

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Bioquímica Clínica
Servei de Bioquímica i Genètica Molecular
Hospital Clínic, Barcelona

**Estudis bioquímics i genètics en dos grups de malalties
metabòliques hereditàries que cursen amb
malformacions cerebrals:**

**DEFECTES CONGÈNITS DE LA GLICOSILACIÓ
i
DEFICIÈNCIES DE PIRUVAT DESHIDROGENASA**

Ester Quintana Camps
TESI DOCTORAL
Barcelona, 2009

Programa de Doctorat de Bioquímica Clínica i Biologia Molecular,
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Memòria per optar al grau de
Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

Presentada per:

ESTER QUINTANA CAMPS

Vist i plau:

Dra. Paz Briones Godino
Directora de la tesi

Dra. Antonia Ribes Rubió
Directora de la tesi

Dr. Francesc González-Sastre
Tutor de la tesi

Ester Quintana Camps
Interessada

Barcelona, Setembre 2009

Als meus pares, Joan i Maria,

a l'Imma,

a en Gerard

Agraïments

Ara ha fet just quatre anys que vaig entrar per primera vegada al despatx de la Paz Briones, portada de la mà de la M^a Josep Coll, dient-me que buscaven algú per un projecte, que segur que aprendria moltes coses.... i en tots aquests quatre anys ja ho crec que n'he après de coses!!!

És complicat resumir totes les ajudes que s'han rebut sense deixar-se a ningú. Per això, primer de tot, demano perdó si m'oblido d'algú que m'hagi ajudat durant aquests anys.

Muchisísimas gracias Paz, por todo lo que hemos compartido, que no ha sido poco. Sobre todo gracias por tus conocimientos, por tu confianza, por tu buen humor, por tu forma de razonar las cosas cuando el resultado no era el esperado, por tu modo de afrontar los problemas, por tu amistad,... Contigo he aprendido mucho de ciencia y mucho de la vida.

També vull agrair a l'Antònia Ribes la seva confiança i el fet de comptar amb mi durant tot aquest temps. Alguns articles són una mica culpa teva, gràcies per la teva insistència a l'hora de donar valor al treball fet, al final l'article va sortir!!

Y ahora le toca al navarro, muchas gracias Rafa Artuch por acordarte siempre de mi, me he sentido muy cuidada, me has regalado muchas oportunidades, y además siempre acompañadas de buen humor.

Sonia, te has perdido mi última etapa estresada por el IBC. Nos lo hemos pasado bien en nuestro lado de poyata. Estoy segura que a partir de ahora siempre controlaré que la balanza no se quede sucia. Te agradezco mucho la confianza que has depositado en mi y lo mucho que me has enseñado.

I a la M^a Antònia, sempre disposada a animar i col·laborar, entre tots fèieu que a Sant Joan de Déu també em trobés com a casa. També a la Raquel, l'Aida, la Belèn, el Joan,.. entre tots feu un bon grup.

Laura Gort, ens trobarem a faltar. Moltes gràcies per tots els teus consells, per l'empenta que has donat als articles, i per la teva manera, sempre amable, d'ensenyar i d'escoltar. Què faré ara sense les teves fotos per animar el fons de la pantalla??

M^a Josep, ets en part la culpable que ara estigui aquí, si no m'ho haguessis proposat tu potser no ho hauria buscat mai, i estic molt contenta d'haver tastat una mica de ciència. Vull agrair també a la Marisa Giròs, Montse Lluch, Teresa

Pàmpols, José M^a Hernández, Amparo Chabás i José Luís Marín, que després de tants anys a tots us ha tocat aguantar les meves preguntes, dubtes, problemes.. i sempre hi heu estat ben disposats.

Alejitu!! Déu ni do si n'hem fet de coses junts!! Com trobaré a faltar allò que tant et caracteritza, les teves imitacions!!! Moltes gràcies per la teva paciència (que no ha sigut poca), pels teus consells de Jedi (als quals feia més cas del que et penses), per la teva disponibilitat (sempre i quan no fos l'hora de marxar o de dinar) i pel teu caràcter, que fa sempre les coses més fàcils. Ah, i felicitar a la Mercè, que sense la seva crítica la portada no hagués estat el mateix.

Judit M. (Molecular), segur que hi haurà alguna calçotada o excusa per trobar-nos i explicar-nos les batalletes... Amb tu no han sigut 4, sinó més aviat 5 anys! Ha passat volant! Molta sort, que ara comences tu!!

Y por último Ángela y Judit, para terminar nuestro grupo de doctorcitos. Cuantas charlas, como nos hemos reído, y cuantas penas compartidas.

I a les noves generacions, Gemma, Nuri (la nova chica Briones, cuida'm a la jefa, eh), Laura Ozaez, Aida i Frederic, amb aquestes converses tant emocionants a l'hora de dinar.

Cristina, la nueva reina de las CDGs! Nos hemos entendido y nos lo hemos pasado bien. Gracias por escucharme.

I a tot l'equip de l'IBC: Lotti, Patri, Lali, Quim, Marta, Ana, Helena, Josep, Lina, tots els de precoç, Eulàlia, l'Ana la secre... entre tots m'heu ensenyat molt.

A tot el grup de cito: Aurora Sánchez, Anna Soler, Núria Cluselles, Carme, Irene, Emma, Edu, Marian, Marc, Sabine... finalment s'ha acabat recollir líquids amniòtics!! Moltes gràcies per tot el que he après amb vosaltres i perdoneu per la feina de més que un he donat!

I també al grup d'alcoholisme de l'Hospital Clínic, que ens van cedir mostres quan les vam necessitar.

Al grupo del CEDEM de Madrid, Célia Pérez-Cerdá, Belén Pérez, Ana Vega, Pedro. Ha sido muy agradable y enriquecedor colaborar con vosotros, además de pasar buenos ratos cuando nos encontrábamos en los congresos.

I would specially like to thank the Euroglycanet group for their nice collaboration, for all the things that I have learned during these years and for their help with

some pitfalls. Specially, I must mention Prof Jaak Jaeken, Gert Matthijs, Hubert Carchon, Luisa Sturiale, Rita Barone, Ron Wevers and Dirk Lefeber.

I do also appreciate the collaboration and the critical revisions of Dr Lissens and Dr Sperl.

I per últim a tots els metges, pacients i famílies que ens han enviat les mostres, perquè sense ells aquest treball no tindria el mateix sentit...

I deixant de banda la ciència, vull dedicar unes línies a les meves amigues: Anna, Eva, Irene, Marina, Mònica, Olga i Raquel, pels ànims, i per l'intent d'entendre en què consisteixen els CDG i la PDH, encara que amb un got de vi sempre s'entén tot millor!

També a les farmacèutiques i als bioquímics, per les històries compartides, pels dinars ràpids del migdia i per l'interès que heu mostrat pel meu treball.

En especial aquesta tesi la dedico als meus pares, pel recolzament incondicional que m'han donat en tot moment i per cuidar-me, estimar-me i ajudar-me sempre. També a l'Imma, la meva germana, sempre pendent de com em van les coses i sempre disposada a ajudar i escoltar.

També a tota la família: tiets, tietes, cosins, cosines, cosinets petits... gràcies pel vostre interès i pels vostres ànims.

I com no, a en Gerard, per la paciència que ha tingut amb mi, sobretot durant aquesta última i estressant etapa de la tesi. Pels ànims, per la confiança que té sempre en mi, per cuidar-me i estar sempre al meu costat.

I en general, moltes gràcies a tots!!!

ÍNDIX:

1.	INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1.	GLICOSILACIÓ	3
1.1.1.	Defectes Congènits de la Glicosilació (CDG)	6
	Defectes de la N-glicosilació	6
	Defectes de la O-glicosilació	9
1.1.2.	Diagnòstic dels CDG	15
	Cribratge	15
	Diagnòstic	16
	Altres estudis	18
1.1.3.	Tractament dels CDG	18
1.2.	COMPLEX PIRUVAT DESHIDROGENASA (PDHc)	20
1.2.1.	Deficiències de PDHc	23
	Deficiència de PDH-E1 α	23
	Deficiències de PDH-E1 β	26
	Deficiències de PDH-E2	26
	Deficiències de PDH-E3	27
	Deficiències de E3BP (PDH-X)	27
	Deficiències de piruvat deshidrogenasa fosfatasa	28
1.2.2.	Diagnòstic de les deficiències de PDHc	28
1.2.3.	Tractament de les deficiències de PDHc	29
2.	OBJECTIUS	31
3.	MATERIAL I MÈTODES	33
3.1.	Determinació d'isoformes de sialotransferrina per IEF mitjançant la visualització de bandes en gel d'agarosa	33
3.2.	Determinació d'isoformes de sialotransferrines mitjançant separació per HPLC i detecció amb espectrofotòmetre UV/Vis	35
3.3.	Determinació d'isoformes de sialotransferrina mitjançant CZE	37
3.4.	Tractament de sèrum amb neuraminidasa per la detecció de polimorfismes	39
3.5.	Determinació d'isoformes d'ApoC-III per separació mitjançant IEF i immunoblot	40
3.6.	Anàlisi d'oligosacàrids en orina per cromatografia en capa fina (TLC), seguit d'extracció i identificació de la seva composició	42
3.7.	Determinació de fructosa en sèrum	45

3.8.	Immunoblot de les subunitats de PDHc	47
3.9.	Extracció de DNA	50
3.10.	Extracció de RNA i obtenció de cDNA	52
3.11.	Cerca de mutacions en el gen <i>PMM2</i> mitjançant real-time PCR	54
3.12.	Cerca de mutacions en el gen <i>PMM2</i> mitjançant PCR convencional, SSCP i seqüenciació	57
3.13.	Cerca de mutacions en el gen <i>PDHA1</i> en DNA genòmic	62
3.14.	Cerca de mutacions en els gens de les diferent subunitats de PDHc: <i>PDHA1</i> (PDH-E1 α), <i>PDHB</i> (PDH-E1 β), <i>DLAT</i> (PDH-E2), <i>DLG</i> (PDH-E3) i <i>PDHX</i> (E3BP)	65
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	69
4.1.	<i>MILLORA DE LES TÈCNiques DE CRIBRATGE PELS DEFECTES CONGÈNITS DE LA GLICOSILACIÓ</i>	69
4.1.1.	Substitució dels gels d'acrilamida per gels d'agarosa	69
4.1.2.	Millora de l'objectivitat de la metodologia de cribratge introduint dues tècniques semi-quantitatives: HPLC i CZE	72
4.2.	<i>AMPLIACIÓ DE LA METODOLOGIA PER L'ESTUDI DE PACIENTS AMB PATRÓ DE SIALOTRANSFERRINA TIPUS 2</i>	93
4.2.1.	Posada al punt de la detecció d'isoformes de apolipoproteïna C-III (apoC-III) per IEF	93
4.2.2.	Estudi d'oligosacàrids en orina i identificació de la seva composició	97
4.3.	<i>CRIBRATGE I ESTUDI DE PACIENTS</i>	101
4.3.1.	Pacients afectes de Defectes Congènits de la Glicosilació	109
4.3.2.	Casos que presenten un patró de sialotransferrina alterat degut a causes secundàries	115
	Alteració de Tf-IEF degut a meningitis pneumococcica	115
	Alteració de Tf-IEF degut a alteracions en el metabolisme de la fructosa (HFI i deficiència de F-1,6-bifosfatasa)	117
	Alteració de Tf-IEF degut a un polimorfisme de la transferrina poc freqüent	127
4.4.	<i>CERCA DE CDG EN FETUS AMB MALFORMACIONS ECOGRÀFIQUES SEVERES i AVORTAMENTS ESPONTANIS</i>	129
4.4.1.	Anàlisi de les isoformes de la transferrina en líquid amniòtic o sèrum fetal	130
4.4.2.	Estudi molecular del gen <i>PMM2</i>	133

4.5.	<i>ESTUDI MOLECULAR DE LES DEFICIÈNCIES DE PDHc</i>	141
4.5.1.	Estudi mutacional del gen <i>PDHA1</i>	143
4.5.2.	Deficiència de <i>PDHB</i>	167
4.5.3.	Deficiència de <i>DLD</i> (PDH-E3)	183
4.5.4.	Polimorfismes	186
4.5.5.	Altres estudis	187
5.	CONCLUSIONS	189
6.	BIBLIOGRAFIA	191
7.	ANNEX	
7.1.	<i>Annex 1: Secondary alterations of the transferrin-IEF pattern in a case of bacterial meningitis</i>	203
7.2.	<i>Annex 2: FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes</i>	209

ÍNDIX DE FIGURES:

Fig. 1	Esquema de la via de la glicosilació	4
Fig. 2	Correlació entre les estructures de glicans i bandes d'IEF	16
Fig. 3	Algoritme pel diagnòstic dels CDG	17
Fig. 4	Via metabòlica i acció de la manosa en les deficiències de <i>PMI</i> (CDG=Ib)	19
Fig. 5	Esquema de la via del metabolisme energètic	20
Fig. 6	Esquema de la reacció que du a terme el complex PDH	21
Fig. 7	Esquema del complex PDH	22
Fig. 8	Diferent efecte de les mutacions en mascles i femelles	24
Fig. 9	Esquema del gen <i>PDHA1</i>	25
Fig. 10	Esquema de l'estructura per la construcció d'un gel d'agarosa	34
Fig. 11	Esquema de la transferència de les isoformes d'apoC-III	41
Fig. 12	Revelat d'una cromatografia en capa fina	43
Fig. 13	Reacció utilitzada per la valoració de fructosa en plasma	45
Fig. 14	Mètode utilitzat per l'anàlisi de corbes de <i>melting</i>	55
Fig. 15	Esquema de programa de la corba de <i>melting</i>	56
Fig. 16	Resultat de l'anàlisi de corbes de <i>melting</i>	56
Fig. 17	Single Strand Conformation Polymorphism	60
Fig. 18	Transferrina glicosilada	69
Fig. 19	Diferents patrons obtinguts d'IEF	70
Fig. 20	Comparació entre gels d'acrilamida i gels d'agarosa	70
Fig. 21	Irregularitat en la tinció de les bandes	71
Fig. 22	ApoC-III glicosilada	93
Fig. 23	Detecció d'isoformes d'apoC-III amb els diferents <i>kits</i> de revelat	94
Fig. 24	Diferents patrons d'apoC-III de controls i pacients	95
Fig. 25	Cromatografia en capa fina per la detecció d'oligosacàrids en orina	97
Fig. 26	Espectre de lactosa obtingut amb HPLC-MS/MS	98
Fig. 27	Cromatograma de la lactosa obtingut per GC-MS	99

Fig. 28	Diferents patrons de sialotransferrines detectats per HPLC, IEF i CZE	102
Fig. 29	Patró de Tf-HPLC en un pacient CDG-Ib abans i després del tractament	103
Fig. 30	Patró de Tf-HPLC en un pacient galactosèmic	104
Fig. 31	Patró de Tf-HPLC en un pacient efecte de HFI i cromatograma de la detecció de fructosa	104
Fig. 32	Perfil de Tf-HPLC pel control de dieta en pacients efectes de HFI	105
Fig. 33	Patrons alterats d'isoformes d'apoC-III	106
Fig. 34	Patró de Tf-IEF i apoC-III d'un pacient amb cutis laxa	108
Fig. 35	TLC dels pacients que presenten oligosacàrids anòmals en orina	108
Fig. 36	Patró de Tf-IEF i apoC-III-IEF d'un pacient amb sepsis	115
Fig. 37	Tf-IEF dels pacients portadors del polimorfisme CD _{4,5} tractats amb neuraminidasa	128
Fig. 38	Tf-HPLC de diferents mostres de líquid amniòtic i sèrums fetals	131
Fig. 39	Distribució en el gen <i>PMM2</i> de les mutacions descrites	133
Fig. 40	Esquema de l'anàlisi de corbes de <i>melting</i>	134
Fig. 41	Comparació de les corbes de <i>melting</i> entre pacients i controls	135
Fig. 42	Comparació de les corbes de <i>melting</i> per cada mutació amb un control	136
Fig. 43	Corba de <i>melting</i> d'una mostra que difereix dels controls	137
Fig. 44	Patró de SSCP de les diferents mutacions detectades en <i>PMM2</i>	138
Fig. 45	Patró de SSCP dels pacients portadors del canvi c.179-22dupT	139
Fig. 46	Seqüència on s'observa la duplicació de la T present en els pacients portadors del canvi c.179-22dupT	139
Fig. 47	Esquema de la selecció de pacients i de l'estudi mutacional del gen <i>PDHAI</i>	143
Fig. 48	Esquema del gen <i>DLD</i> i localització de les mutacions descrites	184

ÍNDIX DE TAULES:

Taula 1a	Defectes Congènits de la N-Glicosilació tipus I	10
Taula 1b	Defectes Congènits de la N-Glicosilació tipus II	11
Taula 2a-c	Defectes Congènits de la O-glicosilació	12-14
Taula 3	Contingut de cada cubeta en la determinació de fructosa en plasma	46
Taula 4	Encebadors utilitzats amb l'amplificació dels exons del gen <i>PDHAI</i>	63
Taula 5	Resum de les condicions de PCR per l'amplificació dels exons del gen <i>PDHAI</i>	63-64
Taula 6	Descripció dels programes de PCR	64
Taula 7	Encebadors utilitzats per l'amplificació dels diferents gens de PDHc	66
Taula 8	Resum de les condicions de PCR per l'amplificació dels diferents gens de PDHc	67
Taula 9	Descripció dels programes de PCR	68
Taula 10	Valors de la quantificació de transferrina per densitometria, controls i pacients	71
Taula 11	Valors de la quantificació d'apoC-III per densitometria, controls i pacients	95
Taula 12	Resultats del cribratge per CDG	102
Taula 13	Resultats de l'estudi d'isoformes d'apoC-III	106
Taula 14	Resultats de l'estudi de glicans dels pacients CDG-IIx	107
Taula 15a-c	Resum dels pacients diagnosticats de CDG	112-114
Taula 16	Valors de Tf-HPLC en líquids amniòtics i sèrums fetals	130
Taula 17	Resum de l'estudi mutacional dels gens de PDHc	142

ABREVIATURES:

ALDOB	Aldolasa B
ApoC-III	Apolipoproteïna C-III
APS	Persulfat d'amoni
ASF/ SF2	Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2
AUC	Àrea sota la corba (Area Under Curve)
BSTFA	Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CZE	Electroforesis capil·lar (Capillary Zone Electrophoresis)
CDG	Defectes congènits de la glicosilació (Congenital Disorders of Glycosylation)
CDT	Transferrina deficient de carbohidrats (Carbohydrate-Deficient Transferrin)
COG	Complex Oligomèric de Golgi
CT-Scan	Tomografia computaritzada (Computed Tomography Scanning)
DLAT	Dihidrolipoamida acetiltransferasa
DLD	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
DMSO	Dimetil sulfòxid
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
FBP1	Fructosa 1,6-bisfosfatasa 1
FeNTA	Nitrilacetat de ferro
GC-MS	Cromatografia de gasos – espectrometria de massa
HCl	Àcid clorhídric
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-MS/MS	High performance liquid chromatography – espectrometria de massa en tàndem
HFI	Intolerància hereditària a la fructosa (Hereditary Fructose Intolerante)
IEF	Isoelectro enfoc
IgG	Immunoglobulina G
LA	Líquid amniòtic
LB	Tampó de càrrega (Loading Buffer)
LBF	Tampó de càrrega amb formamida (Loading Buffer Formamide)
LLO	Oligosacàrid unit al lípid (Lipid Linked Oligosaccharide)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MRI	Imatge de ressonància magnètica (Magnetic Resonance Imaging)
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleòtid
PBS	Tampó fosfat salí (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PDHc	Complex Piruvat Deshidrogenasa
PMI	Fosfomanosa Isomerasa

PMM	Fosfomanomutasa
P1	1- ¹⁴ C-piruvat
P2	2- ¹⁴ C-piruvat
SDS	Dodecil sulfat sódic o lauril sulfat sódic
SNP	Polimorfisme d'un sol nucleòtid (Single Nucleotide Polymorphism)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
Tf	Transferrina
TLC	Cromatografia en capa fina (Thin Layer Chromatography)
Tm	Temperatura de fusió (<i>melting</i>)
UV/Vis	Ultraviolat / visible

1. INTRODUCCIÓ

Els defectes congènits de la glicosilació (CDG) són un grup de malalties que afecten a la síntesis o al processament del glicans units a glicoproteïnes o glicolípidis. La presentació clínica que es considera clàssica consisteix en: retard psicomotor, hipotonia, convulsions, anormalitats oftalmològiques, signes neuronals, microcefalia, problemes de desenvolupament, endocrins i de coagulació, i fàcies anòmales, mamel·les invertides i acúmuls anormals de greix subcutanis. Però, a mesura que s'han anat descrivint més pacients, s'ha observat que la presentació clínica pot variar des de *exitus* neonatal amb severes malformacions fins a casos asimptomàtics, passant per tots els esglaons de severitat possibles (*Jaeken i col 2001; Grünwald 2007*).

El complex piruvat deshidrogenasa és responsable de la conversió de piruvat en acetil-coenzim A (acetil-CoA) permetent així l'entrada dels carbohidrats al cicle de Krebs. El sistema nerviós central és altament dependent de glucosa i el complex PDH és l'enzim limitant d'aquesta via energètica; això fa que lleus deficiències en la seva activitat puguin tenir significat patològic. El complex PDH està format pels components: PDH-E1 (heterotetràmer $\alpha_2\beta_2$), PDH-E2, PDH-E3 i E3BP; a més a més és un complex altament regulat, que s'inactiva mitjançant fosforilació per l'acció de l'enzim PDH kinasa (4 isoenzims), i s'activa per l'acció desfosforilant de la PDH fosfatasa (2 isoenzims). Les primeres caracteritzacions clíniques descrivien pacients que en l'etapa neonatal o en la primera infància presentaven una acidosis làctica severa, habitualment fatal. Descripcions posteriors mostren diferents graus de severitat clínica que inclou atàxies, síndrome de Leigh, o també malalties neurodegeneratives i anormalitats del desenvolupament (*Robinson 2001, Brown 1992, Patel 1995*).

Tant els CDG com els defectes de PDH alteren vies molt importants pel correcte funcionament de l'organisme, això fa que deficiències molt parcials tinguin conseqüències patològiques. En aquestes formes menys severes, les manifestacions clíniques de les deficiències de glicosilació i de piruvat deshidrogenasa es superposen dificultant així la correcta orientació del diagnòstic.

L'objectiu d'aquest treball ha estat millorar i implementar metodologies, tant bioquímiques com genètiques, per l'estudi d'aquests dos grups de malalties, i així poder descartar o confirmar aquests defectes, i per tant agilitzar el diagnòstic dels pacients. Per una banda hem intentat facilitar el cribratge dels defectes congènits de la glicosilació i avançar més en el seu diagnòstic, i per l'altre ampliar i aprofundir en l'estudi genètic de les deficiències de piruvat deshidrogenasa.

1.1. GLICOSILACIÓ

La glicosilació consisteix en l'addició enzimàtica de carbohidrats a proteïnes o lípids. Segons la base de dades SwissProt (www.expasy.org), més de la meitat de les proteïnes de l'organisme estan glicosilades (Apweiler i col 1999). Aquests oligosacàrids que s'uneixen a la proteïna tenen la funció de modular la seva estabilitat, la conformació i també participen en l'adhesió, migració i diferenciació, i en conjunt afecten al desenvolupament cel·lular (Varki 1993, Helenius i Aebi 2004; Hatliwanger i Lowe 2004). La majoria de proteïnes secretades, de superfície cel·lular i de matriu extracel·lular estan glicosilades.

La unió d'aquests glicans a la proteïna es fa mitjançant un grup amino de determinades asparagines en el cas de la N-glicosilació, o a través d'un grup hidroxil de treonina, serina o hidroxilisina quan es tracta de O-glicosilació.

La major part dels defectes congènits de la glicosilació (CDG – Congenital Disorders of Glycosylation) coneguts fins al moment en humans són defectes de la N-glicosilació, tot i que cada vegada es descriuen més defectes associats a la O-glicosilació, o que afecten per igual a la N i a la O-glicosilació, i també defectes dels glicolípid.

N-glicosilació:

La via de la N-glicosilació és una via metabòlica molt conservada en eucariotes (Freeze i col 2005). Compromet tres compartiments cel·lulars (Jaeken i col 2003; Marquard i Denecke 2003):

I. Citosol: en ell es sintetitzen els diversos donadors de monosacàrids (nucleòtid-sucres), i també s'uneixen 2 N-acetilglucosamines i 5 manoses a un dolicol-fosfat ancorat a la membrana del reticle endoplasmàtic (RE). Un cop obtinguda aquesta estructura serà translocada al lúmen del RE mitjançant l'acció d'una flipasa (Helenius i col 2002).

II. Reticle endoplasmàtic (RE): Un cop l'estructura de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ es troba dins el lúmen del RE es continuen unint manoses i glucoses, que són donades per dolicol-sucres ancorats a la membrana, mitjançant l'acció de múltiples glucosiltransferases (Burda i col 1999) fins a obtenir l'oligosacàrid estàndard o glicà precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, que ja podrà ser transferit a la proteïna mitjançant l'acció del complex enzimàtic oligosacàril transferasa (OTasa). Aquest complex enzimàtic presenta gran especificitat per l'estructura correctament formada, i per tant només transferirà el glicà precursor del PP-Dol a la proteïna quan aquell estigui complet. Encara en reticle endoplasmàtic, l'estructura de glicans unida a la proteïna començarà a ser modificada perdent la primera glucosa, per l'acció d'una glucosidasa (α -glucosidasa I).

III. Aparell de Golgi: L'estructura $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Prot}$ passa a l'aparell de Golgi on continua essent modificada per l'acció de varies glucosidases, manosidases i glucosiltransferases fins a obtenir l'estructura final: $\text{Sia}_2\text{Gal}_2\text{GalNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; alguns d'aquests glicans es poden fucosilar (*Hirschberg i col 1998*) en la primera GlcNAc. Els sucres activats (nucleotid-sucres) requereixen transportadors de membrana específics per entrar a l'Aparell de Golgi. En els darrers anys s'ha demostrat la gran importància que té el manteniment de la integritat de Golgi, ja que s'han descrit nous defectes de la glicosilació relacionats amb la pèrdua d'aquesta integritat: defectes del complex oligomèric conservat de Golgi (COG) (*Wu i col 2004; Spaapen i col 2005; Foulquier i col 2006; Foulquier i col 2007*) i defectes en ATPases (*Kornak i col 2008*).

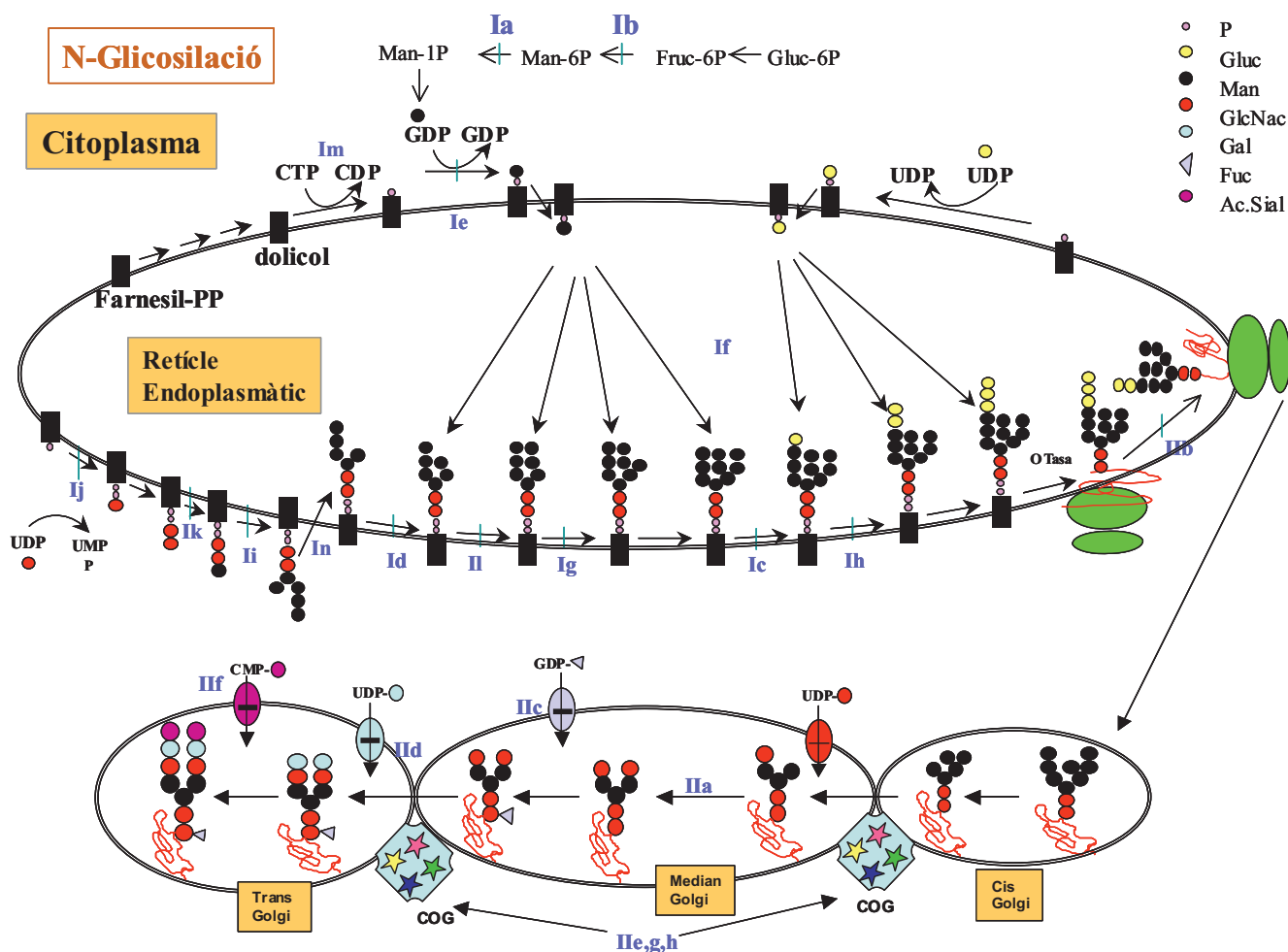


Figura 1. Esquema del procés de glicosilació. En blau s'indiquen els defectes descrits fins al moment amb la nomenclatura establerta el 1999.

O-glicosilació:

A diferència de les estructures de N-glicosilació, la O-glicosilació no presenta un únic model i un únic procés. Actualment es coneixen 7 tipus diferents de estructures O-glicosilades, que es classifiquen segons el primer sucre unit a serina/treonina (*Wopereis i col 2006*). Segons això trobem:

- Mucin type
- GAG
- O-galactosilades
- O-N-acetil-glucosaminades
- O-manosilades
- O-glucosilades
- O-fucosilades

Mucin type

Aquest grup es caracteritza pel fet que el sucre unit a la proteïna és N-acetil-galactosamina. Dins aquest grup es troba una gran varietat d'estructures finals. En són un exemple d'aquest grup les proteïnes que determinen el grup sanguini (A i B)

Glicosaminoglicans (GAG)

Es caracteritzen per utilitzar xilosa en la seva unió a la proteïna. Junt amb el mucin type són els dos tipus de O-glicosilació que resulten en varies estructures finals de glicans. Els trobem en els proteoglicans

O-galactosilades

En aquest grup es troba la cadena de glicosilació unida a lisina mitjançant un residu de galactosa. Aquesta estructura la trobem en col·lagen.

O-N-Acetil-glucosaminades

En aquests casos es tracta de l'addició única i reversible d'una GlcNAc, actuant com una modificació posttraduccional anàloga a una fosforilació. Els enzims responsables d'aquesta procés són: O-GlcNAc transferasa i O-GlcNAcasa.

O-manosilades

El carbohidrat que s'uneix directament a la proteïna és una manosa. És l'estructura O-glicosilada menys comú en humans, que es troba en la proteïna α -dístroglicà.

O-glucosilades

La seva estructura consisteix en un residu de glucosa unit a la proteïna a través de serina. Es troba en els factors de coagulació VII i IX.

O-fucosilades

En les proteïnes O-fucosilades, l'addició dels carbohidrats es fa mitjançant un residu de fucosa. Igual que en el cas de la O-glucosilades, es trobem en els factors de coagulació VII i XII.

1.1.1. Defectes Congènits de la Glicosilació de proteïnes (CDG)

Els CDG són un grup de malalties hereditàries causades per defectes en algun dels molts passos de les vies de la glicosilació. Degut al gran nombre de proteïnes glicosilades i a la importància dels processos on participa, la hipoglicosilació es manifesta amb afectació multisistèmica i alta heterogeneïtat clínica.

El 1980, el professor Jaeken i col·laboradors (*Jaeken i col 1980*) van descriure els primers pacients amb una estranya combinació de desordres en diferents glicoproteïnes circulants, i van arribar a la conclusió que el defecte primari es trobava en els glicans i no en les proteïnes. Així es va descriure el primer defecte de la glicosilació, i des del moment de la seva publicació el nombre de defectes ha anat creixent contínuament.

Defectes de la N-glicosilació.

Tradicionalment, els defectes de la N-glicosilació s'han dividit en dos grups en funció de la localització de l'enzim alterat (*Jaeken 2003*):

CDG-I El defecte es troba en qualsevol dels passos de la síntesis i transferència a la proteïna de l'oligosacàrid lligat a dolicol (LLO – Lipid Linked Oligosaccharide). Com a conseqüència es produeix una hipoglicosilació.

CDG-II El defecte es troba en el processament que es dona després de la unió de l'oligosacàrid a la proteïna i fins a finalitzar l'estructura completa, resultant en una glicosilació anòmala.

En la figura 1 està esquematitzat el punt d'alteració de cadascun dels diferents defectes.

El 1999 es va introduir la classificació dels CDG en base al patró de transferrina obtingut per isoelectroenfoc (IEF) (CDG-I i CDG-II) i dins de cada subtipus es classificaven alfabèticament per ordre de la seva descripció (CDG-Ia, Ib, Ic...) (*Aebi i col 1999*). Actualment, degut a que el nombre de CDG ha incrementat molt en els últims anys i s'espera que encara continuï creixent, s'ha considerat que aquesta nomenclatura està obsoleta ja que no dona cap informació sobre el gen o l'enzim afectat i a més a més els defectes de O-glicosilació o de glicolípid no estan representats dins aquesta classificació. És per això que

s'ha proposat una nova nomenclatura que consta del nom del gen deficient seguit de les sigles CDG, p. ex. deficiència de *PMM2*-CDG (*Jaeken i col 2008*)

Defectes Congènits de la Glicosilació tipus I (CDG-I)

Els defectes de glicosilació de tipus I són deguts a una incorrecta síntesis dels LLO i, com a conseqüència, el glicà precursor defectuós no serà reconegut per la oligosacaridil transferasa (OTasa) i no serà transferit a la proteïna. Recentment s'ha descrit un nou defecte de tipus I localitzat en la OTasa, en aquest cas el glicà es sintetitza correctament però igualment no es transfereix a la proteïna (*Molinari i col 2008, Garshasbi i col 2008*). La formació del LLO en reticle endoplasmàtic depèn de molts enzims, i per tal de conèixer quin d'ells és el defectuós, s'analitzen per HPLC les estructures errònies acumulades en fibroblasts mitjançant la incubació amb manosa radioactiva; això permet reconèixer quin és el pas truncat i per tant l'enzim defectuós.

Així doncs, en tots els defectes de tipus I, es dona una hipoglicosilació de les glicoproteïnes (*Wada i col 1992*); però malgrat tenir les mateixes conseqüències bioquímiques, la presentació clínica no és la mateixa en tots els tipus. S'ha comprovat que com més a l'inici de la construcció del LLO es troba el defecte, l'afectació clínica és més severa. Això podria ser degut al fet que la OTasa podria acceptar parcialment com a correctes estructures molt semblants a la que ha de transferir a la proteïna, en canvi, un estructura molt allunyada de la correcta no seria mai transferida (*Eklund i Freeze 2006*).

Cada subtipus de CDG-I presenta una clínica més o menys diferenciada de les altres, però dins un mateix subtipus de CDG-I també es troba variabilitat clínica. Possiblement les diferències de fenotip estan relacionades amb el grau d'activitat residual de la proteïna alterada; es creu que una falta total d'activitat és incompatible amb la vida (*Jaeken i col 2001; Schollen i col 2004*)

Per tant els CDG es presenten amb una gran variabilitat de símptomes que fa difícil classificar un defecte concret de glicosilació sense un estudi bioquímic que permeti localitzar on està situat el defecte enzimàtic.

Deficiència de *PMM2*-CDG (CDG-Ia). Deficiència de fosfomanomutasa

És el més comú dels defectes congènits de la glicosilació. Es coneixen més de 700 casos arreu del món (*Grünewald 2007*). Els CDG-Ia estan causats per la deficiència d'activitat de l'enzim fosfomanomutasa (*PMM2*) (*Van Schaftingen i col 1995*), localitzat en el citosòl, que transforma la manosa-6-fosfat en manosa-1-fosfat. Degut a la deficiència, no es produeix prou GDP-manosa i per tant tampoc prou dolicol fosfat manosa (Dol-P-Man), que és el donador de

manosa, per tal d'obtenir el LLO correcte .

Les primeres pacients (dues germanes bessones) diagnosticades de CDG-Ia presentaven mamil·les invertides, acúmuls anòmals de grassa subcutanis, retard psicomotor, atàxia deguda a hipoplàsia cerebelar, retinitis pigmentosa i estatura baixa (*Jaeken i col 1980*). Aquests símptomes, juntament amb alteracions hormonals i de la coagulació, hepatopatia i facies anòmales, es consideren encara la presentació "clàssica" de la CDG-Ia (*Miossec-Chauvet i col 2003*). Però avui en dia se sap que es pot trobar un ampli ventall de símptomes, des de retard psicomotor profund, convulsions intractables i greus dismorfies en pacients severament afectats, fins a retard mental lleu, problemes gastrointestinals, hipoglucèmies o hipertròfia del miocardi en pacients amb clínica més lleu. Fins i tot en el decurs d'un estudi familiar es va trobar un individu amb deficiència de *PMM2-CDG* però completament asimptomàtic (*Dupre i col 2005*).

La proteïna *PMM2* està codificada pel gen *PMM2*, que es troba localitzat en 16p13. La mutació més comú és p.R141H que mai s'ha trobat en homozigosi. Aquesta falta d'homozigots s'explica pel fet que l'activitat residual deguda a aquesta mutació és pràcticament zero, indicant que la manca total d'activitat *PMM2* és incompatible amb la vida (*Jaeken i col 2001; Schollen i col 2004*).

El més habitual és aconseguir el diagnòstic en el període neonatal o en la primera etapa de la infància, on ja es manifesten les característiques clíniques típiques. La mortalitat infantil es presenta aproximadament en el 20% dels casos (*Matthijs i col 2000*). Però també es realitzen diagnòstics de casos més lleus en l'edat adulta, on el pacient acostuma a presentar atàxies, retard mental no progressiu i neuropatia perifèrica.

La resta de CDG-I tenen, en general, un fenotip caracteritzat per hipotonia muscular, anomalies dels sistema nerviós, retard del creixement, problemes de coagulació i hepatopatia, excepte els CDG-Ib i Ih que es manifesten amb alteracions hepato-intestinals, coagulopatia, enteropatia amb pèrdua proteica i, clàssicament, sense alteracions neurològiques. Tots aquest tipus de CDG estan representats per un baix nombre de pacients, excepte els CDG-Ib i Ic amb uns 40 casos descrits.

Defectes Congènits de la Glicosilació tipus II (CDG-II)

Els defectes de glicosilació de tipus II són deguts a un incorrecte processament del glicà un cop està unit a la proteïna. Es coneixen defectes en transportadors de sucres activats (nucleotid-sucres) dins de l'aparell de Golgi, en transferases, en enzims catalítics, i més recentment en proteïnes que contribueixen a l'estabilitat de l'aparell de Golgi (diferents subunitats de COG i V-ATPasa). No s'ha descrit un nombre significatiu de pacients en cap

dels subtipus de CDG-II, la qual cosa fa difícil establir unes característiques clíniques específiques.

Resten molts pacients classificats com a CDG-IIx, cosa que suggereix un ampli espectre de defectes no descrits fins al moment.

La taula 1 resumeix tots els defectes tipus I i II de la N-glicosilació coneguts fins al moment. Aquests defectes es troben també identificats en la figura 1.

Defectes de la O-glicosilació:

Els processos de O-glicosilació són molt complexos, amb un gran nombre de gens implicats. A diferència de les deficiències de la N-glicosilació, els defectes de la O-glicosilació no són fàcilment classificables i la majoria tenen noms sindròmics o bioquímics que no mantenen relació amb la resta de defectes de la O-glicosilació. Poden afectar a una sola estructura de glicà o a més d'una. Dins aquest tipus de defectes es troba un ventall molt gran de presentacions clíniques, des de afectació multisistèmica amb afectació neurològica fins a fenotips completament normals (*Wopereis i col 2006*).

Actualment hi ha un gran creixement en el coneixement d'aquest tipus de patologies, i s'espera que en els pròxims anys es descriguin moltes més malalties relacionades amb aquest tipus de glicosilació.

La taula 2 resumeix tots els defectes de la O-glicosilació coneguts fins al moment.

Taula 1a.- Resum dels defectes de glicosilació tipus I descrits fins al moment.

Nom	Proteïna alterada	MIIM	Nº pacients	Clínica
Def <i>PM2</i> (CDG-Ia)	Fosfomanomutasa	601785	>800	Mamil·les invertides, acúmuls de grassa subcutanis, retard psicomotor, ataxies, hipoplasia cerebelar, alteracions de la coagulació i hormonals
Def <i>PM1</i> (CDG-Ib)	Fosfomanoisomerasa	154550	30	Enteropatia amb pèrdua proteica, fibrosi hepàtica congènita i coagulopatia sense afectació neurològica. Vòmits i hipoglucèmia. És l'únic tipus de CDG que gaudeix d'un tractament eficient.
Def <i>ALG6</i> (CDG-Ic)	Glucosiltransferasa I	604566	40	Retard psicomotor moderat, hipotonia muscular, epilèpsia i atàxia
Def <i>ALG3</i> (CDG-Id)	Manosiltransferasa IV	608750	6	Microcefàlia, dismorfies, tetraparèsia espàstica, epilèpsia greu, absència quasi total de desenvolupament psicomotor i atròfia del nervi òptic
Def <i>DPM1</i> (CDG-Ie)	Dol-P-Man sintasa I	603503	5	Discapacitats greus, escàs desenvolupament psicomotor, microcefàlia, absència de contacte visual, ceguesa cortical i epilèpsia greu
Def <i>MPDU1</i> (CDG-If)	Lec35	604041	6	Encefalopatia greu amb ictiosi. Dos casos presentaven nanisme i retinitis pigmentosa
Def <i>ALG12</i> (CDG-Ig)	Manosiltransferasa VIII	607144	10	Retard psicomotor, hipotonia i sovint mamil·les invertides i acúmuls de grassa subcutanis anòmals. Susceptibilitat a patir infeccions
Def <i>ALG8</i> (CDG-Ih)	Glucosiltransferasa II	608103	5	Afectació hepàtica, renal i intestinal severa, coagulopaties i enteropatia amb pèrdua proteica.
Def <i>ALG2</i> (CDG-Ii)	Manosiltransferasa II	607905	1	Durant el primer any de vida desenvolupament de hipomielinització, retard mental, convulsions, hepatomegalia i defectes de la coagulació
Def <i>DPAGT1</i> (CDG-Ij)	GlcNAc-transferasa I	191350	1	Hipotonia greu, epilèpsia que no responia al tractament, retard mental, microcefàlia i exotropia
Def <i>ALG1</i> (CDG-Ik)	Manosiltransferasa I	605907	4	Convulsions intractables, hipotonia, atrofia de cerebel, dany de la visió i coagulopatia
Def <i>ALG9</i> (CDG-Il)	Manosiltransferasa VII	606941	2	Anormalitats cerebrals severes, incloent microcefàlia, atrofia cerebral difusa, hipoplasia cerebelar, retard de la mielinització i convulsions.
Def <i>DK1</i> (CDG-Im)	Dolicol quinasa	610768	2	Hipotonia, malformacions de la pell i del cabell. <i>Exitus</i> durant el primer any de vida
Def <i>RFT1</i> (CDG-In)	DolPP-GlcNAc ₂ Man ₅ flipasa	612015	4	Retard del desenvolupament, hipotonia, convulsions, afectació visual, coagulopatia i sordera
Def <i>N33/TUSC3</i>	Subunitat de la OTasa	601385	3	Retard mental amb diferents graus de severitat
Def <i>DPM3</i>	Dol-P-Man sintasa III	605951	3	Distrofia muscular

Taula 1b.- Resum dels defectes de glicosilació tipus II descrits fins al moment.

