PRIROĐENI POREMEĆAJI GLIKOZILACIJE I PROJEKT »EUROGLYCANET«

CONGENITAL DISORDERS OF GLYCOSYLATION AND PROJECT »EUROGLYCANET«

DANIJELA PETKOVIĆ, KARMEN BILIĆ, DOROTEA NINKOVIĆ, MARTIN ĆUK, KSENIJA FUMIĆ, IVO BARIĆ*

Deskriptori: Prirođeni poremećaj glikozilacije – dijagnoza, metabolizam, patofiziologija; Prirođene greške metabolizma ugljikohidrata – dijagnoza, metabolizam, patofiziologija; Glikoproteini – biosinteza; Glikozilacija

Sažetak. Prirođeni poremećaji glikozilacije su brzo rastuća skupina nasljednih metaboličkih bolesti uzrokovanih poremećenom sintezom glikoproteina. Ove bolesti nastaju zbog enzimskih nedostataka koji uzrokuju poremećaje u sintezi, prijenosu ili doradi oligosaharidnog lanca s posljedičnom nepotpunom glikozilacijom proteina. Razlikujemo poremećaje N-glikozilacije i O-glikozilacije, a opisani su i kombinirani poremećaji. Prirođeni poremećaji N-glikozilacije multisistemske su bolesti s vrlo različitim kliničkim obilježjima koja uključuju mentalnu retardaciju, teško zaostajanje u psihomotornom razvoju, konvulzije, malformacije, strukturne abnormalnosti središnjega živčanog sustava, jetrenu fibrozu, hormonske poremećaje, poremećaje koagulacije itd. Nasuprot tomu, poremećaji O-glikozilacije obično su ograničeni na jedan organski sustav i često imaju karakteristike prirođenih malformacija. Referentna orijentacijska metoda otkrivanja poremećaja N-glikozilacije kojom se mogu preliminarno otkriti brojni poremećaji iz ove skupine (CDG sindromi tipa Ia do IL i tipovi IIa i IId) jest izoelektrično fokusiranje transferina u serumu. Posljednje dvije godine metoda je dostupna i u našoj zemlji. Cilj ovog članka je upozoriti liječnike na prirođene poremećaje glikozilacije proteina kao moguće uzroke bolesti nerazjašnjene etiologije, pogotovo ako su prisutni i simptomi sa strane središnjega živčanog sustava ili bolesnik ima fibrozu jetre. Projekt »Euroglycanet« okuplja europske znanstvenike iz različitih područja medicine, posebno genetike, i glikobiologije, a osnovan je s namjerom da se razmijene stečena iskustva i znanja te unaprijede istraživanje, dijagnostika i liječenje prirođenih poremećaja glikozilacije.

Descriptors: Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome – diagnosis, metabolism, physiopathology; Carbohydrate metabolism, inborn errors – diagnosis, metabolism, physiopathology; Glycoproteins – biosynthesis; Glycosylation

Summary. Congenital disorders of glycosylation are rapidly growing group of inborn errors of metabolism caused by defects in the biosynthesis of glycoproteins. Primary disorders are due to enzyme deficiencies, resulting in defects of assembly, transfer or processing of carbohydrate side chains, leading to incomplete glycosylation of plasma proteins. They comprise disorders of N-glycosylation, O-glycosylation and combined disorders. Congenital disorders of N-glycosylation are multisystem diseases with wide variation in clinical presentation including mental retardation, severe developmental delay, seizures, malformations, structural abnormalities of central nervous system, liver fibrosis, hormonal and coagulation disorders, etc. In contrary, O-glycosylation disorders are often organ restricted and have characteristics of congenital malformations. Isoelectric focusing of serum transferrin is the accepted screening method for many of N-glycosylation disorders. In the last two years the method is available in Croatia. The aim of this article is to point out congenital disorders of glycosylation as possible causes of multisystem disorders of unknown origin, especially when central nervous system symptoms or liver fibrosis are present. »Euroglycanet« is a project set up by European medical doctors, in particular geneticists, and glycobiologists with the purpose to exchange experiences and knowledge and to improve research, diagnosis and treatment of congenital disorders of glycosylation.

Liječ Vjesn 2007;129:286–292

Prirođeni poremećaji glikozilacije (kratica CDG; od engl. *Congenital Disorders of Glycosylation*, stari naziv *Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes*) jesu brzo rastuća skupina nasljednih bolesti uzrokovanih enzimskim nedostatcima koje imaju za posljedicu poremećaje u sintezi, prijenosu ili doradi ugljikohidratnog dijela glikoproteina, što dovodi do nepotpune glikozilacije proteina. Od 1980. kada su Jaeken i suradnici opisali prvo dvoje djece s bolešću iz ove skupine, znanja i spoznaje o ovim poremećajima s godinama se vrlo brzo povećavaju pa je do danas opisano više od 40 različitih bolesti. Osnovni patofiziološki problem koji sjedinjuje ovu vrlo heterogenu skupinu bolesti jest poremećena sinteza ili dorada glikana koji se veže na protein u nastajanju. Glikanski lanac odgovoran je za tercijarnu strukturu, topljivost i stabilnost proteina, modulaciju aktivnosti enzima i signalizirajućih molekula, unutarstanični prijenos signala, komunikaciju među stanicama itd.[1] Kolika je važnost procesa glikozilacije govori činjenica da je više od 50% ukupnih tjelesnih proteina glikozilirano, a čak 1% ljudskoga genoma uključeno je u procese glikozilacije.[2] Većina sekretnih proteina, proteina na površini stanice i proteina ekstracelularnog matriksa su glikoproteini.[3] Glikoproteini su uključeni u međustanično prepoznavanje, regulaciju staničnoga rasta te u interakcije stanice s okolinom, enzimima, hormonima i mikroorganizmima te su nužni za normalan rast i funkciju svih tkiva. Transkripcija proteinske sekvence s molekule DNA na RNA i kasnije translacija nisu jedini procesi koji određuju funkciju proteina. Proteini ulaze u brojne (>200) posttranslacijske modifikacije koje nisu zapisane u RNA, a koje definiraju protein u strukturnom i funk-

* **Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet u Zagrebu** (Danijela Petković, dr. med.; Martin Ćuk, dr. med.); **Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb** (Karmen Bilić, dipl. ing. med. biokem.); **Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb** (Dorotea Ninković, dr. med.; prof. dr. sc. Ivo Barić, dr. med.); **Laboratorij za dijagnostiku nasljednih i metaboličkih bolesti, KBC Zagreb** (dr. sc. Ksenija Fumić, dipl. ing. med. biokem.)

