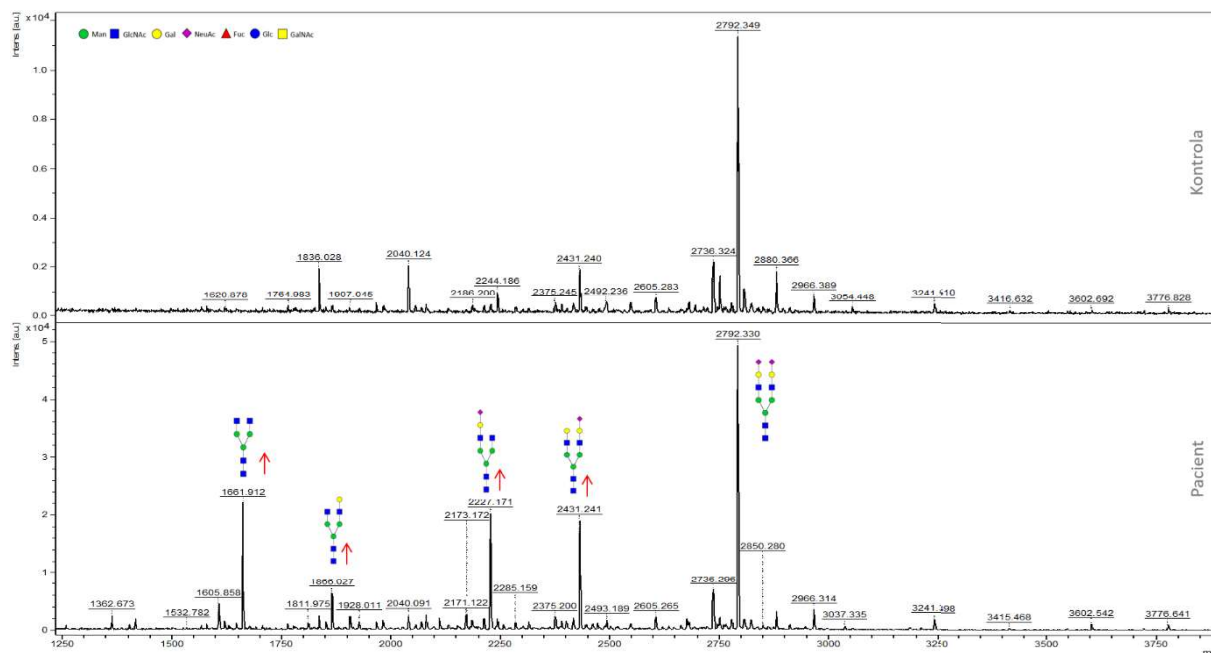


**Obr. 1. MALDI-TOF permetylovaných enzymaticky (PNGáza F) uvoľnených N-glykánov zo séra pacienta a kontrolnej vzorky**

**Tab. 1. Zastúpenie agalaktozylovaných a monogalaktozylovaných glykánov v krvnom sére pacienta**  
Hodnoty percentuálneho zastúpenia boli vypočítané z celkového množstva identifikovaných glykánov vo vzorkách. Hex – hexóza, HexNAc – N-acetylglukozamín, Fuc – fukóza, NeuAc – kyselina sialová

	Relatívna intenzita (%) vo vzorke pacienta	Relatívna intenzita (%) v kontrolnej vzorky
Hex3HexNAc4 (1661,8357 Da)	5,4 %	0 %
Hex4HexNAc4 (1865,9355 Da)	2,7 %	0,2 %
Hex3HexNAc5 (1906,962 Da)	5,5 %	0,5%
Hex3HexNAc5Fuc (2081,0512 Da)	2,3 %	0,3 %
Hex4HexNAc4NeuAc (2227,1091 Da)	10,6 %	0,9 %
Hex4HexNAc5Fuc (2285,151 Da)	1,9%	1%
Hex5HexNAc4NeuAc2 (2792, 3826 Da)	10,9 %	34,3 %