Nom	Proteïna	MIM	Nº pacients	Clinica
Def <i>MGAT2</i> (CDG-IIa)	GlcNAc-trasferasa II	212066	4	Retard psicomotor marcat, facies anòmala, hipotonia muscular i convulsions
Def <i>GLSI</i> (CDG-IIb)	Glucosidasa I	606056	1	Hipotonia generalitzada, greu retard del desenvolupament, convulsions, múltiples característiques dismòrfiques, problemes d'alimentació i hipoventilació. És un tipus de CDG que no presenta alteració del patró de isoelectroenfoque de transferina (TF-IEF). Es va diagnosticar gràcies a una banda anòmala d'oligosacàrids que es va observar en orina
Def <i>SLC35C1/FUCT1</i> (CDG-IIc)	Transportador GDP-fucosa	266265	3	Distrofia craneofacial, greu retard psicomotor, hipotonia, retard del creixement. Infeccions recurrents amb marcada leucocitosi
Def <i>B4GALT1</i> (CDG-IId)	Galactosiltransferasa	607091	1	Hipotonia muscular, retard psicomotor i malfomació Dandy-Walker
Def <i>COG7</i> (CDG-IIe)	Cog7	608779	7	Clinica severa amb dismorfia, hepatomegalia, hipotonia i convulsions
Def <i>SLC35A1</i> (CDG-IIf)	Transportador GDP-àcid siàlic	603585	1	Ceguesa amb severa trobocitopenia i plaquetes gegants
Def <i>COG1</i> (CDG-IIg)	Cog1	611209	1	Hipotonia greu, epilèpsia que no respon al tractament anticonvulsivants, retard mental, microcefalia i exotropia
Def <i>COG8</i> (CDG-IIh)	Cog8	611182	2	Hipotonia i retard mental amb presentació molt lleu
Def <i>ATP6V0A2</i>	Subunitat $\alpha 2$ V-ATPasa	611716	12	Cutis laxa, fisonomia característica, diferents graus de retard del creixement i del desenvolupament i anomalies neurològiques
Def <i>COG5</i>	Cog5	606821	1	Retard psicomotor moderat, dismorfia moderada i epilèpsia

Taula 2a.- Resum dels defectes de O-glicosilació descrits fins al moment

Tipus de O-glicà	Proteïna	Gen	Malaltia associada	Clinica	
Mucin type	UDP-GalNAc transferasa III	<i>GALNT3</i>	Calcinosis tumoral familiar (FTC)	Dipòsits de calci en pell i teixit subcutani. Falta de resposta a hormona paratiroidèica	
GAG	β -1,4-galactosil-transferasa IV	<i>B4GALT7</i>	Variant hereditària de Ehlers-Danlos	Envel·liment prematur, pell i elàstica i laxitud articular. Retard psicomotor, hipotonia i macrocefàlia	
	Extosin-1,-2,-3	<i>EXT1 / EXT2 / EXT3</i>	Exostosis múltiples hereditàries (HME)	Herència autosòmica dominant. Tumors d'os benignes, malformacions esquelètiques.	
	NAcGlc-6-O-sulfotransferasa	<i>CHST6</i>	Distròfia muscular congènita (MCD)	Pèrdua bilateral de visió durant la primera dècada de vida i distròfia muscular	
	Condroïtin-6-sulfotransferasa I	<i>CHST3</i>	Displàsia espondiloepifisal tipus Omami (SED)	Estatura baixa, escoliosis, luxacions articulars i rizomelia.	
	Transportador de sulfat de displàsia diastròfic		<i>DTDST</i>	Acondrogenesis tipus B1 (ACGB1)	Letal abans o en el moment del naixement. Hipodisplàsia espinal i falta d'extremitats
				Atelosteogenesis tipus II	Anormalitats de cartílag de tràquea, laringe i bronquis
Displàsia distrofica (DTD)				Baixa estatura, contractures articulars i escoliosi	
3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfat sintasa II		<i>ATPSK2</i>	Displàsia múltiple epifisal (EDM4)	Deformitats esquelètiques amb escoliosi, deformació dels dits	
			Displàsia espondiloepifisal tipus Pakistani	Problemes ossis i articulars.	
O-galactosil glicans	Lisil hidroxilasa I	<i>PLOD</i>	Ehlers-Danlos tipus VIa	Pell fràgil, laxitud articular i hipotonia muscular.	

Taula 2b.- Resum dels defectes de O-glicosilació descrits fins al moment

Tipus de O-glicà	Proteïna	Gen	Malaltia associada	Clínica	
O-manosil glicans, presents en α -distroglicà	O-manosil transferasa	<i>POMT1</i> / <i>POMT2</i>	Walker-Warburg síndrome (WWS) Dis. musc. de cintures tipus 2K (LGMD2K)	Malformacions en múscul, ull i cervell. Esperança de vida inferior als tres anys Debilitat muscular progressiva amb afectació de músculs de l'esquena i pelvis. Microcefàlia i retard mental sever	
	Man-b1,2-NAcGlc transferasa I	<i>POMGNT1</i>	Malaltia de múscul-ull-cervell (MEB)	Distròfia muscular amb desordres de la migració neuronal i malformacions oculars	
	Fukutina	<i>FCMD</i>	Dis. Musc. congènita tipus Fukuyama	Debilitat muscular, hipotonia severa, retard mental i malformacions cerebrals	
	Proteïna relacionada amb la fukutina		<i>FKRP</i>	Dis. Mus. congènita tipus 1C (MDC1C)	Severa debilitat i hipertrofia muscular, malaltia pulmonar severa. Cardiomiopatia
				Dis. Musc. de cintures tipus 2I (LGMD2I)	Hipotonia, debilitat i hipertrofia muscular. Sense afectació ocular ni cerebral. Presentació de la malaltia entre els 6 mesos i els 40 anys
				WWS / MEB	
				Dis. Musc. congènita tipus 1D (MDC1D)	Distròfia muscular, retard mental profund, i alteracions cerebrals de la substància blanca
	Transportador de CMP-sialic	<i>SLC35A1</i>	CDG-IIif	Ceguesa amb severa trombocitopenia i plaquetes gegants.	
	Afecta a la sialilació dels O-glicans	UDP-NAcGlc 2 epimerasa /NAcMan quinasa	<i>GNE</i>	Miopatia hereditària amb cossos d'inclusió (hIBM)	Malaltia muscular severa, progressiva i no inflamatòria, Debilitat i atròfia dels músculs de les extremitats
				Miopatia distal vacuolada (MNK)	
			Sialúria	Retard psicomotor lleu, infeccions respiratòries recurrents i hepatopatia	

Taula 2c.- Resum dels defectes de O-glicosilació descrits fins al moment

Tipus de O-glicà	Proteïna	Gen	Malaltia associada	Clínica	
Altres estructures	Fucosiltransferasa I i 2	<i>FUT1</i> / <i>FUT2</i>	grup sanguini Bombay, para-Bombay i no-secretor	No presenten manifestacions clíniques	
	Galactosa 3(4) fucosiltransferasa	<i>FUT3</i>	Grup sanguini Lewis -nul	No presenten manifestacions clíniques	
	Golgi FUCT	<i>FUCT1</i>	CDG-IIc	Dismorfia craneofacial, retard psicomotor greu, hipotonia, retard del creixement, infeccions recorrents amb marcada leucocitosi	
	Galactosil-transferasa I	<i>B4GALT1</i>	CDG-IIId	Hipotonia muscular, retard psicomotor i malformació de Dandy-Walker	
	COG 7, 1, 8	<i>COG 7, 1, 8</i>	CDG-IIe, g, h	Dismorfia, hipotonia generalitzada, hepatosplenomegàlia, retard mental. Infeccions recorrents	
	Proteïna d'unió a GTP		<i>SAR42</i>	Malaltia de retenció de quilomicrons (CMRD)	Síndrome de malabsorció amb diarrea i esteatorrea. Retard de creixement. Alteracions neurològiques
				Malaltia d'Anderson	
				CMRD amb síndrome Marinesco-Sjögren	Síntomes de CMRD, catarates congènites, atrofia i signes d'ataxia cerebelar i anomalies esquelètiques

1.1.2. Diagnòstic dels Defectes Congènits de la N-Glicosilació

Cribratge

Pel diagnòstic de les CDGs s'utilitza una proteïna abundant en sèrum, la transferrina, com a model de proteïna N-glicosilada (*Keir i col 1999*). L'estudi de la hipoglicosilació de la transferrina era una metodologia ja establerta quan es van descriure els defectes de glicosilació, ja que s'utilitza com a marcador pel control de l'abús d'alcohol.

La transferrina és un proteïna sèrica, de síntesis hepàtica i que presenta dos punts de N-glicosilació. Cada punt de glicosilació conté un glicà habitualment biantenal, però que en ocasions també es troba més ramificat, i cada antena acaba amb un àcid siàlic. L'àcid siàlic té càrrega negativa, la qual cosa permetrà separar les diferents isoformes segons la seva càrrega i per tant el seu nombre d'àcids siàlics. Es formen fins a 8 isoformes diferents, des de l'asialotransferrina fins a la octosialotransferrina, essent la isoforma més abundant la tetrasialilada (*Leroy 2006*). Els defectes de la N-glicosilació poden donar lloc a hipoglicosilació o a glicosilació anòmala, de manera que s'observa disminució relativa de la banda tetrasialilada i augment de les tri-, di-, mono- o asialilades (*Stibler and Jaeken 1990*).

La primera metodologia utilitzada per estudiar el grau de glicosilació va ser la determinació del % de transferrina deficient en carbohidrats (%CDT), on es mesura el percentatge de la suma de les bandes di-, mono- i asialotransferrina respecte la transferrina total. Més endavant es va utilitzar el sistema de isoelectroenfoc de la transferrina (Tf-IEF), que permet observar les diferents isoformes de la transferrina. El mètode del %CDT només indica si hi ha un augment de les isoformes poc sialilades, però no quines són les isoformes alterades, mentre que amb el sistema Tf-IEF s'aconsegueix la seva identificació. El Tf-IEF és el sistema de referència més utilitzat pel diagnòstic dels defectes de la glicosilació. Separa les isoformes de la transferrina en funció del seu pI, de manera que quan existeix un defecte s'observa alteració del perfil obtingut (*Jaeken i col 1984*).

Els patrons alterats es poden classificar en dos grups: patró del tipus 1 o patró tipus 2 (Fig. 2). Tal com ja s'ha esmentat, el patró tipus 1 correspon a una hipoglicosilació deguda a defectes enzimàtics localitzats en el citosol o en el RE. En la majoria dels casos hi ha una síntesi alterada del LLO que s'ha d'unir a la proteïna, però també poden ser defectes en la OTasa. En qualsevol dels casos, el patró que s'observa en aquest tipus de defectes s'explica per la manca de branques de glicans unides a la proteïna. En el Tf-IEF es veuen augmentades les bandes di i asialo i una disminució de la tetrasialotransferrina.

En canvi, en un patró de tipus 2 el defecte està en el processament de l'estructura del glicà unit a la proteïna que es produeix majoritàriament en Golgi. El que es troba és un augment de

les bandes menys sialilades, sobretot tri, di i monosialilades. En aquests casos, el glicà precursor es sintetitza correctament, i per tant es transfereix normalment, però es processa de forma errònia, produint una manca dels àcids siàlics terminals dels glicans (Jaeken 2003).

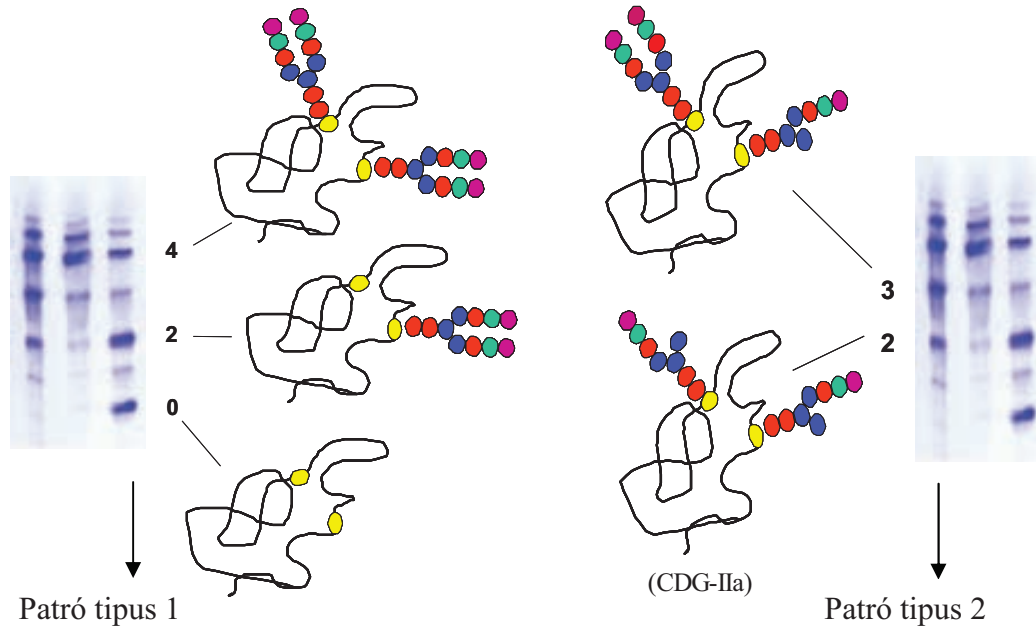


Figura 2. Esquema de la correlació entre les bandes observades en l'isoelectroenfoc i la corresponent isoforma

A més del %CDT i de l'IEF, hi ha altres tècniques que s'han proposat més endavant i que també permeten estudiar les diferents isoformes entre les quals es troba la cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) (Helander i col 2003) i l'electroforesi capil·lar (CZE) (Carchon i col 2004). Aquestes noves metodologies van associades a una menor manipulació de la mostra, i per tant, a una reducció del temps de treball. També permeten una separació reproducible i una semi-quantificació de les isoformes de transferrina, fet que disminueix la subjectivitat en la interpretació.

Diagnòstic

Un cop es detecta un patró alterat, cal trobar el defecte enzimàtic que produeix aquesta alteració.

Existeixen malalties que secundàriament alteren el patró de transferrina presentant un perfil tipus 1, és el cas de la galactosemia, on l'acumul de galactosa-1-P inhibeix la galactosiltransferasa de la via de la glicosilació, o el de la intolerància hereditària a la fructosa, on s'inhibeix la fosfomanosaisomerasa degut a les altes concentracions de fructosa-1-P, o el cas de l'alcoholisme crònic, etc. Altres situacions com la hepatopatia o la immaduresa, provoquen un patró tipus 2 secundari. Per tant, sigui quin sigui el tipus de patró

alterat que presenti el pacient és important descartar causes secundàries. En cas d'alteració secundària i en particular en els casos a dalt esmentats, es corregeix el patró de transferrina en administrar el tractament adequat.

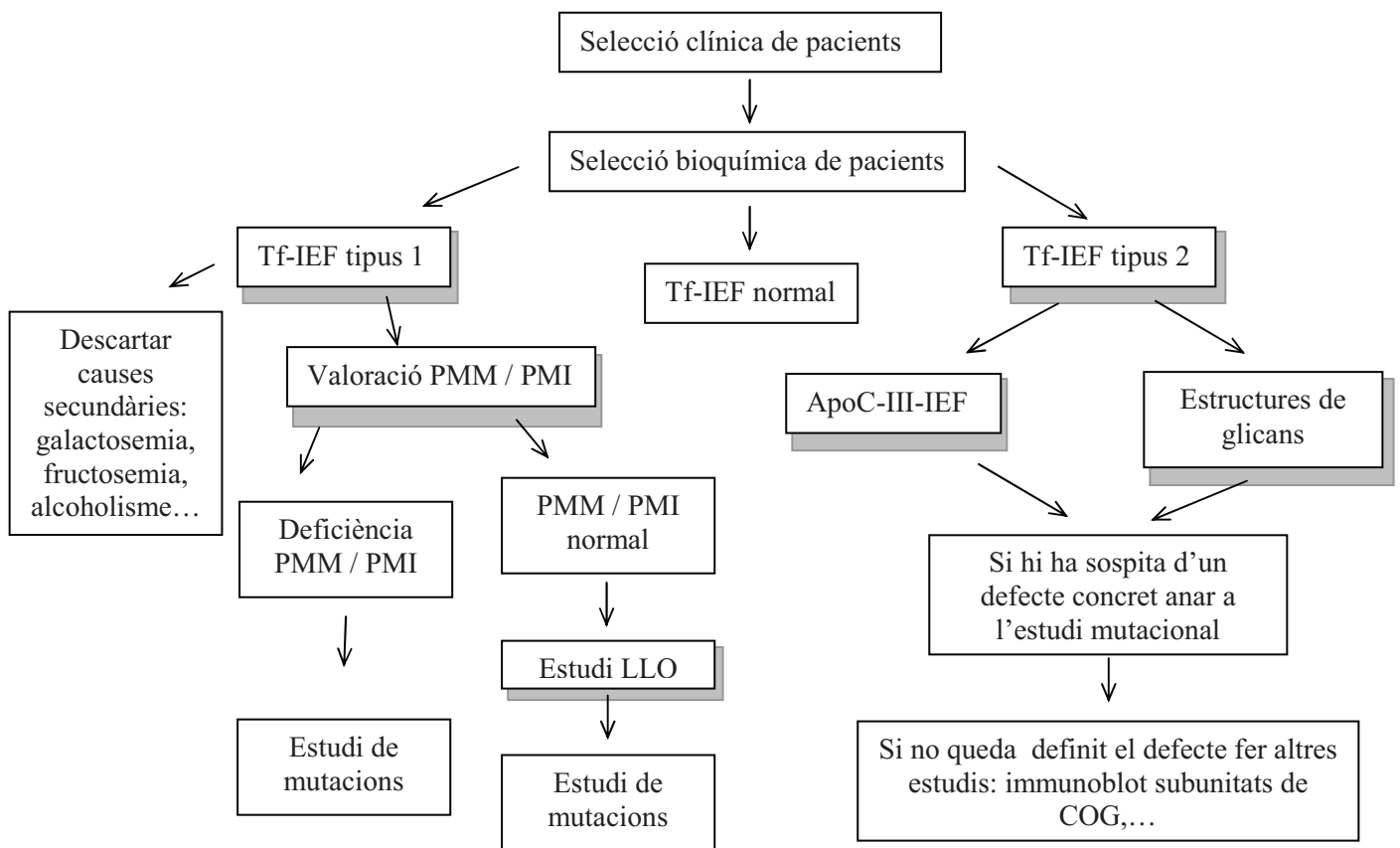


Figura 3. Esquema de l'algoritme a seguir pel diagnòstic dels defectes de la glicosilació de proteïnes.

En el cas d'un patró de tipus 1, l'algoritme diagnòstic a seguir és bastant clar (Fig. 3). En certes ocasions la clínica que presenta el pacient ens pot orientar cap a un subtipus determinat de CDG. El més freqüent és el que afecta el gen *PMM2* (CDG-Ia); per això davant d'un patró tipus 1 s'estudiarà inicialment l'activitat de l'enzim fosfomanomutasa (PMM2) en fibroblasts o leucòcits (Aebi i col 1999). Si la clínica és compatible, també s'ha d'estudiar l'activitat enzimàtica de fosfomanoisomerasa (PMI), que correspon a la deficiència de *PMI-CDG* (CDG-Ib). Encara que aquest tipus no és molt freqüent, és important confirmar-lo o descartar-lo el més ràpidament possible, ja que és l'únic tipus de CDG on és possible aplicar un tractament eficaç i interessa iniciar-lo abans que s'instauri una hepatopatia severa.

En el cas que s'hagi descartat un defecte de PMM i PMI, el següent pas és estudiar la composició dels LLO en fibroblasts cultivats amb manosa radioactiva; l'estructura que s'acumuli senyalarà el pas bloquejat. Aquesta tècnica permet identificar gran part dels altres defectes tipus I (Burda i col 1998).

Si el patró trobat en el cribratge és del tipus 2, l'algoritme a seguir no està tant definit. Igual que en els patrons tipus 1, cal descartar una alteració secundària (hepatopatia, immaduresa, polimorfismes de la transferrina, etc). El següent pas a seguir seria l'estudi de les isoformes de l'apolipoproteïna C-III (apoC-III). Aquesta proteïna s'utilitza per al diagnòstic com a exemple de proteïna O-glicosilada que comparteix alguns passos del seu procés de glicosilació amb el processament en Golgi de les proteïnes N-glicosilades. Per tant, un patró tipus 2 de la transferrina junt amb un patró alterat d'apoC-III serveix per acotar alguns tipus de CDG-II (*Wopereis i col 2005*). L'estudi de les isoformes d'apoC-III també es realitza per IEF.

En un patró tipus 2 també s'aconsella fer un estudi de l'estructura de glicans. El sistema utilitzat és l'anàlisi per MALDI-TOF dels glicans units a proteïnes sèriques, no només a la transferrina. Amb aquesta tècnica es pot detectar l'estructura anòmala dels glicans acumulats i així orientar la localització del defecte enzimàtic.

Altres estudis

Oligosacàrids en orina: l'únic pacient diagnosticat amb deficiència de *GLSI-CDG* (CDG-IIb) presentava un patró de Tf-IEF sense alteracions però excretava un oligosacàrid anòmal (*De Praeter i col 2000*). La glucosidasa I, és l'enzim encarregat de hidrolitzar la primera de les tres glucoses del glicà precursor un cop unit a la proteïna. Al no produir-se aquesta hidròlisi, s'activa la endo- α 1,2-mannosidasa que allibera les tres glucoses i una manosa unides. D'aquesta manera el processament del glicà pot continuar, donant una estructura de glicans correcta. I el tetrasacàrid de glucoses i manosa (Glc₃Man) s'excreta en orina.

Així doncs, l'estudi d'oligosacàrids en orina per cromatografia en capa fina (TLC) és també una tècnica útil pel diagnòstic d'alguns CDG's.

1.1.3. Tractament dels Defectes Congènits de la N-Glicosilació

No es disposa d'un tractament eficaç per a la majoria dels defectes. En els pacients CDG-Ia s'havia proposat l'administració de manosa, ja que *in vitro* s'havia observat que afegint manosa al medi de cultiu dels fibroblasts s'aconseguia millorar la incorporació d'aquesta en la via de la glicosilació. Però, al assajar l'administració de manosa en pacients no es va produir cap millora clínica ni bioquímica (*Jaeken i Casaer 1997*). El tractament simptomàtic és, fins al moment, la única mesura possible per tal d'aconseguir una millor qualitat de vida.

El subtipus CDG-Ib sí que gaudeix d'un tractament eficaç que corregeix el defecte; consisteix en l'administració via oral de manosa: 1g/Kg/dia dividit en 4-6 dosis (*Niehues i col 1998; Martín-Hernandez i col 2008*). La manosa administrada es transforma, per l'acció

d'una hexoquinasa, en la manosa-1-P necessària per a la via de la N-glicosilació (Fig. 4). Aquest és un tractament que els pacients han de prendre tota la vida; com a efecte secundari, l'administració d'altres dosis de manosa pot causar diarrees osmòtiques (Leroy 2006).

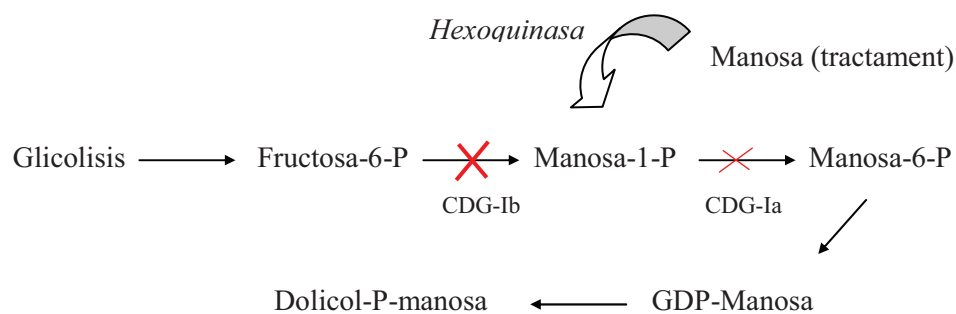


Figura 4. Representació de la via metabòlica afectada en els CDG-Ia i CDG-Ib, i com el tractament amb manosa pot restaurar la manca de manosa-1-P deguda a la deficiència d'activitat de PMI.

El subtipus CDG-IIc que presenta alteració en el transportador de GDP-fucosa, també té tractament eficaç. L'administració de fucosa, 25 mg/Kg/dia en 3 dosis, aconsegueix millorar les infeccions recurrents (Marquardt i col 1999).

1.2. COMPLEX PIRUVAT DESHIDROGENASA

El piruvat és un metabolit molt important per la cèl·lula, i prové majoritàriament de la via de la glicolisi. Pot ser metabolitzat per quatre enzims diferents: lactat deshidrogenasa (per la formació de lactat), alanina aminotransferasa (per la producció d'alanina), piruvat carboxilasa (primer pas de la gluconeogenesis) i el complex piruvat deshidrogenasa (encarregat de la formació de acetyl-CoA que entrarà al cicle de Krebs). El cicle de Krebs és un pas central del metabolisme energètic, ja que té com a objectiu la formació d'equivalents reduïts que seran transferits a la cadena respiratòria on s'oxidaran per tal de produir energia en forma d'ATP (Pithukpakorn 2005; Robinson 2006).

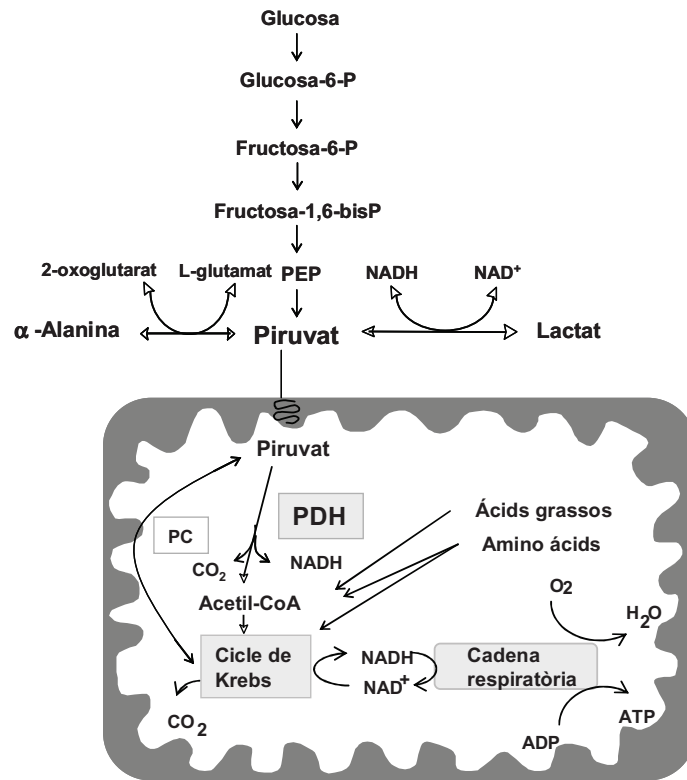


Figura 5. Esquema de la glicosilació i el cicle de Krebs, amb el complex PDHc connectant les dues vies.

Així doncs un pas clau d'aquesta via metabòlica és la conversió del piruvat en acetyl-CoA mitjançant el complex piruvat deshidrogenasa.

El complex piruvat deshidrogenasa (PDHc) es troba associat a la membrana interna mitocondrial, i és un enzim limitant d'aquesta via oxidativa de la glucosa, en una posició clau entre la glicolisi i el cicle de Krebs. Catalitza la reacció següent:



És un complex multi-enzimàtic format per múltiples còpies de tres proteïnes catalítiques i altres elements estructurals i reguladors (Fig. 6 i 7):

- E1 o piruvat decarboxilasa, que catalitza la formació de CO_2 i transfereix el grup acetil a la següent proteïna catalítica (E2). El component E1 és un heterotetramer format per 2 subunitats α i 2 subunitats β .
- E2 o dihidrolipoamida acetil transferasa, que catalitza la formació de acetil-CoA.
- E3 o dihidrolipoamida deshidrogenasa (LAD), que catalitza la formació de NADH. Aquesta deshidrogenasa és una flavoproteïna comú als complexos α -cetoglutarat deshidrogenasa, al complex deshidrogenasa dels aminoàcids ramificats i també al sistema de fragmentació de glicina.
- Proteïna X o E3 binding protein, que actua com a lipoiltransacetilasa i té com a funció mantenir unida la subunitat E3 al nucli de E2.
- Piruvat deshidrogenasa kinasa, n'existeixen 4 isoformes que s'expressen en diferents teixits. La seva funció és la fosforilació de tres residus de serina de la subunitat $\text{E1}\alpha$ per tal d'inactivar el PDHc.
- Piruvat deshidrogenasa fosfatasa, existeixen 2 isoformes, també distribuïdes en diferents teixits. La seva funció és la desfosforilació i per tant l'activació del PDHc.

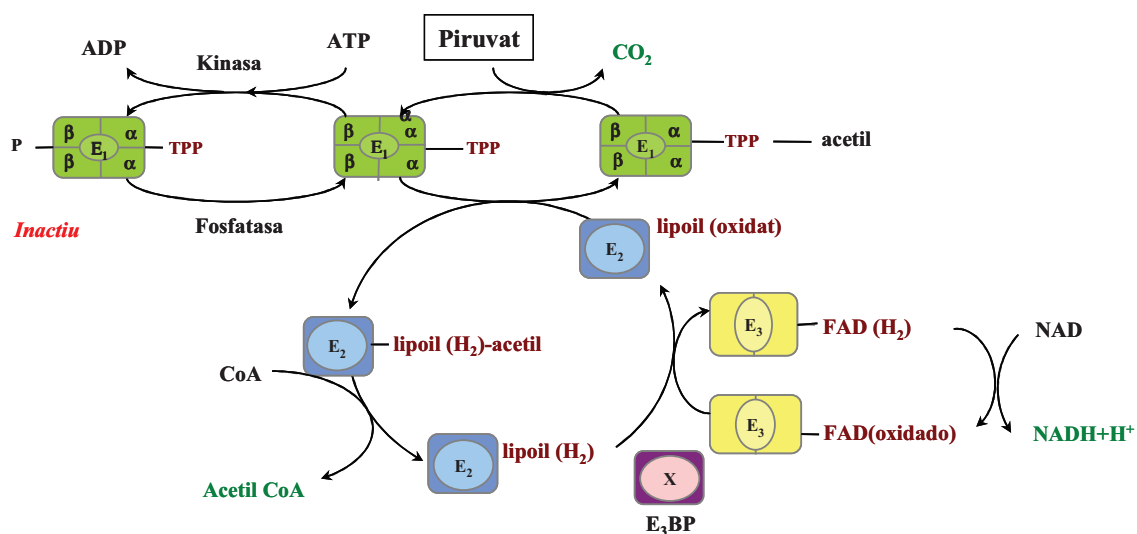


Figura 6. Esquema de la reacció que es duu a terme en cada una de les subunitats del complex PDH

Cadascuna d'aquestes subunitats està present en més d'una còpia, així doncs un complex correctament format conté 20-30 còpies de E1, 60 còpies de E2 i 6 còpies de E3 i X, donant un pes molecular de $7 - 8,5 \times 10^6$ Da (Robinson 2001).

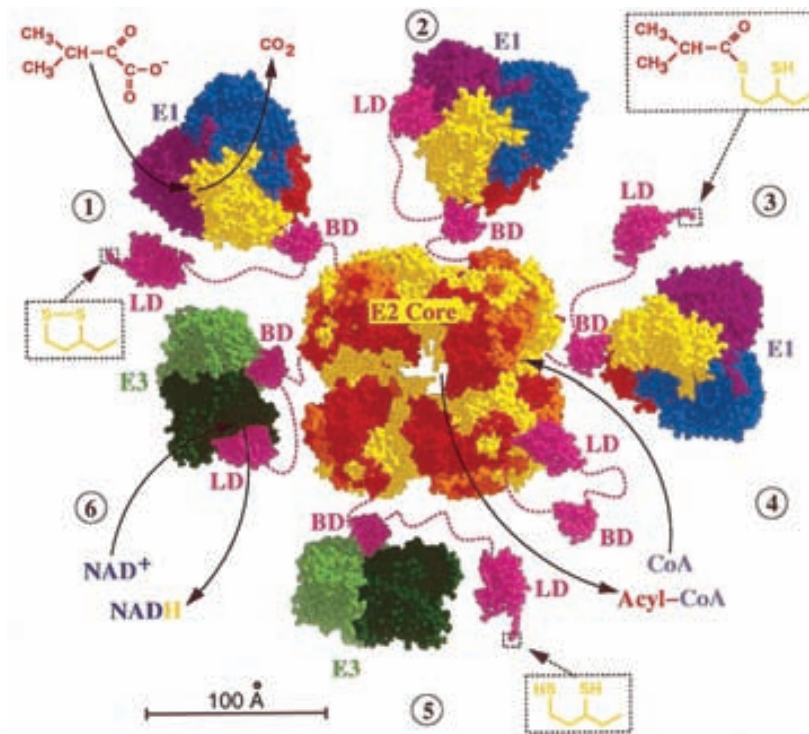


Figura 7. Esquema del complex piruvat deshidrogenasa, amb les múltiples còpies de cadascuna de les seves subunitats. Extret de *Aevarsson i col 1999*.

A més a més de les subunitats del complex piruvat deshidrogenasa, també es requereixen 5 coenzims pel seu funcionament:

- Tiaminpirofosfat (TPP), s'uneix a la subunitat E1 i és un factor crític per la descarboxilació del piruvat.
- Àcid lipoic
- FAD
- Coenzim A
- NAD⁺

Degut a la seva importància en la via, el PDHc està altament regulat. En presència d'ATP, la PDH quinasa fosforila tres residus de serina de la subunitat E1 α , el primer dels quals és el responsable real de la inactivació, mentre que els altres dos inhibeixen la reacció de la fosfatasa (*Randle 1981*). Però també està regulat per diferents substrats i productes de la via: la piruvat quinasa és molt sensible a la relació NAD/NADH i acetil-CoA/CoA, de manera que quan s'acumula NADH o acetil-CoA (significa que la cèl·lula té nivells alts d'energia) s'activa la piruvat quinasa per tal que s'inhibeixi el PDHc. En canvi, quan la cèl·lula té un dèficit d'energia representat per uns nivells alts de ADP, NAD⁺ i CoA, s'inhibeix la piruvat quinasa i s'activa el PDHc. L'enzim encarregat d'activar el PDHc, la piruvat deshidrogenasa

fosfatasa, aconsegueix l'activació completa quan està en presència de Mg^{2+} i Ca^{2+} (Robinson 2001).

1.2.1. Deficiències del complex piruvat deshidrogenasa

La deficiència de piruvat deshidrogenasa és una de les causes més comunes d'acidosis làctica primària en nens (Robinson 2001). S'han descrit deficiències de totes les subunitats (Brown 1992; Brown i col 2004; Head i col 2005; Robinson i col 1977; Robinson i col 1990; Robinson i col 1975), encara que el major nombre de casos pertanyen a la subunitat E1 α , codificada pel gen *PDHA1* localitzat en el cromosoma X.

El nivell d'activitat del complex PDH determina el balanç entre l'ús de diferents substrats energètics i, en alguns teixits, l'enzim treballa quasi a velocitat màxima. Per tant, una modesta reducció en l'activitat provoca una acumulació d'àcid pirúvic i per tant d'àcid làctic. El PDHc juga un paper important en tots els teixits, però és especialment crític en el cervell, on normalment obté tota la seva energia a partir de la oxidació aeròbica de la glucosa (Brown i col 1994). Això explica el fet que tots els pacients amb deficiència de PDH presentin algun grau de dany neurològic.

Inicialment les deficiències de PDHc es van associar a un fenotip clínic de presentació neonatal o en la primera infància amb acidosis làctica severa, sovint fatal. La descripció de nous pacients ha ampliat molt l'espectre clínic d'aquesta deficiència, incloent episodis d'acidosis làctica amb atàxies, síndrome de Leigh o malaltia neurodegenerativa crònica amb atrofia cerebral i problemes de desenvolupament, sobretot entre pacients de sexe femení (Brown i col 1989; Brown i Sperl 2008).

Deficiència de PDH-E1 α

La majoria de deficiències de PDHc són degudes a mutacions en el gen *PDHA1* (MIM 300502), localitzat en el cromosoma Xp22, que codifica per la subunitat PDH-E1 α . Consta d'onze exons i un total de 17 Kb. Malgrat la seva localització en el cromosoma X trobem igual nombre de pacients en ambdós sexes.

En mascles totes les cèl·lules de l'organisme estan afectades, per tant la severitat de la presentació clínica dependrà de la mutació que presenti el pacient la qual determinarà l'activitat residual de PDH E1; mutacions que suprimeixin o redueixin quasi completament l'activitat PDH presumiblement provoquen mort en el període intrauterí, ja que les cèl·lules no generen suficient ATP per sobreviure. Quan l'activitat residual de PDH és del 20 – 30% dels controls s'acostuma a observar una clínica neonatal regida per acidosis làctica. I quan l'activitat residual és superior al 40 – 50% dels controls s'observa una presentació clínica més

tardana amb símptomes neurològics i acidosis làctica lleu o moderada (Dahl 1995).

En canvi en femelles el quadre és més complicat ja que el grau d'afectació no només dependrà de la severitat de la mutació sinó també de la lionització del cromosoma X. Degut a aquest fenomen de lionització és habitual l'absència d'acidosis làctica en femelles, ja que el lactat produït per les cèl·lules que tenen actiu el cromosoma X mutat serà metabolitzat per les cèl·lules que mantenen actiu el cromosoma X normal, encara que la falta d'ATP de les cèl·lules mutades no podrà ser contrarestat per les cèl·lules normals, donant lloc al quadre clínic (Fig. 8).

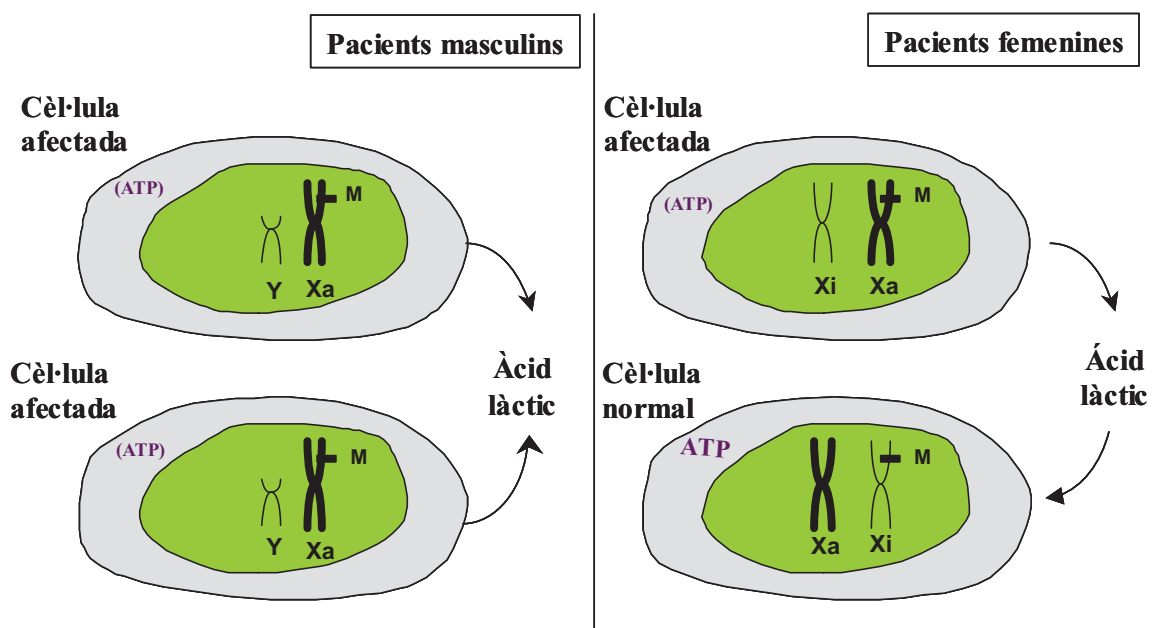


Figura 8. Diferent efecte de les mutacions en E1 α en mascles i femelles. En mascles, totes les cèl·lules estan afectades, i la magnitud de la deficiència d'energia (ATP) o de l'acidosis làctica depèn de la severitat de la mutació. En les dones, l'acidosis làctica pot no ser aparent, perquè l'excés de lactat produït per les cèl·lules afectades és metabolitzat per les cèl·lules normals. Mod. de Dahl 1995.

Tot això incrementa encara més el ventall de presentacions clíniques observades en les deficiències de PDH, on es pot trobar des d'acidosis làctica severa, més freqüentment observada en nounats mascles, fins a formes neurològiques cròniques en femelles, i passant per totes les formes intermitges (Brown i col 1994).

El diagnòstic es realitza generalment mitjançant tècniques enzimàtiques, s'ha de tenir en compte que les deficiències totals són incompatibles amb la vida, i que activitats inferiors al 50% indiquen patologia. Però en femelles el diagnòstic és molt més complex ja que, a part de la parcialitat del dèficit, s'ha de tenir en compte la diferent lionització en els diferents teixits (Willemsen i col 2006). Per tant, una activitat dins el rang control en fibroblasts (el material més utilitzat pel diagnòstic) no descarta una activitat inferior a nivell cerebral, on a més a més

les cèl·lules són més dependents de l'obtenció d'energia a partir de la glucosa (Robinson 2001). Això fa que s'aconselli l'estudi molecular del gen *PDHA1* davant una pacient amb característiques clíniques i bioquímiques que suggereixin una deficiència de PDH malgrat que les activitats enzimàtiques estiguin dins els valors de referència (Matthews i col 1994). Així doncs l'estudi mutacional és necessari per confirmar la deficiència enzimàtica. S'han descrit més de 100 mutacions (Lissens i col 1996; Lissens i col 2000; Ridout i col 2005; www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) que han permès veure la distribució irregular que presenten al llarg del gen, localitzant-se majoritàriament entre els exons 5 i 11.

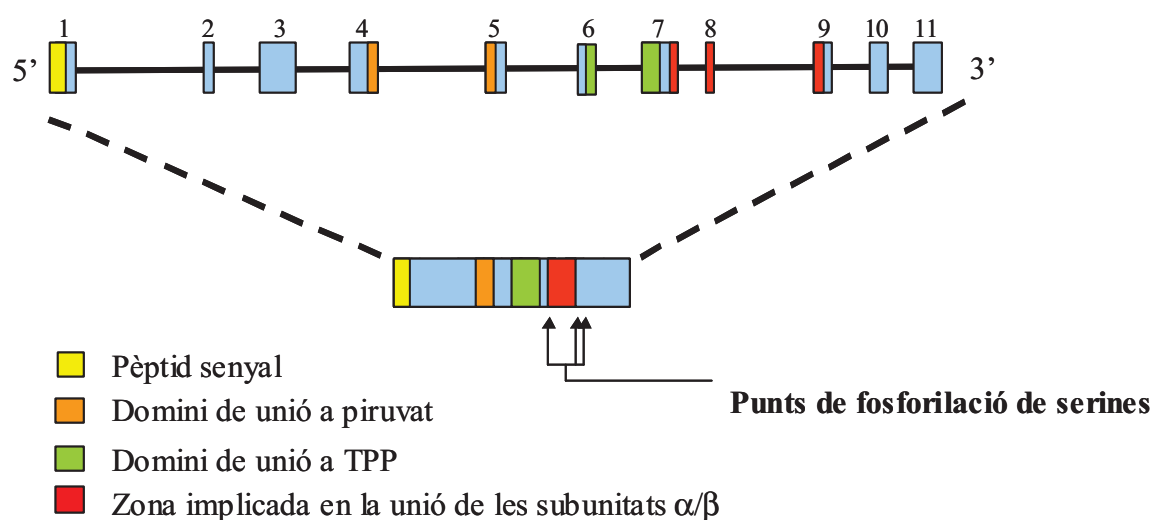


Figura 9. Esquema del gen *PDHA1* i localització de les seqüències funcionals

El tipus de mutacions que trobem en mascles i femelles també varia. Les mutacions més severes només es detecten en femelles, ja que una lionització favorable permet la seva viabilitat. En canvi pel que fa a les mutacions lleus només les detectem en mascles, ja que segurament en les dones heterozigotes no causen patologia i per tant passen desapercebudes. Un recull de mutacions fet per Robinson en el 2001 (Robinson 2001), mostrava que del total de 41 mutacions corresponents a canvi d'amino àcid (missense) o de codó stop (nonsense) es distribueixen 14 entre les dones i 27 en homes, mentre que de 32 delecions / insercions, 21 es troben en dones i 11 en homes, trobant-se aquestes últimes sempre localitzades en els exons 10 i 11.