Adresa za dopisivanje: Prof. I. Barić, Zavod za genetiku i metabolizam, Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb, e-mail: ibaric@kbc-zagreb.hr

Primljeno 14. veljače 2007., prihvaćeno 26. travnja 2007.

cionalnom smislu. Zbog sadržaja ugljikohidratne molekule glikoproteini nisu pod izravnom genskom kontrolom.[4] Glikozilacija (dodavanje šećera na protein) jedan je od najvažnijih posttranslacijskih procesa i ovisan je o enzimima. Nakon transkripcije mRNA napušta jezgru i u citoplazmi se veže s ribosomima zrnatog endoplazmatskog retikuluma (ER) te započinje sinteza proteina. Novi polipeptidni lanac u nastajanju, nakon otpuštanja s ribosoma, premješta se u lumen ER. Prilikom prijenosa polipeptida kroz membranu ER započinje N-glikozilacija rastućeg polipeptida (kemijska modifikacija). N-glikozilacije su nužne za nabiranje polipeptidnog lanca u lumenu ER. Glikozilacija se nastavlja u Golgijevu aparatu. Konačni rezultat svih modifikacija na polipeptidu je poprimanje konačne konformacije i funkcije proteina.[5]

Dva su glavna oblika glikozilacije proteina: N-glikozilacija (ugljikohidratni lanac je vezan za dušik amidne skupine asparagina) i O-glikozilacija (ugljikohidratni lanac je vezan za kisik hidroksilne skupine serina, treonina ili hidroksilizina).

N-glikozilacija proteina

N-glikozilacija proteina vrlo je složen proces sinteze i prijenosa oligosaharida na polipeptidni lanac u nastajanju. U njemu sudjeluje više od 40 različitih enzima i zbiva se u citosolu, ER i Golgijevu aparatu. Zajednička preteča svih N-vezanih oligosaharida je oligosaharid građen od tri molekule glukoze, devet molekula manoze i dvije molekule N-acetilglukozamina koji nastaje na lipidnom nosaču dolikol-pirofosfatu vezanom za membranu ER, najprije u citosolu, a zatim na luminalnoj strani ER. Proces glikozilacije započinje u ER, gdje se ovaj oligosaharid s pomoću membranskog enzima oligosaharil transferaze prenosi s dolikolnog nosača na Asn-X-Thr/Ser slijed polipeptidnog lanca u nastajanju. Oligosaharid se povezuje N-glikozidnom vezom s asparaginom koji se nalazi u tripletnoj sekvenci, tj. sačuvanom glikozilacijskom motivu, Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu, izuzev prolin. Na reducirajućem kraju oligosaharida uvijek se nalazi N-acetilglukozamin. Zatim se biosinteza N-glikana nastavlja u ER i Golgijevu aparatu modifikacijama zajedničke preteče. U proces modifikacije uključen je velik broj glikozidaza i glikoziltransferaza koje specifično kataliziraju pojedine korake. Nastali glikoproteini sekretornim vezikulama izlaze iz Golgijeva aparata i prenose se do konačnog odredišta.[4,6,7]

O-glikozilacija proteina

O-glikozidnom vezom mogu biti povezani različiti monosaharidi ili oligosaharidi (na nereducirajućem kraju najčešće je N-acetilgalaktozamin) s aminokiselinama serinom i treoninom. O-glikozilacija proteina zbiva se u Golgijevu aparatu i mnogo je složeniji proces od N-glikozilacije. U ljudi je poznato 7 različitih O-glikana koji se klasificiraju prema prvom saharidu, vezanom za serin, treonin ili hidroksilizin proteina, na: O-glikane mucinskog tipa, glikozaminoglikane, O-vezane N-acetilgalaktozamine, O-galaktozilglikane, O-manozilglikane, O-glukozilglikane i O-fukozilglikane. Najčešći tipovi O-glikana u ljudi su O-glikani mucinskog tipa, u kojima je prva skupina N-acetilgalaktozamin, i glikozaminoglikani, u kojima je prvi saharid ksiloza. Ove dvije grupe O-glikana pokazuju najveću varijabilnost. Tako npr. broj monosaharidnih skupina O-glikana mucinskog tipa može varirati od jedan do deset, dok glikozaminoglikanski lanci mogu imati 100 ili više monosaharidnih skupina. Ostalih pet O-glikana pokazuje znatno manju varijabilnost i uglavnom se pojavljuju u jednoj konformaciji.[3]

Prirođeni poremećaji N-glikozilacije proteina

Poremećaji N-glikozilacije su autosomno-recesivni nasljedni poremećaji koje možemo podijeliti u dvije skupine: skupinu CDG-I kod koje je poremećena sinteza glikanskog lanca i njegov prijenos na protein (zbiva se u citosolu i ER) i skupinu CDG-II kod kojeg je poremećena dorada glikanskog lanca glikoproteina (zbiva se u ER i Golgijevu aparatu). U skupinu CDG-x svrstani su poremećaji glikozilacije kod kojih nije poznat enzimski nedostatak, odnosno etiologija poremećaja. Prirođeni poremećaji N-glikozilacije vrlo su heterogena skupina multisistemskih bolesti s različitom simptomatologijom i vrlo velikom varijabilnošću kliničkih obilježja, kako među pojedinim vrstama bolesti tako i među pacijentima oboljelima od iste bolesti. Dosad je opisano oko 600 bolesnika s poremećajem N-glikozilacije.[1] Specifičnog liječenja nema, osim kod tipa CDG-Ib koji se liječi manozom[8] i CDG-IIc kod kojeg je opisan uspjeh nakon primjene fukoze.[9] Do danas opisani prirođeni poremećaji N-glikozilacije prikazani su na tablici 1. O češćim bolestima iz ove skupine bit će nešto više rečeno u nastavku teksta.