Na základe výsledku analýzy N-glykoprotílu krvného séra pacienta, sme sa rozhodli vykonať hmotnostnú analýzu aj pre sérový transferín, ktorý vo svojej štruktúre obsahuje dve N-glykozylačné miesta, kde sú v prípade zdravých jedincov naviazané v najvyššej abundancii dva bianténarne sialované glykány (m/z 2792, 3826 Da - Hex5HexNAc4NeuAc2) [5]. Podobne ako v prípade N-glykoprotílu krvného séra pacienta, štruktúrna analýza transferínu identifikovala zmeny v zastúpení galaktozylovaných glykánov – zvýšené hladiny glykánov s m/z 1661,8357 Da, m/z 1865,9355 Da, m/z 2227,1091 Da a m/z 2431,2089 Da, vid' Obr. 2.



**Obr. 2. MALDI-TOF permetylovaných enzymaticky (PNGáza F) uvoľnených N-glykánov zo sérového transferínu pacienta a kontrolnej vzorky**

## Záver

V prezentovanej práci sme prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF identifikovali N-glykoprofil pacienta a bližšie popísali štruktúru N-glykánov sérového transferínu, ktorý mal zmenený profil izoelectrickej fokusáci. V N-glykoprofile pacienta boli zistené zvýšené hladiny agalaktozylovaných ( $m/z$  1661,8357,  $m/z$  1906,962,  $m/z$  2081,0512) a monogalaktozylovaných N-glykánov ( $m/z$  1865,9355,  $m/z$  2227,1091,  $m/z$  2285,151) v porovnaní so zastúpením glykánov v zdravom ľudskom krvnom sére. Prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie sme tiež pozorovali zníženú galaktozyáciu sérového transferínu pacienta. Rovnako ako v celkovom N-glykoprofile, aj v glykoprofile transferínu sme pozorovali agalaktozylované a monogalaktozylované formy glykánov (1661,8357 Da,  $m/z$  1865,9355 Da,  $m/z$  2227,1091 Da a  $m/z$  2431,2089 Da), slúžiacich ako prekursor pre dominantný bianténny sialovaný glykán, viazaný na transferíne. Zmeny vznikajú v dôsledku nedostatočného transportu UDP-galaktózy prostredníctvom galaktózového transportéru, kódovaného génom SLC35A2, z cytosolu do lúmenu endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, kde dochádza k pripájaniu galaktózových jednotiek na glykánové antény. Aj napriek rozdielnemu lokusu mutácie v géne SLC35A2, ktoré boli doposiaľ popísané a publikované [6], boli v N-glykoprofile pacienta identifikované charakteristické zmeny v zastúpení glykánových biomarkerov (Hex3HexNAc4, Hex4HexNAc4NeuAc), typických pre toto ochorenie.

Výsledky práce môžu byť v budúcnosti prospešným materiálom pri monitorovaní progresie a štúdia SLC35A2-CDG ochorenia a jeho prípadnej terapie, ktorá je založená na galaktózovej suplementácii pacientov, po ktorej bola u pacientov pozorovaná zlepšená celková glykozylácia [7].

### **PodĎakovanie**

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, APVV-18-0336, a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Na práci sa podieľali členovia European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN) - Project ID No. 739543.

### **Zoznam použitej literatúry**

- [1] Hoffmann G. F., Nyhan W. L., Zschocke J., et al. (2002). Inherited metabolic diseases. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, p. 3
- [2] Péanne R., de Lonlay P., Foulquier F., et al. (2018). Eur. J. Med. Genet. 61(11), p. 643
- [3] Quelhas D., Correia J., Jaeken J., et al. (2021) Mol. Genet. Metab. Rep. 26, p. 10071
- [4] GeneCards®: The Human Gene Database. [21.marec 2022] <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC35A2>>
- [5] Wada Y. (2016). Proteomics. 16(24), p. 3105
- [6] Abuduxikuer K., Wang J. S. (2021) Front. Genet. 12, p. 658786
- [7] Witters P., Tahata S., Barone R. et al. (2020) Genet. Med. 22(6), p. 1102