Una correlació genotip – fenotip només és possible en homes, on s'observa que mutacions iguals presenten clíniques similars, en canvi en dones l'efecte de la lionització impedeix fer aquest tipus de correlació.

Degut a la gravetat de la patologia en molts casos, els pacients afectes de deficiència de PDH-E1 α no tenen descendència, això fa que la majoria de mutacions siguin *de novo*. S'estima que tan sols en un 25% dels casos les mares són portadores (*Lissens i col 2000*). S'ha de tenir en compte que el fet de descartar la presència de la mutació en cèl·lules sanguínies o en fibroblasts de la mare (teixits d'on s'acostuma a extreure el DNA per l'estudi molecular) no descarta la presència de mutacions en les cèl·lules germinals, la qual cosa justifica la realització d'estudis prenatals en futures gestacions. En fetus femelles portadors de mutacions, els estudis prenatals no poden predir les conseqüències clíniques del futur nadó, ja que no es pot predir l'efecte de la lionització en els diferents teixits de l'organisme (*Brown i col 1994*).

Deficiència de PDH-E1 β

L'any 2004 Brown i col·laboradors van descriure els dos primers casos de deficiència de PDH-E1 β , demostrant així que aquesta subunitat també podia ser causa de deficiència de E1. Des de llavors només s'han descrit 4 casos més amb un total de set mutacions detectades.

La presentació clínica d'aquests pacients no difereix de la presentada en les deficiències de PDH-E1 α : encefalopatia, hipotonia, dificultats respiratòries, acidosis làctica i convulsions, amb agenesia del cos callòs en quatre dels sis pacients descrits (*Brown i col 2004; Okajima i col 2008*).

El defecte molecular es troba en el gen *PDHB* (MIM 179060), localitzat en el cromosoma 3p13-q23, consta de 10 exons i té una mida de 18 kb. Al tractar-se d'un gen localitzat en el cromosoma 3 l'herència és autosòmica recessiva i per tant afecta per igual a homes i dones.

Deficiència de PDH-E2

La deficiència de PDH-E2 és la de més recent caracterització, amb dos pacients amb mutacions en el gen *DLAT* (MIM 245348), localitzat en la posició 11q23.1 (*Head i col 2005*).

Aquests pacients presenten una clínica més moderada que la descrita per la resta de subunitats del complex PDH. El primer pacient descrit presentava ataxia i distonia que es va corregir introduint una dieta cetogènica, restant només un problema residual d'incoordinació de les habilitats motores fines; sorprenentment la funció mental no estava alterada. El segon pacient presentava també distonia amb cert retard en el desenvolupament. L'estudi de lactat en sèrum i líquid cefaloraquídi va resultar normal. Els dos pacients mostraven lesions bilaterals restringides al globus pallidus.

Aquests pacients representen un repte diagnòstic ja que la concentració elevada de lactat en líquid cefaloraquidi, que es considera clau pel cribratge inicial de les deficiències de PDH, era normal.

Deficiència de PDH-E3

Aquesta deficiència, a més d'afectar al complex piruvat deshidrogenasa, també altera la α -cetoglutarat deshidrogenasa, la deshidrogenasa dels amino àcids ramificats i del sistema de fragmentació de la glicina, ja que és un enzim comú a diferents deshidrogenases (*Patel i Roche 1990; Kikuchi i Higara 1982*). El fet que tots aquests complexos estiguin alterats fa que en les deficiències de dihidrolipoamida deshidrogenasa (LAD / E3) s'observi increment de lactat i piruvat, de α -cetoglutarat i d'amino àcids ramificats així com de glicina en sang, orina i líquid cefaloraquidi (LCR). Els primers pacients diagnosticats presentaven una clínica molt severa amb períodes de cetoacidosis i mort durant el primer any de vida. Però més endavant s'han descrit pacients molt més lleus, amb hipotonia i fatiga però sense afectació neurològica (*Odiève i col 2005*).

El diagnòstic es realitza amb la valoració de l'activitat enzimàtica, tot i que en algunes ocasions s'han observat activitats del 59 – 63% dels controls (*Robinson 2001*).

El gen que codifica per aquesta subunitat és *DLD* (MIM 238331) situat en el cromosoma 7q31-q32, consta de 14 exons i 20kb.

Deficiència de E3BP (PDH-X)

És la segona causa més comú de deficiència de PDHc després de la *PDHA1*. Els pacients es caracteritzen per presentar una clínica homogenia amb acidosis làctica i retard en el desenvolupament psicomotor. És molt comú trobar agenèsia del cos callòs a vegades associada a atrofia cerebral. En general la clínica és semblant però menys severa que en les deficiències de *PDHA1*, ja que la majoria sobreviuen a l'adolescència (*Miné i col 2006*) i només s'ha descrit un pacient amb mort neonatal.

Aquesta clínica més lleu contraresta amb el fet que tots els pacients descrits presenten un dèficit total de E3BP però amb una activitat de PDHc residual considerable, la qual evidencia la capacitat d'unió entre E3 i E2 sense l'ajut de E3BP (*Head i col 2005*).

S'ha especulat que la uniformitat observada en la clínica dels pacients amb aquesta deficiència és deguda a que només s'han descrit pacients amb manca total de la proteïna però hauríem d'esperar que poguessin haver-hi pacients amb reduccions parcials en la quantitat de proteïna o solsament alteració de la seva funció, que no es detecten perquè les manifestacions clíniques i bioquímiques no són prou significatives (*Brown i col 2006*).

Les deficiències són degudes a mutacions en el gen *PDHX* (MIM 245349) situat en el cromosoma 11p13, que consta de 11 exons i 80 kb.

Deficiència de piruvat deshidrogenasa fosfatasa

Es coneixen dues isoformes, PDP1 i PDP2, amb diferent distribució tissular: la isoforma PDP1 es troba altament expressada en cor, cervell i testicles, i requereix de Ca^{2+} , Mg^{2+} i de la subunitat E2 per la seva activació. D'altra banda la isoforma PDP2 es troba en cor, fetge i ronyons, no requereix elements activadors, i mostra una activitat 50 vegades menor que la de PDP1 (*Maj i col 2006*).

S'han descrit diferents casos associats a defectes de piruvat deshidrogenasa fosfatasa, però només en una família s'ha trobat la mutació causant de la deficiència en el gen *PDP1* (MIM 608782) codificant per la isoforma PDP1 (*Maj i col 2005*). Es tracta de dos germans fills de pares consanguinis que manifestaven hipotonia i lactat elevat, amb una activitat PDHc inferior al 25%.

1.2.2. Diagnòstic de les deficiències del complex piruvat deshidrogenasa

El diagnòstic de deficiència de PDHc s'ha de considerar en tots els pacients amb debut de malaltia neurològica, sobretot si està associat a anomalies estructurals cerebrals i amb acidosis metabòlica sense causa aparent. Habitualment presenten acidèmia làctica, però en ocasions l'increment d'àcid làctic només és detectable en líquid cefalorraquidi (*Dalh 1995; Brown i col 1994*).

Així doncs, el primer i més important anàlisi de laboratori per reconèixer possibles deficiències de PDH és la valoració de lactat i piruvat en plasma i en líquid cefalorraquidi, amb valors elevats dels dos metabolits donant lloc a una relació lactat/piruvat normal o baixa (*Robinson 2001*).

La valoració de l'activitat enzimàtica de PDHc basal i total o activada (amb inhibició de les PDH quinasa i/o activació de la PDH fosfatasa) i de les subunitats E1 i E3, es realitza habitualment en fibroblasts i múscul, però també es pot valorar en altres teixits o en limfòcits i plaquetes tal i com descriuen alguns autors (*Schofield i col 1980*). Els fibroblasts algunes vegades poden emascarar defectes enzimàtics però, pel fet de ser un teixit viu, ens dóna la possibilitat de realitzar estudis genètics més extensius (*Brown i Sperl 2008*).

Però malgrat la capacitat per a realitzar determinacions de l'activitat enzimàtica, els resultats moltes vegades són difícils d'interpretar, ja que s'han descrit pacients amb un ampli rang d'activitats residuals, així com pacients amb activitats PDHc en fibroblasts i/o múscul dins el rang dels controls. S'observa diferent llindar d'activitat PDHc en funció dels teixits, essent el

cervell el teixit més dependent d'activitat PDHc i això explica el fet que pacients amb activitats residuals molt altes en fibroblasts o múscul presentin encefalopaties.

A l'hora de determinar enzimàticament la subunitat on es localitza la deficiència també hi ha dificultats, ja que sobretot en femelles amb deficiència de *PDHA1* es pot observar activitat normal degut a una inactivació favorable del cromosoma X (*Dalh 1995*).

El diagnòstic diferencial de la deficiència de E3 s'aconsegueix per una activitat reduïda i per un increment en plasma d'amino àcids ramificats i altres metabolits, però s'han descrit també alguns casos on cap d'aquestes alteracions es produeix.

Degut a totes aquestes dificultats diagnòstiques, és indispensable la realització de estudis genètics per tal de confirmar les deficiències de PDHc i localitzar la subunitat afectada.

1.2.3. Tractament de les deficiències del complex piruvat deshidrogenasa

No existeix un tractament totalment eficaç, però s'ha observat certa millora en alguns pacients mitjançant l'administració de cofactors: tiamina, àcid lipoic, carnitina o dicloroacetat i també amb dieta cetogènica.

D'aquests tractaments caldria destacar l'administració de tiamina que ha mostrat molt bons resultats en alguns pacients i quasi cap millora en altres. No s'ha pogut realitzar una correlació entre les mutacions que afecten els pacients i la resposta al tractament amb tiamina. Per tant, es recomana l'assaig de l'administració de tiamina en tots els pacients diagnosticats de deficiència de PDHc. Degut al fet que la tiamina s'uneix a la subunitat E1, s'espera que la seva administració doni bons resultats en les deficiències de PDH-E1 α i de PDH-E1 β , però s'han descrit bones respostes en pacients amb deficiències en altres subunitats, p. ex. E3 (*Elpeleg i col 1995*)

El tractament amb dicloroacetat presenta més controvèrsia. Es tracta d'un inhibidor de les PDH quinases que, per tant, augmenta l'activitat de PDHc provocant que es trobi sempre en la seva forma activada. Això produeix una millora bioquímica però no es tradueix en una millora clínica, a més a més, els efectes secundaris associats a l'administració de dicloroacetat (neuropatia perifèrica) fan que la seva administració sigui molt limitada i poc recomanada.

En alguns casos s'ha obtingut millora clínica amb l'administració d'arginina, que al actuar com a xaperona, permet allargar la vida mitja de l'enzim quan la seva estabilitat està compromesa degut a la mutació (*Silva i col 2008*). Això es dona fonamentalment en les mutacions *missense*.

Per últim, la dieta cetogènica limita el consum de glúcids i per tant la utilització de PDHc, potenciant la obtenció d'energia a partir de les grasses. És eficaç sobretot en pacients amb una activitat residual alta, debut tardà i absència o mínima neuropatia (Robinson 2001), entre

aquest grup cal destacar pacients lleument afectats de deficiència de PDHA1 (E1 α), i pacients de DLD (E3) i DLAT (E2) (*Brown i Sperl 2008*).

2. OBJECTIUS

L'ampli ventall de presentacions clíniques i bioquímiques tant en les deficiències congènites de la glicosilació com en les deficiències de piruvat deshidrogenasa fa que sigui necessari millorar el seu diagnòstic, ampliar la selecció de pacients i aprofundir en els casos ja diagnosticats.

Pel que fa als defectes de la glicosilació de proteïnes, són un grup de malalties relativament noves. Els pacients presenten una gran variabilitat clínica i bioquímica, des de simptomatologies molt severes amb patrons de sialotransferrina molt alterats fins a casos quasi asimptomàtics amb alteracions molt lleus. A més contínuament es descriuen nous tipus de CDG, i es creu que poden estar implicats en aquesta via almenys uns 200 gens (*Jaeken i col 2008*). Per aquests motius és important disposar de les tècniques analítiques necessàries per tal d'aconseguir un ampli cribratge i una fàcil interpretació dels patrons que plantegen dificultats.

D'altra banda, les deficiències de piruvat deshidrogenasa són un grup de malalties que presenten certa complexitat en el diagnòstic bioquímic pel fet que lleus canvis en l'activitat PDHc tenen conseqüències patològiques. Aquesta complicació s'incrementa en les femelles, ja que la majoria de deficiències de PDHc són degudes a mutacions en el gen *PDHA1*, localitzat en el cromosoma X, de manera que en femelles la severitat de la malaltia dependrà del grau de lionització de l'al·lel mutat. A més a més, una mostra àmpliament utilitzada per aquesta determinació enzimàtica són els fibroblasts cultivats, en els quals durant el procés de creixement pot ser que s'afavoreixi l'increment de les cèl·lules sanes, no mutades, respecte a les mutades.

En conseqüència, els **objectius concrets** que ens vàrem proposar són:

- Millorar les tècniques de cribratge pels defectes congènits de la N-glicosilació (CDG).
- Ampliació de la metodologia per l'estudi dels pacients amb patró de sialotransferrines tipus 2.
- Aplicació d'aquestes tècniques a l'estudi de pacients.
- Cribratge en fetus amb malformacions ecogràfiques i avortaments espontanis.
- Ampliació de l'estudi molecular de les deficiències de PDHc.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. DETERMINACIÓ D'ISOFORMES DE SIALOTRANSFERRINA PER IEF MITJANÇANT LA VISUALITZACIÓ DE BANDES EN UN GEL D'AGAROSA

Mostra:

- Sèrum, descartar plasma amb EDTA

Aparells:

- Estufa
- Microones o bany termoestatitzat
- Sistema d'isoelectro enfoc Multiphor (LKB, Estocolm, Suecia)
- Font d'electroforesis amb programa per IEF
- Agitador orbital
- Secador

Reactius:

- Solució per preparar el gel: 0,25 g d'agarosa per IEF, 3 g de sorbitol, 1,65 ml Ampholines Preblended pH 4.0 – 6.5 (Amersham Biosciences). Portar a un volum final de 25 ml amb aigua destil·lada. Des de setembre de 2007 aquest producte està retirat del mercat i actualment utilitzem Ampholyte high resolution pH: 5 – 7 (Sigma-Aldrich)
- Solució d'ànode per elèctrode: àcid glutàmic 0.04 M
- Solució de càtode per elèctrode: hidròxid de sodi 0,5 M
- Solució de destenyir: mesclar 350 ml d'etanol, 100 ml d'àcid acètic i 550 ml d'aigua destil·lada
- Solució de tenyir: 1,16 g/L de Coomassie Brilliant Blue (BioRad), dissolt en solució de destenyir
- Solució d'anticòs anti-transferrina humana: dilució 1:5 amb solució salina (250 µl d'anticòs (policlonal de conill contra transferrina humana, Dako, Dinamarca) + 1250 µl de solució salina per un gel sencer de 265 mm x 125 mm)

Procediment:

Preparació de les mostres:

Utilitzar 50 µl de sèrum, al que s'afegeixen 5 µl de citrat de ferro III per tal de saturar la transferrina amb ferro, 5 µl de bicarbonat de sodi (0.1 M), i finalment diluir la preparació amb

50 µl de solució salina. Deixar saturar la transferrina 30 minuts a temperatura ambient, centrifugar les mostres durant 5 minuts a 24°C i 16.000 x g. Per aplicar la mostra, diluir 10 µl de sobrenadant amb 20 µl de solució salina. Carregar 2 i 5 µl de la mostra diluïda.

Preparació del gel:

Polimeritzar el gel entre dos vidres que deixen un espai entre ells de 0.5 mm mitjançant unes gomes que marquen la separació (Fig. 10).

Preparar la solució del gel, dissoldre la solució d'agarosa i sorbitol al microones, portar-la a 73°C i afegir els Ampholines Preblended. Abocar-la entre els vidres i deixar refredar per tal que polimeritzi.

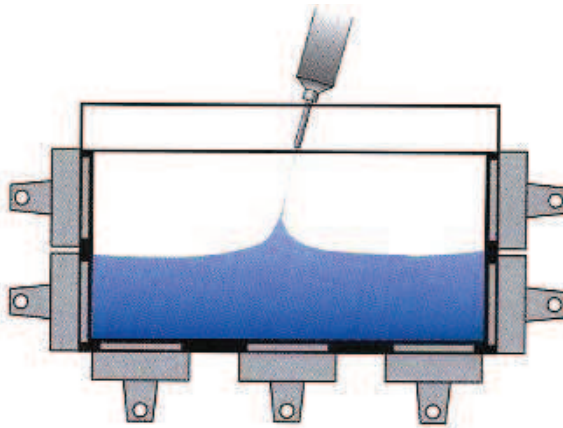


Figura 10. Esquema de l'estructura per la construcció d'un gel d'agarosa

Separació i detecció:

Separar les isoformes de la transferrina de les mostres preparades mitjançant IEF utilitzant el sistema Multiphor (LKB).

Les condicions limitants utilitzades són: 1000 V - 25mA - 8W

Primer fer un prefocusing de 10 minuts, tot seguit carregar 2 i 5 µl de les mostres en sengles pous de sembra, i continuar l'electroforesis durant 45 minuts. Seguidament procedir a la immunofixació aplicant la solució diluïda d'anticòs de conill anti-transferrina humana (DAKO) que s'estén sobre el gel amb una nansa de vidre i deixar-la 2h a 4°C.

Eliminar l'excés d'anticòs mitjançant rentats amb solució salina en agitació orbital durant 17h.

Seguidament precipitar les proteïnes per secat, amb paper Watman amb contacte directe amb el gel i amb pes al damunt durant 30 minuts. Acabar d'assecar amb aire calent.

Per visualitzar les bandes, submergir el gel en solució de tenyir durant 10 minuts amb agitació orbital i seguidament rentar amb solució de destenyir.

3.2. DETERMINACIÓ D'ISOFORMES DE SIALOTRANSFERRINA MITJANÇANT SEPARACIÓ PER HPLC I DETECCIÓ AMB ESPECTROFOTOMETRE UV/V (Helander i col 2003 i 2004)

Mostra:

- Sèrum

Aparells:

- HPLC–Agilent i compartiment per la columna termoestatitzats, acoblat a espectrofotòmetre UV/Vis amb capacitat de lectura a múltiples longituds d'ona, i amb el software ChemStation
- Columna d'intercanvi aniònic SOURCE 15Q (Amersham Biosciences)

Reactius:

- Nitrilacetat de ferro (FeNTA): Solució de àcid nitrilacètic 1mM i clorur de Fe(III) 1mM
- Solució de precipitació de lípids: Barreja de volums iguals de clorur de calci 1 M i dextran sulfat 20 g/L
- Tampó A: bis-tris 10 mM ajustat a pH 7 amb HCl
- Tampó B: bis-tris 10 mM en NaCl 0.5 M, ajustat a pH 6.2 amb HCl
- Tampó C: bis-tris 10 mM ajustat a pH 6.2 amb HCl
- Solució D: NaCl 2M

Procediment:

Preparació de les mostres:

Barrejar sèrum, FeNTA i solució de precipitació de lípids en la proporció 5:1:1. Deixar reposar 30 - 60 minuts a 4°C. Centrifugar les mostres durant 5 minuts a 5°C i a 16.000 x g. Filtrar 130 µl de sobrenadant a través d'un filtre Microcon YM-10 per tal d'eliminar proteïnes i altres molècules de baix pes molecular. Recuperar la fracció no filtrada invertint el filtre i centrifugant, i finalment diluir-la amb aigua MilliQ fins a obtenir un volum final de 260 µl; així obtenim la mostra diluïda 1:1.

Mètode de HPLC:

Volum d'injecció de mostra: 100 µl

El mètode per la separació de les isoformes de la transferrina consisteix en:

Temps (min)	Tampó A	Tampó B	Tampó C	Solució D	Fluxe (ml/min)
0.00	100	0	0	0	1.00
1.00	100	0	0	0	1.00
1.01	0	0	100	0	1.00
30.00	0	20	80	0	1.00
30.01	0	0	0	100	1.00
35.00	0	0	0	100	1.00
35.50	100	0	0	0	1.00
37.00	100	0	0	0	1.00

Detecció i quantificació d'isoformes de transferrina:

La detecció és possible per l'absorbància diferenciada que presenta el complex ferro-transferrina a 460 nm. En aquest longitud d'ona l'absorbància de la transferrina és baixa però específica, i així es pot diferenciar de la resta de proteïnes del sèrum.

La distribució relativa de cada isoforma de transferrina respecte la total, s'expressa mitjançant el percentatge d'àrea sota la corba (%AUC) calculat amb integració de la línia base.

3.3. DETERMINACIÓ D'ISOFORMES DE SIALOTRANSFERRINA MITJANÇANT ELECTROFORESIS CAPILAR (CZE) (Carchon i col 2004)

Mostra:

- Sèrum

Aparells:

- Electroforesis capil·lar P/ACE 5000 system (Beckman- Coulter, Fullerton, CA, USA) equipat amb detector d'absorbància de llum ultravioleta/visible
- Capil·lar de sílica 67 cm x 50µm ID fused-silica capillary (Analisis, Brussel·les, Bèlgica)

Reactius:

- CEofix-CDT kit (Analisis): conté tots els reactius necessaris per la realització de la tècnica:
 - o Rinse: Aigua bidestil·lada
 - o Conditioner: NaOH 0.2 M
 - o Initiator: Tampó TRIS/fosfat pH 2.0
 - o Buffer: Tampó TRIS/ borat pH 8.5
 - o Fe solution Citrat de Fe(III)

Procediment:

Preparació de les mostres :

Barrejar 15 µl de sèrum amb 45µl de solució de ferro del CEofix Kit. La mostra està preparada per analitzar.

Mètode de CZE:

Al iniciar el mètode per la detecció de les isoformes de la transferrina en CZE injectar solució Rinse per rentar el capil·lar i l'injector; seguidament acondicionar la columna amb el pas d'una solució de NaOH; injectar la mostra junt amb un tampó TRIS/fosfat a pH 2.0 i la separació de les isoformes es produeix amb tampó TRIS/borat pH 8.5 i per l'acció d'un voltatge de 28 KV durant 10 minuts.

Detecció i quantificació de les isoformes de transferrina:

La detecció de les diferents isoformes és per l'absorbància a 214 nm. La distribució relativa de cada isoforma de transferrina respecte la total, s'expressa mitjançant el percentatge d'àrea sota la corba (%AUC) calculat amb integració de pic a pic.

3.4. TRACTAMENT DE SÈRUM AMB NEURAMINIDASA PER LA DETECCIÓ DE POLIMORFISMES

En l'anàlisi del patró de sialotransferrina es poden trobar alteracions secundàries degudes a altres patologies (galactosemia, fructosemia, hepatopatia) o a immaduresa, i també degudes a polimorfismes de la transferrina que resultin en una proteïna amb càrrega total diferent. Per tal de descartar un polimorfisme de la transferrina tractem la mostra de sèrum amb neuraminidasa, un enzim que talla els àcids siàlics terminals de les antenes dels glicans. D'aquesta manera elimina les càrregues de les estructures de glicans que ens permeten observar les isoformes, i les úniques càrregues responsables del recorregut de la transferrina seran les pròpies de la cadena peptídica. En una mostra sense polimorfismes tractada amb neuraminidasa s'observa una sola banda en la posició de l'asialotransferrina, en canvi en una mostra portadora d'un polimorfisme en heterozigosi es detecten dues bandes, una a nivell de asialotransferrina i una altra amb un desplaçament diferent, que variarà en funció de la variant polimòrfica.

Mostra:

- Sèrum

Aparells:

- Bany termoregulable

Reactius:

- Solució de neuraminidasa: disoldre 10 unitats de neuraminidasa de *Clastridium perfringens* (Sigma N2876 10 unitats) en 1 ml de 0.1 M Tris pH 7.0

Procediment:

Per aconseguir una completa digestió dels àcids siàlics terminals aplicar 10 µl de la solució de neuraminidasa a 50 µl de sèrum i deixar reaccionant tota la nit a 37°C. Un cop digerit, processar la mostra segons la metodologia de cada tècnica.

3.5. DETERMINACIÓ D'ISOFORMES DE apoC-III PER SEPARACIÓ MITJANÇANT ISOELECTROENFOC, I VISUALITZACIÓ PER WESTERN BLOT AMB REVELAT PER QUIMIOLUMINESCÈNCIA O COLOR (Wopereis i col 2003)

Mostra:

- Sèrum

Aparells:

- Estufa
- Sistema d'isoelectroenfoc (Multiphor)
- Font d'electroforesis
- Agitador orbital

reactius:

- Solució per la preparació gel: disoldre 630 µl de Ampholines Prebended pH 3.5 – 5.0 (Amersham Biosciences) en 9,87 ml d'una solució de urea 8,4 M
- Solució d'ànode per elèctrode: àcid acètic 0.5 M
- Solució de càtode per elèctrode: hidròxid de sodi 0,5 M
- Tampó de transferència: solució de Tris 25 mM amb glicina 192 mM, SDS 0.1 % i 20 % d'etanol
- Solució de rentat: Tween 20 0,1% (v/v) en PBS
- Solució bloquejadora: conté BSA 3% (p/v) i Tween 20 0,1% (v/v) dissolts en PBS
- Solució d'anticòs primari: dilució 1:100 de anticòs de conill anti-apoC-III humana (BioTrend, Alemanya) amb solució bloquejadora
- Solució d'anticòs secundari: dilució 1:1000 d'anticòs anti-IgG de conill marcat amb peroxidasa de rave (Healthcare, Anglaterra) amb solució bloquejadora

Procediment:

Preparació de les mostres:

Sobre una safata de vidre de la mida del gel evocar la solució per la preparació del gel. Tot seguit posar un gel deshidratat (CleanGel®, Amersham Biosciences) al damunt del líquid, procurant que no quedin bombolles. Deixar rehidratar el gel durant 90 minuts a temperatura ambient.

Separació per isoelectroenfoc:

Aplicar directament 2 µl de sèrum sense tractament previ.

Separar les isoformes d'apoC-III de les mostres mitjançant IEF amb el sistema Multiphor

(LKB).

El programa utilitzat és:

Prefocusing:	700 V	12 mA	8 W	20 min
Entrada de les mostres:	500 V	8 mA	8 W	20 min
Isoelectroenfoc	2000 V	14 mA	14 W	90 min
Final	2500 V	14 mA	18 W	10 min

Western blot i detecció:

Un cop acabat l'isoelectroenfoc, transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa, durant 1 hora a 65°C.

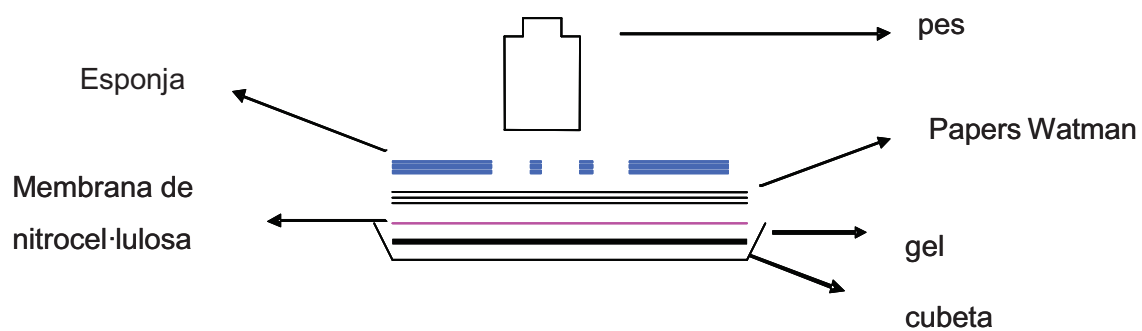


Figura 11. Esquema de la transferència

Deixar la membrana en solució bloquejadora, durant tota la nit a 4°C. Seguidament, eliminar l'excés de proteïna amb solució de rentat.

Incubar-la amb un volum de solució d'anticòs primari suficient per cobrir-la durant 1 hora a temperatura ambient.

Rentar (x3) amb solució de rentat i tot seguit incubar amb solució d'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient.

El revelat es pot realitzar per quimioluminiscència (kit de detecció ECL - Amersham Biosciences) o per color (kit de detecció OPTI-4CN - BioRad, Italia) seguint les indicacions del corresponent fabricant.

3.6. SEPARACIÓ D'OLIGOSACÀRIDS EN ORINA PER CROMATOGRÀFIA EN CAPA FINA (TLC), SEGUIT D'EXTRACCIÓ I IDENTIFICACIÓ DE LA SEVA COMPOSICIÓ

Mostra:

- Orina

Aparells:

- Cubetes per cromatografia
- Placa calefactora
- Columnes Carbograph (BioRad)
- HPLC-MS/MS (Waters 2795 – Quatro micro API)
- GC/MS (HP5890 - Agilent)

Reactius:

- Fase mòbil: mesclar 50 ml de N-butanol, 25 ml d'àcid acètic i 25 ml d'aigua destil·lada
- Solució de revelat: barrejar 5 ml d'àcid sulfúric concentrat amb 50 ml d'una solució d'orcino 16 mM

Procediment:

Separació d'oligosacàrids en l'orina:

Activar les plaques de silicagel 20 x 20 cm (Merck) deixant-les a 85°C durant 30 minuts.

Per obtenir una bona senyal carregar la quantitat d'orina equivalent a 10 µg de creatinina. Degut a la diferent composició de l'orina en els recent nascuts, cal calcular la quantitat necessària d'orina a carregar en funció del valor de creatinina i de l'edat del pacient (*Blom i col 1983*):

Menors de 6 mesos: $7,9 / \text{creatinina } (\mu\text{M}) = \mu\text{l d'orina a sembrar}$

Majors de 6 mesos: $13,6 / \text{creatinina } (\mu\text{M}) = \mu\text{l d'orina a sembrar}$

Un cop activada la placa, sembrar l'orina necessària aplicant-la directament en la línia de sembra (a 2 cm de la base de la placa).

Deixar la placa dins la cubeta que conté la fase mòbil (50 ml de N-butanol + 25 ml d'àcid acètic + 25 ml d'aigua) fins que aquesta hagi recorregut la placa i arribi a la línia superior (3 cm de l'extrem).

Deixar assecar la placa completament i repetir el recorregut de la fase mòbil dues vegades més.

Pel revelat, vaporitzar-la amb solució de revelat i deixar-la 15 minuts damunt una placa calefactors a 100°C (l'operari s'ha de protegir amb una màscara dotada de filtre amb protecció P3).

Extracció dels oligosacàrids:

Un cop separats els oligosacàrids de l'orina per cromatografia en capa fina seguint el procediment anterior, rascar directament de la placa i sense tenyir, la banda que es vol identificar.

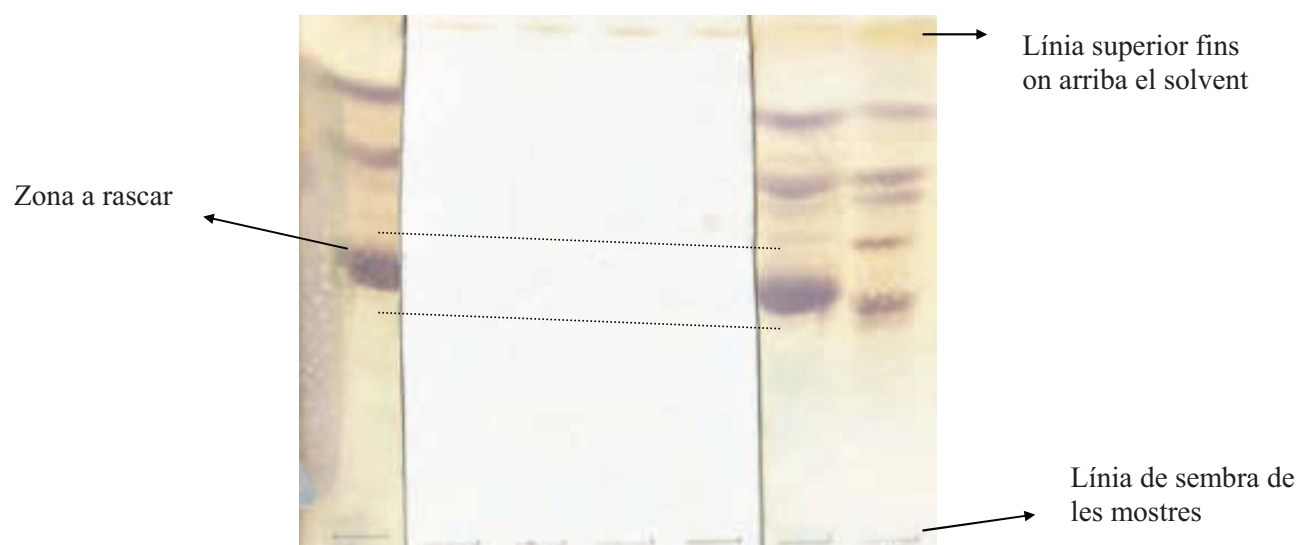


Figura 12. Cromatografia en capa fina per la separació d'oligosacàrids en orina. Es revelen els extrems de la placa per tal de localitzar les bandes que ens interessin i es rasca la zona no tenyida.

Per tal d'extreure els oligosacàrids adherits a la silicagel rascada de la placa, rentar amb aigua:metanol proporció 1:1 amb agitació. Després de cada rentat centrifugar i recollir el sobrenadant que ha de contenir els oligosacàrids.

Evaporar el metanol amb nitrogen, de manera que s'obtingui l'oligosacàrid dissolt en aigua.

Purificar la mostra filtrant-la amb columnes de grafit (Carbograph - BioRad).

Anàlisi del pes molecular de l'oligosacàrid:

Per identificar el pes molecular, analitzar la mostra mitjançant HPLC-MS/MS. Carregar la mostra dissolta en aigua tal i com s'obté de les columnes de Carbograph (Alltech, USA) (veure resultats).

Anàlisi de la composició de l'oligosacàrid:

Hidrolitzar l'oligosacàrid per tal d'obtenir els monosacàrids. Les condicions de la hidròlisis són: a 50 µl de sacàrid dissolt en aigua, afegir 300 µl de butanol-HCl a 85°C i durant 24 hores.

Sililar les mostres per tal que puguin ser detectades per GC-MS. Condicions de la sililació: afegir 150 µl de BSTFA i deixar-ho 30 minuts a 60°C.

Identificar la composició de l'oligosacàrid mitjançant l'anàlisi de la mostra sililada pel sistema de cromatografia de gasos – espectrometria de masses (GC-MS) (veure resultats i discussió 4.2).

3.7. DETERMINACIÓ DE FRUCTOSA EN SÈRUM

Mostra:

- Sèrum

Aparells:

- Espectrofotòmetre

Reactius:

- Tampó Tris/HCl: solució de Tris 90 mM ajustat a pH 6.6 amb HCl
- Estàndard de fructosa: Solució de fructosa 0,25 mM en BSA 40 g/L
- NADH 25 mM
- Àcid perclòric 5,5 M
- Sorbitol deshidrogenasa (Sigma, USA)

Procediment:

Preparació de la mostra:

Desproteïnitzar la mostra mesclant parts iguals d'àcid perclòric 5,5 M i del sèrum a analitzar (100 µl). Centrifugar a 16000 x g a temperatura ambient durant 2 minuts. Utilitzar el sobrenadant com a mostra.

Reacció enzimàtica:

La tècnica consisteix en la valoració de l'oxidació de NADH a partir de fructosa mitjançant l'acció de l'enzim sorbitol deshidrogenasa:

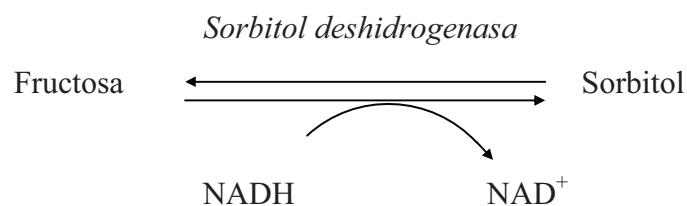


Figura 13. Esquema de la reacció

Per cada mostra a analitzar i per l'estàndard es prepara una cubeta per la reacció i una altra pel blanc.

Cada cubeta conté:

	Estàndard	Sèrum desproteïnit	Tris-HCl	NADH	Sorbitol deshidrogenasa
Estàndard	50 µl	-	445 µl	5 µl	1 µl
Blanc estàndard	50 µl	-	445 µl	5 µl	-
Mostra	-	80 µl	415 µl	5 µl	1 µl
Blanc mostra	-	80 µl	415 µl	5 µl	-

Taula 3. Esquema del contingut de cada cubeta

Es posa a la cubeta l'estàndard o el sèrum, el tampó TRIS-HCl i el NADH i es realitza una primera lectura a 340 nm; quan l'absorbància és estable s'afegeix 1 µl de sorbitol deshidrogenasa i es valora la disminució d'absorbància fins que la lectura torni a ser estable (aproximadament 50 min).

Càlcul de la concentració de fructosa en sèrum:

$$\text{Concentració de fructosa en sèrum} = \frac{(\Delta\text{Abs mostra} - \Delta\text{Abs blanc}) \times V_f}{\epsilon (\text{NADH}) \times V_m} \times 2$$

ϵ (NADH): Coeficient d'extinció del NADH = 6,22

V_f : Volum final a la cubeta = 500 µl

V_m : Volum de mostra o estàndard

Summerfield i col (1993) van establir el valor de fructosa en plasma < 0,27 mM com a valors de referència.

3.8. IMMUNOBLOT DE LES SUBUNITATS DE PDHc

Mostra:

- Homogenat de fibroblasts o múscul.

Aparells:

- MiniProtean, BioRad
- Kit de transferència, BioRad
- Agitador orbital

Reactius:

- Solució de preparació de gel acumulador:

Tris-HCl pH 6,2	0,125 M
Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1	4 %
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,1 %

- Solució de preparació de gel resolutiu:

Tris-HCl pH 6,2	0,375M
Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1	10 %
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,1 %

- Piruvat deshidrogenasa de cor porcí utilitzada com a marcador (Sigma, USA)

- Tampó de càrrega:

Glicerol	15%
SDS	0,45%
2-β-mercaptoetanol	7.5%
Blau de bromfenol	2,4 mM
Tris-HCl pH 6,8	90 mM

- Tampó d'electroforesis: solució de Tris-HCl 25 mM pH 8,3 amb glicina 0.2 M i SDS 0,1 %

- Tampó de transferència: solució de Tris 25 mM amb glicina 192 mM, SDS 0,1 % i d'etanol

20 %

- Solució bloquejadora: solució de PBS amb BSA 3% (p/v) i Tween 20 0,1% (v/v)
- Solució de rentat: Tween 20 0,1% (v/v) en PBS
- Anticòs anti PDHc humana, donat pel Dr W. Ruitenbeek, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Holanda
- Solució d'anticòs secundari: dilució 1:1000 d'anticòs anti-IgG de conill marcat amb peroxidasa de rave (Healthcare, Anglaterra) unit a peroxidasa amb solució bloquejadora

Procediment:

Preparació de les mostres:

La mostra a carregar ha de contenir dues parts d'homogenat per una de tampó de càrrega. La quantitat a carregar al MiniProtean dependrà de la quantitat de proteïna que contingui l'homogenat, amb un volum màxim de 60 µl per pou.

Així doncs, la concentració de proteïna que ens quedarà en la mescla homogenat-tampó de càrrega és de 2/3 de l'inicial.

Per tal de poder interpretar correctament el resultat del western blot, cal que els pous tinguin la mateixa quantitat de proteïna per tal de poder comparar els resultats. Així doncs un cop preparada la mostra calculem quina quantitat n'hauré de carregar als pous per tal de tenir valors de proteïna per pou semblants i per tant comparables.

$$C_f \times V_f = \text{proteïna total al pou}$$

Abans de carregar les mostres cal desnaturalitzar el complex proteic per tal que cada subunitat es desplaci lliurement pel gel, per això aplicar una temperatura de 95°C durant 5 minuts a la mostra ja preparada.

Electroforesis:

Condicions d'electroforesis:

Gel acumulador:	150 V	150 mA
Gel separador:	175 V	150 mA

Procedir a l'electroforesis fins perdre la banda blava del tampó de càrrega, continuar durant 10 minuts més a 200 V.

Transferència:

Transferir les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa per tal de poder fer la detecció de les proteïnes. Treballar amb tots els elements impregnats de tampó de transferència.

El sandwich de transferència consisteix en: esponja – tres papers Watman – membrana de nitrocel·lulosa – gel – tres papers Watman – esponja. La corrent, i per tant les proteïnes es desplaçaran del negatiu al positiu, per tant és essencial posar el gel al costat negatiu i la membrana al costat positiu.

Realitzar la transferència a 4°C, amb agitació i durant una hora a 100 V i 150 mA.

Un cop finalitzada la transferència bloquejar la membrana amb un volum de solució bloquejadora suficient per cobrir-la, durant tota la nit a 4°C. Seguidament, eliminar l'excés de BSA de la solució bloquejadora amb solució de rentat (x3).

Incubar la membrana amb un volum de solució d'anticòs primari suficient per cobrir-la durant 1 hora a temperatura ambient.

Rentar (x3) amb solució de rentat i tot seguit incubar amb solució d'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient.

El revelat es pot realitzar per quimioluminiscència (kit de detecció ECL - Amersham

Biosciences) o per color (kit de detecció OPTI-4CN - BioRad, Italia) seguint les indicacions del fabricant.

3.9. EXTRACCIÓ DE DNA

Mostra:

- Sang entera, fibroblasts, teixits diversos

Aparells:

- Centrifuga

Reactius:

- *Kit* d'extracció de DNA Puregene™ (Gentra Systems) que conté:
 - RBC Lysis Solution
 - Cell Lysis Solution
 - Protein Precipitation Solution
 - DNA Hydration Solution
- Etanol, Merck
- Isopropanol, Merck
- Lauril sulfat sòdic (SDS) 10 %, Sigma-Aldrich
- Proteinasa K
- Hidròxid de sodi (NaCl) 5,5 M, Merck
- Cloroform
- Tampó de lisis d'eritròcits

Procediment:

Extracció de DNA a partir de sang o fibroblasts utilitzant el *kit* Puregene™

Segons les instruccions del fabricant:

Afegir 3 ml de RBC Lysis Solution en un tub Corning estèril que contingui 1 ml de sang entera. Barrejar per inversió, incubar 10 minuts a temperatura ambient i centrifugar a 2000 x g durant 10 minuts més. Eliminar el sobrenadant deixant el pellet amb uns 100 – 200 µl de líquid residual.

El procediment comença aquí quan la mostra per l'extracció de DNA són fibroblasts.

Vortejar el tub vigorosament per resuspendre les cèl·lules. Afegir 1 ml de Cell Lysis Solution, ajudar al trencament cel·lular incubant a 37°C fins que les cèl·lules estiguin lisades. Seguidament afegir 333 µl de Protein Precipitation Solution, vortejar almenys durant 20 segons i centrifugar 10 minuts a 2000 x g.

Recollir el sobrenadant i passar-lo a un tub Corning nou que contingui 1 ml d'isopropanol 100 %. Barrejar per inversió fins a observar el precipitat blanc format per la unió del DNA. Centrifugar durant 3 minuts a 2000 x g, per portar tot el DNA comprimit i localitzat al fons del tub. Eliminar el sobrenadant per decantació. Afegir 1 ml d'etanol 70 %, centrifugar 1 minut a 2000 x g i decantar el sobrenadant.