CDG-Ia

CDG-Ia je najčešći prirođeni poremećaj glikozilacije. Dosad je opisano više od 500 bolesnika. Bolest nastaje zbog manjka enzima fosfomanomutaze (PMM), odgovornog za pretvorbu manoza-6-fosfata u manoza-1-fosfat. Često se već u novorođenčadi i dojenčadi s ovim poremećajem vide strabizam, hipotonija, nenapredovanje u tjelesnoj težini, a mogu se vidjeti i uvučene bradavice i pojasna raspodjela masnog tkiva kojima se prije pridavala velika važnost u postavljanju sumnje na ovu bolest.[4] Međutim, s vremenom se utvrdilo da to i nisu tako tipična obilježja. Nešto kasnije se kod ove djece vidi mentalna retardacija, ataksija (kao posljedica hipoplazije malog mozga) i pigmentni retinitis. Neki bolesnici dobiju konvulzije ili doživljavaju učestale epizode slične moždanom udaru. Vrlo često se nađe i osteopenija. Smrtnost je u prvim godinama života oko 20%, a nakon toga bolest ima stabilniji tijek.[10] Kod odraslih se vide ataksija, neprogresivna mentalna retardacija i periferna neuropatija. Žene vrlo često imaju i hipergonadotropni hipogonadizam.[11] U laboratorijskim nalazima nađu se povišene aminotransferaze, hipoproteinemija, hipokolesterolemija i koagulopatija (snižen antitrombin III, protein C i faktor XI).[12] Bolest značajno narušava kvalitetu života tako da je velika većina ovih bolesnika vezana za invalidska kolica i ovisna o pomoći okoline. Bolesnici s ovim poremećajem pokušavali su se liječiti peroralnim unosom manoze, no na navedenu terapiju nije došlo do kliničkog a ni biokemijskog poboljšanja.[13,14]

CDG-Ib

Ovaj poremećaj nastaje zbog manjka enzima fosfomanoza izomeraze (PMI) koji sudjeluje u stvaranju manoza-6-fosfata. Dosad je opisano 20-ak bolesnika. Za razliku od ostalih poremećaja glikozilacije ova bolest nema neurološke simptomatologije, a osnovna obilježja su enteropatija s gubitkom proteina, fibroza jetre i koagulopatija. Bolest počinje već u prvoj godini života s kroničnim proljevima, cikličnim povraćanjem i nenapredovanjem u tjelesnoj težini. Neki bolesnici imaju epizode hipoglikemija. S vremenom se može razviti fibroza jetre.[15] Također su opisane trombotičke epizode i teška krvarenja koja su u nekoliko navrata imala fatalni ishod.[16] Ovu bolest je bitno na vrijeme prepoznati jer

Tablica – Table 1. *Prirođeni poremećaji N-glikozilacije u ljudi / Human congenital disorders of N-glycosilation*

Ime Name	Enzim Enzyme	Gen Gene	OMIM	Glavna obilježja Key features
CDG-Ia	Fosfomanomutaza II Phosphomannomutase II	PMM2	212065	Mentalna retardacija, hipotonija, konvulzije, ezotropija, hipoplazija malog mozga, epizode slične moždanom udaru Mental retardation, hypotonia, seizures, esotropia, cerebellar hypoplasia, stroke-like epizodes
CDG-Ib	Fosfomanoza izomeraza Phosphomannose isomerase	MPI	602579	Fibroza jetre, enteropatija s gubitkom proteina, koagulopatija, hipoglikemija Liver fibrosis, protein-losing enteropathy, coagulopathy, hypoglycaemia
CDG-Ic	Glukoziltransferaza I Glucosyl transferase I	ALG6	603147	Umjerna mentalna retardacija, hipotonija, epilepsija Moderate mental retardation, hypotonia, epilepsy
CDG-Id	Manoziltransferaza IV Mannosyl transferase IV	ALG3	601110	Teško psihomotorno zaostajanje, atrofija optikusa, mikrocefalija, kolobomi irisa, hipsaritmija Profound psychomotor delay, optic atrophy, acquired microcephaly, iris colobomas, hypsarrhytmia
CDG-Ie	Dolikol-P-manoza sintaza I Dolichol-P-mannose synthase I	DPM1	603503	Teška mentalna retardacija, epilepsija, hipotonija, blaga dizmorfija, koagulopatija Severe mental retardation, epilepsy, hypotonia, mild dysmorphism, coagulopathy
CDG-If	Lec35 Lec35	MPDU 1	608799	Nizak rast, ihtioza, psihomotorna retardacija Short stature, ichtyosis, psychomotor retardation
CDG-Ig	Manoziltransferaza VIII Mannosyl transferase VIII	ALG12	607143	Hipotonija, dismorfija lica, psihomotorna retardacija, stečena mikrocefalija, učestale infekcije Hypotonia, facial dysmorphism, psychomotor retardation, acquired microcephaly, frequent infections
CDG-Ih	Glukoziltransferaza II Glucosyl transferase II	ALG8	608104	Hepatomegalija, enteropatija s gubitkom proteina, zatajenje bubrega, hipoalbuminemija, edemi, ascites Hepatomegaly, protein-losing enteropathy, renal failure, hypoalbuminaemia, oedema, ascites
CDG-Ii	Manoziltransferaza II Mannosyl transferase II	ALG2	607906	Mentalna retardacija, zakasnjela mijelinizacija, konvulzije, kolobomi irisa, hepatomegalija, koagulopatija Mental retardation, hypomyelination, seizures, iris colobomas, hepatomegaly, coaguopathy
CDG-Ij	UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferaza UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferase	DPAGT1	608093	Teška mentalna retardacija, hipotonija, konvulzije, mikrocefalija, egzotropija Severe mental retardation, hypotonia, seizures, microcephaly, exotropia
CDG-Ik	Manoziltransferaza I Mannosyl transferase I	ALG1	608540	Teška psihomotorna retardacija, hipotonija, mikrocefalija, konvulzije, koagulopatija, nefrotski sindrom Severe psychomotor retardation, hypotonia, microcephaly, seizures, coagulopathy, nephrotic syndrome
CDG-IL	Manoziltransferaza VII/IX Mannosyl transferase VII/IX	ALG9	608776	Teška mikrocefalija, hipotonija, konvulzije, hepatomegalija Severe microcephaly, hypotonia, seizures, hepatomegaly
CDG-IIa	N-acetilglukozaminiltransferaza II N-Acetylglucosaminyltransferase II	MGAT2	212066	Mentalna retardacija, dismorfija, stereotipije, konvulzije Mental retardation, dysmorphism, stereotypies, seizures
CDG-IIb	Glukozidaza I Glucosidase I	GLS1	606056	Dismorfija, hipotonija, konvulzije, fibroza jetre Dysmorphism, hypotonia, seizures, liver fibrosis
CDG-IIc	GDP-fukoza transporter I GDP-fucose transporter I	SLC35C1 /FUCT1	266265	Rekurentne infekcije, neutrofilija, mentalna retardacija, mikrocefalija, hipotonija Recurrent infections, persistent neutrophilia, mental retardation, microcephaly, hypotonia
CDG-IId	β-1,4-galaktoziltransferza I β-1,4-Galactosyltransferase I	B4GALT1	607091	Hipotonija, spontana krvarenja, malformacija Dandy-Walker Hypotonia, spontaneous haemorrhage, Dandy-Walker
CDG-IIe	Podjedinica Golgijeva kompleksa Subunit of COG complex in Golgi	COG 7	608779	Dismorfija, hipotonija, konvulzije, hepatomegalija, žutica, infekcije, srčano zatajenje Dysmorphism, hypotonia, seizures, hepatomegaly, jaundice, recurrent infections, cardiac failure
CDG-IIf	CMP transporter sijalinske kiseline CMP-sialic acid transporter	SLC35A1	605634	Trombocitopenija Trombocytopaenia

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

postoji mogućnost uspješnog liječenja peroralnim unosom manoze. Na taj se način poveća depo manoza-6-fosfata u organizmu, što dovodi do smanjenja hipoglikozilacije proteina.[8] Klinički simptomi bolesti obično se povlače vrlo brzo nakon uvođenja terapije,[12,13] ali je opisan i bolesnik koji je umro za vrijeme provođenja terapije. Zanimljivo je da je poremećaj dokazan i u jedne osobe bez simptoma.

CDG-Ic

Ova je bolest druga po učestalosti među poremećajima N-glikozilacije. Nastaje zbog manjka enzima glukoziltransferaze I, a opisana je u 30-ak bolesnika i sliči tipu CDG-Ia. Glavna klinička obilježja su psihomotorna retardacija, hipotonija, strabizam i recidivirajuće konvulzije. Za razliku od tipa CDG-Ia kod ovog poremećaja obično nema karakterističnih dismorfnih obilježja niti hipoplazije malog mozga, a tijek bolesti je blaži.[17]

CDG-IIa

Ova je bolest još rjeđa nego prethodno opisane, a uzrokovana je mutacijom gena koji kodira enzim N-acetilglukozaminiltransferazu II. Djeca s ovim poremećajem imaju tešku

psihomotornu retardaciju, generaliziranu hipotoniju i stereotipne pokrete, a također se vide dismorfija lica, velike, nisko položene uške i široko razdvojene mamile.[18]

CDG-x

Kao što je već spomenuto, u ovu su skupinu uvršteni bolesnici koji ne spadaju ni u jedan od dosad opisanih poremećaja glikozilacije i za koje do sada nisu otkriveni deficijentni enzimi, odnosno mutacija gena. Radi se o bolesnicima s vrlo različitom kliničkom slikom. Opisani su oligohidramnij, fetalni hidrops, dismorfija lica, nenapredovanje u tjelesnoj težini, izostanak psihomotornog razvoja, smrt nakon konvulzija refrakternih na terapiju, progresivna mikrocefalija, hipoplazija malog mozga, trombocitopenija, proljevi i povraćanje, demineralizacija distalnih dijelova dugih kostiju, tubulopatija.[19] Pretpostavlja se da u ovoj grupi značajan udio čine oni koji imaju kombiniran poremećaj N i O-glikozilacije (dosad je opisano 10 kombiniranih poremećaja N i O-glikozilacije).

Prirođeni poremećaji O-glikozilacije proteina

Prirođeni poremećaji O-glikozilacije su izrazito heterogena skupina bolesti. Prvi ovakvi poremećaji prepoznati su među ranije poznatim bolestima (multiple egzostoze, progeroidna forma sindroma Ehlers-Danlos, sindrom Walker-Warburg). Kod mnogih je bila poznata genska osnova, ali ne i biokemijski poremećaj odgovoran za nastanak bolesti. Za razliku od prirođenih poremećaja N-glikozilacije koji su multisistemske bolesti, kod mnogih od ovih poremećaja vidi se zahvaćenost samo jednog organskog sustava. Razlog tomu je što su enzimi uključeni u procese O-glikozilacije eksprimirani samo u pojedinim tkivima (iznimka su enzimi uključeni u sintezu O-glikana mucinskog tipa).[3] Također, za razliku od prirođenih poremećaja N-glikozilacije koji se nasljeđuju autosomno-recesivno, neke od ovih bolesti se nasljeđuju autosomno-dominantno (sijalurija, multiple hereditarne egzostoze). Najčešći poremećaji iz ove skupine su poremećaji stvaranja O-manozilglikana, koji se očituju kao mišićne distrofije, i poremećaji stvaranja glikozaminoglikana, koji se očituju abnormalnostima kosti i hrskavice.[1]

Dosad opisani prirođeni poremećaji O-glikozilacije navedeni su na tablici 2, a neki će biti posebno spomenuti u daljnjem tekstu.

Poremećaji sinteze O-manozilglikana

O-manozilglikani su u ljudskom organizmu gradivni dio nekoliko glikoproteina koji se nalaze u mozgu, mišićima i živcima. Poremećena O-manozilacija jednog od tih glikoproteina, α-distroglikana, dovodi do poremećene migracije neurona i mišićne disfunkcije. Naime, distroglikanski kompleks koji povezuje citoskelet s ekstracelularnim matriksom sastoji se od β-distroglikana, transmembranske podjedinice koja se veže za citoskeleton, i α-distroglikana, izvanstanične podjedinice koja se veže za ekstracelularni matriks. Upravo O-manozilglikani imaju važnu ulogu u vezanju α-distroglikana za proteine ekstracelularnog matriksa (laminin u mišićima, odnosno neureksin u mozgu).[3]