Deixar evaporar l'etanol restant del precipitat de DNA.

Afegir un volum variable (20 – 200 µl) de DNA Hydration Solution.

Extracció de DNA a partir de teixits

Homogeneïtzar el teixit en un morter amb l'ajuda de bisturí i 300 µl de tampó de lisi d'eritròcits (TLE). Passar l'homogenat a un tub eppendorf i afegir 20 µl de SDS 10 %, vortejar durant 20 segons. Afegir 50 µl de proteinasa K i tornar a vortejar uns altres 20 segons. Deixar la barreja durant tota la nit a 37°C.

L'endemà afegir 100 µl de NaCl 5,5 M i agitar durant 20 segons. Centrifugar 10 minuts a 4.000 x g per tal de precipitar la sal. Passar el sobrenadant a un altre tub i tornar a centrifugar 10 minuts a 4.000 x g.

Recuperar el sobrenadant, afegir 470 µl de cloroform i agitar. Centrifugar 5 minuts a 16.000 x g, passar el sobrenadant a un tub eppendorf nou i afegir 940 µl d'etanol. Agitar vigorosament per inversió fins a obtenir un precipitat blanc de DNA.

Traspassar el precipitat blanc de DNA a un nou tub eppendorf i deixar-lo assecar.

Rehidratar el DNA amb aigua estèril.

3.10. EXTRACCIÓ DE RNA I OBTENCIÓ DE cDNA

Mostra:

- Cultiu fresc de fibroblasts

Aparells:

- Centrífuga d'alta velocitat

Reactius:

- *Kit* d'extracció de RNA QIAshredder i RNeasy, Qiagen (Germany). Conté les solucions RLT, RW1, RPE i H₂O RNase free; i també les columnes QIAshredder i Rneasy
- β -mercaptoetanol, BioRad
- Oligo dT, Roche (Espanya)
- MMLV Transcriptasa reversa, RNase H Minus, Point Mutant, Promega (USA)
- Tampó per transcriptasa reversa, Promega (USA)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Roche
- Aigua estèril

Procediment:

Extracció de RNA:

Segons les instruccions del fabricant:

Afegir 350 μ l de solució d'extracció de RNA formada per RLT amb un 1% de β -mercaptoetanol, barrejar amb la pipeta i passar a la columna QIAshredder. Centrifugar durant 2 minuts a 16.000 x g. El filtrat que s'obté en aquest pas es pot conservar a -80°C .

Afegir sobre el filtrat un volum equivalent d'etanol 100 % (350 μ l), barrejar amb la pipeta i passar a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a 16.000 x g. Descartar el filtrat.

Afegir 700 μ l de RW1 a la columna, centrifugar durant 15 segons a 16.000 x g. Descartar el filtrat.

Canviar el tub col·lector. Afegir 500 μ l de RPE, centrifugar durant 15 segons a 16.000 x g. Descartar el filtrat. Afegir novament 500 μ l de RPE, centrifugar durant 2 minuts a 16.000 x g. Descartar el filtrat. Centrifugar durant 1 minut a 16.000 x g per assecar la columna.

Canviar el tub col·lector. Afegir entre 30 – 50 μ l de aigua RNase free directament sobre el filtre de la columna, deixar rehidratar durant almenys 1 minut. Centrifugar 1 minut a 16.000 x g. El filtrat que s'obté és RNA.

Síntesis de cDNA:

Realitzar una primera reacció per eliminar estructures secundàries que pot formar el RNA. Barrejar 13 µl d'aigua RNase free + 1 µl d'oligo dT + 1 µl de RNA, i incubar-ho a 70°C durant 5 minuts, seguidament clavar en gel durant 5 minuts més.

Afegir a la barreja anterior: 5 µl de tampó per transcriptasa reversa

1 µl de dNTPs

3 µl de aigua RNase free

1 µl de transcriptasa reversa

Amb aquesta mescla realitzar el programa de PCR que anomenem RNATR que consisteix en 1 cicle a 42°C durant 1 h i tot seguit 10 minuts a 70°C per inactivar la reacció. El producte que s'obté és cDNA total.

3.11. CERCA DE MUTACIONS EN EL GEN PMM2 MITJANÇANT REAL-TIME PCR

Mostra:

- DNA

Aparells:

- PCR a temps real Applied Biosystems StepOne Plus (Applied Biosystems, UK) amb el software v2.0
- Centrífuga per plaques ELISA

Reactius:

- SYTO9 verd fluorescent, Invitrogen Molecular Probes (USA)
- Ampli Taq Gold, Applied Biosystems (USA)
- Tampó per Ampli Taq Gold, Applied Biosystems (USA)
- MgCl₂ per Ampli Taq Gold, Applied Biosystems (USA)
- Aigua estèril
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Encebador directe exó 3 (CDG3AS*): 5' TTCCTAGAGGCATTCATTGTG
- Encebador revers exó 3 (CDG3S)*: 5' GTTTTGATTCTTTGCATTCTAAG
- Encebador directe exó 5 (CDG5Ag)[∞]: 5' AGGCTGTTTATCTATGTTGCC
- Encebador revers exó 5 (CDG5Bg)[∞]: 5' CACCAGGCCATATCTTATTT
- Encebador directe exó 8 (CDG8A)*: 5' GAGCACGTGTGGGAGGAC
- Encebador revers exó 8 (CDG8B)*: 5' TCCAGGGTCACATCAGCAAT

*Encebadors dissenyats pel grup de la Dra Belén Perez del CEDEM de Madrid amb qui col·laborem.

[∞]Encebadors dissenyats per nosaltres mitjançant el programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Procediment:

Preparació de la PCR:

- 1 µl de DNA
- 0.22 µl de SYTO9 150 µM
- 0.2 µl Ampli Taq Gold 1 U
- 1 µl tampó per Ampli Taq Gold
- 1,2 µl MgCl₂ per Ampli Taq Gold 25 mM

- 0,2 µl dNTPs 10 mM
- 0,2 µl (x 2) de cada primer 5 µM
- 5,78 µl d'aigua estèril, fins a un volum final de 10 µl

Mètode Real Time PCR:

El mètode pels estudis de corba de *melting* amb l'aparell StepOnePlus™ utilitza la modelitat de 96 pous, quantificació amb comparatiu C_t , SYBR Green com a reactiu per detectar el DNA i la opció de incloure la corba de *melting*.

The screenshot shows the StepOnePlus software interface with the following sections:

- Which instrument are you using to run the experiment?**
 - StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)
 - StepOne™ Instrument (384 Wells)
- What type of experiment do you want to set up?**
 - Quantitation - Standard Curve
 - Quantitation - Relative Standard Curve
 - Quantitation - Comparative C_t ($\Delta\Delta C_t$)
 - Melt Curve
 - Genotyping
 - Presence/Absence
- Which reagents do you want to use to detect the target sequence?**
 - TaqMan® Reagents
 - SYBR® Green Reagents
 - Other
- Which ramp speed do you want to use in the instrument run?**
 - Standard (~ 2 hours to complete a run)
 - Fast (~ 30 minutes to complete a run)

Figura 14. Selecció del mètode a utilitzar amb l'aparell de PCR a temps real StepOne Plus

Programa de PCR:

Condicions del programa de PCR per l'amplificació de les mostres:

- Pas 1: 10 min a 95°C
- Pas 2: 15 segons a 95°C
- Pas 3: 1 min a 60°C
- 40 cicles del pas 2 – 3
- Corba de *melting*: 15 segons a 95°C, baixar a 60°C durant 1 min i tot seguit començar la corba de *melting* incrementant la temperatura de l'ordre de 0,1°C per minut fins arribar als 95°C

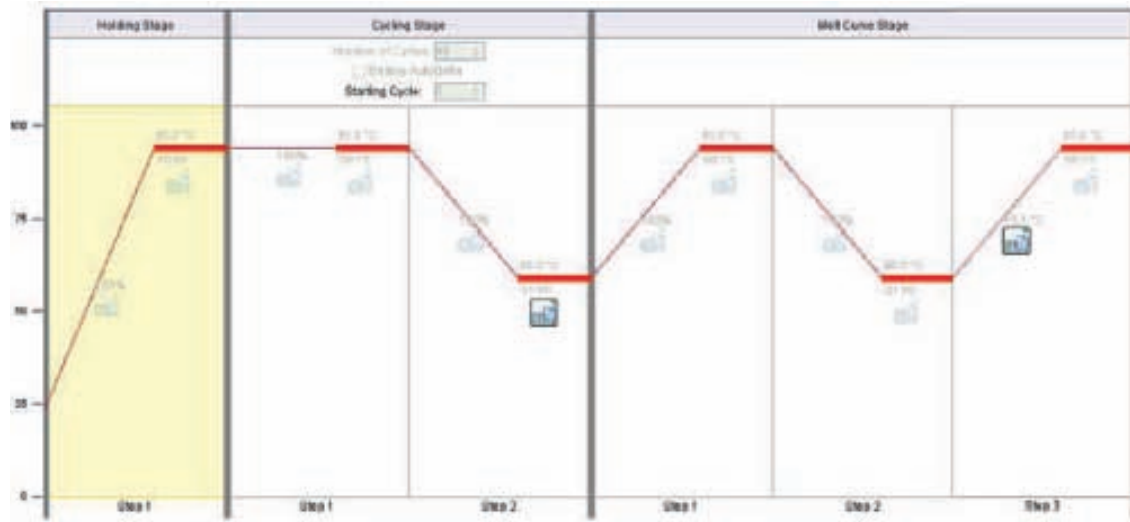


Figura 15. Esquema del programa d'amplificació i de la corba de *melting*

Anàlisi dels resultats:

El software del programa ens dóna la T_m de cada mostra, i la observació del pic.

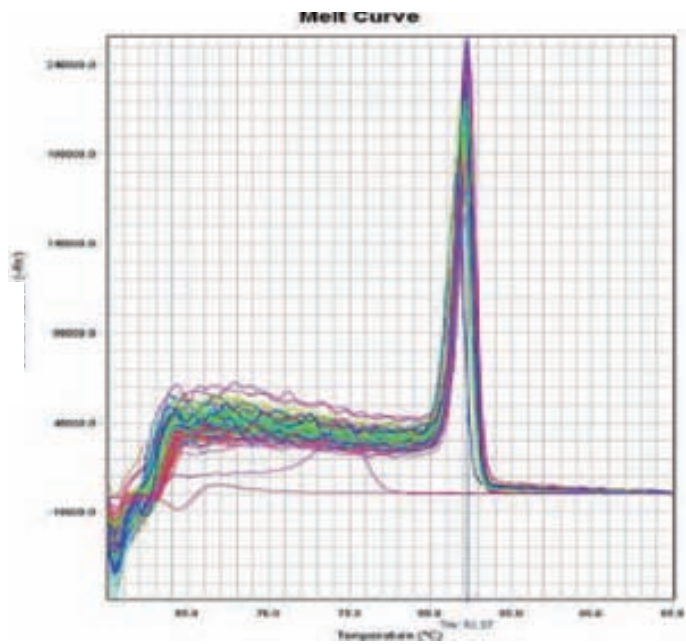


Figura 16. Esquema de l'anàlisi de la corba de *melting*

3.12. CERCA DE MUTACIONS EN EL GEN PMM2 MITJANÇANT PCR CONVENCIONAL

Mostra:

- DNA

Aparells:

- Termociclador MJ Researcher, Inc (USA) o Analytik Jena (Alemanya)
- Sistema d'electroforesis vertical Hoefer Scientific Instrument (San Francisco, CA)
- Sistema d'electroforesis horitzontal GenePhor, Amersham Bioscience
- Centrífuga per eppendorf

Reactius:

- Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- Tampó per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- MgCl₂ per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Encebador directe (D) exó 3 (CDG3AS)*: 5' TTCCTAGAGGCATTCATTGTG
- Encebador revers (R) exó 3 (CDG3S)*: 5'TTTTGATTCTTTGCATTCTAAG
- Encebador directe (D) exó 5 (CDG5Ag)[∞]: 5'AGGCTGTTTATCTATGTTGCC
- Encebador revers (R) exó 5 (CDG5Bg)[∞]: 5' CACCAGGCCATATCTTATTT
- Encebador directe (D) exó 8 (CDG8A)*: 5' GAGCACGTGTGGGAGGAC
- Encebador revers (R) exó 8 (CDG8B)*: 5'TCCAGGGTCACATCAGCAAT
- Aigua estèril
- Tampó de càrrega (Loading Buffer – LB) 20% ficoll, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.05% xilencianol, 0.05% bromfenol dissolts en aigua
- Tampó de càrrega desnaturalitzant (Loading Buffer Formamida – LBF) 20 mM EDTA, 0.05 xilencianol, 0.05% bromfenol, 95% formamida dissolts en aigua
- GeneGel Excel 12,5/24 kit, conté gels d'acrilamida 12.5% per la separació, i gels d'acrilamida 0.6% com a ànode i càtode, GenePhor System, Amersham Bioscience
- Exosap, Roche (Espanya)
- Big Dye, màster mix Ready Reaction Premix Terminator v3.1 AB (USA)
- Tampó Big Dye AB (USA)
- Etanol absolut
- EDTA 125 mM

*Encebadors dissenyats pel grup de la Dra Belén Perez del CEDEM de Madrid amb qui col·laborem.

∞Encebadors dissenyats per nosaltres mitjançant el programa Primer3: (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Procediment:

Preparació de la PCR:

Treballar amb un volum final de 25 µl. Utilitzar condicions diferents per cadascun dels exons, segons els esquemes següents:

Condicions exó 3:

Programa GC60

dNTPs	0,5 µl
Primers: D i R	0,5µl + 0,5 µl
Tampó	2,5µl
MgCl ₂	2 µl
Aigua estèril	17,85 µl
Taq polimerasa	0,15 µl
DNA	1 µl

Condicions exó 5:

Programa GC60

dNTPs	0,5 µl
Primers: D i R	0,5 µl + 0,5 µl
Tampó	2,5 µl
MgCl ₂	2.5 µl
Aigua estèril	17,35 µl
Taq polimerasa	0,15 µl
DNA	1 µl

Condicions exó 8:

Programa GC60

dNTPs	0,5 µl
Primers: D i R	0,5 µl + 0,5 µl
Tampó	2,5 µl
MgCl ₂	1 µl
Aigua estèril	18,85 µl
Taq polimerasa	0,15 µl
DNA	1 µl

Passos del programa GC60:

1. 5 min a 95°C
2. 30 segons a 95°C
3. 40 segons a 60°C
4. 35 cicles dels passos 2 + 3
5. 3 min a 72°C

Comprovació de la PCR:

Un cop realitzada la PCR comprovar que les bandes s'han amplificat correctament corrent 5 µl de producte de PCR amb 3 µl de tampó de càrrega (LB) en un gel d'agarosa al 2%. La observació de les bandes s'aconsegueix per intercalació de bromur d'etidi en el DNA i observació en llum UV.

Detecció de canvis en la seqüència amplificada:

Utilitzar la tècnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism) per detectar si hi ha algun canvi (polimòrfic o mutació) en el fragment que s'ha amplificat. La tècnica de SSCP consisteix en desnaturalitzar i analitzar la conformació de plegament que adquireixen al separar-se les dues cadenes de DNA amplificades. L'anàlisi es realitza amb un gel d'acrilamida de mida variable. El sistema de Hoefer Scientific Instrument (gel 24 cm) permet una millor separació de les conformacions adquirides per les cadenes durant el plegament, però requereix una separació de 15 – 22 hores. La tècnica de SSCP també es pot realitzar en el sistema GenePhor, on els gels tenen una longitud de 11 cm, i aplicant un voltatge de 600 V s'aconsegueix la separació en 1 h i 45 min.

Independentment del tipus de gel on es realitzi el SSCP, el tractament de les mostres consisteix en mesclar la mateixa quantitat de producte de PCR que de tampó de càrrega

desnaturalitzant (LBF) (1:1), incubar la mescla a 95°C durant almenys 3 minuts per desnaturalitzar la doble cadena de DNA, i seguidament refredar en gel almenys 3 minuts.

Carregar 14 µl de la mescla en el gel d'acrilamida si es treballa amb el sistema de Hoefer, i 6 µl amb el sistema GenePhor.

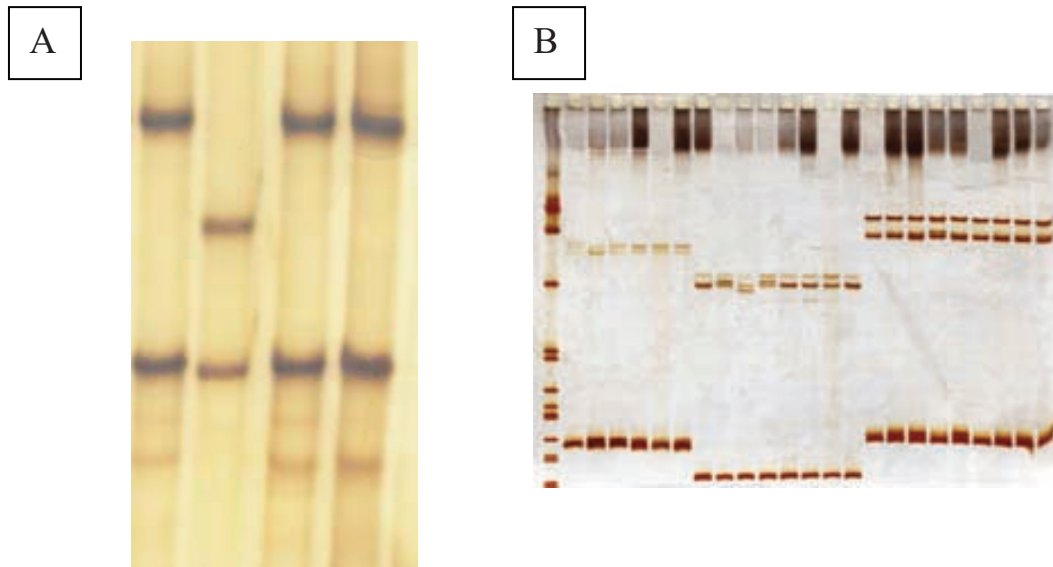


Figura 17. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) en el sistema Hoefer (A) i en el sistema GenePhor (B)

Les bandes obtingudes es visualitzaran amb tinció de plata:

- Fixació amb etanol 10% durant 5-10 min
- Oxidació amb àcid nítric 10% durant 3 min
- Rentat ràpid amb aigua destil·lada
- Tinció amb solució de nitrat de plata 2% durant 20 min
- Rentat ràpid amb aigua destil·lada
- Revelat amb solució de Na_2CO_3 fins a obtenir una òptima visualització de les bandes
- Aturar la reacció de revelat amb àcid acètic 10% durant 5 min

Procediment de seqüenciació:

Per preparar el producte de PCR que es vol seqüenciar, seguir el protocol següent:

• ExoSap:

- Transferir 5 µl del producte de PCR a un tub eppendorf de 0.5 ml.
- Afegir 2 µl d'ExoSap (USB, Amersham Biosciences); aquesta solució comercial conté dos enzims: exonucleasa I, que degrada els fragments de DNA de cadena senzilla

(encebadors), i fosfatasa alcalina, que hidrolitza els dNTPs.

- Posar els tubs al termociclador amb un programa que consisteix en una incubació a 37°C durant 25 min i a 80°C durant 15 min.
- Reacció de seqüenciació:
 - Afegir als tubs que contenen el producte de PCR + ExoSap: 2 µl de BigDye Sequencing Buffer, 6 µl d'aigua estèril, 1 µl d'encebador 5 mM i 4 µl de Ready Reaction Premix (*Kit* de seqüenciació BigDye Terminator v3.1). Mantenir els tubs en gel i a la foscor.
 - Posar els tubs al termociclador amb un programa que consisteix en: 30 seg a 96°C, 15 seg a 55°C i 60 seg a 60°C repetir aquest cicle 28 vegades. Un cop finalitzat el programa es guarden les mostres protegides de la llum i a 4°C.
- Precipitació del producte de seqüenciació:
 - Posar el producte de seqüenciació en un nou tub eppendorf de 0.5 ml.
 - Afegir 5 µl d'EDTA 125 mM i 60 µl d'etanol absolut en fred.
 - Precipitar 15 min en gel.
 - Centrifugar a 16.000 x g durant 15 min a temperatura ambient (24°C).
 - Eliminar el sobrenedant amb compte de no arrossegar el precipitat.
 - Rentar el precipitat amb 60 µl d'etanol al 70% en fred.
 - Centrifugar a màxima velocitat durant 2 min a temperatura ambient (24°C).
 - Eliminar el sobrenedant.
 - Deixar assecar els precipitats a temperatura ambient.

Un cop fet això, les mostres s'envien a la Unitat de DNA de l'Hospital Clínic de Barcelona on es disposa d'un seqüenciador ABI Prism® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.13. CERCA DE MUTACIONS EN EL GEN PDHA1 EN DNA GENÒMIC

Mostra:

- DNA

Aparells:

- Termociclador MJ Researcher, Inc (USA) o Analytik Jena (Alemanya)
- Sistema d'electroforesis vertical Hoefer Scientific Instrument (San Francisco, CA)
- Centrífuga per eppendorf

Reactius:

- Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- Tampó per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- MgCl₂ per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Aigua estèril
- Tampó de càrrega (Loading Buffer – LB) 20% ficoll, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.05% xilencianol, 0.05% bromfenol dissolts en aigua
- Tampó de càrrega desnaturalitzant (Loading Buffer Formamida – LBF) 20 mM EDTA, 0.05% xilencianol, 0.05% bromfenol, formamida 95% dissolts en aigua
- Exosap, Roche (Espanya)
- Big Dye, màster mix Ready Reaction Premix Terminator v3.1 AB (USA)
- Tampó Big Dye AB (USA)
- Etanol absolut
- EDTA 125 mM
- Encebadors, dissenyats per nosaltres mitjançant el programa Primer3: (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), descrits en la següent taula.

Fragment	Encebador directe	Encebador revers
Exó 1	5'- AGCGCATGACGTTATTA	5'- CCACTCGCGCCCCATCC
Exó 2	5'- ATGAATATGTTGGGGC	5'- TATCAGAGTGTACCTGTGA
Exó 3	5'- TGTGGAGGATAATAACTACC	5'- CCACCACAAACCTACC
Exó 4	5'- TTGCCTCATAGTTTCTCC	5'- AATCCACGCATTTCCCC
Exó 5	5'- GCTTTGTAGAGTTGGTTTG	5'- AATCTAAAGCAGCACAC
Exó 6	5'- TGTGGTTCCTTTCTCG	5'- TAAGACTGTTTTTGGG
Exó 7-8	5'- AGATGATGAAGCCTGGAGAA	5'- ATGGGAGGCAGTCTTTAAC
Exó 9	5'- CTCAGTCATCGTTC	5'- TTCAAAGCCCACCCC
Exó 10	5'- TCTACTGGAAGTCTGCTC	5'- TTCAAACCACCATGAC
Exó 11	5'- CTTTTACACTGTTACCTA	5'- ACTGTCTGGTAGCCC

Taula 4. Recull dels encebadors utilitzats per cada exó

Procediment:Preparació de la PCR:

Es treballa amb un volum final de 25 µl incloent 1 µl de DNA. S'utilitzen condicions diferents per cadascun dels exons, segons es descriu en la taula següent:

Fragment	dNTP	Encebadors	Tampó	MgCl₂	DMSO	Taq	Aigua	Programa
PDH1	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1	-	0,15	18,85	GCDE53
PDH2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	3	2,5	0,15	14,35	GCDE8
PDH3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	-	0,15	17,85	P5530
PDH4	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	-	0,15	17,85	P5530
PDH5	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	-	0,15	17,85	P5528
PDH6	0,5	0,5 + 0,5	2,51	2	-	0,15	17,85	P5030
PDH7-8	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	2,5	0,15	15,35	P5528
PDH9	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	-	0,15	17,85	P5530

Fragment	dNTP	Encebadors	Tampó	MgCl₂	DMSO	Taq	Aigua	Programa
PDH10	0,5	0,5 + 0,5	2,5	3	2,5	0,15	14.35	P5030
PDH11	0,5	0,2 + 0,5	2,5	1,5	-	0,15	18.65	P4526

Taula 5. Resum de les condicions de PCR utilitzades per l'amplificació de cadascun dels exons.

Totes les unitats corresponen a µl.

Descripció dels programes utilitzats per la PCR:

Nom	t a 95°C	T annealing	t annealing	t a 72°C	Cicles
GCDE53	40''	53°C	30''	-	35
GCDE8	40''	50°C	30''	-	30
P5530	40''	55°C	30''	-	28
P5528	40''	55°C	30''	-	30
P5030	40''	50°C	30''	-	30
P4526	40''	45°C	30''	-	26

Taula 6. Descripció dels programes de PCR

t: temps

T: temperatura

Tots els programes comencen amb una desnaturalització a 95°C durant 5 minuts i finalitzen amb una extensió de 3 minuts a 72°C.

A partir d'aquest punt, realitzar la comprovació de la PCR, la detecció de canvis i la seqüenciació tal i com s'indica en l'apartat 3.12.

3.14. CERCA DE MUTACIONS EN ELS GENS DE LES DIFERENT SUBUNITATS DE PDHc: PDHA1 (PDHE1 α), PDHB (PDHE1 β), DLAT (PDH-E2), DLD (PDH-E3) I PDHX (E3BP)

Mostra:

- cDNA

Aparells:

- Termociclador MJ Researcher, Inc (USA) o Analytik Jena (Alemanya)
- Centrífuga per eppendorfs

Reactius:

- Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- Tampó per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- MgCl₂ per Taq polimerasa, Roche (Espanya)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Aigua estèril
- Tampó de càrrega (Loading Buffer – LB) 20% ficoll, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.05% xilencianol, 0.05% bromfenol dissolts en aigua
- Exosap, Roche (Espanya)
- Big Dye, màster mix Ready Reaction Premix Terminator v3.1 AB (USA)
- Tampó Big Dye AB (USA)
- Etanol absolut
- EDTA 125 mM
- Encebadors, dissenyats per nosaltres mitjançant el programa Primer3: (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), descrits en la següent taula.

NOM FRAGMENT	ENCEBADOR DIRECTE	ENCEBADOR REVERS
PDH1	5'- CTCCTGGGTTCTGAGGAGTC	5'- AGCACAACCTCCTTTTCGTC
PDH2	5'- ACCCCACAGACCATCTCATC	5'- ACAATAGGCAGCAGCAAACC
PDH3	5'- ACTGCCTGTGCTTCATGAG	5'- TGCATGCAATTGCTACCTGC
PDHB1	5'-CGGATAGAGGACACGACCAA	5'-TGTTATCCCGAATGGCTGAT
PDHB2	5'-AGTGCTTTGCTGCCTGGTAT	5'-TTGCAAATATGATGTCTTTGACC
PDHB3	5'-GAGGCTGGCCACAGTTTG	5'-TTCATGAGGACTCTGCCACA
DLAT1	5'-GTTGGTTTTGGGGTGTGG	5'-TCCCTGGTACCTTCAGCAAC
DLAT2	5'-GTTGGATTTGAGAGCCTGGA	5'-CGAATGTTGCTGATTGGGATA
DLAT3	5'-CTCCCACAGGTCCTGGAAT	5'-GAAGCACCAATTGCCAAAAT
DLAT4	5'-TCTCCAATTTAGGAATGTTTGGA	5'-GCTAGGCAAGGCCACATACA
DLD1	5'-GACGTAGGCTGCGCCTGT	5'-CAAGCGAACTTCGGACATTT
DLD2	5'-CATATGGCCCATGGAAAAGA	5'-TTGGTAGCACCAGTAACCTTTG
DLD3	5'-ACGCATCCTTCAAAAACAGG	5'-CAGCACCTGGTCCAAGAATA
DLD4	5'-AGATGGCATGGTGAAGATCC	5'-GCTCCAGCCATGTAAAATTCA
PDHX1	5'-GGGCAGCCAGTGAGAAGG	5'-GGGCAGCTGGACTTAAACG
PDHX2	5'-CCAAAGACGTAGGTCCTCCA	5'-CTCCAAGGTCACAGTCAGCA
PDHX3	5'-TCGAAGAGTTATTGCCAAGAGA	5'-TCAGCACAGGTCGGAACC
PDHX4	5'-TGGCATCGACGAATTTACTG	5'-GCACCAGAGGTTAAAAATGGA

Taula 7. Recull d'encebadors utilitzats per l'amplificació de cada fragment

De tots els encebadors es prepara una solució mare a una concentració de 100 µM, i a es dilueix a 20 µM per la PCR.

Es treballa amb un volum final de 25 µl incloent 1µl de cDNA. S'utilitzen condicions diferents per cadascun dels fragments, segons es descriu en la taula següents:

Fragment	dNTP	Encebadors	Tampó	MgCl₂	DMSO	Taq	Aigua	Programa
PDH1	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1	-	0,15	18,85	NPC20
PDH2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1,5	-	0,15	18,35	NPC20
PDH3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1,5	-	0,15	18,35	NPC20
PDHB1	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	2,5	0,15	17,35	NPC20
PDHB2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
PDHB3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	2,5	0,15	15,35	GC60
DLAT1	0,5	0,7 + 0,5	2,5	1	2,5	0,15	16,15	NPC20
DLAT2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
DLAT3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
DLAT4	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
DLD1	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1,5	2,5	0,15	15,85	NPC20
DLD2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
DLD3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20
DLD4	0,5	0,5 + 0,5	2,5	2	2,5	0,15	15,35	NPC20
PDHX1	0,5	0,5 + 0,5	2,5	1,5	2,5	0,15	15,85	NPC20
PDHX2	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC19
PDHX3	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	2,5	0,15	17,35	NPC20
PDHX4	0,5	0,5 + 0,5	2,5	-	-	0,15	19,85	NPC20

Taula 8. Condicions de PCR de cada fragment

Totes les unitats corresponen a µl.

En les reaccions de PCR on no s'afegeix MgCl₂, es treballa amb el tampó de PCR amb MgCl₂ incorporat, la concentració del qual equival a un volum de 1,5 µl de la solució de MgCl₂.

Descripció dels programes utilitzats per la PCR:

Nom	t a 95°C	T annealing	t annealing	t a 72°C	Cicles
NPC20	45''	60°C	1'	1'15''	35
GC60	40''	60°C	30''	-	30
NPC19	45''	62°C	1'	1'	35

Taula 9. Descripció dels programes de PCR

t: temps

T: temperatura

Tots els programes comencen amb una desnaturalització a 95°C durant 5 minuts i finalitzen amb una extensió de 3 minuts a 72°C.

Seguidament la PCR es comprova i es seqüència directament tal i com es descriu en l'apartat 3.12.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. MILLORA DE LES TÈCNiques DE CRIBRATGE PELS DEFECTES CONGÈNITS DE LA GLICOSILACIÓ (CDG)

4.1.1. Substitució dels gels d'acrilamida per gels d'agarosa

Inicialment, la metodologia utilitzada pel cribratge dels defectes de la glicosilació va ser la separació per isoelectroenfoc de les isoformes de la transferrina (Tf-IEF), fixació amb anticòs i tinció amb Coomassie. Com s'ha comentat en la introducció, aquest és el mètode més utilitzat universalment i el que fins el moment s'utilitza com a mètode de referència.

Abans de començar aquesta tesis, en el nostre laboratori es realitzava el Tf-IEF amb gels d'acrilamida (PAGE plate Pharmacia, rang de pH 4.0 – 6.5). La primera millora va ser la **introducció de Tf-IEF amb gels d'agarosa**. Encara que els gels d'acrilamida permeten una millor separació, especialment entre les bandes tetrasialo i trisialotransferrina, els gels d'agarosa aconseguen una millor eliminació del color de fons de les restes de Coomassie, millorant la visualització de les bandes; i a més a més, la preparació dels gels d'agarosa es realitza al mateix laboratori, reduint el cost de la tècnica.

El resultat de la tècnica de IEF és la visualització de les bandes corresponents a les diferents isoformes de la transferrina separades en funció de la seva càrrega, que depèn del nombre d'àcids siàlics que contenen. Com ja s'ha esmentat, la transferrina conté dos punts de glicosilació on s'uneixen les estructures biantenals de glicans i a l'extrem de cadascuna d'aquestes antenes es troba un àcid siàlic, que està carregat negativament. Si hi ha alguna alteració de la via de la glicosilació es traduirà en una mancança o incorrecte formació d'aquestes antenes, i per tant dels àcids siàlics terminals, la qual cosa alterarà el patró de bandes d'IEF, i ens alertarà de que el pacient té un defecte de glicosilació.

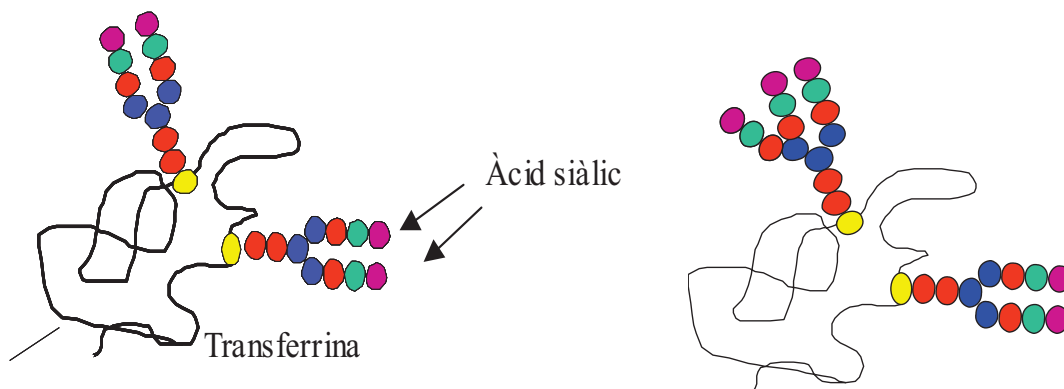


Figura 18. Esquema de la transferrina glicosilada. La isoforma més abundant és la tetrasialotransferrina, però també existeixen antenes més ramificades que donen lloc a les isoformes amb més siàlics.

Segons el tipus de defecte que pateixi el pacient podem trobar aquests diferents tipus de patrons de bandes:

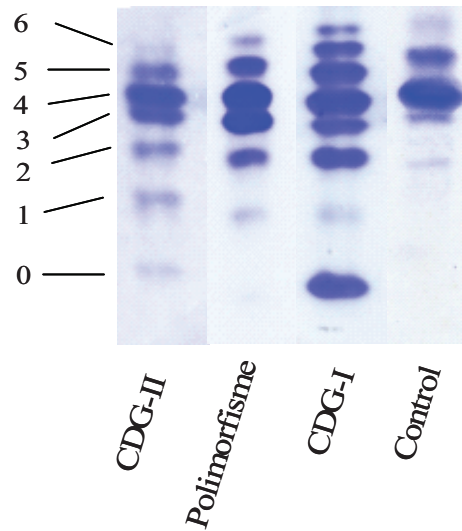
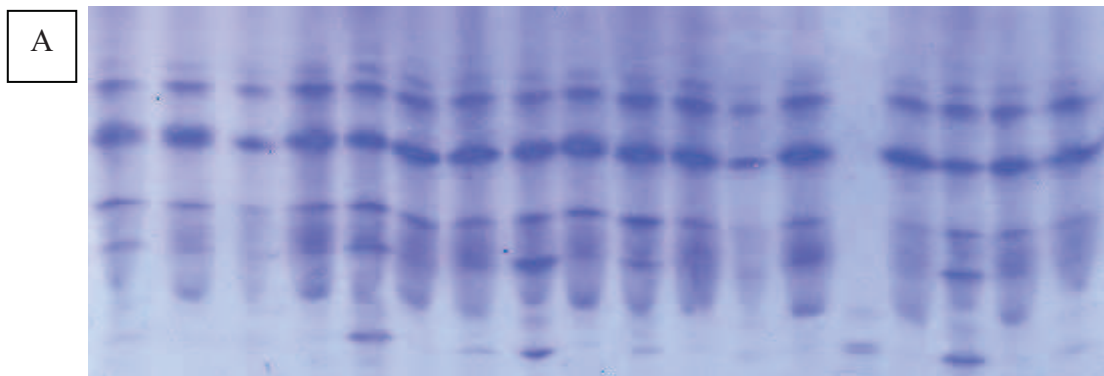


Figura 19. Diferents patrons d'isoformes de transferrina. Els números indiquen el nombre d'àcids siàlics que conté cada isoforma.

Com a control intern de la tècnica, en cada gel posem una mostra amb patró alterat.

Amb la incorporació de la tècnica esmentada vam obtenir uns gels amb menys soroll de fons i que faciliten la interpretació dels patrons.



Gel d'acrilamida, rang de pH 4.0 – 6.5



Gel d'agarosa, rang de pH 4.0 – 6.5

Figura 20. A) Gel d'acrilamida. B) Gel d'agarosa

Les bandes dels gels es poden quantificar per densitometria, tot i que els valors obtinguts no sempre s'ajusten bé al que s'observa en el gel. Això es deu al fet que les bandes no estan homogèniament tenyides i, depenent del lloc per on passi el lector de densitat òptica, reconeixerà més o menys saturació de color. D'altra banda, quan la quantitat de proteïna és molt elevada, sovint es produeix un error en la tinció i apareix una banda blanca a l'interior de la banda tenyida, que el densitòmetre interpreta com a falta proteïna (Fig. 21).



Figura 21. Exemple d'una banda molt abundant de tetrasialotransferrina que, degut a la gran quantitat de proteïna, es tenyeix malament donant lloc a una banda blanca que altera la quantificació per densitometria.

Tot i els inconvenients de la quantificació de les bandes per densitometria, la introducció dels gels d'agarosa en lloc dels de poliacrilamida, ens va permetre establir els següents valors de referència:

	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo	Tetrasialo	Pentasio
Controls n=30	0 - 4	0 - 10	2 - 12	8 - 18	40 - 65	18 - 33
CDG-I n = 5	nd - 20.8	nd - 3.2	19.9 -35.4	4.7 -12.7	23.5 -43.5	9.5 - 23.5
CDG-II n = 3	nd - 0.5	nd - 3.2	5.2 - 24.6	24.2 - 31.1	29.6 - 38.8	15.9 - 20.1

Taula 10. Valors de referència (expressat en % del total de transferrina) obtinguts quantificant les bandes de les isoformes de la transferrina per densitometria.

Degut a les dificultats de quantificació de les bandes per densitometria que plantegen tant els gels d'acrilamida com els d'agarosa, la interpretació dels resultats normalment es fa valorant qualitativament (*de visu*) el conjunt de bandes. Aquesta interpretació moltes vegades és molt subjectiva i es fa especialment difícil davant d'un patró patològic lleu, o d'un patró amb anormalitats inespecífiques. Això ens va fer cercar noves metodologies que poguessin facilitar la interpretació dels resultats.

4.1.2. Millora de l'objectivitat de la metodologia de cribratge introduint dues tècniques semi-automàtiques i quantitatives: HPLC i Electroforesi Capilar (CZE)

Tot i que el mètode més utilitzat per la determinació d'isoformes de la transferrina pel diagnòstic de CDG continua essent el IEF, cada vegada tenen més protagonisme els mètodes semi-automàtics i quantitius, com són el HPLC i la CZE.

Degut a la gran varietat de presentacions clíniques que podem trobar dins el grup dels defectes congènits de la glicosilació, l'ampliació del cribratge és important per poder detectar aquelles presentacions clíniques no descrites fins al moment. Per tal de facilitar aquest cribratge són molt adequats els mètodes semi-automàtics que redueixen el temps que el personal de laboratori dedica a la tècnica.

A més a més, la quantificació dels pics mitjançant HPLC i CZE permet més objectivitat a l'hora d'interpretar el resultat, i és útil sobretot en els patrons lleugerament alterats, difícils de reconèixer en els gels de IEF.

Per intentar resoldre aquest problema vàrem implementar aquestes dues tècniques semi-quantitatives: **detecció de isoformes de la transferrina mitjançant HPLC i electroforesi capilar (CZE), amb detector UV/Vis.**

Aquest treball s'ha realitzat en el marc de dos projectes, un del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) a nivell espanyol i d'un projecte europeu "Euroglycanet", i en col·laboració entre l'Institut de Bioquímica Clínica i l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Inicialment en els dos centres es realitzava el cribratge de les CDG mitjançant Tf-IEF, però en ambdós s'ha optat per posar a punt tècniques semi-quantitatives. Primerament vam implamentar la detecció d'isoformes de la transferrina mitjançant HPLC a l'Institut de Bioquímica Clínica. Posteriorment a l'Hospital Sant Joan de Déu es va posar a punt la seva detecció mitjançant electroforesi capil·lar (CZE). La validació d'aquests mètodes, les modificacions fetes respecte els mètodes prèviament descrits i els avantatges que ha suposat la seva implementació, així com l'estudi comparatiu dels tres mètodes dels que disposàvem (Tf-IEF, Tf-HPLC i Tf-CZE), han estat publicats en sengles articles:

Article 1:

Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Quintana E, Navarro-Sastre A, Hernández-Pérez J M, García-Villoria J, Montero R, Artuch R, Ribes A, Briones P. Clin Biochem 2009;42:408-15.*

Article 2:

Comparison between HPLC and capillary zone electrophoresis procedures for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation syndromes. *Quintana E, Montero R, Casado M, Navarro-Sastre A, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009;877:2513-18.*

SÍNTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ (ARTICLE 1)

Per a la implantació de l'HPLC com a tècnica analítica pel diagnòstic dels CDGs hem utilitzat el mètode descrit per Helander i col (2003) amb modificacions. Per obtenir un perfil més definit de les isofomes de transferrina hem eliminat substàncies de pes molecular inferior a 10 KDa mitjançant la filtració a través dels filtres Microcon 10-YM i hem diluït la mostra 1:1 amb aigua destil·lada en comptes de 5 vegades com proposava Helander.

Hem realitzat un estudi econòmic per demostrar l'interès d'aplicar tècniques semi-automàtiques en els laboratoris assistencials. Tot i que el sistema de HPLC resulta molt més car que el de IEF, és un aparell de ampli ús en el laboratori que pot ser utilitzat per altres tècniques. Per altra banda els reactius utilitzats pel Tf-IEF i sobretot el temps de dedicació del personal de laboratori fan que el preu per mostra resulti un 50% més car amb Tf-IEF que amb Tf-HPLC.

Hem validat aquesta tècnica, comprovant que tots els patrons que prèviament havíem detectat com a alterats per Tf-IEF (pacients de CDGs, alteracions secundaries o polimorfismes de la transferrina) presentaven un patró anòmal amb la tècnica de l'HPLC i uns valors de %AUC de les isoformes de la transferrina fora del rang control. Fins i tot patrons molt lleument alterats, difícils de detectar per Tf-IEF, mostren uns valors fora del rang control per Tf-HPLC, reforçant el fet que la quantificació millora el diagnòstic.

Hem analitzat mostres de plasma amb EDTA, que són les mostres procedents de sang que més usualment rebem al laboratori però no són vàlides pel Tf-IEF degut a que l'EDTA produeix unes modificacions en el perfil de sialotransferrina. Per HPLC observem l'aparició d'un pic extra degut a l'EDTA però que no es superposa amb cap de les isoformes de la transferrina. Així doncs, amb la tècnica de l'HPLC les mostres de plasma amb EDTA també es poden utilitzar pel diagnòstic.

Hem estudiat també mostres de pacients amb malalties que secundàriament alteren el patró de transferrina donant lloc a un patró tipus 1, com són la intolerància hereditària a la fructosa i la galactosemia. Quan els pacients amb intolerància hereditària a la fructosa fan un mal seguiment de la dieta queda palès amb l'aparició d'un patró més o menys alterat de sialotransferrines, que es manté alterat durant aproximadament un mes, temps de vida mitja

de la transferrina.

Pels motius ja esmentats podem concloure que la implementació de la determinació d'isoformes de la transferrina mitjançant HPLC ha significat una millora en el diagnòstic dels CDG ja que permet una millor objectivitat a l'hora d'interpretar els resultats, i ha demostrat una gran sensibilitat per detectar patrons lleument alterats. A més a més, al ser un mètode semi-automàtic permet analitzar més mostres amb menys dedicació del personal de laboratori, i per tant redueix el cost de la tècnica.

SÍNTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ (ARTICLE 2)

L'estudi comparatiu entre el Tf-HPLC i Tf-CZE mostra una correlació molt bona entre els valors obtingut en la quantificació de totes les isoformes de la transferrina excepte per la disialotransferrina, ja que mitjançant la tècnica de HPLC, obtenim uns valors significativament més elevats que obliguen a establir diferents rangs de referència per cadascuna de les dues tècniques pel que fa a aquesta isoforma, mentre que per la resta d'isoformes és suficient amb un únic rang.

Al comparar els resultats obtingut pels mètodes quantitius respecte el Tf-IEF, observem que la capacitat de detecció de patrons lleument alterats és més alta pels mètodes semi-quantitatius que pel mètode de IEF, el que dona més seguretat en els diagnòstics.

Els polimorfismes en la seqüència proteica de la transferrina són causes secundàries d'alteració del patró de sialotransferrines que podrien interferir en el diagnòstic dels CDGs, per això hem analitzat sèrums amb diferents tipus de polimorfismes, que havien estat estudiats per IEF, obtenint una bona detecció de la variant CD tant per HPLC com per CZE, i una incapacitat per la detecció de les variants C₁C₂ i CD₄₋₅. Però pel que fa a dos variants CB, indistingibles entre elles per Tf-IEF, observem dos perfils clarament diferenciables per Tf-CZE, mentre que per HPLC una de les variants presenta un patró clarament alterat i l'altre mostra un patró amb alteracions molt lleus, quan ho analitzem amb el nostre mètode (*Quintana et al 2009*), i indistingible d'un patró control quan apliquem estrictament el mètode de Helander (*Helander i col 2004*) sense filtrar la mostra.

Tal com ja havien senyalat altres autors pel control de tractament de pacients alcohòlics, la quantificació de la disialotransferrina és especialment important a l'hora de detectar patrons alterats, tant de tipus 1 com de tipus 2. Els dos mètodes quantitius als que fem referència, HPLC i CZE, han mostrat una gran sensibilitat per la quantificació d'aquesta isoforma.

Amb tot això, el mètode de detecció d'isoformes de la transferrina mitjançant CZE ha demostrat ser útil pel nostre objectiu de diagnosticar els defectes congènits de la glicosilació.

Article 1:

Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF).

Quintana E, Navarro-Sastre A, Hernández-Pérez J M, García-Villoria J, Montero R, Artuch R, Ribes A, Briones P.

Clin Biochem 2009;42:408-15.

Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF)

Ester Quintana^a, Aleix Navarro-Sastre^{a,c}, José María Hernández-Pérez^a, Judit García-Villoria^{a,c}, Raquel Montero^{b,c}, Rafael Artuch^{b,c}, Antonia Ribes^{a,c}, Paz Briones^{a,c,d,*}

^a *Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain*

^b *Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain*

^c *CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain*

^d *CSIC, Barcelona, Spain*

Received 22 July 2008; received in revised form 14 November 2008; accepted 12 December 2008

Available online 31 December 2008

Abstract

Objectives: Transferrin isoelectrofocusing (Tf-IEF) is widely used to screen for Congenital Disorders of Glycosylation (CDG), but it is laborious, time-consuming, and not suitable for automation or accurate quantification. We present our experience and advantages of the implementation of Tf-HPLC.

Methods: Sera were iron saturated, lipid precipitated and filtrated on Microcon-YM10. Glycoforms were separated by HPLC on a SOURCE 15Q anion-exchange column. Detection was at 470 nm.

Results: We established reference values and validated the HPLC method by analysing samples with abnormal Tf-IEF. Comparison between both methods is described.

Conclusions: HPLC is useful for CDG screening, especially for laboratories that deal with great number of samples, due to its easy sample processing, the possibility of performing long series of analysis and the advantage of peak quantification, which allows objective interpretations. © 2008 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Congenital Disorders of Glycosylation (CDG); Sialotransferrin isoforms; HPLC; Isoelectric focusing (IEF)

Introduction

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are a growing group of inherited defects in the synthesis (CDG-I) and processing (CDG-II) of the linked glycans of glycoproteins and glycolipids [1,2]. Over 25 different disorders of N-glycosylation have been identified. However, there are very few identified cases in each subgroup, except for *PMM2*

deficiency (CDG-Ia) (over thousand patients) and *MPI* deficiency (CDG-Ib) and *ALG6* deficiency (CDG-Ic) [3].

CDG are multisystem diseases, with several levels of severity [4]. Patients may present a wide spectrum of clinical features, from severe mental retardation with dysmorphic features to slight retardation or even asymptomatic [5] [6] [7]. Due to the different clinical presentations and the fast publication of new types of CDG, a broad screening of these inherited defects is necessary [8].

Transferrin (Tf) is an abundant glycosylated protein in serum broadly studied for CDG screening. Most serum transferrin is tetrasialotransferrin because most molecules of this protein carry two N-linked disialylated biantennary oligosaccharide chains that result in a total of four terminal sialic acids; in addition, some of those oligosaccharide chains may be triantennary or even tetraantennary, which explains the constant presence of penta

Abbreviations: CDG, Congenital Disorders of Glycosylation; Tf, Transferrin; IEF, Isoelectric focusing; AUC, Area under the curve; HFI, Hereditary fructose intolerance; CV, coefficient of variation.

* Corresponding author. Institut de Bioquímica Clínica, Edifici Helios III, C/ Meija Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 227 5668.

E-mail address: pbriones@clinic.ub.es (P. Briones).

and hexasialo forms. Any defect in the synthesis or processing of these glycans results in an alteration of the sialotransferrin forms, which is detectable because the sialotransferrins can be separated according to their different charges [9].

Several analytic procedures have been developed for the analysis of carbohydrate-deficient transferrin, as it has been extensively used for the follow-up of chronic alcoholic abuse [10]. Transferrin isoelectric focusing (TF-IEF) is the most widely used method to screen for Congenital Disorders of Glycosylation, but it is a laborious and time-consuming technique neither suitable for automation [11] nor for accurate quantification. Other laboratory techniques such as capillary zone electrophoresis (CZE) [11] and high pressure liquid chromatography (HPLC) [12] [13] are suitable for detection of the different sialotransferrins allowing a rapid processing and quantitation of the forms.

The present study aims to explain our experience with the implementation of Tf-HPLC for CDG screening in our laboratory, the comparison with IEF and the divergences we observed between these two methods.

Materials and methods

Sample collection and patients

The procedures followed were approved by the ethics committee at the Hospital Clinic of Barcelona and were in accordance with the Helsinki Declaration.

Controls

For the HPLC procedure, reference values were established in 122 serum samples without abnormalities in the Tf-IEF pattern. We prepared a control pool with 23 sera randomly chosen between those 122 control samples. This pool was used as internal control in all the series.

Patients with abnormal Tf-IEF

To prove the correlation between Tf-IEF and Tf-HPLC, we analysed by HPLC available sera from several patients: 5 *PMM2* deficiencies (CDG-Ia), 1 *MPI* deficiency (CDG-Ib), 1 *DPMI* deficiency (CDG-Ie), 1 *COG₈* deficiency (CDG-IIh), 7 CDG-IIx, 2 fructosaemia, 3 classical galactosaemia and 1 alcoholic abuser, with altered sialotransferrin patterns previously demonstrated by IEF and also sera with transferrin variants demonstrated by IEF and neuraminidase treatment [14].

We also included a patient of particular interest because of her very mild Tf-IEF pattern. She is a 12 year-old girl with some learning and speaking difficulties, and mild strabismus, ataxia and trembling, with cranial studies showing cerebellar hypoplasia. She was diagnosed with CDG-Ia at age 5 years together with her double cousins (sons of a maternal sister and a paternal cousin), who have similar but severer clinical features. Her phosphomannomutase (PMM) activity in leucocytes was clearly deficient (0.32 mU/mg protein; control media 2.19 mU/mg protein), and she is compound heterozygous for mutations p.R141H and p.C241S in the *PMM2* gene ([15], patient 3).

Reagents

Dextran sulphate sodium salt and sorbitol were obtained from USB Corporation (Cleveland, USA); agarose for IEF was from GE Healthcare; nitrilotriacetic acid trisodium salt monohydrate (NTA) and preblended Ampholines pH 4.0–6.5 were from Amersham Biosciences; iron (III) citrate hydrate, bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris), calcium chloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) and sodium chloride (NaCl) were from Merck (Darmstadt, Germany); rabbit anti-transferrin antibodies were from Dako (Glostrup, Denmark); and Coomassie Brilliant Blue R-250 was from Bio-Rad (Hercules, USA).

All chemicals were of analytical grade, and the water was of HPLC grade ($>18 \text{ M}\Omega$).

Methods

Tf-IEF analysis was based on the method described by Van Eijik et al., (1983) [16]; 0.2 g of agarose and 2.4 g of sorbitol were mixed with 18 mL of cold water, heated in microwave oven until all agarose was completely dissolved and then cooled in water bath to 73 °C. At this point, 1.3 mL of preblended Ampholines pH 4.5–6.0 were added and the mixture was poured between two glass plates with *Gel-Fix for Agarose* (SERVA, Heidelberg, Germany) stuck on one glass, left for 15 min at room temperature, and left at least for 1 h in the refrigerator (4–8 °C). For sample preparation 50 μL of serum were mixed with 5 μL of 10 mmol/L Fe (III) citrate and 5 μL of 0.1 mmol/L sodium hydrogen carbonate, and diluted with 50 μL of 0.9% NaCl. This solution was left for 30 min at room temperature and then further diluted 1:2 with 0.9% NaCl. Sialotransferrin isoforms were separated using 2117 Multiphor (LKB, Stockholm, Sweden) and detected after immunofixation with rabbit anti-human transferrin antibody and staining with Coomassie blue.

Tf-HPLC analysis was based on the method described by Helander et al., (2003) [12]. We used 100 μL of serum samples, which were iron saturated with 20 μL of FeNTA 10 mmol/L and lipid precipitated with 20 μL of a solution prepared by mixing equal volumes of 2% dextran sulphate and 1 mol/L CaCl_2 . After mixing, the samples were left at 4 °C during 30 min and then centrifuged at 14,000 g for 5 min at 5 °C; 130 μL of supernatant were collected and centrifuged through a Microcon YM-10 filter (Millipore, Bedford, USA) during 30 min at 14,000 g at 5 °C in order to eliminate small molecules. The fraction retained on the filter was recovered in a new Eppendorf by centrifugation at 1000 g 10 min and water was added to a final volume of 260 μL .

Separation of the transferrin glycoforms was performed by HPLC (Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph) on a SOURCE 15Q PE 4.6/100 anion-exchange column (Amersham Bioscience); 100 μL of sample were injected into the HPLC system and isoform separation was performed using salt gradient elution; detection relied on the measurement of the absorbance of the iron-transferrin complex at 470 nm. The

Table 1
Tf-HPLC: reference values and coefficient of variation (CV) of each sialotransferrin in intraday and interday assays of a pool of control sera and of a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient serum

	^a Asialo	^a Monosialo	Disialo	Trisialo	Tetrasialo	Penta+Hexa
Reference values (<i>n</i> =122)	nd	0–0.7	0.7–2.8	1.4–8.7	60.0–84.6	10.3–25.0
Intraday CV% in control sera (<i>n</i> =10)	–	–	12.3	4.2	0.9	3.0
Interday CV% in control sera (<i>n</i> =10)	–	–	21.8	15.3	2.5	14.5
Intraday CV% in a <i>PMM2</i> def serum (<i>n</i> =6)	14.9	–	5.1	16.8	1.3	3.3
Interday CV% in a <i>PMM2</i> def serum (<i>n</i> =6)	7.1	–	2.8	20.5	1.6	9.0

nd: not detectable; def: deficiency.

^a Asialo and monosialotransferrin are not usually detectable in controls; therefore it is not possible to calculate the CV.

relative distribution of each isoform to total transferrin was measured by the percentage of area under the curve (%AUC).

Results

Reference values for our population and within-run and between-run coefficients of variation of each sialotransferrin for the HPLC procedure are shown in Table 1. The samples used to determine the coefficients of variation were the pool of control sera and serum from a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient.

Studies of sensitivity were made by progressively adding serum from a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient to a pool of control sera. At 5% of CDG-Ia serum, although we detected an increase of the %AUC of disialotransferrin of 73%, the disialotransferrin percentage was still in the control range (2.5%, reference values: 0.7–2.8); at 15% of CDG-Ia serum, the increase of disialotransferrin was 132%, and the pattern was clearly type I. Carry over studies were also performed without any alteration in the transferrin profile of the control pool when run after a pathologic sample.

Comparison between Tf-IEF and Tf-HPLC

Validation

Samples with abnormal Tf-IEF pattern (*PMM2* deficiency (CDG-Ia), *MPI* deficiency (CDG-Ib), *DPM1* deficiency (CDG-Ie), *COG8* deficiency (CDG-IIh), CDG-IIx, untreated fructosaemia, classical galactosaemia and alcoholism) were analysed by HPLC in order to confirm detection ability. The alterations of

sialotransferrin were confirmed by HPLC in all patients (Table 2 and Fig. 1); and HPLC was also able to clearly distinguish transferrin variants BC (Table 2 and Fig. 1) and CD (not shown), but for transferrin variants C₁C₂ (not shown) and C₁D₄₋₅ (Fig. 1) [17,18] the pattern obtained by HPLC did not differ from controls.

Fig 2 shows the HPLC results for patient 1, who brought about great difficulties in the interpretation of her Tf-IEF patterns. She presented a very slightly altered pattern almost undistinguishable from controls by IEF, because it only showed a mild increase of disialotransferrin difficult to discern by visual exploration in the IEF gel. But when we analysed this sample by HPLC, the %AUC of disialotransferrin was clearly altered (4.2%; reference values: 0.7–2.8; *n*=122) (Fig. 2).

EDTA samples

The differences observed between both methods concerning samples with EDTA were also remarkable. It has been reported that EDTA samples disrupt the sialotransferrin profile by IEF [19] and also by other techniques such as carbohydrate-deficient transferrin (%CDT) [20] showing a shift towards the unsialylated forms. When EDTA samples were analysed by HPLC, an extra-peak was detectable at the beginning of the transferrin chromatogram but without alteration of the other isoforms (Fig. 3B). This extra-peak did not overlap with asialotransferrin: when analysing EDTA plasma from a CDG-Ia patient, two peaks appeared at the level of asialotransferrin (Fig. 3D); one of them was due to EDTA. In addition EDTA samples show a loss of absorbance after the tetrasialotransferrin peak (Figs. 3 B and

Table 2
HPLC validation

Type of patient	HPLC quantitative results (%AUC of total transferrin)					
	Asialo	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta+Hexa-
Controls (<i>n</i> =122)	nd	nd–0.7	0.7–2.8	1.4–8.7	60.0–84.6	10.3–25.0
<i>PMM2</i> def (<i>n</i> =5)	nd–24.0	nd–3.5	4.2–39.0	2.6–6.1	30.8–76.0	nd–18.5
<i>MPI</i> def (<i>n</i> =1)	23.9	1.6	42.0	2.1	21.7	8.7
<i>DPM1</i> def (<i>n</i> =1)	1.3	nd	26.7	4.6	58.3	9.1
<i>COG8</i> def (<i>n</i> =1)	nd	1.7	4.9	21.4	64.6	7.4
CDG-IIx (<i>n</i> =7)	nd	nd–10.7	7.0–18.6	18.2–30.3	36.3–59.0	5.4–14.7
Untreated HFI (<i>n</i> =2)	19.3/30.2	nd/nd	13.3/20.7	5.6/6.8	40.2/25.9	21.6/16.4
Untreated galactosaemia (<i>n</i> =3)	3.9–22.5	nd	7.4–27.2	nd–8.9	37.1–68.1	9.2–18.5
Alcohol abuser (<i>n</i> =1)	0.4	nd	5.8	3.8	73.0	17.0
Prot. variant (BC) (<i>n</i> =1)	nd	nd	1.0	2.6	41.4	55.0

Relative distribution of each sialotransferrin in %AUC in controls and in different transferrin altered patterns.

nd: not detectable; n: number of patients analysed; def: deficiency.

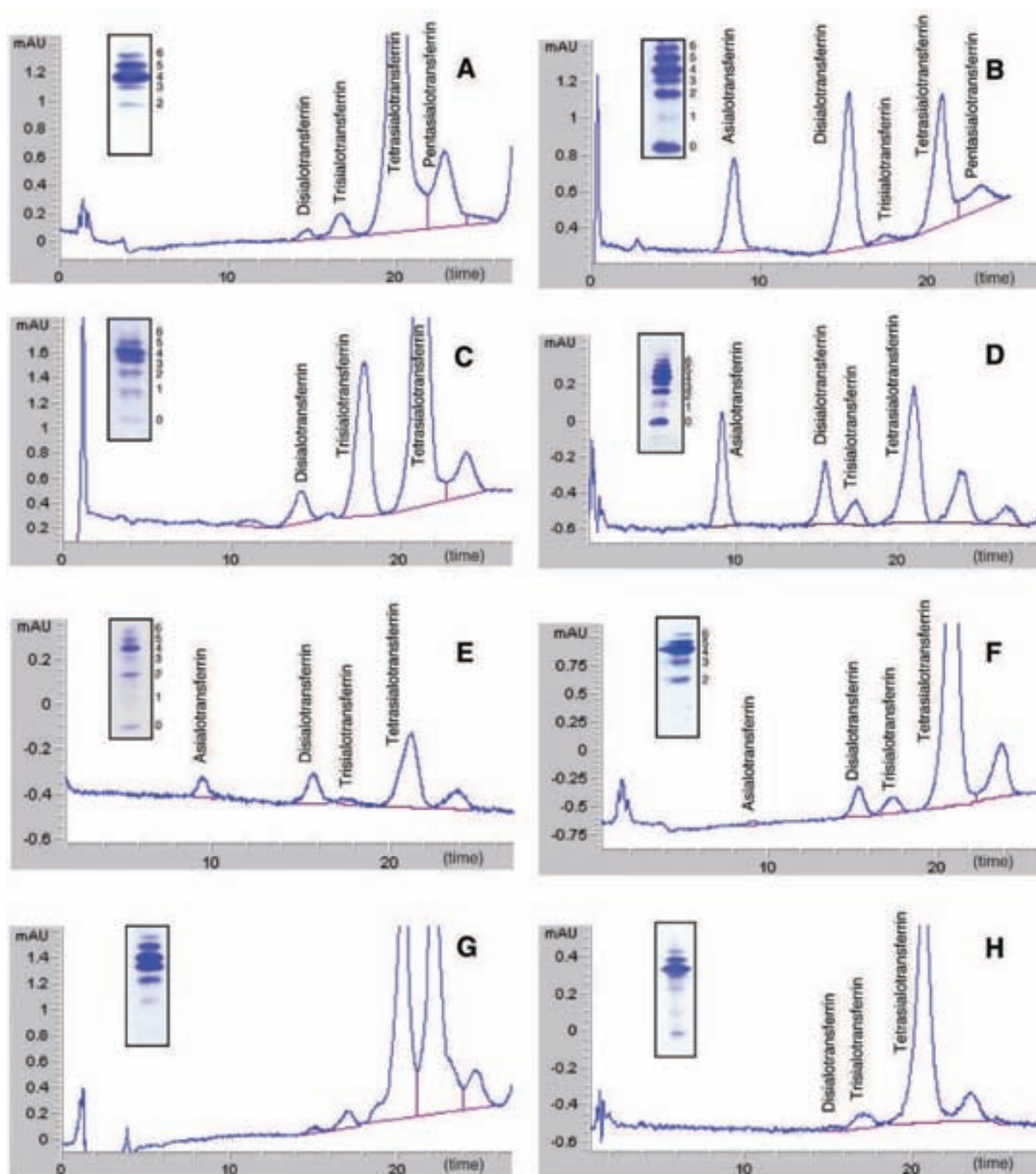


Fig. 1. Transferrin glycoform patterns by IEF and by HPLC in serum samples. (A) Serum from a control; (B) *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient; (C) *COG8* deficient (CDG-IIh) patient; (D) Untreated HFI patient; (E) Untreated classical galactosaemia patient; (F) Alcohol abuse patient; (G) Protein variant BC sample; (H) Protein variant CD₄₋₅.

D). But the %AUC of each transferrin isoform remained unaltered in EDTA samples as compared to sera (see the table in Fig. 3, where the calculated percentages are similar for A and B or for C and D).

Economical evaluation

We performed an economical approach regarding the comparison of costs for both methods. It is clear that HPLC equipments are more expensive than those for IEF (about three

times more as compared to the Multiphor equipment that we use), but on the other hand, the Tf-IEF technique needs antibody anti human transferrin, which is an expensive reagent. We estimated the price/sample with 1000 analysis/year by both methods: We took into account the prices of reagents and apparatus (for a depreciation period of 7 years), but summing only 2/5 of the HPLC system costs, as it is not used more than 2 days a week for CDG analysis. In such case, the price for IEF is about 10% more expensive than for HPLC. For 2008, the

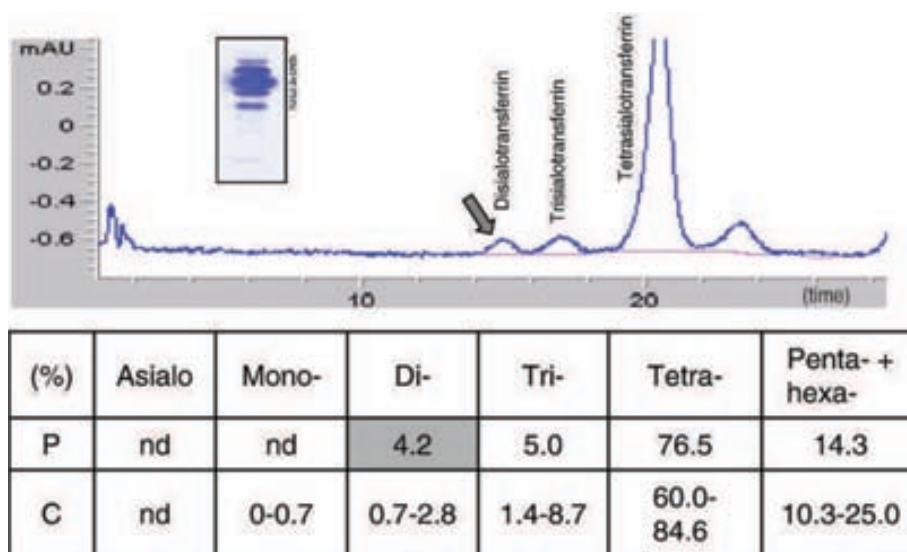


Fig. 2. Transferrin glycoform patterns by IEF and HPLC in serum samples from a patient 1, *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient with very slightly altered type I pattern.

prices are 6 € (IEF) and 5.5 € (HPLC). To this, we must add the costs of laboratory staff. With HPLC there is no limitation in the number of samples to be analysed/series; we usually run series of 30 sera, which occupies 6.5 h of personal work including preparation, performing and result analysis (therefore 13 min/sample). For IEF the number of analysed samples is limited by the size of the gel; we can run 12 different samples in each gel, which takes a total of 5.5 h of work (27.5 min/sample).

Tf-HPLC for dietary control of HFI and galactosemia

Hereditary fructose intolerance (HFI, MIM# 229600) is a known cause of secondary type I transferrin pattern. With a diet free of fructose, the transferrin pattern normalises. We used HPLC to control dietary compliance in HFI patients, and we could detect poor compliance by means of slightly altered pattern of sialotransferrin in a serum sample (Fig. 4), even though fructose was undetectable by enzymatic methods.

Untreated patients of classical galactosaemia (MIM# 230400) also present transferrin type I pattern that becomes normal with galactose-free diet. For the follow up of classical galactosaemia patients we determine their erythrocyte galactose-1-phosphate concentration. We analysed Tf-HPLC isoforms in galactosaemic patients with $>0.6 \mu\text{mol}$ galactose-1-phosphate / gr Hb (which is the highest limit acceptable for galactosaemic patients) and did not detect any alteration (data not shown).

Discussion

Tf-IEF is the reference procedure to screen for CDG patients because it is the most widely used method and because the use of antibody fixation provides high selectivity for transferrin [21]. Nevertheless, it is a laborious technique that does not permit analysing a lot of samples together, while a wide screening for CDG is important in order to detect new clinical presentations and new CDG types [22].

In addition, Tf-IEF pattern interpretation is often subjective. In order to get a more objective interpretation, quantification of the bands using densitometric methods has been proposed, but the results can be misinterpreted due to saturated staining when there is a high amount of transferrin or to irregular staining along the band and the lane. Usually, the observation of the full isoform pattern allows an easy interpretation of the results, but for some slightly abnormal patterns it is difficult to discern visually whether they are normal or altered.

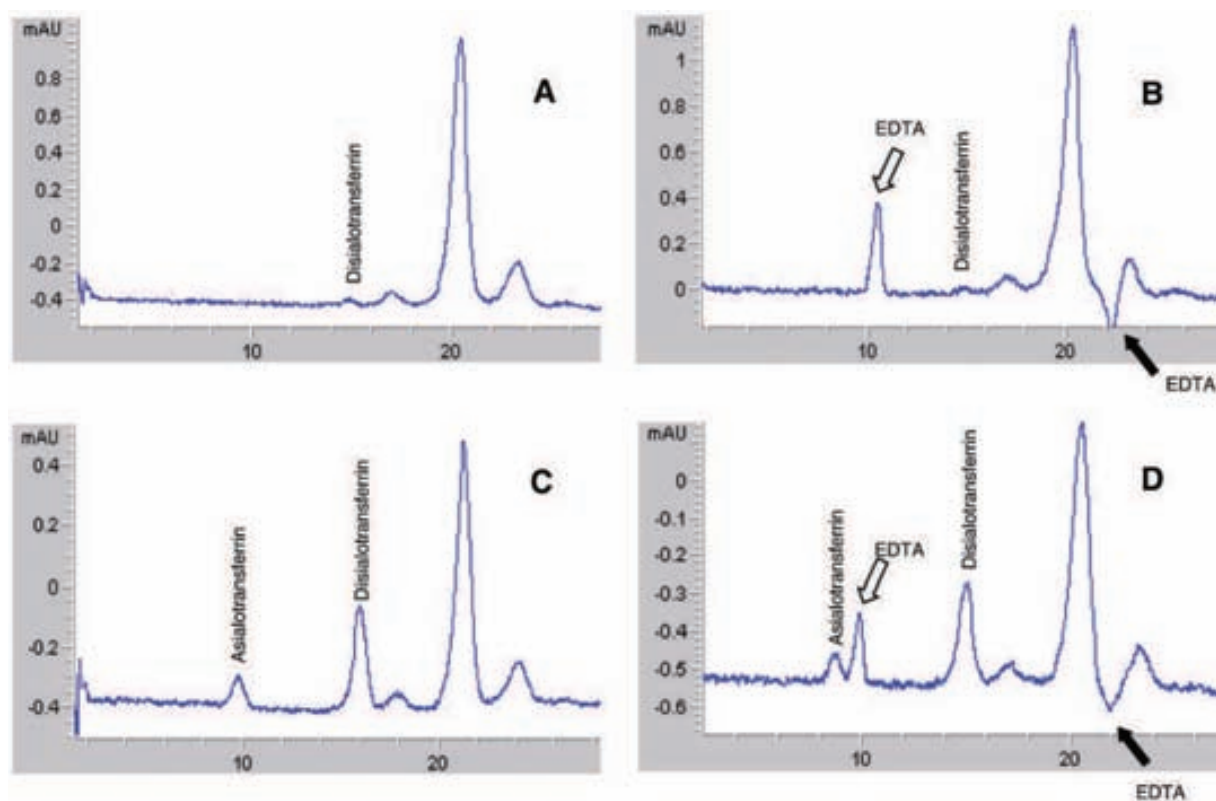
HPLC has been proposed as a useful method to screen for CDG [12]. Detection is performed at 470 nm in order to have a selective absorbance of the iron-transferrin [23]. A valuable feature of this method is the quantification system of the HPLC with measurement of the %AUC of each isoform, which allows an objective interpretation of the profile. HPLC does not use a specific antibody and therefore it is not as selective as IEF but, otherwise, it allows the separation of glycoforms based on structural differences of the glycans. In addition, HPLC system equipped with autosampler facilitates the possibility of processing long series of samples for screening purposes.

The cost of the HPLC equipment is indeed much higher than that of IEF; but taking into account that HPLC can be used for other determinations, that Tf-IEF needs more expensive reagents, and that HPLC is less time consuming, the estimate price/sample by HPLC is finally about 50 % cheaper than by IEF.

Another semi-automated method that is used for CDG screening is capillary electrophoresis (CZE), which is similar to HPLC because also permits a quantification of the peaks and analysis of long series of samples [11], although the cost of CZE system is still higher than HPLC.

Reference values and validation

We have established our reference values and determined the coefficients of variation (CV), which were acceptable for the tetra and penta+hexasialotransferrin peaks (Table 1). For the



(%)	Asialo	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta- + hexa-
A	nd	nd	2.4	4.9	75.4	17.4
B	nd	nd	2.0	4.9	81.4	11.7
C	5.3	nd	21	4.1	57.9	11.6
D	3.4	nd	20.7	4.1	60.9	9.9
Control	nd	0-0.7	0.7-2.8	1.4-8.7	60.0-84.6	10.3-25.0

Fig. 3. Comparison between serum and EDTA plasma. (A) control serum; (B) EDTA plasma from a control; (C) serum from a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient; (D) EDTA plasma from a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient. In samples with EDTA there is an extra narrow peak at the beginning of the chromatogram (open arrow) but it does not overlap with the asialotransferrin peak. In addition, a loss of absorbance (filled arrow) is detected after the tetrasialotransferrin peak.

control pool, between-run coefficients of variation of disialotransferrin and trisialotransferrin showed high values that we considered acceptable because the small areas of these peaks are difficult to delimitate. When we analysed the coefficients of variation with serum of a *PMM2* deficient (CDG-Ia) patient, with high values of disialotransferrin, its coefficient of variation decreased to 5% (Table 1).

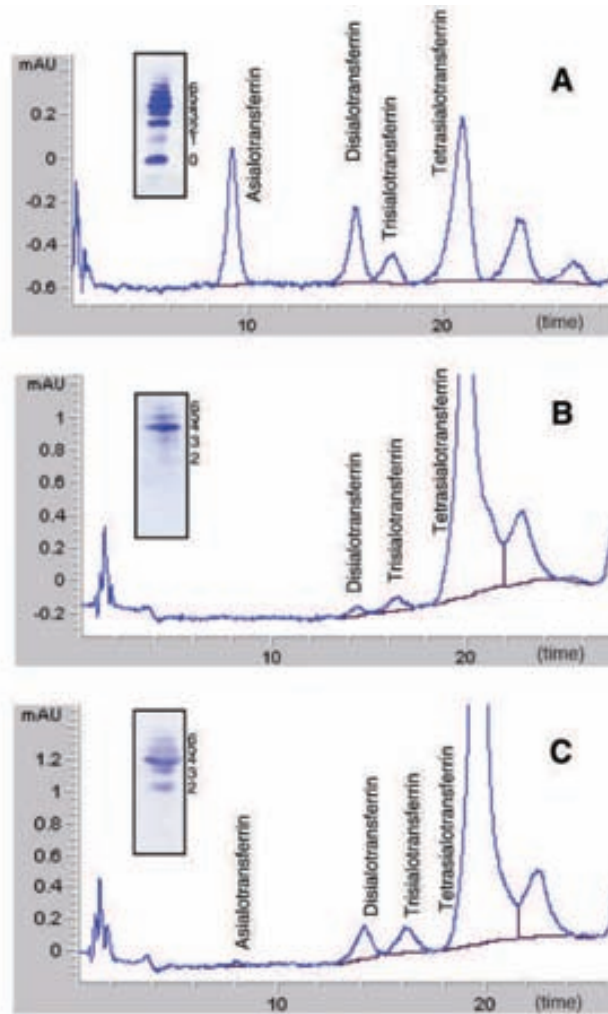
Samples with abnormal Tf-IEF pattern were analysed by HPLC in order to confirm detection ability, and in all cases the alterations of sialotransferrin were also detected by HPLC. In our experience HPLC has proven to be very useful in difficult or unsolved cases like patient 1, where the only detectable Tf-IEF abnormality was a very slight increase in disialotransferrin. Her abnormal pattern was difficult to detect in IEF gel (Fig. 2A), but with the introduction of the HPLC method, we could clearly distinguish the altered %AUC of disialotransferrin.

EDTA samples

It is noteworthy that with HPLC, EDTA samples were as useful for diagnosis as serum, because the EDTA peaks did not overlap with the transferrin isoforms, and therefore the percentage of each transferrin peak could be accurately calculated (Fig. 3). This is important because many of the samples that we receive for diagnosis of metabolic disease are EDTA plasma, and sometimes are the unique samples available.

Tf-HPLC for dietary control of HFI and galactosemia

Tf-HPLC has proven to be useful for controlling the compliance of a diet free of fructose in HFI patients, where the intake of fructose causes defective glycosylation. As in the case of alcoholic patients, the sialotransferrin profile reflects the



(%)	Asialo	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta- + hexa-
A	19.3	nd	13.3	5.6	40.2	21.6
B	nd	nd	1.4	2.3	73.8	22.5
C	0.5	nd	4.7	4.5	74.9	15.4
Control	nd	0-0.7	0.7-2.8	1.4-8.7	60.0-84.6	10.3-25.0

Fig. 4. Tf-HPLC profile from HFI patients. (A) Untreated HFI patient; (B) HFI patient after correct treatment; (C) HFI patient with poor dietary compliance.

compliance of the diet during a period of time. HPLC permits us to detect slight alterations in the Tf-pattern due to poor dietary compliance (Fig. 4C).

On the other hand, for galactosemic patients, evaluation of galactose-1-P is a better parameter for biochemical control. Tf-HPLC is not so sensitive, as we failed to detect alterations in serum transferrin in patients with high levels of erythrocyte galactose-1-phosphate.

Protein variants

We analysed transferrin variants because they alter the Tf-IEF pattern without any glycosylation defect, and therefore

might induce false diagnosis. By Tf-IEF we could clearly distinguish transferrin variants C₁C₂, BC, CD and CD₄₋₅, but by HPLC we were unable to detect C₁C₂ and CD₄₋₅. Therefore, although in our hands HPLC has proven to be useful for CDG screening, its failure to detect these variants suggests that our HPLC method has less resolution than IEF to distinguish transferrin forms. We want to remark that the difference between the C₂ variant and the C₁ normal protein are very subtle; in our experience they can easily be distinguished with PAGE-IEF (polyacrylamide gel electrophoresis), but not so easily with agarose (data not shown) and with HPLC we have been unable to detect this very frequent polymorphism.

For variant D₄₋₅, the differences with C₁ by IEF (PAGE or agarose) are very clear: a band appears at the asialotransferrin position; this variant must have very different charge. But we could not observe differences by our HPLC method. Perhaps the substitution introduced by the polymorphism causes a gain of mass that counteracts the loss of charge. This hinders us of distinguishing this variant.

Nevertheless, this represents the unique clear divergence that we have found between IEF and HPLC patterns, and the fact that we do not detect these protein variants does not interfere in our diagnostic purpose of detecting patients with Congenital Disorders of Glycosylation.

We conclude that HPLC is useful for CDG screening, especially for laboratories that deal with great number of samples, due to its easy sample processing, the possibility of performing long series of analysis and the advantage of peak quantification, which allows objective interpretations.

Acknowledgments

We thank Cristina Fernández, Gemma Gracia, Mireia Vaquero and Sonia Moliner for skillful technical assistance. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. This study was supported by grants FIS PI041845, FIS PI041339 and FIS AI079007 from the Spanish Ministry of Health and LSHM-CT2005-512131 Euroglycanet from the European Community. This work has been performed in the context of the PhD program of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona.

References

- [1] Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8: 261–78.
- [2] Jaeken J, Hennet T, Freeze H, Matthijs G. On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *J Inherit Metab Dis* 2008;31:669–72.
- [3] Marklova E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 2007;385:6–20.
- [4] Grünewald S. Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early Hum Dev* 2007;83:825–30.
- [5] Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): update and developments. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:423–6.
- [6] Dupre T, David A, Viullaumier-Barrot S, Le Bizec C, Barnier A, Durand G, Seta N. About an asymptomatic congenital disorder of glycosylation (CDG-Ia) subject. *J Inherit Metab Dis* 2005;28(Suppl 1):197.
- [7] Pancho C, Garcia-Cazorla A, Varea V, Artuch R, Ferrer I, Vilaseca MA, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia revealed by hypertransaminasemia and failure to thrive in a young boy with normal neurodevelopment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:320–2.
- [8] Freeze HH. Congenital disorders of glycosylation and the pediatric liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:501–15.
- [9] Freeze HH, Aebi M. Molecular basis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes type I with normal phosphomannomutase activity. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:167–78.
- [10] Landberg E, Pahlsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppsson J-O. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;210:267–74.
- [11] Carchon HA, Chevigné R, Falmagne JB, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clin Chem* 2004;50:101–11.
- [12] Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881–90.
- [13] Helander A, Bergström J, Freeze HH. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. *Clin Chem* 2004;50:954–8.
- [14] Knopf C, Rod R, Jaeken J, Berant M, Van Schaftingen E, Fryns JP, et al. Transferrin protein variant mimicking carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome in trisomy 7 mosaicism. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23:399–403.
- [15] Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, Ferrer I, Maties M, Busquets C, et al. Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2002 Dec;25:635–46.
- [16] Van Eijk HG, van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1983;132:167–71.
- [17] Albahri Z, Marklova E, Vaníček H, Minxová L, Dědek P, Skálová S. Genetic variants of transferrin in the diagnosis of protein hypoglycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:1184–8.
- [18] Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001;47:1225–33.
- [19] Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Gene* 2001;2:129–51.
- [20] Pérez-Cerdá C, Quelhas D, Vega I A, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem* 2008;54:93–100.
- [21] Jaeken J. Komrower lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis* 2003;26:99–118.
- [22] Grünewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* 2002;52:618–24.
- [23] Jeppsson J-O. Isolation and partial characterization of three human transferrin variants. *Biochim Biophys Acta* 1967;140:468–76.

Article 2:

Comparison between HPLC and capillary zone electrophoresis procedures for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation syndromes.

Quintana E, Montero R, Casado M, Navarro-Sastre A, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009;877:2513-18.



Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation

Ester Quintana^{a,c}, Raquel Montero^{b,c}, Mercedes Casado^b, Aleix Navarro-Sastre^{a,c}, María A. Vilaseca^{b,c}, Paz Briones^{a,c,d}, Rafael Artuch^{b,c,*}

^a Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain

^d Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2009

Accepted 22 June 2009

Available online 30 June 2009

Keywords:

Congenital disorders of glycosylation
High performance liquid chromatography
Capillary zone electrophoresis
Isoelectric focusing
Paediatric patients

ABSTRACT

Transferrin isoelectric focusing (IEF) is the most widely used method to screen for congenital disorders of glycosylation (CDG). Our aim was to compare high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary zone electrophoresis (CZE) procedures for serum sialotransferrin analysis. 58 serum samples were processed both by CZE and HPLC: 35 were from paediatric controls, 18 from patients with an altered sialotransferrin IEF pattern and 5 were transferrin variant samples. HPLC analysis was performed with an anion-exchange column with spectrophotometric detection at 470 nm. CZE analysis was done using the commercial CEofix-CDT kit with spectrophotometric detection at 200 nm. Passing-Bablok regression analysis showed good agreement for tri-, tetra- and penta-sialotransferrin by both procedures. But for disialotransferrin, higher values were observed by the HPLC procedure. The HPLC and CZE methods allowed reproducible separation and analysis of single transferrin glycoforms with similar peak patterns. All patients presented values outside the range established in our control population either by HPLC or by CZE, even in patients with moderate forms of CDG that had been difficult to detect by IEF. In conclusion, measurement of sialotransferrin isoforms and interpretation using method-specific reference values may offer some advantages for the diagnosis of CDG as compared with the standard IEF procedure.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a growing group of genetic diseases caused by deficiencies in the carbohydrate moiety of glycoproteins and other glycoconjugates [1]. The clinical spectrum is highly heterogeneous, with different levels of severity [2]. Patients may present a wide spectrum of clinical features that often imply multi-organ involvement [3,4].

N-glycosylation defects are the result of abnormal synthesis (CDG-I) or incorrect processing (CDG-II) of the N-glycans, which results in deficient incorporation of sialic acid, the terminal nega-

tively charged sugar. To date, over 25 disorders of N-glycosylation have been identified. The incomplete addition of sialic acid to transferrin (Tf) molecules is the most commonly used marker for initial screening of a CDG [5]. As the evaluation of carbohydrate deficient transferrin is also used as a diagnostic test for alcohol abuse, several analytical procedures have been developed including isoelectric focusing (IEF), IEF in combination with immunofixation, zone immunoelectrophoresis, Western blotting, anion-exchange chromatography followed by immunochemical determinations, high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary zone electrophoresis (CZE) [6,7]. Transferrin isoelectric focusing is the most widely used method to screen for CDG, but it is a laborious and time-consuming technique neither suitable for automation [6] nor for accurate quantification. For this reason, nowadays some laboratories have turned to semi-automated methods such as HPLC and CZE. Assays based on HPLC and CZE have the advantage of providing reproducible separation and measurement of the relative percentages of the different transferrin isoforms.

Our aim was to compare HPLC and CZE procedures for serum sialotransferrin analysis. We also assessed their diagnostic

Abbreviations: CDG, congenital disorders of glycosylation; Tf, transferrin; CDT, carbohydrate deficient transferrin; IEF, isoelectric focusing; HPLC, high performance liquid chromatography; CZE, capillary zone electrophoresis.

* Corresponding author at: Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain.
Tel.: +34 932806169; fax: +34 932803626.

E-mail address: rartuch@hsjdbcn.org (R. Artuch).

efficiency as compared to IEF in patients with altered sialotransferrin patterns.

2. Materials and methods

2.1. Samples

For the comparison study, a total of 53 serum samples were processed both by CZE and HPLC: 35 of them were serum samples from paediatric controls (age range: 2 months–18 years) admitted to our hospital for minor surgical interventions; exclusion criteria were the presence of acute or chronic diseases or pharmacological treatments. The other 18 samples were from patients with an altered sialotransferrin IEF pattern (age range: 3 days–35 years). This group consisted of 11 patients presenting type I pattern (5 *PMM2* deficiency (CDG-Ia; OMIM 601785), 1 *PMI* deficiency (CDG-Ib; OMIM 154550), 1 *DPM1* deficiency (CDG-Ie; OMIM 603503), 1 untreated galactosaemic (OMIM 230400), 2 untreated inherited fructose intolerance (OMIM 229600) and 1 alcohol abuser), and 7 patients presenting type II pattern (1 *COG8* deficiency (CDG-IIh; OMIM 606979) and 6 CDG-IIx patients with impaired Tf glycosylation of unknown origin). We also analyzed 5 transferrin variant samples causing anodal (B) or cathodal (D) shift of the protein bands by IEF, as compared to the common Tf variant (C): 1 BC sample (decreased isoelectric point), 2 CD and 1 CD₄₋₅ (increased isoelectric point) and 1 C₁C₂ (with a very mildly increased isoelectric point).

Informed written consent was obtained for biochemical and genetic investigations, which were performed following diagnostic protocols approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu and Hospital Clínic (Barcelona) and were in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2. Analytical procedures

HPLC analysis of transferrin glycoforms: Tf-HPLC analysis was based on the method described by Helander et al. [8] as modified by Quintana et al. [9]. After iron saturation, lipid precipitation and filtration (Microcon 10-YM, Millipore, Bedford, USA) of serum samples, separation of transferrin glycoforms was performed by HPLC (Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph) on a SOURCE 15Q PE 4.6/100 anion-exchange column (Amersham Bioscience, Barcelona, Spain) by a linear gradient salt elution at a flow rate of 1 mL/min. Mobile phase A consisted of 100% Bis-TRIS buffer 10 mmol/L, pH 6.2, starting at 100%. Mobile phase B (Bis-TRIS buffer 10 mmol/L, pH 6.2 plus 0.5 mol/L NaCl) was added, reaching 20% (V/V) in 29 min. Detection relied on the measurement of the absorbance of the iron-transferrin complex at 470 nm.