Poremećena O-manozilacija navedenoga glikoproteina uzrok je najmanje sedam kongenitalnih mišićnih distrofija (sindroma Walker-Warburg, bolesti »mišić-oko-mozak«, Fukuyamine mišićne distrofije, kongenitalne mišićne distrofije tipa 1C i 1D te mišićne distrofije »limb-girdle« tipa 2K i 2I). Tipična klinička obilježja bolesti »mišić-oko-mozak« su kongenitalni glaukom, miopija, hipoplazija retine, atrofija papile vidnog živca, teška hipotonija, miokloni trzajevi, hidrocefalus i mentalna retardacija, a u središnjem živčanom sustavu vide se pahigirija, izravnano moždano deblo i hipoplazija malog mozga. Tijek bolesti je dosta varijabilan tako da neki bolesnici umru u prvim godinama života, dok većina doživi odraslu dob. Tijek sindroma Walker-Warburg znatno je teži i smrt obično nastupi unutar prve godine života. Najvažnija obilježja ove bolesti su lisencefalija tipa II, hidrocefalus, hipoplazija malog mozga, ageneza korpusa kalozuma i vermisa malog mozga, fuzija hemisfera, encefalokele, teška hipotonija mišića, adinamija, odsutnost tetivnih refleksa te mikroftalmija i druge anomalije oka (katarakta, plitka prednja komora, mikrokorneja, nedostatak leće, retinalna displazija, ablacija retine, hipoplazija ili atrofija optičkog živca i makule, kolobomi, glaukom).[20] Ostale bolesti iz ove skupine su vrlo rijetke.

Poremećaji sinteze glikozaminoglikana

Mutacije gena koje dovode do poremećene sinteze glikozaminoglikana mogu dovesti do nekoliko različitih bolesti u ljudi. Dva najpoznatija poremećaja iz ove skupine su progeroidna varijanta sindroma Ehlers-Danlos i multiple nasljedne egzostoze. Progeroidna varijanta sindroma Ehlers-Danlos nastaje zbog manjka enzima β-galaktoziltransferaze. Osim obilježja tipičnih za sindrom Ehlers-Danlos (hipermobilni zglobovi i rastegljiva koža) i progeriju (starački izgled i gubitak dlaka) kod ovih se bolesnika vide i nizak rast, osteopenija, manjkavo mliječno zubalo, produljeno cijeljenje rana, hipotonija, kraniofacijalna disproporcija i zaostajanje u psihomotornom razvoju.[4] Multiple nasljedne egzostoze su autosomno-dominantna nasljedna bolest s incidencijom od 1:50 000. Bolest nastaje zbog poremećene sinteze heparan sulfata koji je odgovoran za prestanak proliferacije i sazrijevanje hrskavičnog tkiva. U ovih bolesnika već od rane dojenačke dobi i za vrijeme rasta kostiju nastaju brojni hrskavični tumori, najčešće na dugim kostima, koji s vremenom dovode do deformacija kostura i niskog rasta. Također, puno je veća učestalost malignih tumora hrskavice i kosti nego u općoj populaciji.[21]

Sekundarni uzroci poremećene glikozilacije proteina

Poremećena glikozilacija proteina može biti i sekundarna pojava kod drugih nasljednih poremećaja u metabolizmu ugljikohidrata, kao što su galaktozemija i fruktozemija. U bolesnika koji imaju klasičnu galaktozemiju u lanac N-glikana se ne može ugraditi galaktoza jer akumulirani galaktoza-1-fosfat blokira aktivnost galaktoziltransferaze potrebne u N-glikozilaciji proteina.[22] Bolesnici s galaktozemijom prije uvođenja dijete pokazuju promijenjen profil u izoelektričnom fokusiranju transferina sličan profilu CDG tipa I. Nakon što se uvede dijeta bez galaktoze biosinteza N-glikana se normalizira.[1] Isto tako, u bolesnika koji boluju od fruktozemije nakupljeni fruktoza-1-fosfat blokira aktivnost enzima fosfomanoza izomeraze (enzima koji nedostaje kod bolesnika oboljelih od CDG-Ia).[23] Prije uvođenja dijete ovi bolesnici pokazuju abnormalan profil izoelektričnog fokusiranja transferina s povišenim tri, di i asijalotransferinom te blago sniženim tetrasijalotransferinom. Kao i kod galaktozemije, uvođenjem dijete glikozilacija proteina se normalizira. N-glikozilacija proteina je poremećena i kod alkoholičara i bolesnika s teškim oštećenjem jetre, no biokemijski mehanizam je za sada nerazjašnjen. U bolesnika s

Tablica – Table 2. *Prirođeni poremećaji O-glikozilacije u ljudi* / Human congenital disorders of O-glycosylation**