CZE analysis of transferrin glycoforms: Tf-CZE analysis was based on the method described by Carchon et al. [6], using the commercial CEofix-CDT kit (Analisis, Suarleé, Belgium). The electrophoretic system consisted of an automatic P/ACE 5000 system (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with a ultraviolet absorbance detector. 45 µL of kit iron solution was added to 15 µL of serum for iron saturation. Separation of glycoforms was carried out with a 67 cm × 50 µm ID fused-silica capillary (Analisis, Suarleé, Belgium), at a voltage of 28 kV for 10 min in alkaline borate buffer. The transferrin isoforms were detected by measurement of absorbance at 200 nm.

In both methods, the relative amounts of the transferrin glycoforms were measured by their respective areas under the curve (AUC) and expressed as the percentage of each isoform respect to total transferrin.

Isoelectric focusing analysis of serum transferrin (Tf-IEF) was run in agarose gels as previously reported [9]; the glycoforms were separated using the 2117 Multiphor (LKB, Stockholm, Sweden) system and detected after immunofixation with rabbit anti-human transferrin antibody and staining with Coomassie blue.

2.3. Statistical analysis

Data distribution was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test (SPSS 17.0 program). Since the data followed a Gaussian distribution, control values were calculated as average ±2 standard deviations.

Passing-Bablok regression analysis and Bland–Altman Plot (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) were applied to compare both procedures in 53 serum samples from controls and patients (polymorphic variants were not included). The HPLC procedure was considered the reference method.

3. Results

3.1. Comparison study

Fig. 1 shows the comparison of the percentage of each glycoform by HPLC and CZE using the Passing-Bablok regression analysis and the Bland–Altman plot. These plots showed a strong linear correlation between the two methods for all isoforms studied ($p < 0.001$). The slopes and intercepts obtained for each isoform in Passing-Bablok regression analysis are shown in Fig. 1. The results suggested good agreement for tri-, tetra- and penta-sialotransferrin. But in spite of the strong correlation for disialotransferrin, the two methods were not transferable for the measurement of this isoform. The intercept obtained was significantly different from 0 (−0.30; 95% CI −0.42 to −0.10) and the slope was significantly different from 1 (0.88; 95% CI 0.77–0.93), and consequently the two methods showed constant and proportional differences (higher values were observed for the HPLC procedure).

We established reference values with 35 paediatric serum samples by both procedures in order to compare the percentage of each sialotransferrin obtained in patients (Table 1). Since the agreement test showed transferable results, a unique reference interval was established for tri-, tetra- and penta-hexasialotransferrin for both methodologies (Table 1), while two different reference ranges had to be distinguished for disialotransferrin. No reference values were calculated for mono- or a-sialotransferrin since both forms were undetectable in the control population.

3.2. Patient sample analysis

The HPLC and CZE methods allowed reproducible separation and evaluation of the transferrin patterns. Fig. 2 shows the HPLC and CZE transferrin pattern of 2 *PMM2* deficient (CDG-Ia) patients (a severe case and a moderate one) and a CDG-IIx patient. Results for the 18 patients are summarized in Table 1. All cases presented values outside the ranges established in our control population by both methods; even patients with moderate forms of CDG-Ia that were difficult to discern by IEF, were clearly detectable both by HPLC and CZE: e.g. for 2 patients whose only altered isoform was disialotransferrin, its respective percentages were 4.2 and 4.3% by HPLC (control range 1.3–2.2%), and 3.2 and 3.4% by CZE (control range 0.89–1.5%).

3.3. Transferrin variants

Several polymorphisms were analyzed by HPLC and CZE. Comparable results by both methodologies were obtained for protein variants BC, CD₄₋₅ and C₁C₂; these latter two were not detectable

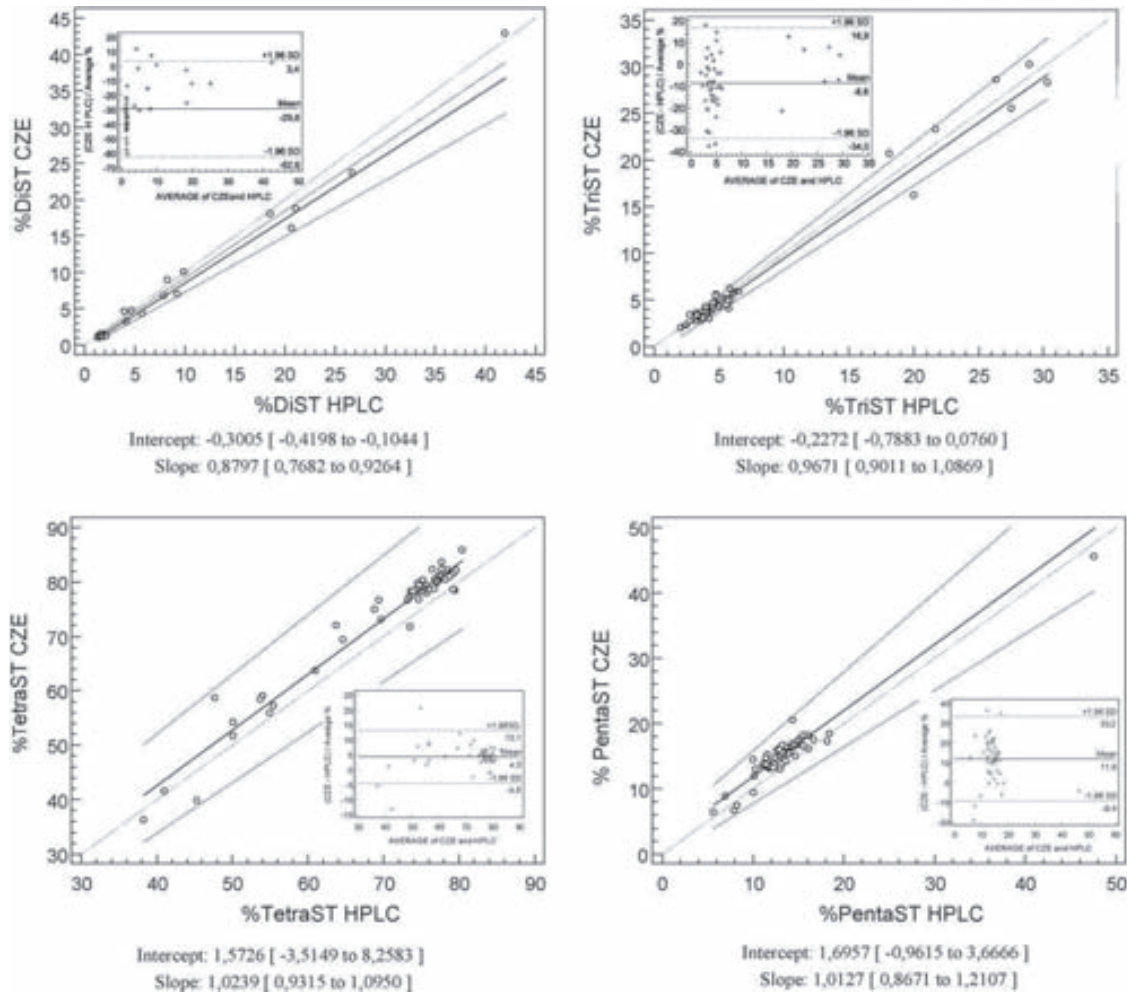


Fig. 1. Scatter diagrams with the regression line (solid line), including 95% confidence interval for the regression line (dashed lines) and identity line ($x=y$, dotted line) and Passing-Bablok regression equations. Bland-Altman plot shows differences between both methods expressed as percentage of the averages.

either by HPLC or by CZE (data not shown). Concerning two protein variants CD with identically altered patterns by IEF (Fig. 3 A2 and B2), two different profiles were detected by the two procedures. By HPLC, one of them showed two nearly overlapping peaks at the level of tetrasialotransferrin (Fig. 3 A1) while the other showed a clearly polymorphic pattern (Fig. 3 B1), similar to those obtained by CZE for both samples (Fig. 3 A3 and B3). When these two variant CDs were treated with neuraminidase, two different transferrin forms were detected both by IEF (Fig. 3 A2n and B2n) and CZE (Fig. 3 A3n and B3n); by HPLC we could clearly distinguish two peaks in one CD polymorphism (Fig. 3 B1n), but for the CD variant that presents an almost normal Tf-HPLC pattern, two nearly overlapping peaks were observed (Fig. 3 A1n). Moreover, in our hands, this latter CD variant showed a completely normal pattern following the HPLC methodology as described by Helander et al. [8],

for which no filtration with Microcon YM-10 tubes was performed (Fig. 4 A).

4. Discussion

In this study, we compared the suitability of Tf-HPLC and Tf-CZE as methods to screen for CDG in a paediatric population. Comparison studies for these two procedures have already been reported for diagnosis of chronic alcohol abuse [10], where correlations of the di-, tri-, tetra and penta + hexasialotransferrin forms were evaluated.

We found a strong linear correlation between the two methods for all sialoforms analyzed; results for tri-, tetra- and penta + hexasialotransferrin can be considered transferable and a unique reference range is applicable for CDG screening. Disialotransferrin values measured by HPLC were generally higher than

Table 1

Sialotransferrin isoforms. Control values for a paediatric population ($n = 35$) measured by HPLC and CZE and results for 18 patients (range: minimum and maximum) presenting sialotransferrin type I and II patterns. Results are expressed as the percentage of each isoform referred to total transferrin.

	ASTf	MonoSTf	DiSTf*		TriSTf	TetraSTf	Penta + HexaSTf
			HPLC	CZE			
Control interval ($n = 35$)	nd	nd	1.3–2.2	0.89–1.5	2.1–6.6	75.8–83.7	10.1–16.1
Type I pattern ($n = 11$)	nd–32.8	nd–2.1	4.2–42.0	3.1–42.8	2.0–6.7	15.9–74.7	2.9–21.6
Type II pattern ($n = 7$)	nd	nd–10.8	1.0–18.6	0.6–18.0	16.0–30.3	36.3–63.6	7.0–16.8

nd: not detectable.

* Since data of tri-, tetra- and penta-hexa-sialotransferrin were transferable, a unique reference interval was established for both procedures.

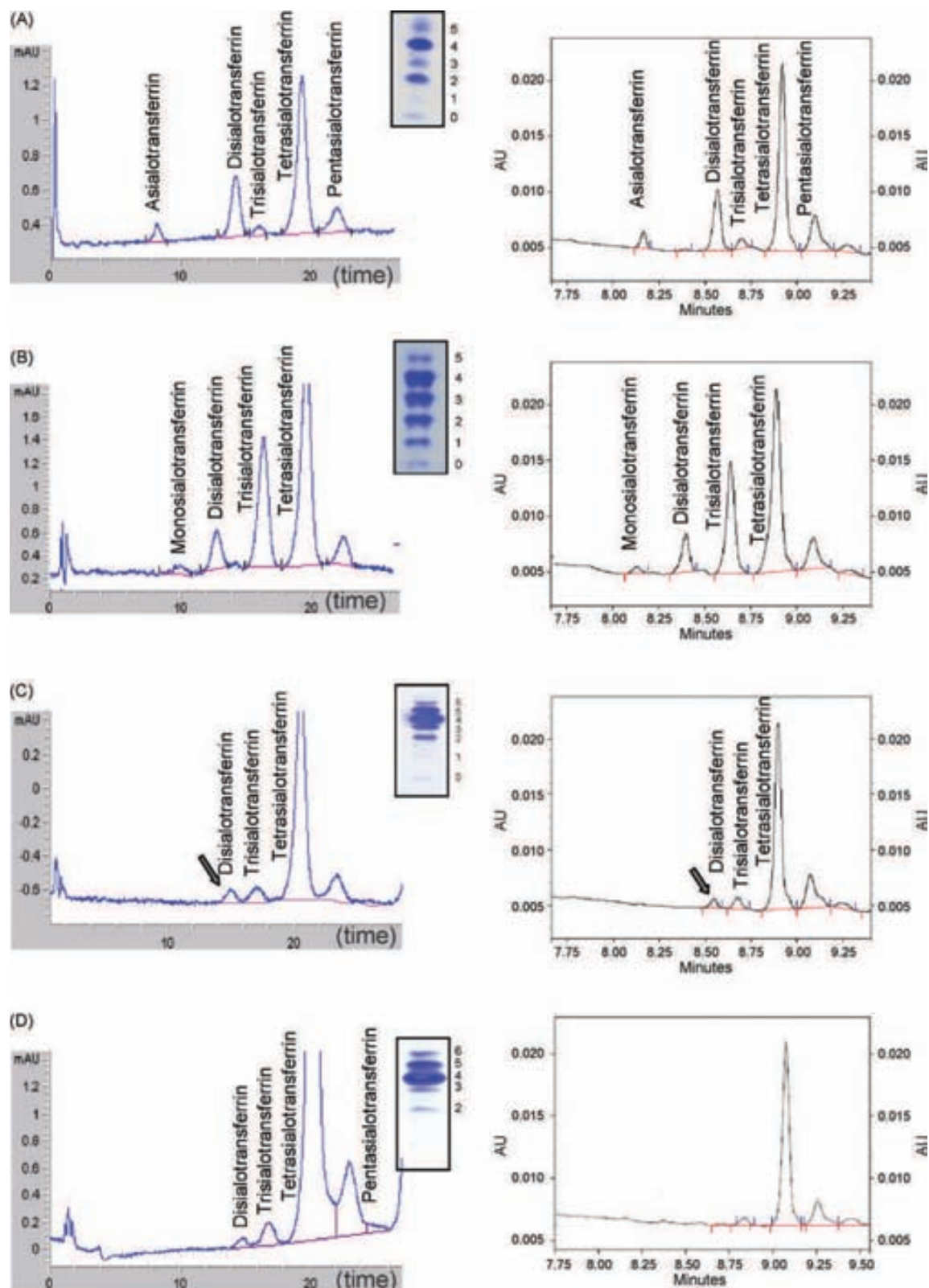


Fig. 2. Sialotransferrin patterns by HPLC (left panels), IEF (middle panels) and CZE procedures (right panels). Several serum samples presenting different sialotransferrin patterns are presented: (A) type I pattern (CDG-Ia, severe form); (B) type II pattern (CDG-IIx); (C) type I pattern (CDG-Ia, mild form); (D) control.

those obtained by CZE and this difference was statistically significant. Several studies have reported a similar linear relationship in the comparison of disialotransferrin levels obtained by HPLC and CZE [10]. In those reports, this isoform determination was used as a marker for detection of alcohol abuse, and therefore, the recruited

population for the study was different from our paediatric patients. Even so, the bias obtained was similar, and our results support the idea that a semi-quantitative measurement of disialotransferrin is particularly important for identification of slightly abnormal CDG patterns.

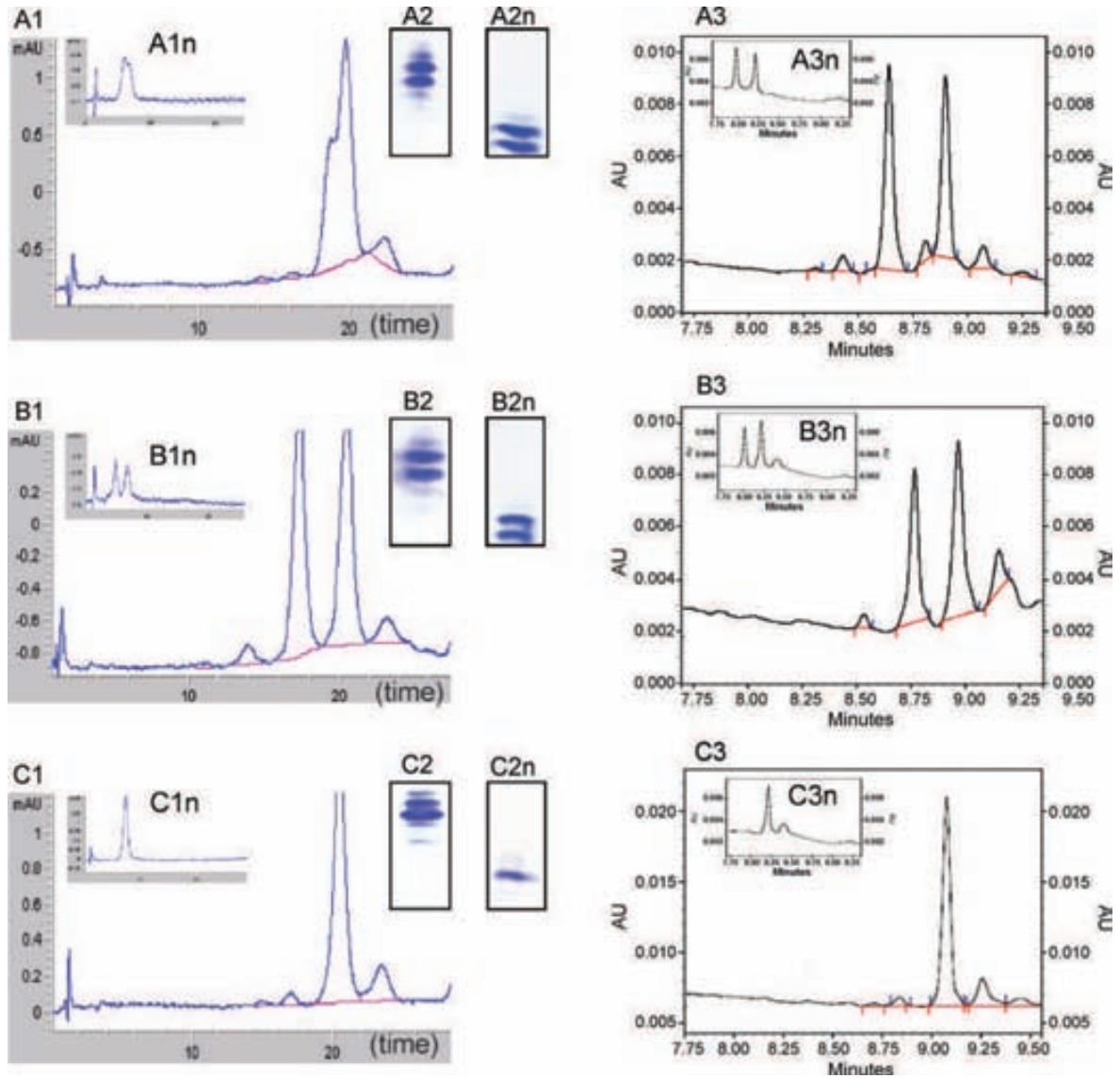


Fig. 3. Sialotransferrin patterns of two CD transferrin variants (A and B) as compared to a control sample (C). Subfigures 1, 2 and 3 refer to HPLC, IEF, and CZE, respectively. In the corresponding subfigures, the letter n refers to neuraminidase-treated samples. After neuraminidase treatment, the appearance of 2 peaks/bands with similar intensity confirms the presence of a transferrin variant. Tf-IEF panels: The numbers indicate the number of sialic acid residues in the corresponding type of sialotransferrin form (0, 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to a-, mono-, di-, tri-, tetra- and penta-sialotransferrin, respectively).

Other authors have previously established control values for the diagnosis of CDG syndromes in paediatric and adult controls [6,11], concluding that there were no marked age- or sex-related differences in the relative amounts of transferrin glycoforms. The values obtained in our paediatric population were very similar to those previously published by those authors.

Tf-IEF remains the cornerstone for the diagnosis of N-glycosylation defects, although it is a laborious and time-consuming technique not suitable for automation [6]. Furthermore, sensitivity problems may arise, especially for detecting slightly altered patterns. In our experience, we easily detected all the altered patterns both by HPLC and CZE, and even some slightly abnormal patterns that might be missed by Tf-

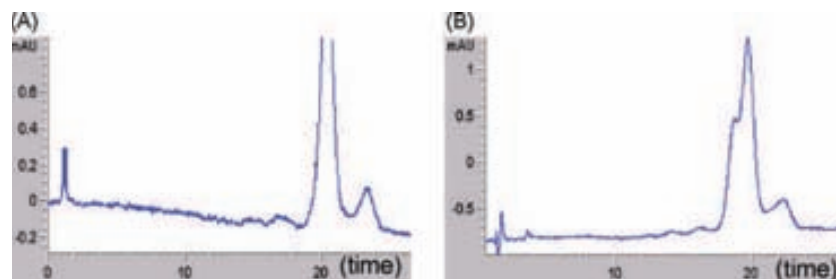


Fig. 4. HPLC analysis of a CD transferrin variant serum without sample filtration (panel A) and after filtration (panel B).

IEF were clearly discriminated by these procedures (Fig. 2, Table 1).

Protein variants have been a cause of diagnosis pitfalls with some techniques such as percentage of CDT (%CDT TIA), which expresses the sums the Tf variants carrying two or less sialic acid residues in relation to the amount of total Tf. We have analyzed several polymorphisms in order to verify that they do not interfere in our diagnostic tasks. Reproducible results were observed by HPLC and CZE for the detection of variant BC, and the pattern was undistinguishable from controls for variants CD₄₋₅ and C₁C₂ by the two procedures. But the analysis of two sera with the CD polymorphism that had presented the same altered Tf-IEF pattern (highly increased trisialo band), showed very slight differences between both samples by CZE, while it was difficult to detect the CD polymorphism in one of those sera by HPLC (Fig. 3). Filtration of this latter serum with Microcon YM-10 increased the resolution and allowed us to identify this polymorphic variant (Fig. 4). These two different polymorphisms may equally change the total charge of the transferrin polypeptide, and for this reason they present the same IEF profile. In addition, in one of them a change in the final structure due to the polymorphism of transferrin possibly counteracts the change of charge; this would make difficult its detection by HPLC, where the separation of transferrin glycoforms is based not only on the net charge of the molecules but also on their structural differences [11].

5. Conclusions

The data from this study indicate that both HPLC and CZE allow the separation and semi-quantitative evaluation of the transferrin glycoforms. Consequently, both are good procedures to screen for

CDG. Moreover, interpretation of the results using method-specific reference values may offer some advantages as compared with the standard Tf-IEF technique.

Acknowledgements

We thank the patients' families and the clinicians in charge of patients for their collaboration. The study was financially supported by grants Euroglycanet (Contract number: 512131) and FIS AI07/90007 (Ministry of Health). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII, Spain. This work has been performed in the context of the PhD program of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona.

References

- [1] J. Jaeken, G. Matthijs, H.A. Carchon, E. Van Schaftingen, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, USA, 2001, p. 1601.
- [2] S. Grünewald, *Early Hum. Dev.* 83 (2007) 825.
- [3] J. Jaeken, *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (2004) 423.
- [4] E.A. Eklund, H.H. Freeze, *NeuroRX* 3 (2006) 254.
- [5] C. Pérez-Cerdá, D. Quelhas, A. Vega, J. Ecaj, L. Vilarinho, M. Ugarte, *Clin. Chem.* 54 (2008) 93.
- [6] H.A. Carchon, R. Chevigné, J.B. Falmagne, J. Jaeken, *Clin. Chem.* 50 (2004) 101.
- [7] C. Lanz, J.B. Falmagne, F. l'Escaille, U. Marti, W. Thormann, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 33.
- [8] A. Helander, A. Husa, J.O. Jeppsson, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1881.
- [9] E. Quintana, A. Navarro-Sastre, J.M. Hernández-Pérez, J. García-Villoria, R. Montero, R. Artuch, A. Ribes, P. Briones, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 408.
- [10] A. Helander, J.P.M. Wielders, R. te Stroet, J.P. Bergström, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1528.
- [11] A. Helander, J. Bergström, H.H. Freeze, *Clin. Chem.* 50 (2004) 954.

4.2. AMPLIACIÓ DE LA METODOLOGIA PER L'ESTUDI DE PACIENTS AMB PATRÓ DE SIALOTRANSFERRINES TIPUS 2

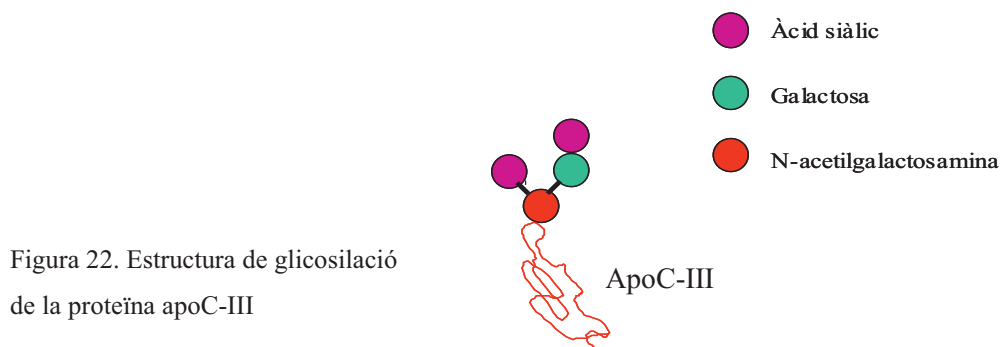
4.2.1. Posada al punt de la detecció d'isoformes d'apolipoproteïna C-III (apoC-III) per IEF

L'estudi de les isoformes de la transferrina ens permet detectar els defectes de la N-glicosilació i a més identificar si el defecte enzimàtic es troba al citosol o al RE (en el cas d'observar un patró tipus 1) o si el defecte es troba en el processament dels glicans un cop ja s'han unit a la proteïna (patró tipus 2).

Per tal d'orientar quin podria ser el nivell en que es troba el pas defectuós en els pacients amb patró tipus 2 vàrem introduir **l'estudi d'isoformes d'apoC-III**. Com ja s'ha esmentat es tracta d'una proteïna O-glicosilada del grup mucin type que comparteix alguns passos del processament dels glicans amb la via de la N-glicosilació i per tant serveix per descartar determinats defectes. L'estudi de les isoformes d'apoC-III permet separar dos grups de defectes tipus 2 de Tf-IEF:

- Patró tipus 2 de Tf-IEF amb alteració d'apoC-III-IEF
- Patró tipus 2 de Tf-IEF sense alteració d'apoC-III-IEF

L'apoC-III conté un sol punt de glicosilació i, igual que en els N-glicans, l'estructura del O-glicà és biantenal amb un àcid siàlic a l'extrem de cada una de les branques que li dona càrrega negativa (Fig. 22). Per tant es presenta amb tres isoformes amb punts isoeleèctrics diferents: apoC-III₀ (l'estructura del glicà unit no conté cap àcid siàlic), apoC-III₁ (amb un àcid siàlic) i ApoC-III₂ (dos àcids siàlics).



Un cop separades les isoformes d'apoC-III per IEF i fet el western blot es poden detectar per quimioluminiscència o per color, obtinguent una fotografia (ECL) (Fig. 23A) o una membrana tenyida (OPTI 4CN) (Fig. 23B) amb el patró de sialilació.

Com a control intern de la tècnica s'inclou en cada gel una mostra amb patró alterat. En el cas

que no es pugui diferenciar el control positiu, no s'acceptarien els resultats d'aquell gel.

Els patrons que trobem són:

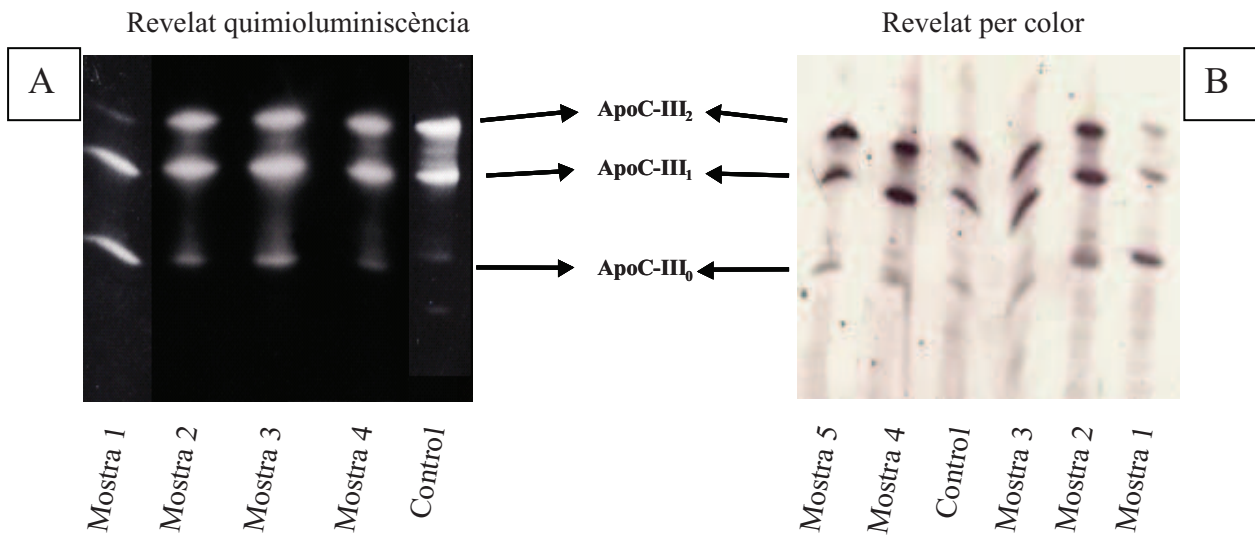


Figura 23. Resultat obtingut en la detecció de les isoformes d'apoC-III utilitzant revelat per A) quimioluminiscència, B) color. Mostra 1 presenta un patró apoC-III₀, mostres 2, 3, 4 i 5 corresponen a individus sense alteració en el patró d'apoC-III-IEF.

D'acord amb les descripcions d'altres autors (*Wopereis i col. 2003*), els nostres resultats mostren dos tipus de patrons alterats en les isoformes de la proteïna apoC-III (Fig. 24)

- Perfil apoC-III₀. Es caracteritza per mostrar un augment de la banda asialilada. Aquest és el perfil que presenten, entre altres, els pacients amb defectes de COG (CDG-IIe, g i h).
- Perfil apoC-III₁. Es caracteritza per mostrar un augment de la banda monosialilada, sense que hi hagi augment de la banda asialilada. Entre altres s'ha trobat en pacients amb defectes en el gen *ATP6V0A2* que codifica per una ATPasa localitzada a la membrana de l'aparell de Golgi. Aquest tipus de CDG es manifesta clínicament amb cutis laxa.

Però sovint apareixen dificultats en la interpretació de perfils de isoformes d'apoC-III. La banda monosialilada és la més abundant en un individu control, però, com hem mencionat, una de les alteracions (perfil apoC-III₁) es caracteritza per l'augment d'aquesta banda i no sempre és fàcil dilucidar si l'abundància de la banda monosialilada està dins els valors de referència o bé si està patològicament incrementada (Fig. 24).

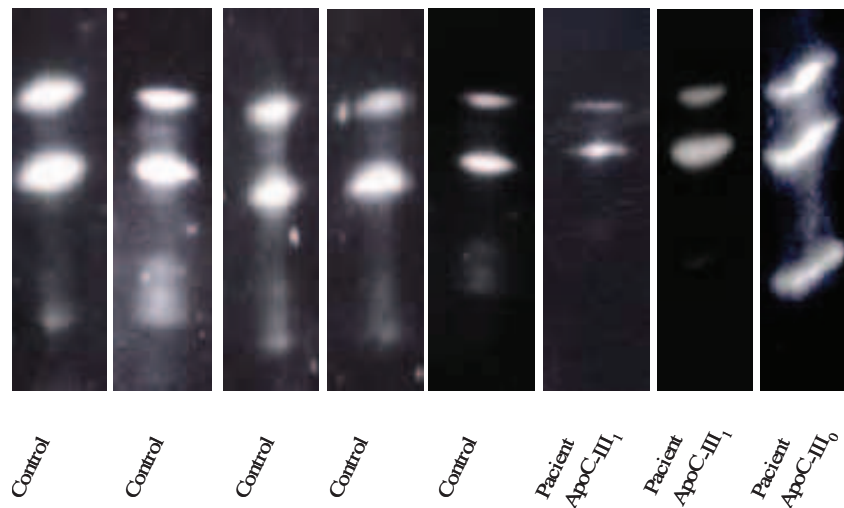


Figura 24. Diferents patrons de isoformes d'apoC-III de controls i pacients. Podem observar que alguns controls presenten una banda monosialo més incrementada que la disialo, difícil de diferenciar d'un patró patològic.

Tal com s'ha comentat per la transferrina, els mètodes densitomètrics per quantificar les bandes d'un gel o d'una membrana moltes vegades poden donar uns valors erronis, sovint la banda no és completament uniforme, de manera que s'obtenen diferents valors en funció del lloc escollit per la quantificació. Això fa que, en alguns casos, la interpretació de les bandes incorpori una subjectivitat important a l'hora de donar el resultat.

	Asialo-	Monosialo-	Disialo-
Controls n=15	0 - 11.8	30.1 - 63.9	27.4 - 66.1
ApoC-III ₀ n = 3	35.4 - 52.2	29.3 - 55.1	10.3 - 23.5
ApoC-III ₁ n = 2	5.6 / 4.0	75.2 / 67.2	19.3 / 28.8

Taula 11. Quantificació de les bandes de les isoformes de l'apoC-III per densitometria. Valors de referència i patològics.

Els valors de referència obtinguts per densitometria mostren un rang molt ampli (taula 11), per tant l'anàlisi quantitatiu no representa un ajut diagnòstic important respecte a la observació visual.

L'estudi de les isoformes de l'apoC-III ha permès fer un pas més en el diagnòstic dels CDG-

II, orientant o descartant certs defectes enzimàtics ja coneguts. La tècnica utilitzada pel seu estudi és l'isoelectroenfoc, que també és la tècnica per l'estudi de les isoformes de la transferrina, i amb les mateixes dificultats interpretatives. Wopereis i col (2003) van descriure dos possibles patrons d'apoC-III alterats, un amb increment de les bandes mono- i asialilada i un altre amb increment de la banda monosialilada, difícil de distingir dels patrons control en els que sovint les bandes monosialilades estan sensiblement augmentades respecte la banda disialilada. Els problemes de quantificació per densitometria dificulten la interpretació d'alguns perfils.

Tenint en compte el perfil d'isoformes de transferrina i d'apoC-III, Wopereis i col (2005) van establir una correlació entre perfils i subtipus de CDG-II. És aquesta una generalització discutible, ja que la severitat del perfil de transferrina i apoC-III (o sigui l'abundància de les bandes menys sialilades) també depèn de l'activitat residual de la proteïna mutada.

4.2.2. Estudi d'oligosacàrids en orina i identificació de la seva composició

Com s'ha esmentat en la introducció, la deficiència de glucosidasa I (CDG-IIb) no presenta alteració en el patró de Tf-IEF. El pacient descrit amb aquesta deficiència es va diagnosticar gràcies a la identificació dels sacàrids que formaven una banda anòmala en l'anàlisi per cromatografia en capa fina (TLC) d'oligosacàrids en orina (*De Praeter i col 2000*). Per aquest motiu vam creure convenient posar a punt l'**estudi d'oligosacàrids en orina**.

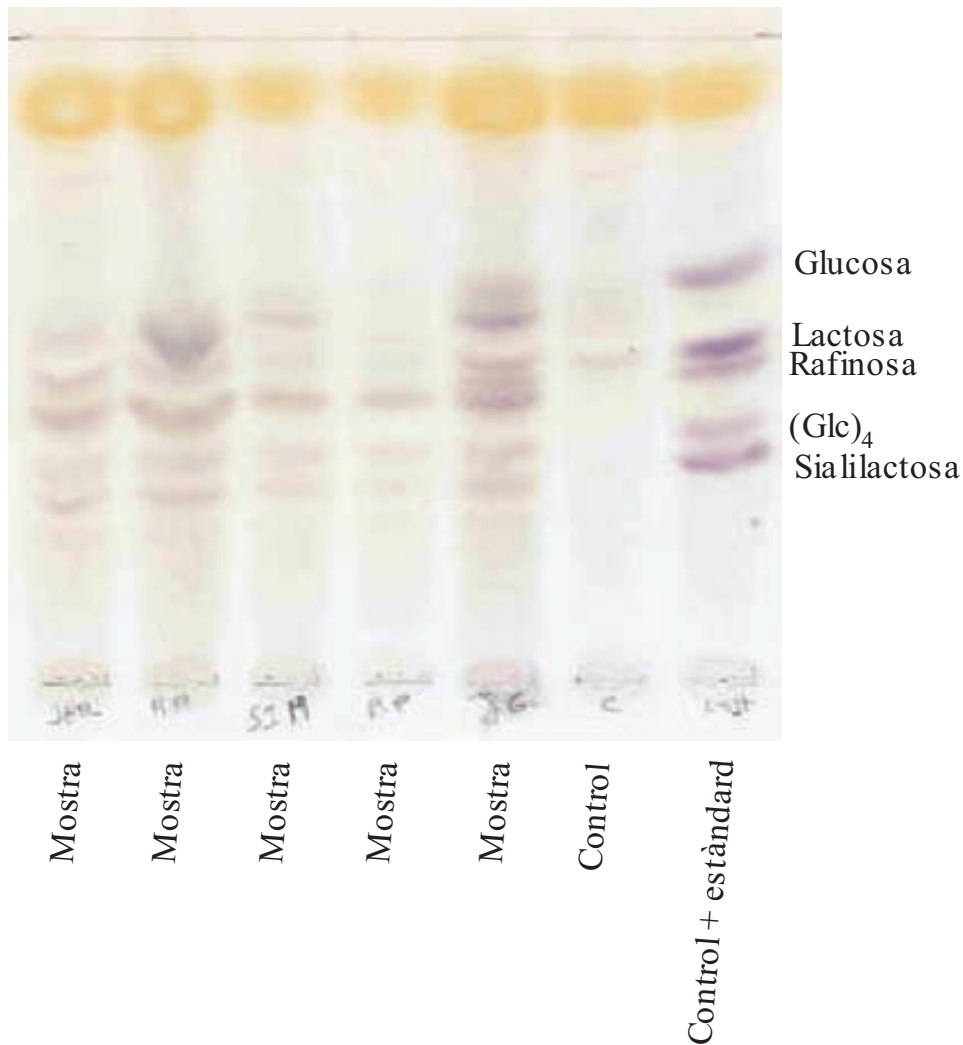


Figura 25. Exemple de cromatografia en capa fina per la detecció d'oligosacàrids en orina

Per tal d'obtenir les condicions òptimes per la identificació d'oligosacàrids, tant per HPLC-MS/MS com per GC-MS, vam processar els diferents estàndards de sacàrids: glucosa, galactosa, lactosa, rafinosa i cel·lotetraosa, a concentració 100 µM en aigua. Les condicions metodològiques òptimes han estat:

HPLC:

Solvent: Aigua : Acetonitril (80:20)

Fluxe: 0,2ml/min

Volum injectat: 50 µl per infusió
directe

MS/MS:

Ionització: Electro Spray negatiu

Voltatge del capilar: 2.5 KV

Voltatge del cono: 20,0 V

T^a font: 120°C

T^a desolvatació: 350°C

Mètode: SCAN

Temps d'anàlisi: 2 minuts

CG:

T^a injector: 250°C

T^a detector: 280°C

Rampa de T^a: 1 minut a 70°C
increment de 6°C/min fins a 250°C i 20
minuts a 300°C

Fluxe d'injecció: 1,3ml/min

Columna: 60m/0,25mm diàmetre/
190915-436 HP -5MS

Gas transportador: heli

MS

Tipus de ionització: impacte
electrònic

Rang de masses: 50-550 KDa

Mètode: SCAN

Temps d'anàlisi: 45 minuts

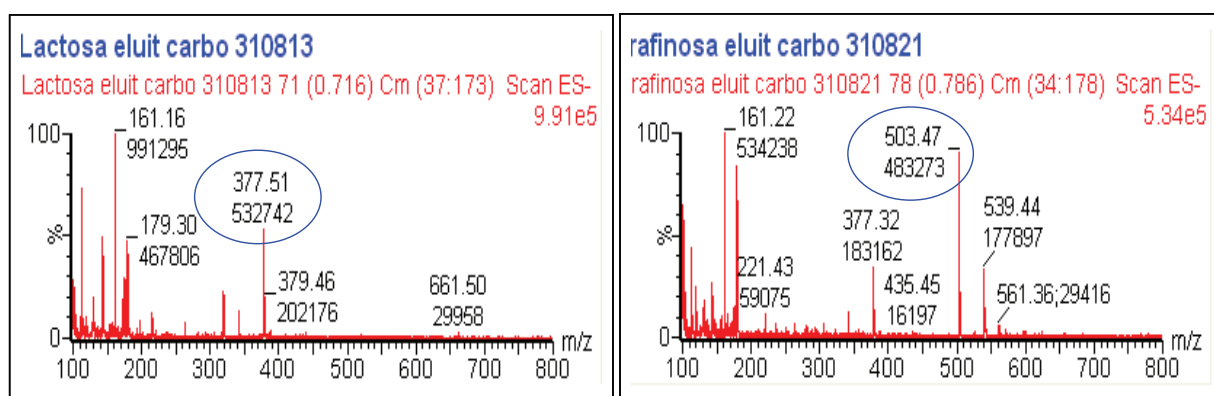


Figura 26. Exemple d'espectre obtingut per HPLC-MS/MS al analitzar els estàndards de lactosa (lactosa dihidratada) i rafinosa respectivament; es troben senyalats el seu pes molecular i l'abundància.

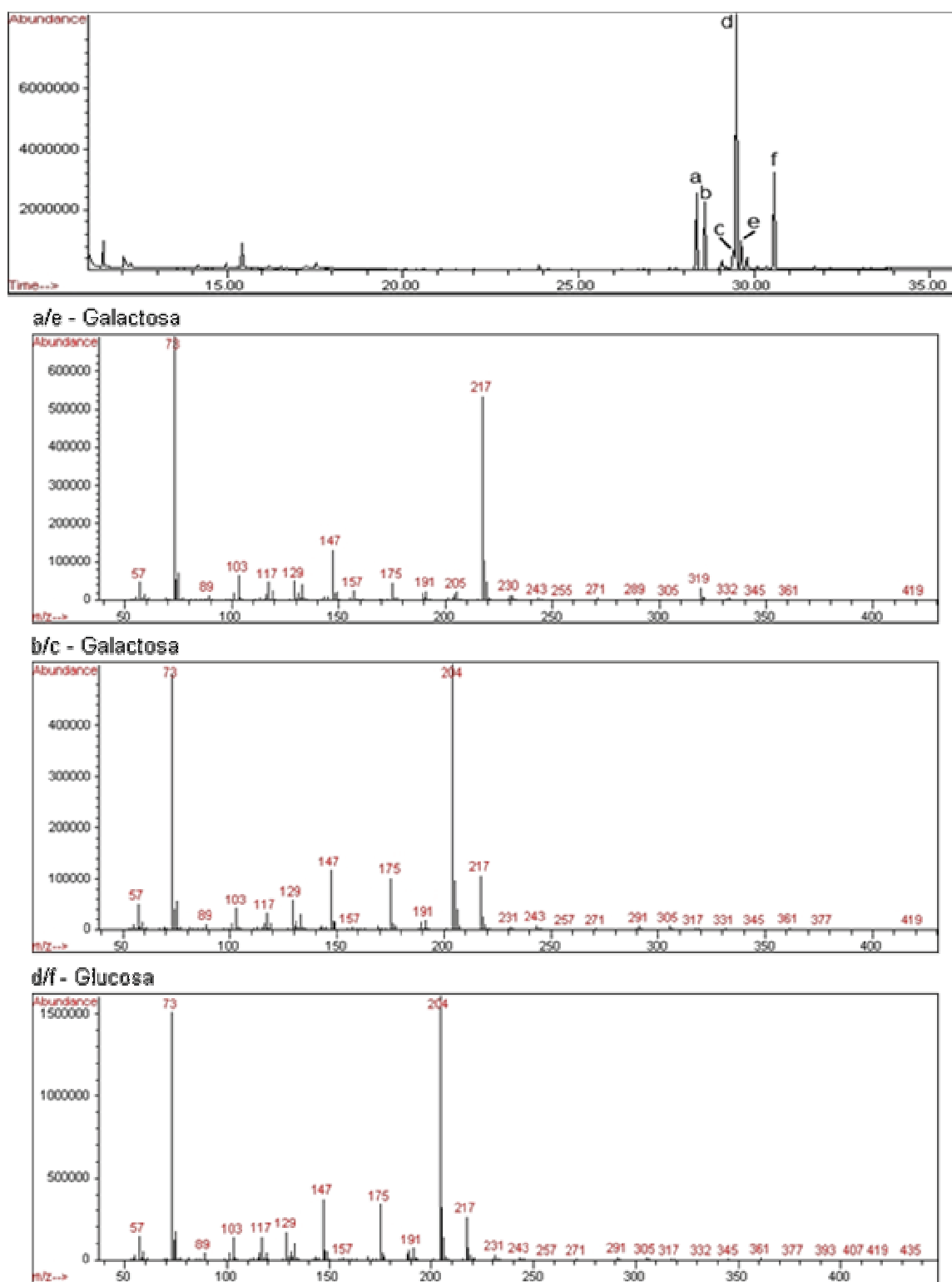


Figura 27. Cromatograma obtingut per GC-MS al analitzar la lactosa i espectre de cadascun dels pics. Diferenciem els pics provinents de la galactosa i els de la glucosa.