Ime Name	Gen Gene	OMIM	Tip O-glikana O-glycan type
Poremećaji u biosintezi mucinskog tipa O-glikana/Defects in mucin type O-glycan			
Obiteljska tumorska kalcinoza Familial tumoral calcinosis	GALNT 3	211900	O-glikan mucinskog tipa mucin type O-glycan
Poremećaji u biosintezi glikozaminoglikana/Defects in glycosaminoglycans biosynthesis			
Progeroidna varijanta sindroma Ehlers-Danlos Progeroid variant of Ehlers Danlos syndrome	B4GALT7	130070	glikozaminoglikan (GAG) glycosaminoglycan (GAG)
Multiple nasljedne egzostoze tip I Hereditary multiple exostoses type I	EXT1	133700	heparan/heparan sulfat heparan/heparan sulfate
Multiple nasljedne egzostoze tip II Hereditary multiple exostoses type II	EXT2	133701	heparan/heparan sulfat heparan/heparan sulfate
Multiple nasljedne egzostoze tip III Hereditary multiple exostoses type III	EXT3	600209	heparan/heparan sulfat heparan/heparan sulfate
Poremećaji u sulfataciji glikozaminoglikana/Defects in glycosaminoglycans sulfation			
Makulokornealna distrofija/Macular corneal dystrophy	CHST6	217800	keratan sulfat/keratan sulfate
Spondiloepifizealna displazija tipa Omani Spondiloepiphyseal dysplasia type Omani	CHST 3	608367	hondroitin sulfat chondroitin sulfate
Ahondrogeneza tipa 1B/Achondrogenesis type 1B	DTDST	600972	sulfatirani GAG/sulfated GAGs
Atelosteogeneza tipa II/Atelosteogenesis type II	DTDST	256050	sulfatirani GAG/sulfated GAGs
Diastrofična displazija/Diastrophic dysplasia	DTDST	222600	sulfatirani GAG/sulfated GAGs
Multipla epifizealna displazija 4 Multiple epiphyseal dysplasia 4	DTDST	226900	sulfatirani GAG sulfated GAGs
Spondiloepimetafizealna displazija tipa Pakistan Spondyloepimetaphyseal dysplasia type Pakistani	ATPSK2	603005	sulfatirani GAG sulfated GAGs
Poremećaji u biosintezi O-galaktozilglikana/Defects in O-galactosyl glycan biosynthesis			
Sindrom Ehlers-Danlos tipa VI Ehlers-Danlos syndrome type VI	PLOD	22540	O-vezana galaktoza O-linked galactose
Poremećaji u biosintezi O-manozilglikana/Defects in O-mannosyl glycan biosynthesis			
Sindrom Walker-Warburg Walker-Warburg syndrome	POMT1, POMT2 FCMD, FKRP ili POMGNT1	236670	O-vezana manoza O-linked mannose
Mišićna distrofija »limb-girdle« tipa 2K Limb-girdle muscular dystrophy type 2K	POMT1	609308	O-vezana manoza O-linked mnanose
Bolest »mišić-oko-mozak«/Muscle-eye-brain disease	POMGNT1 ili FKRP	253280	O-vezana manoza/O-linked mnanose
Mogući poremećaji u biosintezi O-manozilglikana/Putative defects in O-mannosyl glycan biosynthesis			
Nasljedna muskularna distrofija tipa Fukuyama Fukuyama type congenital muscular dystrophy	FCMD	25380	O-vezana manoza O-linked mannose
Nasljedna muskularna distrofija 1C Congenital muscular dystrophy type 1C	FKRP	606612	O-vezana manoza O-linked mannose
Mišićna distrofija »limb girdle« tip 2I Limb-girdle muscular dystrophy type 2I	FKRP	607155	O-vezana manoza O-linked mannose
Kongenitalna muskularna distrofija tipa 1D Congenital muscular dystrophy type 1D	LARGE	608840	O-vezana manoza O-linked mannose
Poremećaji u sijalizaciji O-glikana/Defects in O-glycan sialylation			
Nasljedna miopatija s inkluzijskim tijelima Hereditary inclusion body myopathy	GNE	600737	O-vezani sijalizirani glikan sialylated O-linked glycans
Distalna miopatija s ograđenim vakuolama Distal myopathy with rimmed vacuoles	GNE	605820	O-vezani sijalizirani glikan sialylated O-linked glycans
Sijalurija Sialuria	GNE	239921	O-vezani sijalizirani glikan sialylated O-linked glycans
Prirođeni poremećaj glikozilacije IIf (CDG-IIf) Congenital disorder of glycosylation IIf	SLC35A1	–	O-vezani sijalizirani glikan sialylated O-linked glycans

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man
* S dopuštenjem autora i izdavača preuzeto uz modifikacije iz reference[3] /With permission of authors and publisher taken and slightly modified from reference[3]

hemolitičko-uremičnim sindromom također može postojati sekundarni poremećaj glikozilacije proteina.

Laboratorijsko otkrivanje prirođenih poremećaja glikozilacije

Brojni serumski proteini su glikozilirani zbog čega kod poremećene glikozilacije mogu biti promijenjeni. Preporučeni postupci u laboratorijskoj dijagnostici sindroma CDG jesu: probir na poremećaje N-glikozilacije proteina metodom izoelektričnog fokusiranja transferina, isključenje polimorfizma proteina metodom izoelektričnog fokusiranja transferina nakon tretiranja uzorka neuroaminidazom, isključenje sekundarnih uzroka poremećene glikozilacije proteina, potvrda generaliziranog poremećaja N-glikozilacije proteina metodom izoelektričnog fokusiranja globulina koji

veže tiroksin, analiza ukupnih glikanskih struktura u plazmi; analiza oligosaharida vezanih na lipide, mjerenja ostatnih enzimskih aktivnosti u leukocitima i fibroblastima te genske analize. Kod sumnje na poremećaje glikozilacije O-glikana mucinskog tipa te kombinirane poremećaje O i N-glikozilacije preporučuje se kao metoda probira izoelektrično fokusiranje apolipoproteina C III (Apo C III).[3]

Izoelektrično fokusiranje (IEF) jest visokorezolutna metoda kojom se proteini razdvajaju u gelu u uvjetima kontinuiranog gradijenta pH. Za uspostavljanje kontinuiranog gradijenta pH rabi se ugradnja niskomolekularnih amfoternih molekula (amfoliti) u poliakrilamidni gel. Takve tvari imaju bliske pI-vrijednosti (izoelektrične točke) i pokrivaju određeni raspon pH. U takvim uvjetima proteini migriraju u električnom polju zbog svojeg naboja dok ne dosegnu zonu s vrijednošću pH koja je istovjetna s njihovom izoelektričnom točkom (pI). U području njezine izoelektrične točke ukupni naboj molekule proteina je nula i proteini će stoga stati i fokusirati se u uske zone. Nakon završetka elektroforeze gelovi se trebaju fiksirati te se razdvojeni proteini unutar gela prikazuju bojenjem (Coomassie boja, bojenje srebrom).

Transferin je protein plazme koji ima dva glikanska lanca, a na svaki od tih lanaca su terminalno vezane po dvije sijalinske kiseline. Opisana izoforma je tetrasijalotransferin koji čini glavninu transferina u plazmi. Ostale izoforme koje se normalno nalaze u plazmi, ali u znatno manjim količinama, jesu trisijalo, pentasijalo i heksasijalotransferin (slika 1). S obzirom na to da je sijalinska kiselina nosilac negativnog naboja, o broju sijalinskih kiselina vezanih na transferin ovisit će ukupni naboj molekule, tj. izoelektrična točka (pI) izoforme transferina, što se može odrediti metodom izoelektričnog fokusiranja. Primjenom navedene metode kod poremećaja N-glikozilacije imamo nalaz abnormalnog razdvajanja izoformi transferina na gelu. Prema položaju vrpci (pI-izoformi) može se razlučiti radi li se o poremećaju u sintezi (skupina CDG-I) ili poremećaju u doradi glikanskog lanca (skupina CDG-II). Naime, kod poremećaja u sintezi glikanskog lanca molekuli transferina nedostaje jedan ili oba lanca pa nastaje asijalo ili disijalotransferin, a smanjuje se tetrasijalo i pentasijalofrakcija (slika 1). Kod poremećaja u doradi glikanskih lanaca dolazi do hiposijalizacije transferina, što se vidi kao porast trisijalo i monosijalofrakcije.[4] Iznimka su pacijenti koji boluju od CDG-IIb, CDG-IIc i CDG-IIf kod kojih se u IEF nađe normalan obrazac pa se kod njih ovom metodom ne mogu dokazati navedeni poremećaji. IEF transferina ne preporučuje se raditi prije navršenih nekoliko tjedana života zbog nezrelosti metaboličkih putova u jetri i prisutnosti normalnih majčinih transferina, što može dovesti do lažno negativnih rezultata. Kod interpretacije pozitivnih nalaza, tj. abnormalnog obrasca IEF, prije pristupanja daljnjoj dijagnostici sindroma CDG, treba isključiti sekundarne uzroke poremećene glikozilacije proteina i polimorfizam proteinskog dijela transferina kao moguće uzročnike lažno pozitivnih nalaza. Bolesti koje sekundarno dovode do poremećaja glikozilacije navedene su u prethodnom odlomku. Polimorfizam proteinskog dijela transferina isključi se tako što se transferin prije izvođenja IEF inkubira s neuroaminidazom, enzimom koji cijepa terminalne sijalinske kiseline s glikanskog lanca. Ako se nakon toga učini IEF, normalno se nađe da se sve izoforme transferina pomiču u područje asijalofrakcije u obliku jedne vrpce, dok se kod nalaza proteinskog polimorfizma nađe razdvajanje na dvije vrpce.

Nakon što smo dobili abnormalni obrazac IEF transferina i isključili moguće uzroke lažno pozitivnih nalaza, daljnja dijagnostička metoda je izoelektrično fokusiranje globulina koji veže tiroksin (kratica TBG; od engl. *thyroxine-binding globulin*) ili nekog drugog N-glikoziliranog proteina plazme kojim će se potvrditi generalizirano poremećena glikozilacija proteina plazme. Ako se utvrdi da bolesnik ima poremećaj tipa CDG-I, vrijedi isključiti bolesti iz ove skupine za koje je dostupna enzimska analiza, a to su CDG-Ia i CDG-Ib, mjerenjem enzimske aktivnosti fosfomanomutaze i fosfomanoza izomeraze u leukocitima ili fibroblastima. Dijagnoza ostalih poremećaja iz skupine CDG-I može se postaviti analizom oligosaharida vezanih za lipid (LLO) metodom tankoslojne ili visokotlačne tekućinske kromatografije. Za dijagnostiku poremećaja iz skupine CDG-II i O-glikozilacije analiziraju se glikanske strukture proteina plazme. Prvo se enzimatskim ili kemijskim metodama cijepaju glikoproteini na proteine i glikane, a nakon toga se visokotlačnom tekućinskom kromatografijom ili spektrometrijom masa odredi tip glikana. Završni dijagnostički korak je otkrivanje mutacija relevantnoga gena.

Izoelektrofokusiranje apolipoproteina C-III je metoda probira za otkrivanje prirođenih poremećaja O-glikozilacije gdje je glikan mucin. Apolipoprotein C-III (apoC-III) jest O-glikozilirani protein plazme koji sadržava O-glikan mucinskog tipa na koji su vezane jedna ili dvije sijalinske kiseline. Prema broju sijalinskih kiselina koji sadržavaju postoje tri različite izoforme apoC-III (apoC-III_0, apoC-III_1 i apoC-III_2). Zbog negativnog naboja sijalinske kiseline i razlike u ukupnome naboju, tri se izoforme mogu razdvojiti metodom IEF. U ljudi su normalno prisutne izoforme apoC-III_1 i apoC-III_2, i to u jednakom omjeru, dok apoC-III_0 čini samo manju frakciju. Poremećaj u sintezi O-glikana rezultirat će promijenjenim omjerom izoformi apoC-III, što se može otkriti metodom IEF.[24] I ovdje treba isključiti polimorfizam proteina i sekundarne poremećaje glikozilacije (hemolitičko-uremični sindrom) kao moguće uzroke lažno pozitivnih nalaza.

»Euroglycanet« – europski projekt istraživanja prirođenih poremećaja glikozilacije

Kako su prirođeni poremećaji glikozilacije u posljednje vrijeme predmet velikog interesa u medicini i glikobiologiji, a broj novootkrivenih bolesti i bolesnika naglo se povećava, znanstvenici i kliničari koji se bave ovim područjem prepoznali su potrebu da se osnuje udruženje putem kojeg će se moći izmjenjivati znanja i iskustva diljem europskog kontinenta. Tako je 1999. godine osnovan Europski projekt za unaprjeđenje istraživanja, dijagnostike i liječenja prirođenih poremećaja glikozilacije koji je nazvan »Euroglycanet«. Projekt je 2000. godine poduprt od Europske komisije. On danas okuplja 29 grupa kliničara i stručnjaka bazičnih znanosti iz 17 europskih zemalja, a koordinator projekta je Katoličko sveučilište Leuven iz Belgije. Osnovni ciljevi ovog projekta su razvijanje metoda za ranu dijagnostiku poremećaja glikozilacije, stvaranje preduvjeta za razmjenu podataka o pacijentima (što bi koristilo za novu klasifikaciju ovih poremećaja, kao i za otkrivanje novih tipova bolesti), poboljšavanje osviještenosti liječnika i pacijenata o prirođenim poremećajima glikozilacije te stvaranje baze podataka o bolesnicima koja bi bila dostupna putem interneta.[25] U svakoj od zemalja članica mreže »Euroglycanet« uspostavili su se referentni laboratoriji unutar nacionalnih centara koji pružaju osnovnu dijagnostiku kojom se može utvrditi postoji li abnormalna glikozilacija serumskih proteina. Daljnja dijagnostička obrada kojom se postavlja dijagnoza bolesti nastavlja se u nekoliko visokospecijaliziranih centara u kojima je moguće učiniti specifičnu enzimsku te drugu bio-