Per tant, estàvem ja en condicions de poder analitzar els oligosacàrids a partir de l'orina,

però vam trobar dificultats en la seva extracció a partir de les bandes prèviament separades per TLC. Vam utilitzar diferents solucions d'extracció: aigua – metanol (1:1), aigua i fase mòbil (N-butanol : àcid acètic : aigua (2:1:1). Amb cap d'aquestes condicions vàrem aconseguir una bona extracció. Per tant, malgrat la detecció d'alguns pacients amb excreció anòmala d'oligosacàrids en orina, les dificultats tècniques no han permès identificar la composició d'aquests glicans, ni conèixer si estan relacionats amb la via de la glicosilació.

Aquest és un objectiu que esperem finalitzar en un futur, degut a l'interès que pot tenir la identificació de la composició d'oligosacàrids d'alguns pacients (apartat 4.3).

Les deficiències congènites tipus II representen encara un repte diagnòstic. L'estudi de les isoformes de la transferrina permet la seva detecció en la majoria de casos, però la dificultat es presenta en el moment d'establir un diagnòstic definitiu. Hi ha moltes tècniques que permeten discriminar i orientar la localització del defecte enzimàtic: estudi de les isoformes d'apoC-III, dels glicans en sèrum mitjançant MALDI-TOF, dels oligosacàrids en orina, de les subunitats de COG... però malgrat això resten molts pacients classificats com a CDG-IIx.

De cadascun dels subtipus de CDG-II se n'han descrit un nombre reduït de casos, indicant una incidència baixa, i alhora, la gran quantitat de pacients CDG-IIx suggereix l'existència de moltes deficiències encara desconegudes.

4.3. CRIBRATGE I ESTUDI DE PACIENTS

Fins al moment es coneixen més de 30 tipus diferents de defectes congènits de la glicosilació. Tanmateix, de cada tipus se'n coneixen pocs casos (< 10), excepte per la deficiència de *PMM2-CDG* (CDG-Ia) que és la més freqüent amb uns 700 pacients diagnosticats i per les deficiències de *PMI-CDG* (CDG-Ib) i *ALG6-CDG* (CDG-Ic) amb uns 40 casos (*Freeze H i col 2005* i *Marklová i col 2007*).

En els 11 anys que s'estudien els CDG a l'Institut de Bioquímica Clínica s'han diagnosticat 52 pacients, dels quals 39 són deficiències de *PMM2-CDG* (CDG-Ia), una deficiència de *PMI-CDG* (CDG-Ib), una deficiència de *DPMI-CDG* (CDG-Ie) i una deficiència de *COG₈-CDG* (CDG-IIIh) (*Briones i col 2002*; *García-Silva i col 2004*; *Foulquier i col 2007*), i 10 pacients amb patró de transferrina alterat tipus 2 però que encara no s'ha pogut puntualitzar el defecte enzimàtic associat i que per tant els anomenem CDG-IIx .

Estudi de patrons de sialotransferrines per IEF/HPLC/CZE:

En el anys de realització d'aquesta tesis hem analitzat un total de 1905 sèrums de pacients que han estat remesos al nostre centre per tal de descartar malaltia metabòlica hereditària. Cal destacar que amb la implementació tant de Tf-HPLC com de Tf-CZE com a mètode de cribratge s'ha reduït molt el nombre de segones mostres demanades per confirmar el patró (sobretot amb alteracions de tipus 2) ja que, com s'ha esmentat, el sistema quantitatiu utilitzat permet una interpretació dels patrons de sialotransferrina més fàcil i objectiva. Hem detectat un total de 92 sèrums amb alteracions (taula 12), entre els quals només 14 han resultat ser defectes de la glicosilació: 8 amb patró tipus 1 i 6 amb patró tipus 2. En 42 casos, malgrat mostrar una alteració lleu, hem demanat una segona mostra per descartar un CDG. En els casos que hem rebut aquesta nova mostra hem descartat les alteracions prèviament observades. També hem detectat un total de 29 casos de polimorfismes de la transferrina sense significació patològica, i també dos patrons clarament alterats tipus 1 degut a una galactosèmia, i 5 deguts a fructosèmia. En la figura 28 es mostren exemples d'alguns dels patrons alterats obtinguts

PATRÓ	DIAGNÒSTIC	Nº PACIENTS
Patró tipus 1	CDG-Ia	7
	CDG-Ib	1
	Galactosemia	2
	Fructosemia	5
	Lleus alteracions	8
Patró tipus 2	CDG-II	6
	Polimorfismes	29
	Lleus alteracions	34

Taula 12. Resum dels resultats del cribatge pels defectes congènits de la glicosilació.

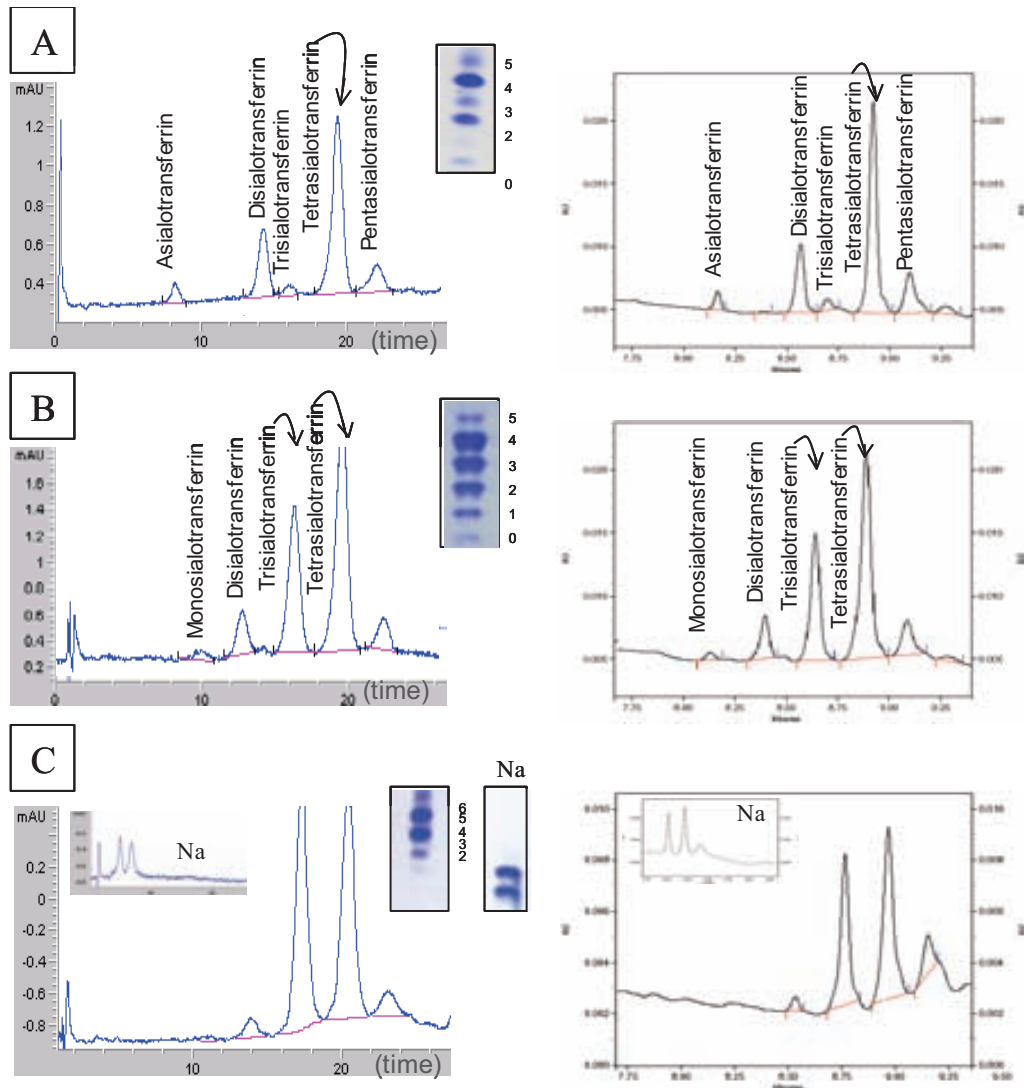


Figura 28. Exemple d' un patró tipus 1 (A), un patró tipus 2 (B) i el patró degut a polimorfisme CD de la transferrina (C) analitzats per HPLC (esquerra), IEF (centre), i CZE (dreta); per demostrar que es tracta d'un polimorfisme i no d'un patró patològic tractem les mostres amb neuraminidasa, per tal d'eliminar tots els siàlics i que la càrrega vingui determinada només per la proteïna. L'aparició de dues bandes o pics confirma que es tracta d'un polimorfisme.

Un total de 7 pacients han estat diagnosticats de deficiència de *PMM2-CDG* (CDG-Ia). Tot i l'àmplia variabilitat clínica descrita en els CDG (*Grunewald 2009*), tots els pacients que hem diagnosticat presenten característiques clíniques clàssiques dels CDG, com són el retard psicomotor i l'atrofia cerebel·lar, però amb diferents graus de severitat; així trobem pacients amb retard psicomotor moderat i sense altres manifestacions clíniques o bé pacients amb retard psicomotor sever associat a dismorfies, hipotonia, crisis convulsives i en algun cas hepatopatia, infeccions recurrents, estrabisme o atàxia.

Hem diagnosticat una pacient amb deficiència de *PMI-CDG* (CDG-Ib), que als 6 mesos presentava distensió abdominal, diarrees, hepatomegàlia i hipoglucèmia hipocetòsica, amb desenvolupament psicomotor normal. El diagnòstic d'aquest subtipus de CDG és rellevant pel fet de ser l'únic que disposa de tractament efectiu, que consisteix en l'administració de manosa 2 gr/Kg/dia. Convé introduir el tractament el més aviat possible per tal d'evitar que s'instauri l'hepatopatia. Amb la determinació d'isoformes de la transferrina podem monitoritzar les millores bioquímiques dels pacients un cop començat el tractament. Com podem veure en la figura 29, la pacient presentava un patró severament alterat en el moment del diagnòstic, aquest millora clarament al iniciar el tractament en paral·lel a una millora clínica, però als 2 anys de tractament encara s'observen alteracions significatives (Fig. 29), que expliquen el retard pondoestatural i la discreta hepatomegalia que presenta actualment.

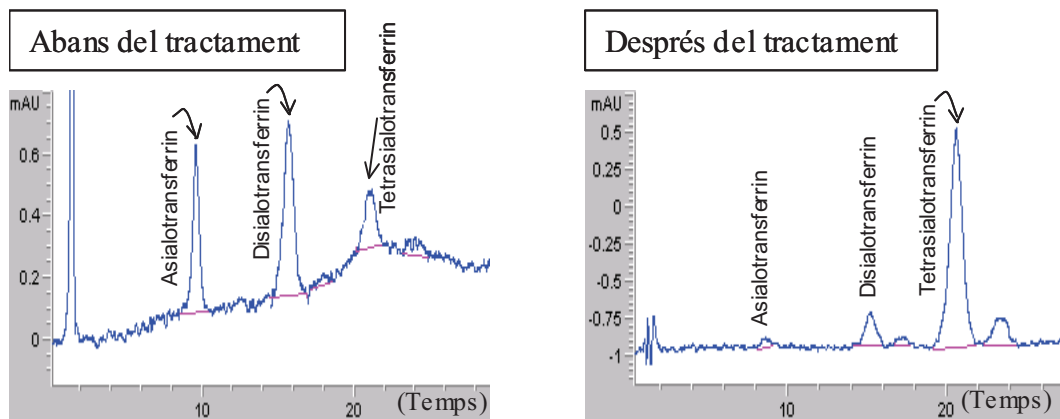


Figura 29. Patró de Tf-HPLC de la pacient amb deficiència de PMI (CDG-Ib) abans d'iniciar el tractament i dos anys després d'haver-lo iniciat.

En dues ocasions hem observat un patró alterat de tipus 1 que en el moment de descartar causes secundàries ha resultat ser una galactosèmia. Aquests pacients presentaven hepatopatia en el període neonatal (Fig. 30).

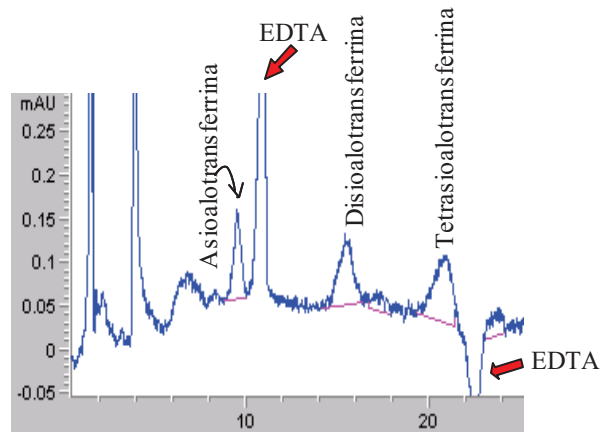


Figura 30. Perfil de Tf-HPLC d'un pacient afecte de galactosèmia

També hem detectat pacients amb patró de sialotransferrines tipus 1 degut a intolerància hereditària a la fructosa (HFI) (Fig. 31). En general es tracta de pacients amb clínica suggestiva de CDG-Ib, pel fet que no presenten afectació neurològica, sinó problemes hepàtics i gastrointestinals. Per tal de poder descartar la HFI com a causa primària de l'alteració del patró de sialotransferrines vam posar a punt la determinació de fructosa en sèrum mitjançant tècniques enzimàtiques. En un cas ens ha permès orientar el diagnòstic d'una sospita de CDG-Ib cap a l'estudi molecular del gen *ALBOB* confirmant així una HFI.

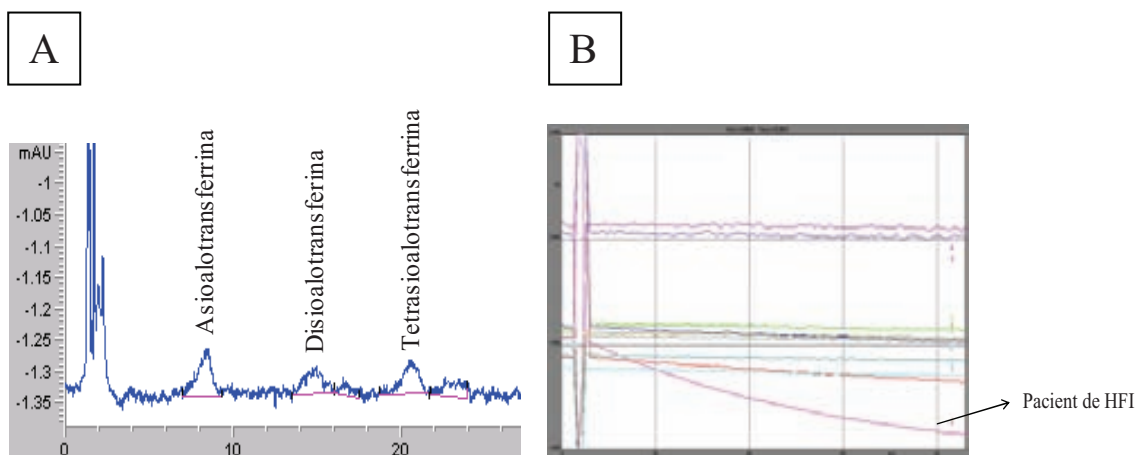


Figura 31. A) Patró de sialotransferrines sèriques d'una pacient amb HFI B) Valoració enzimàtica de fructosa en plasma de la pacient mitjançant la reacció de la sorbitol deshidrogenasa. Disminució de l'absorbància a 340 nm deguda a la oxidació de NADH

Amb el mètode Tf-HPLC també hem fet seguiment del tractament (dieta exempta de fructosa) de pacients afectes de HFI. En un pacient observem un patró completament normalitzat conseqüència d'un correcte seguiment de la dieta. Mentre que en un altre pacient observem lleus alteracions del patró de Tf-HPLC que ens indiquen un compliment incomplet de la dieta (Fig. 32).

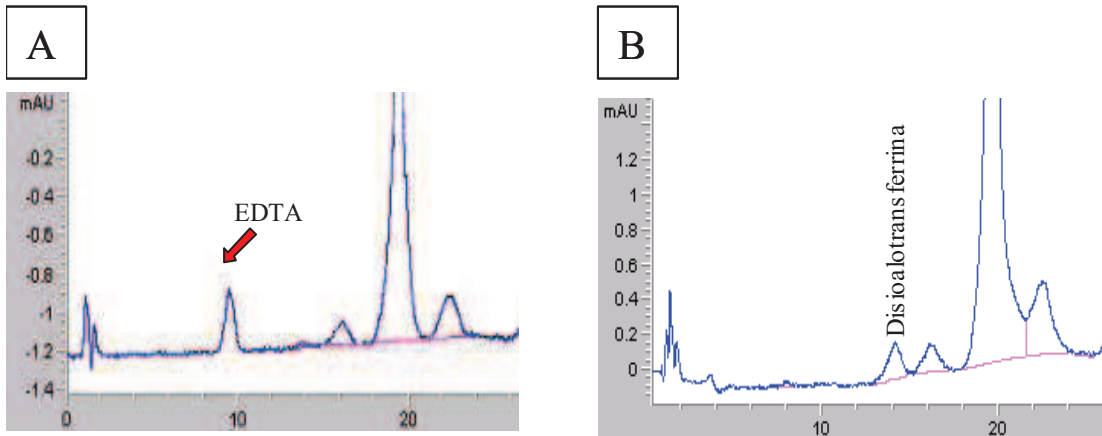


Figura 32. Perfil de Tf-HPLC de dos pacients amb HFI. A) Pacient que porta una correcta seguiment de la dieta exempta de fructosa, mostra una patró completament normalitzat. B) Pacient amb un mal compliment de la dieta, mostra un patró amb increment de la banda disialilada.

En els 6 pacients amb patró d'isoformes de la transferrina tipus 2 hem observat fenotips molt severs, amb *exitus* durant l'etapa neonatal en quatre dels sis. En general presenten dismorfies, hepatopatia, anomalies cefàliques i problemes de coagulació. Tres d'ells presentaven infeccions. Contrastant amb l'afectació generalitzada de la majoria dels pacients, hi ha un cas en què l'única presentació clínica eren convulsions intractables.

Isoelectroenfoc d'isoformes d'apoC-III

Pel que fa l'estudi de les isoformes d'apoC-III, els individus estudiats han estat 15 que presentaven patró de Tf-IEF tipus 2, i s'han inclòs també 117 que presentaven patró de transferrina dubtós i que recordaven el de CDG tipus II. També s'han analitzat 20 mostres de pacients que han estat remeses al centre directament per a descartar alteracions de la O-glicosilació.

D'aquests 152 sèrums analitzats, quatre han mostrat patró alterat. Els resultats s'il·lustren a la figura 33 i es resumeixen a la taula 13. Dos d'ells (pacients 9 i 10) han mostrat patró del tipus ApoC-III₀, i 2 més patró tipus ApoC-III₁ (pacient 11 i pacient 12), el que indica que el defecte d'aquests pacients afecta a la N- i la O-glicosilació.

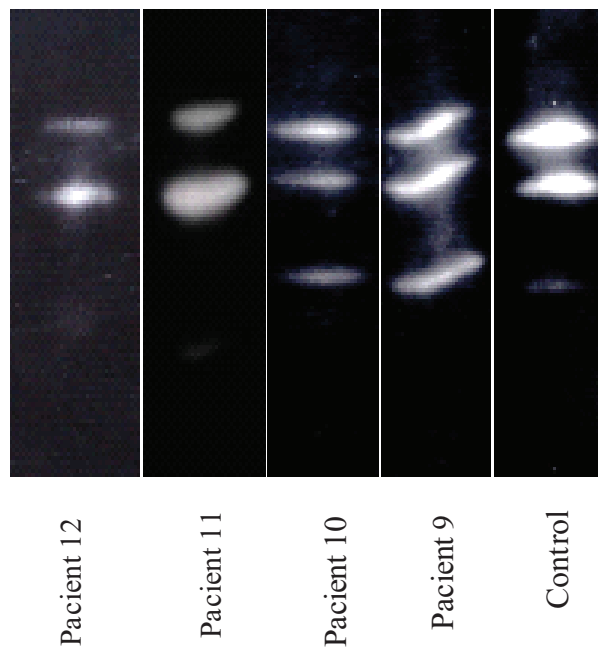


Figura 33. Patrons d'apoC-III-IEF dels pacients que han presentat un patró positiu





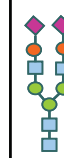







PATRO Tf	PATRÓ ApoC-III	Nº PACIENTS
Patró Tf tipus 2	ApoC-III ₁	2
	ApoC-III ₀	2
	Lleus alteracions	6

Taula 13. Resum dels resultats obtinguts en l'estudi de les isoformes de ApoC-III

Wopereis i col (2005) van proposar un algoritme per tal d'agrupar pacients amb patrons similars. Entre els pacients amb patró de sialotransferrines tipus 2 amb clar increment de totes les isoformes menys sialilades i amb patró de ApoC-III₀ es trobaven els defectes de COG. Aquest patró coincideix amb el que presenten els pacients 9 i 10. Per tal de descartar aquest defecte en aquests pacients hem remès mostres al grup del Dr. Matthijs de Lueven, participants en el projecte Euroglycanet per tal de realitzar un estudi de western blot de totes les subunitats del COG, però no s'ha observat cap deficiència, i actualment s'està realitzant l'estudi molecular dels diferents gens. A més a més, el grup de la Dra Sturiale de Catania, que també participen del projecte Euroglycanet, ha realitzat l'estudi dels glicans en sèrum (els resultats es resumeixen en la taula 14). Els 2 pacients presenten un increment d'estructures amb manca d'àcid siàlic, i també de galactosa en un d'ells, mentre que l'altre presenta increment de les estructures fucosilades. L'increment de les estructures amb dèficits dels últims sucres de la cadena de glicans ha estat prèviament descrit en els pacients amb defectes

de COG (Foulquier i col 2008).

Pels pacients amb alteració apoC-III₁ també s'ha realitzat l'estudi de les estructures de glicans mostrant també increment de les formes asialilades, el pacient 12 mostra un clar augment d'aquestes estructures, mentre que en la pacient 11 l'augment és molt lleu.

												
Pacient 9*	14.2 (nd)	25 (nd)	56.2 (14-30)	46 (16-39)	100	-	14 (13-27)	nd (nd-4)	6.8 (nd-2)	nd (5-18)	6.3 (4-15)	
Pacient 10	§	8	42	17	100	12	24	7,5	6	7,5	5	
Pacient 11	0	0	26	9	100	§	16	8	§	9	10	
Pacient 12	§	9	41	10	100	9	14	8	§	9	7	
Control	0	0	9	11	100	§	11	6	0	10	5	

Taula 14. Resum de les estructures de glicans expressades en quantitat relativa de cada estructura referida al ió més abundant [M]⁻2223.0, que correspon a l'estructura marcada amb 100%.

§ indica traces.

* L'anàlisi de glicans d'aquest pacient va ser realitzat per SELDI pel Dr. Winchester (London). Els seus valors control estan indicats entre parèntesis.

Recentment s'ha descrit un nou defecte de CDG que consisteix en la deficiència de *ATP6VOA2-CDG*, que afecte a la subunitat $\alpha 2$ d'una ATPasa vacuolar (V-ATPasa) localitzada en Golgi (Kornak i col 2008). Aquests pacients presenten un patró tipus 2 de transferrina amb una alteració de ApoC-III₁. Degut a la deficiència d'aquesta ATPasa, s'altera el bombeig de protons i per tant el pH de Golgi causant la deslocalització d'algunes glicosiltransferases, i també alterant el transport vesicular de Golgi. Això dóna lloc a una alteració de la glicosilació (Guillard i col 2009). Hem estudiat un neonat que presentava cutis laxa, mostrava lleus alteracions del patró de Tf-IEF, i un lleu increment de la banda ApoC-III₁ respecte els controls (Fig. 34). En l'actualitat es continuen els estudis (Dra Morava) per esbrinar si la cutis laxa i aquestes lleus alteracions són degudes a una deficiència de *ATP6VOA2-CDG* o si són inespecífiques i degudes a la immaduresa del pacient o causades per un defecte enzimàtic no conegut fins al moment.

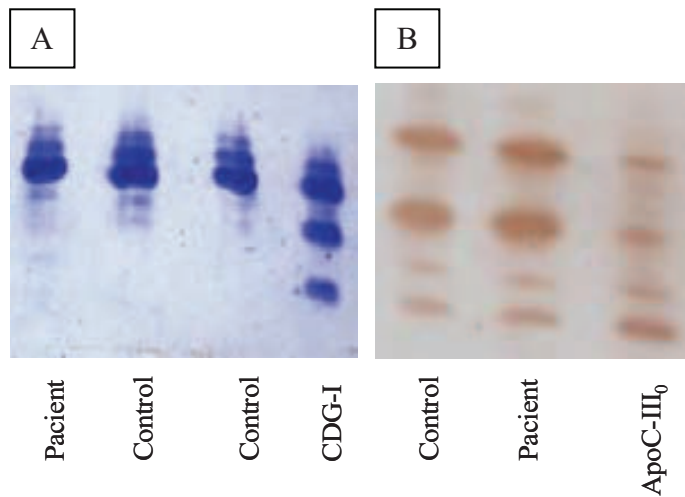


Figura 34. A) Patró de Tf-IEF del pacient on s'observa un lleu increment de les bandes menys sialilades. B) Patró d'apoC-III-IEF del pacient on s'observa un lleu increment de la banda monosialilada

Anàlisi d'oligosacàrids en orina

En l'anàlisi d'oligosacàrids en orina hem estudiat un total de 5 pacients i hem identificat una banda anòmala en dos casos (Fig. 35). Pel desplaçament realitzat pel glicà anòmal pensem que està format per almenys quatre sucres i podria estar sialilat.

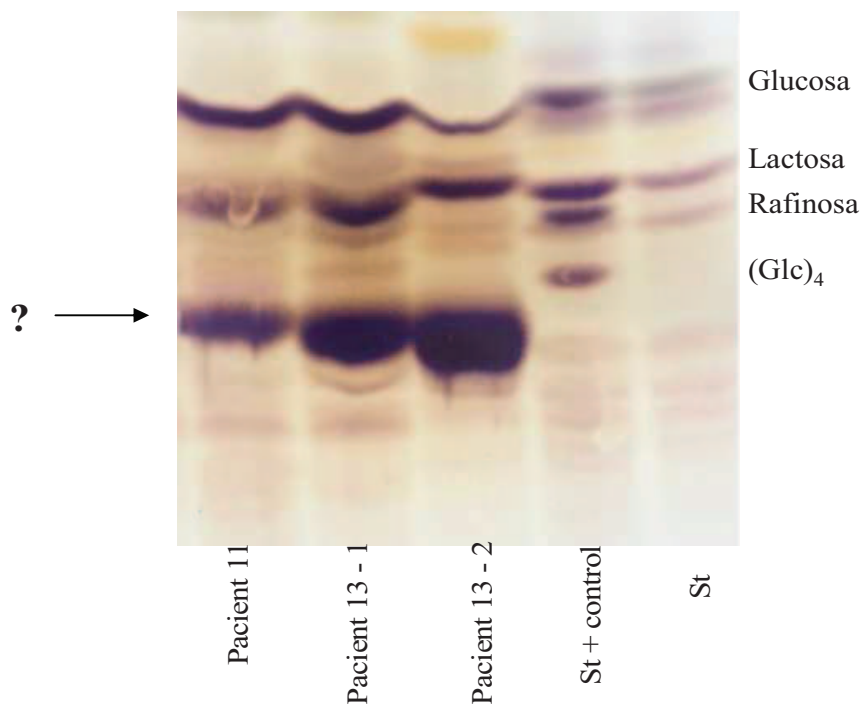


Figura 35. TLC dels pacients que presenten oligosacàrids anòmals en orina.

Degut als problemes que hem tingut amb l'extracció dels oligosacàrids de la placa de TLC, no hem pogut identificar la composició d'aquesta banda anòmala en l'orina de les pacients, aquests estudis han quedat interromputs de moment.

Les característiques dels pacients diagnosticats estan resumides a la taula 15.

4.3.1. Pacients afectes de Defectes Congènits de la Glicosilació

Així doncs, d'un total de 1905 mostres analitzades hem diagnosticat un total de 14 pacients que clarament presenten un CDG, de les quals en 8 s'ha pogut arribar al diagnòstic genètic final, essent 7 d'elles CDG-Ia (taula 15). Les freqüències obtingudes durant la realització d'aquest treball pels diferents tipus de CDG coincideixen parcialment amb les descrites a la bibliografia. Pel que fa als CDG-I, se n'han descrit fins a 15 tipus diferents, però de la majoria amb un número molt reduït de pacients, excepte per les deficiències de *PMM2-CDG* (CDG-Ia) (>700 casos), les deficiències de *PMI-CDG* (CDG-Ib) i les de *ALG6-CDG* (CDG-Ic) amb uns 40 casos cadascuna (*Eklund i Freeze, 2006*). Però encara s'espera trobar nous gens defectuosos causants d'un patró de tipus 1, degut a la descripció de un número significatiu de pacients CDG-Ix (*Morava i col 2008*). Aquestes freqüències queden reflectides també en els diagnòstics que s'han realitzat en el nostre centre durant els 11 anys d'estudi dels CDG, ja que d'un total de 42 pacients amb patró CDG-I, 40 d'ells corresponen a deficiència de *PMM2-CDG* (CDG-Ia) - 7 durant la realització d'aquest treball - i només un d'ells a deficiència de *PMI-CDG* (CDG-Ib) (diagnosticada durant la realització d'aquest treball) i un a deficiència de *DPMI-CDG* (CDG-Ie) (*Garcia-Silva i col 2004*). Cal destacar que no hem diagnosticat cap pacient amb deficiència de *ALG6-CDG* (CDG-Ic), tot i ser relativament freqüent en altres poblacions (*Imbach i col 2000*).

Com ja hem comentat abans, el nombre de defectes genètics associats a CDG creix contínuament, i també apareixen nous tipus de presentacions clíniques associades a defectes ja coneguts. Tot això ens ha dut a realitzar un ampli cribratge dels sèrums de pacients enviats al nostre centre per descartar malalties metabòliques hereditàries. Malgrat això, no hem detectat cap pacient amb patró tipus 1 que no s'hagi pogut associar a algun dels defectes ja descrits, i en un 95% dels casos pertanyien a CDG-Ia. La majoria de pacients manifestaven la simptomatologia clàssica d'aquest tipus de CDG (retard psicomotor, facies anòmales, mamil·les invertides, problemes de coagulació, hepatopatia, afectació cerebelar) però hem de destacar 3 pacients de CDG-Ia, diagnosticats en el nostre centre, amb una presentació clínica que suggeria més una malaltia mitocondrial que un CDG (ataxia progressiva, distonia, nistagmus, oftalmoplegia, retinitis pigmentosa) (*Briones i col 2001*). També cal destacar dos pacients amb clíniques molt lleus (hipertransaminasemia en un cas i retard en el desenvolupament motor en l'altre) malgrat portar la mutació p.R141H considerada molt severa en un dels al·lels.

Hem de ressaltar la utilitat que ha mostrat de detecció d'isoformes de la transferrina pel diagnòstic d'altres malalties metabòliques com és el cas de galactosèmies i intolerància hereditària a la fructosa. En els dos casos, l'afectació hepàtica que presenten els pacients, pot

confondre's amb un CDG, sobretot un tipus Ib. Això és útil sobretot en el cas de la intolerància hereditària a la fructosa, ja que no es disposa d'un mètode poc invasiu i sensible pel seu diagnòstic. Per intentar resoldre el problema del despistatge d'una HFI, hem posat a punt la detecció enzimàtica de fructosa en plasma que presenta uns valors $<0,15$ mM en controls ($n=15$), i que en un pacient de HFI que pren fructosa pot arribar a nivells de 1,05 mM. Es tracta d'una tècnica poc sensible, que no ens permet detectar lleus incompliments de la dieta en pacients amb tractament, però quan es tracta d'una HFI no diagnosticada amb ingesta de fructosa, la concentració d'aquesta en sèrum és prou elevada per ser detectada (Fig. 31B).

Com veiem, en la majoria de patrons tipus 1 s'arriba a identificar el defecte genètic final, ja que els passos a seguir en el diagnòstic estan molt clars. Però en els patrons tipus 2 el diagnòstic és molt més difícil d'orientar i de finalitzar; el nombre de defectes descrits és molt menor, sense que n'hi hagi cap que presenti una freqüència alta. Dels 11 pacients tipus II diagnosticats al nostre centre, només en un d'ells s'ha arribat a un diagnòstic final (deficiència de *COG₈-CDG*, Foulquier i col 2007). Sis dels altres 10 pacients tipus II s'han detectat durant la realització d'aquest treball. Per avançar en el seu diagnòstic hem posat a punt l'estudi de les isoformes d'apoC-III i d'oligosacàrids en orina per acotar la localització del defecte enzimàtic. Això ens ha permès identificar dos alteracions d'apoC-III₁ i dos d'apoC-III₀, i hem descartat l'afectació de la N- i la O-glicosilació en 6 pacients. En els pacients dels quals disposàvem de mostra d'orina hem estudiat la composició dels oligosacàrids, observant en dos casos bandes anòmales.

Per indagar més en l'estudi d'aquests 10 pacients, estem en col·laboració amb altres grups del projecte "Euroglycanet" per tal d'estudiar la composició dels glicans en sèrum, ja que l'acumulació d'un determinat glicà truncat ens orientaria també sobre l'alteració que presenta el pacient. Però malgrat tots aquests estudis en els nostres pacients tipus II, no hem pogut arribar a un diagnòstic definitiu en cap d'ells.

Possiblement crida l'atenció que amb els 11 anys que s'estudien els CDG al nostre centre s'han diagnosticat 42 pacients amb patró tipus 1, dels quals només 8 s'han diagnosticat en els 4 anys de realització d'aquest treball. És habitual en la majoria de malalties poc freqüents, com és el cas dels CDG, que en el moment de la descripció del defecte es diagnostiqui un nombre elevat de pacients entre individus sense diagnòstic i amb clínica compatible amb el nou defecte descrit. Això explica perquè durant els primers anys el nombre de pacients identificats al nostre centre va ser molt superior a l'actual. La freqüència de positius durant la realització d'aquest treball ha estat de 1:136 dels sèrums estudiats que corresponen a una població clínicament seleccionada. Tots els casos detectats venien orientats cap a un defecte

de glicosilació. Malgrat ser una freqüència elevada, és inferior a la que esperàvem, ja que no es tracta d'una malaltia concreta, sinó d'un grup nombrós de malalties i amb possibilitats de nous tipus encara no descrits.

Una explicació pel baix nombre de pacients CDG, sobretot de la deficiència de *PMM2-CDG* (CDG-Ia) per la seva abundància dins el grup dels CDG, vindria donada per la gran importància de la via en la viabilitat d'un individu. S'ha descrit que la mutació més freqüent en el CDG-Ia, R141H (37% dels al·lels patològics) (*Matthijs i col 2000*) presenta una activitat residual molt baixa (1%) (*Pirard i col 1999*). Aquesta mutació no s'ha trobat mai en homozigosi malgrat que s'ha calculat que la freqüència de portadors en població nord europea és de 1/72 (*Schollen i col 2000*). Això fa pensar que el bloqueig total d'aquesta via no és viable i que és possible que la major part d'individus afectes no arribin a néixer. Per tal de fer un cribratge més complet de casos afectes de CDG, es va plantejar l'estudi d'avortaments espontanis i de fetus polimalformats, els resultats dels quals s'exposen més endavant (4.4).

Taula 15a. Resum dels pacients diagnosticats de CDG

Cas	Sexe	Característiques clíniques	Patró Tf-IEF	Patró ApoC-III-IEF	Activitats enzimàtiques nmol/min x mg prot	Mutacions	Estructures de glicans
1	D	Microcefalia, facies anòmales, sordesa, retard psicomotor convulsions, atrofia cerebel·losa	Tipus 1	-	PMM: 0,13 Control: 2,5	p.R123Q/p.F183S PMM2	-
2	D	Encefalopatia, hipotonia axial, hipertonia d'extremitats, discreta distrofia cerebral i cerebel·losa, trastorn oculomotricitat	Tipus 1	-	PMM: 0,73 Control: 2,1	p.V44A/ p.F207S PMM2	-
3	H	Mamil·les invertides, retro-micrognatia, tòrax prominent, criptorquídia, enfonsament palpebral antimongoloide	Tipus 1	-	Pèrdua del seguiment de la mostra	-	-
5	D	Lleu retard psicomotor	Tipus 1	-	PMM: 0.33 Control: 5.22	p.F157S/p.C241S PMM2	-
6	D	Retard psicomotor global sever, dismòrfies, marcada hipotonia, atrofia cerebel·losa	Tipus 1	-	PMM: 0,40 Control: 2,74	p.R141H/p.T226S PMM2	-

Taula 15b. continuació. Resum dels pacients diagnosticats de CDG

Cas	Sexe	Característiques clíniques	Patró Tf-IEF	Patró ApoC-III-IEF	Activitats enzimàtiques nmol/min x mg prot	Mutacions	Estructures de glicans
6	H	Retard psicomotor afectant sobretot l'àrea del llenguatge, hipotonia, estrabisme, hipoplasia cerebel·losa	Tipus 1	-	PMM: 0,84 Control: 2,47	p.R141H/p.C241S PMM2	-
7	D	Retard psicomotor, atrofia cerebel·losa	Tipus 1	-	-	p.P113L/p.P113L PMM2	-
8	D	Gastroenteritis, diarrees, hipoglucèmia acetònica, transaminases i GGR altes, no afectació neurològica	Tipus 1	-	PMI: 0, 24 Control: 10,1	p.M51T/p.M51T PMI	-
9	H	Síndrome polimalformatiu, hepatopatia, nefropatia i osteopatia anomalies cerebrals i facials infeccions recurrents, <i>exitus</i> als 5 mesos i mig	Tipus 2	ApoC-III ₀	-	-	Falta de siàlic i galactosa
10	D	Trastorn multi orgànic, hepatopatia, fàcies anòmala, microcefàlia, alteracions esquelètiques, acidosi, cetosi i làctic elevat, <i>exitus</i> als 15 dies	Tipus 2	ApoC-III ₀	-	-	Dèficit de siàlic i augment d'estructures fucosilades

Taula 15c. continuació. Resum dels pacients diagnosticats de CDG

Cas	Sexe	Característiques clíniques	Patró Tf-IEF	Patró ApoC-III-IEF	Activitats enzimàtiques nmol/min x mg prot	Mutacions	Estructures de glicans
11	D	Convulsions intractables	Tipus 2	ApoC-III ₁	-	-	Petit dèficit d'estructures amb falta de siàlic
12	H	Dismorfies, hepatopatia, infeccions, nefromegàlia, convulsions i retard en les adquisicions	Tipus 2	ApoC-III ₁	-	-	Estructures amb dèficit de siàlic
13	D	Vòmits i dolor abdominal, dismorfies, cardiomiopatia, hepatomegàlia i descompensació metabòlica	Tipus 2	-	-	-	Lleugera hiposialilació i hipogalactosilació
14	H	Transaminases elevades, ascitis, coagulació alterada, descamació, dismorfia, infecció per E. Coli i Pseudomonas, hepatopatia fulminant	Tipus 2	-	-	-	-

4.3.2. Casos que presenten un patró de sialotransferrines alterat degut a causes secundàries

Gràcies al cribratge de tots els sèrums de pacients remesos al laboratori, i en col·laboració amb el grup de Bioquímica Clínica de l'Hospital Sant Joan de Déu, que també treballa en el diagnòstic dels CDG, hem pogut detectar varis pacients interessants amb anomalies en el patró de sialotransferrines sèriques degudes a causes secundàries.

Alteració de Tf-IEF degut a meningitis pneumococcica

Pacient de 5 mesos d'edat que ingressa a l'hospital Sant Joan de Déu amb sospita de meningitis bacteriana, presentant febre, convulsions mioclòniques i hemiparèsia del costat esquerra. Durant l'ingrés es va realitzar estudis de CT-Scan i MRI cerebrals, revelant algunes alteracions que suggerien una possible malaltia metabòlica.

Es va dur a terme un extens estudi metabòlic mostrant com a única alteració un patró de Tf-IEF alterat tipus 2. Seguidament es van analitzar les isoformes d'apoC-III que no van mostrar alteracions.

Per altra banda, responent a la sospita de meningitis bacteriana es van realitzar cultius de sang i de líquid cefalorraquidi que van confirmar la infecció per *Streptococcus pneumoniae*.

Al repetir l'estudi de Tf-IEF passats cinc dies de l'ingrés i de l'inici de la teràpia antibiòtica, es mantenia el patró alterat. Finalment, passats setze dies i juntament amb la remissió de la infecció bacteriana, el patró de sialotransferrines s'havia normalitzat (Fig. 36).

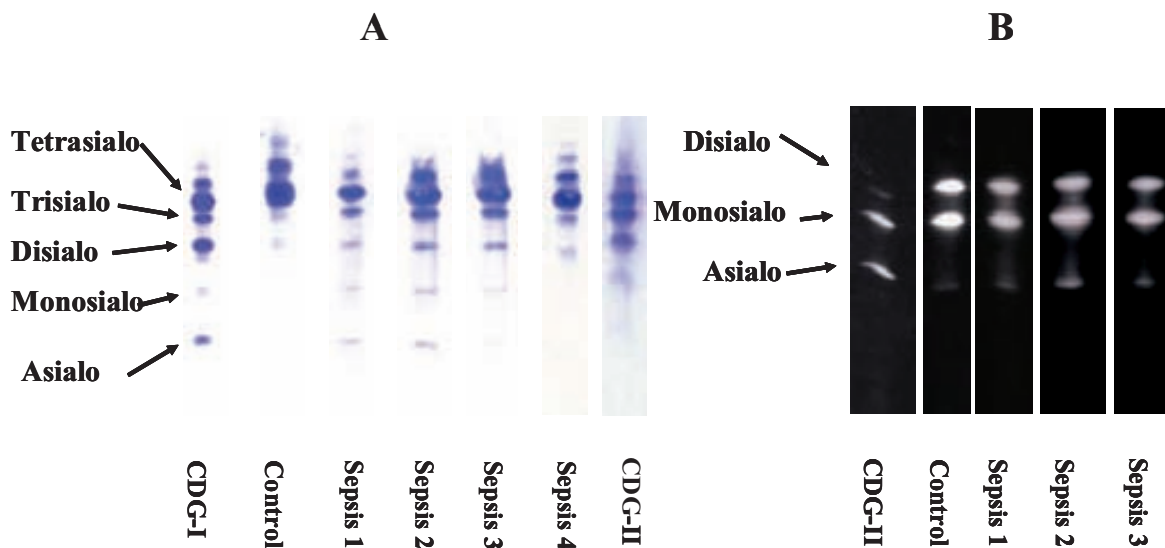


Figura 36. A) Tf-IEF del pacient en diferents moments de la infecció.

B) ApoC-III-IEF del pacient en diferents moments de la infecció, no s'observa alteració en cap d'ells.

Moltes vegades el debut de les malalties metabòliques va associat a un estrès metabòlic com pot ser una infecció, i en aquests casos si el patró de sialotransferrina està alterat, es fa difícil diferenciar si la causa primària de l'alteració és un defecte de glicosilació o la infecció.