kemijsku i gensku dijagnostiku. Osim navedenoga, mreža osigurava specifičnu edukaciju kliničara i znanstvenika uključenih u ovaj program, kao i kontrolu kvalitete rada nacionalnih centara. Zavod za genetiku i bolesti metabolizma, Klinike za pedijatriju i Laboratorij za dijagnostiku nasljednih i metaboličkih bolesti, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb uključili su se 2004. godine u projekt »Euroglycanet«. U sklopu tog projekta je uvedena metoda izoelektričnog fokusiranja transferina. Dosad je obrađeno više od 200 uzoraka i nije nađen pozitivan slučaj patološkog profila IEF transferina. Uvodi se i test neuraminidazom (za isključenje proteinskih polimorfizama kao mogućih sekundarnih uzroka abnormalnih profila). Svi troškovi vezani za dijagnostiku poremećaja glikozilacije (edukacija i reagencije) pokriveni su iz sredstava projekta. Dodatne informacije o projektu »Euroglycanet« mogu se dobiti na internetskoj stranici www.euroglycanet.org., a o dijagnostičkim mogućnostima i projektu u Hrvatskoj na adresi u bilješci.[#]

Zaključak

Prirođeni poremećaji glikozilacije su multisistemske bolesti sa širokim spektrom simptoma koji u različitim kombinacijama uključuju najčešće mentalnu retardaciju, zaostajanje u psihomotornom razvoju, anomalije središnjega živčanog sustava, dismorfiju, hepatopatiju, enteropatiju, hipoglikemije, koagulopatiju, hormonske poremećaje itd. Ove bolesti teško narušavaju kvalitetu života i značajno skraćuju životni vijek. Pretpostavlja se da dosad opisani bolesnici čine samo mali postotak od ukupnog broja stvarno oboljelih osoba. S obzirom na to da je glikozilacija najsloženiji oblik modifikacije biomolekula i da poremećaj, teoretski, može nastati na bilo kojoj razini, valja pretpostaviti da će se u budućnosti otkriti još mnogo različitih bolesti, vrlo vjerojatno i među već poznatim sindromima i bolestima nerazjašnjene etiologije. Preporuka je da se kod svih bolesnika s nerazjašnjenim multisistemskim simptomima, a pogotovo ako su prisutni simptomi sa strane središnjega živčanog sustava, učini osnovni probir na poremećaje glikozilacije. U Laboratoriju za dijagnostiku nasljednih i metaboličkih bolesti, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb u posljednje dvije godine moguće je učiniti standardne orijentacijske pretrage za otkrivanje većine prirođenih poremećaja N-glikozilacije, a putem mreže »Euroglycanet« omogućeno je potvrđivanje dijagnoze u specijaliziranim inozemnim ustanovama.

LITERATURA

1. *Freeze HH.* Genetic defects in the human glycome. Nat Rev Genet 2006;7:537–51.
2. *Lowe JB, Marth JD.* A genetic approach to mammalian glycan function. Annu Rev Biochem 2003;72:643–91.
3. *Wopereis S, Lefeber D, Morava E, Wevers R.* Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. Clin Chem 2006;52:574–600.
4. *Marquardt T, Denecke J.* Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapy. Eur J Pediatr 2003;162:359–79.
5. *Jerić I, Horvat Š.* Glikokonjugati kao modeli u biomedicinskim istraživanjima. Kem Ind 2004;53,63–70.
6. *Jaeken J.* Congenital disorders of glycosylation (CDG): It's all in it. J Inherit Metab Dis 2003;26:99–118.
7. *Freeze HH, Aebi M.* Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. Curr Opin Struct Biol 2005;15: 490–8.
8. *Alton G, Kjaergaard S, Etchison JR i sur.* Oral ingestion of mannose elevates blood mannose levels: a first step toward a potential therapy for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. Biochem Mol Med 1997;60:127–33.
9. *Marquardt T, Brune T, Luhn K i sur.* Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. J Pediatr 1999; 134:681–8.
10. *Jaeken J. Carchon H.* The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. J Inher Metab Dis 1993;16:813–20.
11. *Zegher F, Jaeken J.* Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. Pediatr Res 2005;37:395–401.
12. *Kjaergaard S.* Congenital disorders of glycosylation type Ia and Ib. Dan Med Bull 2004;51:350–63.
13. *Mayatepek E, Kohlmüller D.* Mannose suplementation in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. Eur J Pediatr 1998;157:605–6.
14. *Kjaergaard S, Kristiansson B, Stibler H i sur.* Failure of short-term mannose therapy of patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. Acta Pediatr 1998;87:884–8.
15. *Jaeken J, Matthijis G, Saudubray JM i sur.* Phosphomannose isomerase deficiency: a carbohydrate deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. J Pediatr 1999;135:379–83.
16. *Niehues R, Hasilik M, Alton G i sur.* Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. J Clin Invest 1998;101:1414–20.
17. *Grünewald S, Imbach T, Huijben K i sur.* Clinical and biochemical characteristics of congenital disorder of glycosylation: CDG-Ic, the first recognized human ER defect in N-glycan synthesis. Ann Neurol 2000; 47:776–81.
18. *Ramaekers VT, Stibler H, Kint J, Jaeken J.* A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome. J Inher Metab Dis 1991;14: 385–8.
19. *Grünewald S, Matthijis G, Jaeken J.* Congenital disorders of glycosilation: A review. Pediatr Res 2002;52:618–24.
20. *Cormand B, Pihko H, Bayes M i sur.* Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. Neurology 2001;56:1059–69.
21. *Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT.* Natural hystory study of hereditary multiple exostoses. Am J Med Genet 1995;55:43–6.
22. *Charlwood J, Clayton P, Keir G i sur.* Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. Glycobiology 1998;8:351–7.
23. *Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M i sur.* Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. Pediatr Res 1996;40:764–6.
24. *Wopereis S, Grünwald S, Morava E i sur.* Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. Clin Chem 2003;49:1893–5.
25. *Matthijs G.* Research network: EUROGLYCANET: a European network focused on congenital disorders of glycosylation. Eur J Hum Genet 2005;13:395–7.

[#] Laboratorij za dijagnostiku nasljednih i metaboličkih bolesti, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, Rebro, 10 000 Zagreb. Osobe za kontakt: dr. sc. Ksenija Fumić, e-mail: ksenija.fumic@zg.htnet.hr; tel. 2388545; ing. Karmen Bilić, e-mail: kbilic@kbc-zagreb.hr; tel. 2388706.