Davant un patró de Tf-IEF del tipus 2 però ApoC-III-IEF normal, amb fallida multi orgànica i mort neonatal és important descartar un procés sèptic com a causa de l'alteració de Tf-IEF.

L'ampliació del cribratge pels CDG ens ha permès descriure una causa no coneguda prèviament d'alteració secundària de les sialotransferrines, la sepsis bacteriana. El procés sèptic és un símptoma freqüent en pacients amb síndrome metabòlica generalitzada i aguda, situació en la que poden mostrar un patró 2 secundari a la infecció. Si es repeteix l'anàlisi de les sialotransferrines un cop remesa la infecció, la obtenció d'un patró normal ens indicarà que el perfil 2 era degut a la sepsis, mentre que un patró que es mantingui alterat reforça el diagnòstic de CDG-II. Però en els pacients que són *exitus* durant aquest procés no es possible descartar la sepsis com a alteració secundària.

Aquests resultats han estat publicats amb el nom de “**Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis**”. ***Quintana E, Gala S, García-Cazorla A, Montero R, Muñoz-Almagro C, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R. J Inherit Metab Dis 2007;30:267 (Annex 1)***

Alteració de Tf-IEF degut a alteracions en el metabolisme de la fructosa

Es presenta l'experiència de patró de sialotransferrines anòmal secundari a dues alteracions del metabolisme de la fructosa.

El primer cas consisteix en una pacient amb intolerància hereditària a la fructosa (HFI) i presentació clínica atípica. Neonatalment mostrava afectació neurològica, que junt amb l'hepatopatia i la microcefàlia aparegudes a partir de l'any de vida, van fer sospitar un CDG. L'anàlisi de Tf-IEF va mostrar un sever patró tipus 1, que va desencadenar un estudi exhaustiu sense poder caracteritzar el defecte enzimàtic. Finalment la pacient es va diagnosticar de HFI.

En el segon cas posem de manifest una alteració secundària del patró de sialotransferrines degut a la deficiència de fructosa-1,6-bisfosfatasa (deficiència de FBP1).

La HFI és una causa coneguda d'alteració secundària del patró de sialotransferrines, però la nostra pacient amb deficiència de FBP1 és la primera descripció que associa un patró de glicosilació anòmal amb aquesta deficiència.

Article:

Secondary Disorders of Glycosylation in Inborn Errors of Fructose Metabolism. Quintana E, Sturiale L, Montero R, Andrade F, Couce ML, Barone R, Aldamiz-Echevarria L, Ribes A, Artuch R, Briones P. J Inherit Metab Dis 2009 DOI 10.1007/s10545-009-1219-4.

SINTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

Adamowicz i col el 2007 van reportar tres casos de HFI amb presentació atípica, ja que en dos d'ells es manifestava afectació neurològica ja neonatalment. I en els quals el seu diagnòstic es va retardar per haver-se classificat com a CDG-Ix.

En el nostre article presentem un nou cas de HFI amb presentació atípica, que en el moment del naixement presentava hipotonia, trismus facial, absència del reflex de succió i reflux gastroesofàgic. L'anàlisi mostrava moderada hipertransaminasemia, hiperlactacidemia esporàdica, i nivells baixos de carnitina en plasma així com increment de succinat, fumarat i α -cetoglutarat en orina. Els cossos reductors en orina van ser negatius. La MRI cerebral era normal. La pacient va presentar infeccions respiratòries recurrents, i a partir de l'any de vida es va evidenciar microcefàlia i hepatopatia progressives.

Quan la pacient tenia 3 anys, la coexistència dels signes neurològics, retard en el desenvolupament, junt a l'afectació hepàtica van fer sospitar un defecte de glicosilació. El Tf-IEF va mostrar un patró sever tipus 1 i per tal de caracteritzar el defecte enzimàtic es van

estudiar les activitats de PMM i PMI en fibroblasts que van resultar normals, i també la composició del LLO en fibroblasts.

Degut a l'afectació hepàtica progressiva i al fet que la mare referia rebuig a les fruites, es va pensar en una intolerància hereditària a la fructosa, que es va confirmar amb la presència de les mutacions p.A150P i p.N334K en el gen *ALDOB*.

La pacient actualment té cinc anys i gràcies la dieta exempta de fructosa, presenta una bona evolució, encara que l'estat avançat de la cirrosi que patia, va obligar a realitzar un trasplantament hepàtic. Únicament la microcefalia persisteix.

Hem comptat amb la col·laboració de la Dra Sturiale (Catania) per estudiar les estructures de glicans de la transferrina, observant que abans d'iniciar el tractament hi havia un augment de les formes amb pèrdues d'àcid siàlic i un augment important de les formes fucosilades, característic de l'hepatopatia. Amb la dieta lliure de fructosa aquestes alteracions s'han normalitzat.

La HFI és una causa coneguda d'alteració secundària del patró de Tf-IEF. Els pacients afectes de HFI normalment mostren els primers trastorns a partir dels quatre / sis mesos de vida, quan el nadó comença a menjar fruita i cereals; per aquest motiu les alteracions neonatals que presentava la pacient van donar lloc a que les investigacions de laboratori anessin dirigides cap a altres patologies, el que va causar un retard en el seu diagnòstic.

El nostre article també presenta una alteració moderada en el patró d'isoformes de la transferrina causada per una deficiència de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP1).

La pacient presentava la clínica característica d'una deficiència de FBP1: vòmits, hipoglicèmia, hipertransaminasèmia i increment de glicerol i glicerol-3-P en orina que van confirmar el diagnòstic. Pel fet de tractar-se d'una malaltia que també altera el metabolisme de la fructosa, vam estudiar l'efecte que produïa sobre les isoformes de la transferrina, observant un patró tipus 1 moderat, confirmat per l'estudi mitjançant MALDI-MS dels glicans de transferrina intactes, i que es va normalitzar amb la dieta adequada. L'estudi de la composició dels glicans de la transferrina va mostrar una patró heterogeni, amb petites quantitats d'estructures biantenals truncades i amb un cert increment de les formes amb falta d'àcid siàlic. No es va observar increment en les formes fucosilades. Amb la incorporació del tractament la heterogeneïtat va desaparèixer.

La nostra observació descriu per primera vegada les deficiències de fructosa-1,6-bisfosfatasa com una causa secundària d'alteració del perfil d'isoformes de la transferrina.

La intolerància hereditària a la fructosa era ja una alteració secundària del patró de sialotransferrines àmpliament descrita (*Jaeken i col 1996*), però amb una simptomatologia que

apareix al voltant dels 5 mesos, quan el pacient comença a ingerir fruita i cereals. Adamowicz i col (2007) ja havien descrit l'existència de pacients de HFI amb clínica de presentació neonatal, i que havien estat diagnosticats de CDG-Ix. Nosaltres hem aportat les característiques clíniques d'un nou pacient de HFI amb presentació atípica, i a més hem realitzat l'estudi dels glicans units a la transferrina així com les estructures de glicans, que mostren hipoglicosilació i increment de les formes amb falta de galactosa i àcid siàlic. El patró es normalitza amb la introducció de la dieta exempta de fructosa.

Pel que fa a les deficiències de FBP1, la clínica hepàtica i de hipoglucèmies ens podria fer pensar en una deficiència de *PMI-CDG*, però realitzant l'estudi metabòlic bàsic d'àcids orgànics s'evidencia l'augment de glicerol i glicerol-3-P en orina que indica una deficiència de FBP1.

Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism

E. Quintana · L. Sturiale · R. Montero · F. Andrade ·
C. Fernandez · M. L. Couce · R. Barone ·
L. Aldamiz-Echevarria · A. Ribes · R. Artuch ·
P. Briones

Received: 15 April 2009 / Submitted in revised form: 20 July 2009 / Accepted: 23 July 2009 / Published online: 20 September 2009
© SSIEM and Springer 2009

Summary Adamowicz and colleagues raised the alert in 2007 about patients with atypical hereditary fructose intolerance (HFI) primarily misdiagnosed as CDG IX. We describe a girl with neonatal hypertonia, facial trismus, absent swallowing and coughing reflexes, gastro-oesophageal reflux and sporadically elevated Krebs cycle metabolites and lactate. At 14 months microcephaly and hepatomegaly were noted, with hypertransaminasaemia but normal blood coagulation, glucose, phosphate, and absent urinary reducing substances. Neurological impairment persisted. Because of hepatic and neurological abnormalities with developmental delay,

Tf IEF was performed and showed a severe type 1 pattern, resulting in a wrong diagnosis of CDG. Subsequently, an aversion to fruits suggested HFI, confirmed by the finding of *ALDOB* mutations (p.A150P/p.N335K). The girl improved with fructose-free diet, but liver cirrhosis led to hepatic transplantation. She is now 7 years old with good evolution; facial trismus and hypertonia reversed, but microcephaly persists. Transferrin MALDI-TOF MS characterization revealed underoccupation of glycosylation sites and glycan abnormalities, which reversed with dietary treatment. High maternal fructose concentrations might have caused neonatal abnormalities. Although in

Communicating editor: Jaak Jaeken

Competing interests: None declared

References to electronic databases: Hereditary fructose intolerance: OMIM 229600. Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency: OMIM 229700. Aldolase B: EC 4.1.2.13. Fructose-1,6-bisphosphatase: EC 3.1.3.11.

E. Quintana · C. Fernandez · A. Ribes · P. Briones (✉)
Institut de Bioquímica Clínica,
Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic,
Edifici Helios III, c/ Mejia Lequerica s/n,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: pbriones@clinic.ub.es

L. Sturiale · R. Barone
CNR—Istituto per la Chimica e la Tecnologia dei Polimeri ICTP,
Catania, Italy

R. Montero · R. Artuch
Servei de Bioquímica, Hospital Sant Joan de Déu,
Barcelona, Spain

F. Andrade · L. Aldamiz-Echevarria
Servei de Pediatria, Hospital de Cruces,
Bilbao, Spain

M. L. Couce
Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Santiago,
Santiago de Compostela, Spain

R. Barone
Center for Inherited Metabolic Diseases,
Department of Pediatrics, University of Catania,
Catania, Italy

P. Briones
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Barcelona, Spain

E. Quintana · R. Montero · C. Fernandez · A. Ribes ·
R. Artuch · P. Briones
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER),
Barcelona, Spain

our patient's mother there is no fructose accumulation at present, it is possible that increased ingestion of fruits and vegetables during pregnancy, together with her heterozygosity, caused an accumulation of fructose that finally affected the fetus. We also describe slightly abnormal transferrin isoelectric focusing and MALDI-TOF MS patterns of intact transferrin and *N*-glycans in a fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1)-deficient patient. While HFI is a well-known cause of secondary CDG, we found no reports of abnormal transferrin isoelectric focusing patterns in FBP1 deficiency and we introduce this condition as a possible secondary cause for altered transferrin isoelectric focusing.

Abbreviations

apoC-III	apolipoprotein C-III
CDG	congenital disorder(s) of glycosylation
FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase
GC/MS	gas chromatography-mass spectrometry
HFI	hereditary fructose intolerance
IEF	isoelectric focusing
LLO	lipid-linked oligosaccharides
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MRI	magnetic resonance imaging
MS	mass spectrometry
PMI	phosphomannose isomerase
PMM	phosphomannomutase
Tf	transferrin
TLC	thin-layer chromatography

Introduction

Hereditary fructose intolerance (HFI, OMIM# 229600) is caused by deficiency of aldolase B (EC 4.1.2.13), and usually presents at the time of weaning with episodes of hypoglycaemia and vomiting after the intake of fructose or related sugars; if untreated, HFI may lead to death from severe liver and kidney failure. The clinical presentation of fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1; EC 3.1.3.11) deficiency (OMIM 229700) is also triggered or worsened by ingestion of fructose; a defect of this gluconeogenic enzyme can be life-threatening and manifests with hypoglycaemia and lactic acidosis on fasting, and increased urinary excretion of glycerol and glycerol 3-phosphate (Steinmann et al. 2001).

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are genetic disorders due to defects in the synthesis or processing of glycan moieties of glycoproteins (Jaeken et al. 2001). CDG are usually multisystemic, but with wide clinical heterogeneity, and therefore it is advisable

to include CDG in the routine screening of metabolic disease. The analysis of serum sialotransferrin pattern by isoelectric focusing (Tf IEF) is used for screening of CDG due to a sialic acid-deficient *N*-glycosylation defect. Alterations of Tf IEF patterns may point to defects in the synthesis/assembly (type 1) or processing (type 2) of the glycans (Jaeken et al. 2001). Nevertheless, when finding an altered pattern in a patient, it is essential to discard secondary glycosylation disorders before initiating laborious investigations. In particular, patients with untreated galactosaemia or HFI present a Tf IEF type 1 pattern (Jaeken et al. 1996; Sturiale et al. 2005), and some of them may present atypical features, and be misdiagnosed as CDG (Adamowicz et al. 2007).

We report here our experience with the difficult diagnosis of HFI in a girl with neonatal neurological alterations; her unusual presentation delayed the diagnosis and led to investigations for CDG. We also report that patients with FBP1 deficiency may show a mildly abnormal Tf IEF pattern. The glycosylation defects in both diseases were further investigated by MALDI MS of serum native intact Tf and Tf *N*-glycan before and after dietary treatment.

Methods

Transferrin isoforms were detected after IEF, immunofixation with antihuman transferrin (Dako, Glostrup, Denmark) and Coomassie Brilliant Blue staining (Colomé et al. 2000). Isoforms of apolipoprotein C-III (apoC-III) were analysed as described by Wopereis et al. (2003) after IEF separation on CleanGel with Ampholines Preblended pH 3.5–5.0 (Amersham Biosciences, Piscataway, USA), Western blot and incubation with anti human apoC-III (BioTrend, Köln, Germany) and detection with the OPTI-4CN detect kit, GAM (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy). Tf purification and enzymatic release of the *N*-linked Tf glycans and their MALDI-TOF mass spectrometry were performed as described by Sturiale et al. (2005). Ions were assigned on the basis of the observed masses of the calibrated spectra, which correspond to predicted structures with known theoretical molecular weight.

Case reports

Patient 1 was born at term after an uneventful 38-week pregnancy with weight 2650 g (10th centile), length 50 cm (62nd centile), head circumference 34 cm (52nd centile). Apgar score was 7 at 1 min, 9 at 5 min. She presented with neonatal hypertonia, crisis of bradycardia and hyperventi-

lation, facial trismus, intense salivation with absence of swallowing or coughing reflexes, and gastro-oesophageal reflux. There was moderate hypertransaminasaemia (AST normal, ALT 123 U/L), sporadic hyperlactataemia, decreased plasma carnitine, and increased urine succinate, fumarate and α -ketoglutarate. Cerebral MRI was normal. She was discharged, fed with adapted milk, with introduction of fruits and vegetables at 4–6 months. Repetitive respiratory infections occurred after 1 year, when hepatomegaly was first noticed, with elevated aminotransferases (AST ranging from 39 to 127 U/L; ALT 86–1219 U/L) but normal coagulation factors, glycaemia, phosphataemia and absence of urinary reducing substances. The neonatal clinical abnormalities persisted and there was also microcephaly (head circumference 44 cm, <3rd centile; length 82 cm, 90th centile). The co-existence of liver impairment, neurological abnormalities and motor developmental delay (she could not walk without support) prompted us to investigate CDG, and Tf IEF was performed at 3 years of age, which showed severe type 1 pattern (Fig. 1). Fibroblast phosphomannomutase (PMM) and phosphomannose isomerase (PMI) activities, and lipid-linked oligosaccharides (LLOs) were all normal. Due to her severe and progressive hepatopathy, and aversion to fruit, HFI was investigated, and the presence of mutations p.A150P and p.N335K in the *ALDOB* gene led to the diagnosis at almost 4 years of age. A liver biopsy performed at that time showed severe cirrhosis, and though the hepatopathy and motor symptoms improved on a diet free of fructose, the presence of oesophageal varices, hypersplenism and cirrhosis led to hepatic

transplantation. The girl is now 7 years old and the evolution is very good, with normal mental development. The facial trismus and hypertonia have disappeared; she attends normal bilingual school and walks and eats correctly, but microcephaly (<2nd centile) persists.

Patient 2 is a girl with FBP1 deficiency. Gastric reflux was noticed from the second month of life, and chronic vomiting worsened with the introduction of fruit, which was removed from the diet. She became severely ill at 13 months, in the course of a banal upper respiratory tract infection, with vomiting, hypoglycaemia, lactic acidosis, moderate hypertransaminasaemia, and increased glycerol and glycerol 3-phosphate in urine, which led to the diagnosis of FBP1 deficiency. Preliminary screening for mutations in *FBP1* showed only the silent change (c.651T>C; p.A217A) in heterozygosis; cDNA was not available to complete the study. The symptoms improved with adequate carbohydrate intake, excluding fructose and sucrose. Retrospectively, we wondered whether FBP1 deficiency might also secondarily alter glycosylation. We therefore investigated her serum Tf IEF, which showed a mild type 1 pattern normalizing with treatment (Fig. 1).

Results

For the Tf IEF analysis (Fig. 1) the pattern was abnormal (type 1) in both patients, more severe in patient 1 and milder in patient 2. Both normalized with adequate dietary treatment.

As expected for CDG I, apoC-III IEF isoform patterns in both patients did not differ from those of controls (data not shown).

MALDI-MS analyses of intact serum Tf in both patients, before and after the introduction of dietary regimen (Fig. 2), were in full accordance with the IEF findings. In the HFI patient, MALDI analyses of intact serum Tf before treatment (Fig. 2A) showed fully glycosylated isoforms which bear two biantennary complex-type glycan (diglycosylated Tf), as well as additional Tf species each lacking one (monoglycosylated) or both (aglycosylated) entire glycan chains. After treatment, the Tf profile was almost restored (Fig. 2B). Interestingly, intact serum Tf in FBP1 deficiency (Fig. 2C) showed a type 1 hypoglycosylated pattern, with a milder glycosylation deficiency with respect to the HFI patient. Also in this case the dietary treatment led to normalization of Tf MS (Fig. 2D).

Results of MALDI-TOF MS for Tf glycan analyses are reported in Fig. 3. Before treatment, in HFI the acidic N-glycan pool showed prominent heterogeneity (15 glycan species) with respect to the control sample (8 glycan species). There were traces of tetra-antenn-

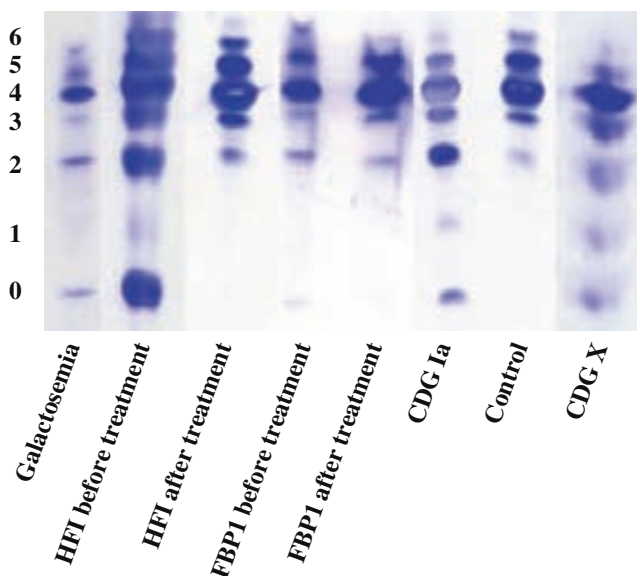


Fig. 1 Transferrin IEF patterns of serum from patients 1 and 2 before and after treatment, as compared to one control, and to patients with altered glycosylation: galactosaemia, *PMM2* deficiency (CDG Ia) and CDG X patients

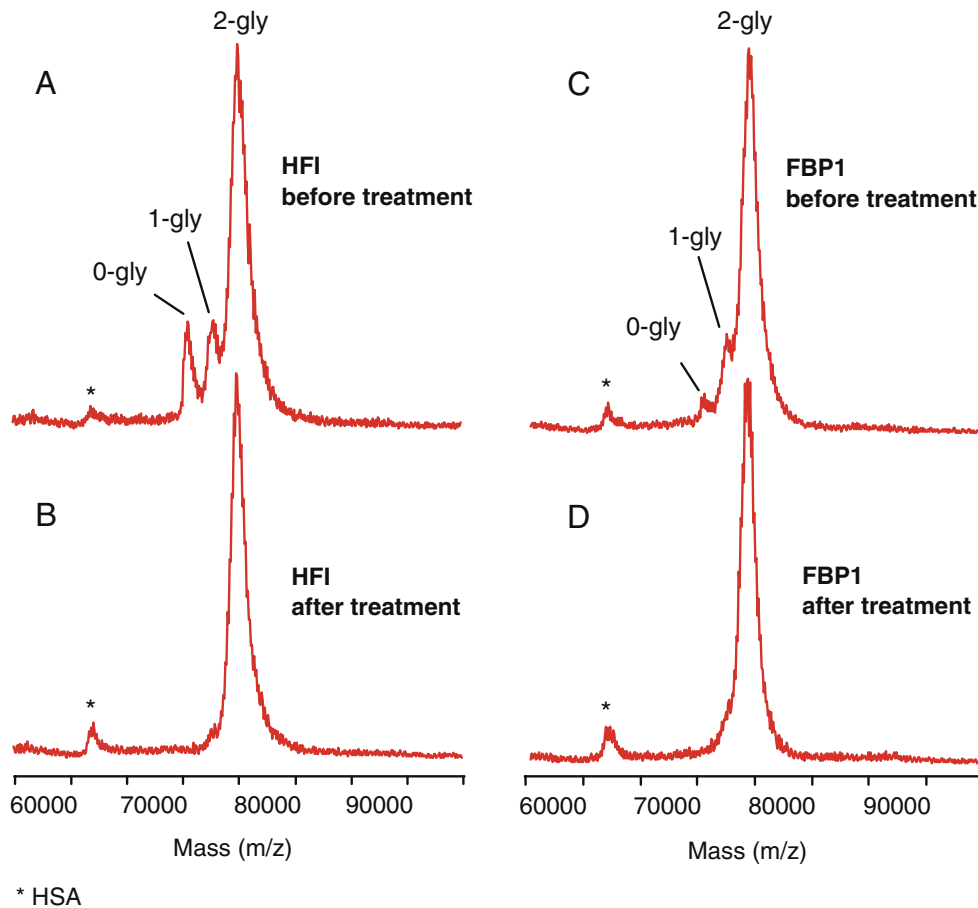


Fig. 2 MALDI-TOF mass spectra of intact serum transferrin from patient 1 (aldolase B deficiency; HFI) and patient 2 (fructose-1,6-bisphosphatase deficiency; FBP1 deficiency). (a, b) HFI before (a)

and after (b) treatment, (c, d) FBP1 deficiency before (c) and after (d) treatment

ary structures, increased biantennary and triantennary hyposialylated glycoforms and even more significantly increased fucosylated species including biantennary monofucosylated (m/z 2077.9, 2369.2) and triantennary monofucosylated (m/z 2734.5, 3025.8), with traces of difucosylated triantennary glycans. After treatment, the N-glycan pattern nearly normalized, with the exception of still slightly increased fucosylation.

In untreated FBP1 deficiency, the MALDI mass spectrum of serum Tf glycans was also heterogeneous (15 glycan species) with a small amount of abnormal structures: traces of truncated biantennary species at low molecular masses and slight increase of under-sialylated species were observed, without hyperfucosylation. Dietary treatment resulted in a decreased overall heterogeneity of the glycosylation profile.

Discussion

HFI is a well-known cause of secondary Tf IEF alterations (Jaeken et al. 1996), starting after the 4th–6th months of

life, when fruits are introduced into the diet. The neonatal clinical features of our patient 1, unusual in this disease, wrongly directed the laboratory investigations and led to a late diagnosis. Our aim is to stress the importance of investigating secondary causes of Tf IEF alterations before undertaking more sophisticated studies.

One might think that the abnormal neonatal features in our patient were independent of her HFI. They apparently cannot be attributed to singularities in her *ALDOB* genotype, since mutation p.A150P is the most frequent in Europe, accounting for 67.4% of Spanish HFI alleles, and p.N335K is the fourth most frequent mutation (2.3% in Spain, 7.2% in Europe) (Sánchez-Gutiérrez et al. 2002). Nevertheless, it is possible that the clinical alterations were really due to fructosaemia. In fact, tone abnormalities, gait difficulties and swallowing problems with intense salivation were also present in the patients reported by Adamowicz et al. (2007), and the symptoms reverted with fructose-free diet. In our patient liver transplantation was necessary because the cirrhosis was advanced and irreversible; the acquired microcephaly was also irreversible but the other clinical



* Symbols identify monosaccharides as reported: ■ GlcNAc ● Man ● Gal ◆ Sialic acid

Fig. 3 N-linked acidic glycans released from serum transferrin in HFI and FBP1 deficiency, identified by MALDI-TOF MS. The amount of each glycan structure, before and after fructose

intake, is reported as relative percentage with respect to the main ion [M]⁻ at m/z=2223.0 and compared with an age- and sex-matched healthy subject

features had clearly ameliorated before transplantation. One might hypothesize that the neonatal abnormalities were due to high maternal fructose levels during pregnancy. As reported by Adamowicz et al. (2007) for one of their patients during lactation, the mother of our patient increased her ingestion of fruits and vegetables during pregnancy, and this increase associated with her heterozygosity might have produced an accumulation of fructose that finally affected the fetus. Unfortunately, we could not analyse those levels while she was pregnant but, at present, they are not significantly elevated in the mother (data not shown).

To give an insight into glycosylation abnormalities associated to inborn errors of fructose metabolism, MALDI characterization of serum native Tf and of Tf glycans in the HFI patient showed findings in line with the type 1 Tf IEF pattern, pointing to an N-linked glycan assembly defect (Wada et al. 1992). An increase of undersialylated species and of total fucosylation was observed, which is consistent with liver impairment. This might reflect the increased expression of processing enzymes and serum fucosyltransferase activity occurring in hepatic inflammation and cancer (Comunale et al. 2006; Morelle et al. 2006). It is noteworthy that before treatment, HFI as a secondary glycosylation

disorder shares some findings with untreated classic galactosaemia in that they both show under-occupancy of N-glycosylation sites, increased fucosylation and slightly increased glycan branching (Sturiale et al. 2005).

In contrast to HFI, which is a well-known cause of secondary CDG (Jaeken et al. 1996), abnormal protein glycosylation in FBP1 deficiency has never been reported before. The defective glycosylation might be explained by the fact that FBP1 deficiency causes a secondary increase of fructose 1-phosphate (Steinmann et al. 2001) which, as in HFI, would inhibit phosphomannose isomerase (Jaeken et al. 1996). In the present patient with FBP1 deficiency the glycosylation defect appeared milder than in HFI, as judged by Tf IEF changes and MALDI MS characterization of intact Tf and N-glycans. The diagnosis of FBP1 deficiency in this girl was based on the clinical data and the presence of glycerol and glycerol 3-phosphate in urine; mutation analysis was normal but the study was performed on genomic DNA and therefore intron mutations leading to splice site alterations were not excluded.

In a non-classical CDG patient it is advisable to perform a basic metabolic study, including GC-MS analysis of urine organic acids and TLC of sugars to

discard secondary causes, before undertaking more complicated investigations.

Acknowledgements We would like to thank Dr J. Jaeken for his help with the diagnosis of patient 1, Dr T. Benlloch and Dr K. Eschrich for mutation analysis in the *ALDOB* and *FBPI* genes, respectively, Dr A. Chabás (Barcelona) for PMM/PMI assays and Dr C. Koerner (Heidelberg) for LLO analysis in case 1. This study was supported by grants FIS PI041845 and FIS PI041339 from the Spanish Ministry of Health and LSHM-CT2005-512131 EUROGLYCANET from the European Community. C. Fernandez is recipient of grant FIS CA 06/0128. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of ISCIII, Spain. This work has been performed in the context of the PhD programme of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona.

References

- Adamowicz M, Ploski R, Rokicki D et al (2007) Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: using the clues and avoiding the pitfalls. *J Inherit Metab Dis* 30:407
- Colomé C, Ferrer I, Artuch R, Vilaseca A, Pineda M, Briones P (2000) Personal experience with the application of CDT assays to the detection of Congenital Disorders of Glycosylation. *Clin Chem Lab Med* 38:965–969
- Comunale MA, Lowman M, Long RE et al (2006) Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 5:308–315
- Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, Van Schaftingen E (1996) Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* 40:764–766
- Jaeken J, Matthijs G, Carchon H, Van Schaftingen E (2001) Defects of N-glycan synthesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds); Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc. eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1601–1622
- Morelle W, Flahaut C, Michalski JC, Louvet A, Mathurin P, Klein A (2006) Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. *Glycobiology* 16:281–293
- Sánchez-Gutiérrez JC, Benlloch T, Leal MA, Samper B, García-Ripoll I, Felú JE (2002) Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain. *J Med Genet* 39:56
- Steinmann B, Gitzelmann R, Van den Berghe G (2001) Disorders of fructose metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds); Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc. eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1489–1520
- Sturiale L, Barone R, Fiumara A et al (2005) Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* 15:1268–1276
- Wada Y, Nishikawa A, Okamoto N et al (1992) Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 189:832–836
- Wopereis S, Grünewald S, Morava E et al (2003) Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem* 49:1839–1845

Alteració de Tf-IEF degut a un polimorfisme de la transferrina poc freqüent

Els polimorfismes afecten a l'estructura primària de la transferrina i, tot i mostrar un patró de sialotransferrines alterat, no és degut a alteracions en la glicosilació. S'han descrit diferents variants de la transferrina, essent la forma més abundant en totes les poblacions l'anomenada transferrina C (*Beckman i col 1998*). Però també se'n coneix una forma que resulta en una transferrina d'un pI més baix i que a l'hora de separar-se per IEF es superposa amb la forma penta- de l'al·lel C; se l'anomena variant B. Igualment també es coneix una variant que resulta en una transferrina de pI més alt, i que es superposa amb la forma trisialilada de la variant al·lèlica C quan separem les isoformes de la transferrina per IEF; és l'anomenada variant D. Es coneixen també altres variants de la forma C, que s'anomenen C₂ i C₃ (*Helander i col 2001*).

Aquests polimorfismes poden representar un error en el diagnòstic dependent de la tècnica utilitzada. En el cas del %CDT-TIA on es valora la suma del tant per cent de les bandes di, mono i asialo respecte el total de la transferrina, els polimorfismes poden donar uns valors de patró alterat sense que hi hagi una alteració dels glicans units a la transferrina. Amb la tècnica de Tf-IEF els polimorfismes de la transferrina mostren un patró característic i fàcilment identificable.

Dins el grup de pacients CDG diagnosticats a l'Institut de Bioquímica Clínica com a CDG-II i encara sense defecte genètic associat (CDG-IIx), 5 pacients mostraven un patró d'isoformes de la transferrina que es caracteritzava per normalitat de les bandes penta, tetra, tri i di però una banda asialilada molt abundant. Les característiques clíniques dels 5 pacients diferien molt entre elles, des de retard psicomotor amb hepatopatia fins a trastorns psiquiàtrics. En tots els casos algun dels progenitors mostrava el mateix patró d'isoformes de la transferrina amb increment de la banda asialilada. El tractament amb neuraminidasa i comprovació amb IEF, mostrava una sola forma de transferrina, la qual cosa ens feia pensar que no es tractava d'un polimorfisme de la transferrina.

L'any 2005, *Albahri i col* van descriure un nou tipus de polimorfisme en el qual la forma tetrasialilada polimòrfica es superposa amb la forma asialilada de la forma C de la transferrina, i a la qual anomenen variant D₄₋₅. Per confirmar la seva presència, com per qualsevol dels polimorfismes mencionats, cal tractar la transferrina amb neuraminidasa, que elimina tots els àcids siàlics de les estructures dels glicans i així el desplaçament de la transferrina desialilada en l'anàlisi per isoelectroenfof només dependrà de les càrregues que tingui la seva estructura proteica primària. Però per poder observar aquesta variant D₄₋₅, necessitem modificar les condicions habituals de Tf-IEF corrent el sèrum tractat en un gel de pH 3.5 – 9, ja que en el gel habitual de pH 4 – 6.5 la forma polimòrfica D₄₋₅, de pI molt bàsic,

queda retinguda en el lloc de càrrega i per tant no es detecta.

Al separar la transferrina tractada amb neuraminidasa en un gel de pH 3.5 – 9 vam poder observar les dues formes de transferrina, i per tant es va descartar que el perfil de Tf-IEF alterat d'aquests pacients fos degut a un defecte congènit de la glicosilació (Fig. 37).

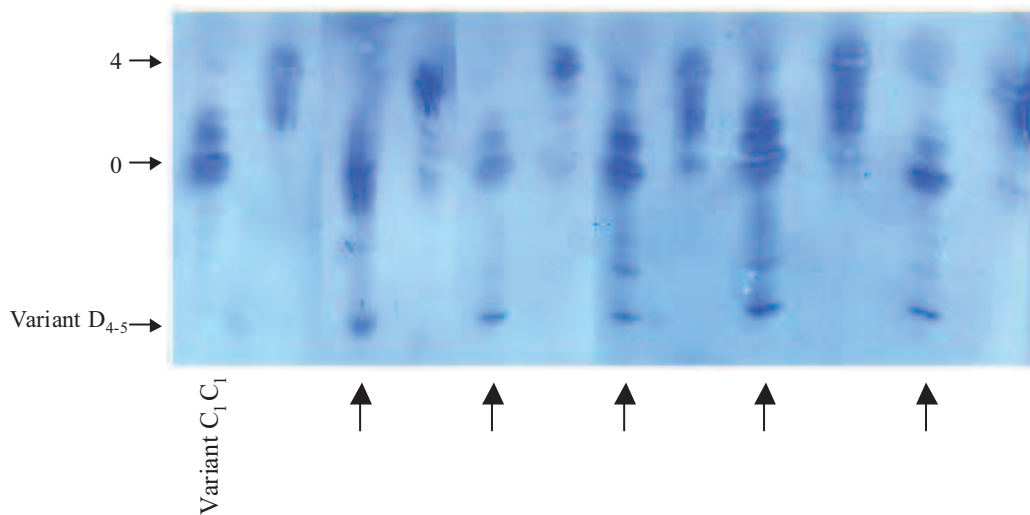


Figura 37. Tf-IEF a pH 3.5 – 9 dels pacients que presenten el polimorfisme CD_{4,5} sense tractar i tractats amb neuraminidasa (indicat amb una fletxa)

Els polimorfismes que més habitualment es detecten són les variants D, B i C₂, fàcilment identificables amb el tractament amb neuraminidasa. En canvi, el polimorfisme D_{4,5} presentat per un grup de 5 pacients, no es detecta pels mètodes habituals ja que el seu pI es troba fora del rang de pH dels gels que s'utilitzen habitualment pH 4,5 -6. El fet de no identificar el polimorfisme va fer que aquests pacients amb patró de sialotransferrines alterat, amb increment de la banda asialilada, es classifiquessin com a CDG-II, i per tant les investigacions de laboratori es van centrar erròniament en aquestes malalties, deixant, durant un temps, de perseguir la causa real de la simptomatologia.

Així doncs, creiem que sempre que es troba una alteració en el patró de sialotransferrines sèriques és important descartar una causa secundària, sobretot quan la clínica no és la clàssica dels CDG. Per això recomanem realitzar tractament amb neuraminidasa i estudis metabòlics bàsics d'àcids orgànics mitjançant GC/MS i de cromatografia en capa fina d'oligosacàrids en orina, així com descartar galactosèmies i fructosèmies abans de començar estudis més complicats com activitats enzimàtiques, anàlisis de LLO o estudis genètics.

4.4. CERCA DE CDG EN FETUS AMB MALFORMACIONS ECOGRAFIQUES SEVERES i AVORTAMENTS ESPONTANIS

Tal i com ja s'ha esmentat anteriorment, el nombre de pacients amb defectes congènits de la glicosilació és menor al que esperàvem. Aquesta ha estat també l'experiència en altres laboratoris europeus dedicats al diagnòstic de CDG. Aquest fet fa pensar que, degut a la importància de la glicosilació i a la severitat d'aquestes deficiències, podria ser que un important nombre de casos es trobes entre els fetus amb greus alteracions ecogràfiques o fetus no viables.

En els estudi moleculars del gen *PMM2*, crida l'atenció la mutació p.R141H, que és la més freqüent en població europea (37%) i també en població espanyola (21%) (*Briones i col 2002*). S'ha vist que la prevalença de portadors per la mutació p.R141H és molt alta, 1/72 en població holandesa i de 1/60 en població danesa, i per tant s'esperaria trobar entre els pacients de CDG-Ia d'un 45% a un 60% de homozigots p.R141H (*Schollen i col 2000*). En canvi, aquesta mutació mai s'ha trobat en homozigosi ni en heterozigosi associada a mutacions que causin una proteïna truncada. Aquest fet no s'explica per la deriva genètica ni l'aparellament no a l'atzar, però si és fàcilment explicable per la severitat de la mutació, ja que l'activitat enzimàtica residual que se li associa és nul·la (*Pirard i col 1999*), la qual cosa fa que el genotip p.R141H / p.R141H sigui incompatible amb la vida. Altres mutacions que també donen un dèficit d'activitat important com són p.R123Q, p.F157S i p.T237R tampoc s'han trobat mai en homozigosi ni associades a p.R141H malgrat ser estadísticament possible (*Matthijs i col 2000*).

Com a grup de població susceptible de portar aquestes mutacions severes hem investigat fetus amb malformacions ecogràfiques i avortaments espontanis. En funció del material disponible hem realitzat l'anàlisi de sialotransferrines en líquid amniòtic, plasma o sèrum fetal, o bé la cerca de mutacions en el gen *PMM2* en amniocits cultivats o material fetal. Aquest treball ha estat realitzat amb el suport del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) mitjançant un projecte intramural anomenat "Glicomal", coordinat pel grup de la Dra Ugarte de la Universitat Autònoma de Madrid, en el que hem col·laborat varis grups, entre ells el grup de obstetrícia i citogenètica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

4.4.1. Anàlisi de les isoformes de la transferrina en líquid amniòtic o sèrums fetals.

Per alguns fetus amb malformacions ecogràfiques o alguns pacients amb malformacions neonatals, només es disposava de líquid amniòtic sense cèl·lules (ja que s'havien utilitzat per realitzar el cariotip) o de sèrum fetal en algun cas, per això vam intentar realitzar el cribratge pels CDG mitjançant la detecció de les isoformes de transferrina en aquests dos fluids fetals. La concentració de transferrina en aquests tipus de mostra és baixa, per tant la senyal que obtenim també és baixa però, com que cerquem pacients molt severos, la senyal obtinguda probablement seria suficient per detectar un patró greument alterat.

Altres autors havien exposat la inadequació de realitzar un diagnòstic prenatal fiable mitjançant IEF en líquid amniòtic o sèrum fetal pel fet que en alguns fetus afectes no s'havia detectat alteració en el patró de transferrina (*Clayton i col 1993, Stibler i Skoyby 1994, Charlwood i col 1998*). Tot i això vam emprendre aquest estudi pel fet de disposar d'una nova metodologia (Tf-HPLC) amb la qual havíem aconseguit detectar patrons molt lleugerament alterats que fàcilment podien escapar al cribratge per Tf-IEF. A més a més el nostre treball no era el d'un diagnòstic prenatal, sinó que estava orientat a detectar les formes més severes, inviàbles, de CDG, on esperàriem que el patró de transferrina del fetus estigués marcadament alterat.

Amb aquest propòsit vam establir valors de referència en 30 líquids amniòtics control i també en 10 sèrums fetals (taula 16). Posteriorment vam analitzar un total de 108 líquids amniòtics susceptibles de presentar un defecte congènit de la glicosilació, però tots van ser negatius. En 2 dels líquids vam trobar un patró alterat degut a un polimorfisme de la transferrina.

	AST	MonoST	DiST	TriST	TetraST	Penta + HexaST
Líquids amniòtics n=30	-	-	1,1 – 9,4	2,1 – 17,2	67,9 – 91,3	5,9 – 20,8
Sèrums fetals n=10	-	-	0,8 – 3,9	10,9 – 21,6	72,5 – 82,9	3,0 – 6,5

Taula 16. Isoformes de la transferrina. Valors de referència obtinguts per HPLC en líquids amniòtics i sèrums fetals.

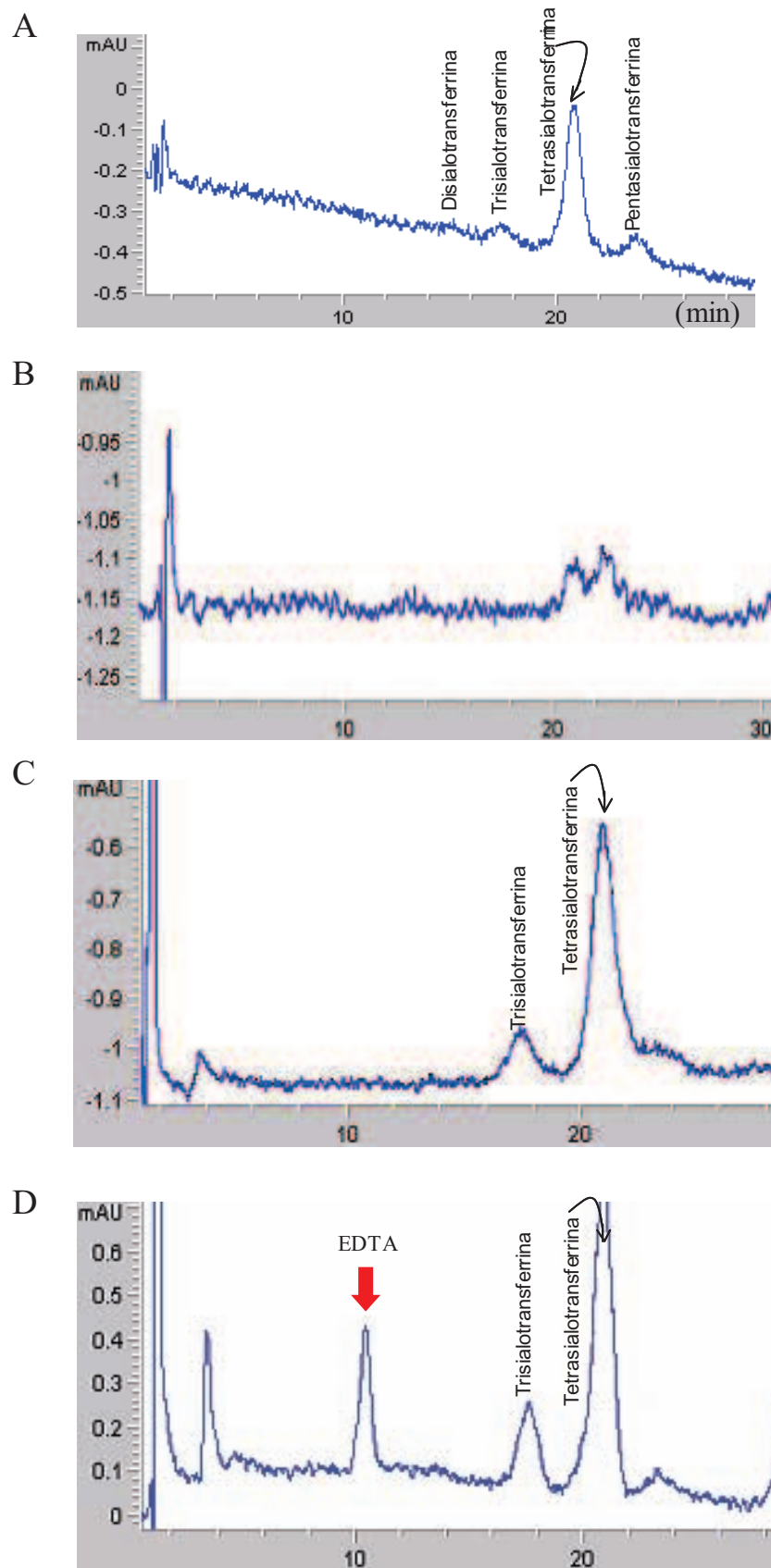


Figura 38. Tf-HPLC de diferents mostres. A) Líquid amniòtic control B) Líquid amniòtic que presenta el polimorfisme CB de la transferrina C) Sèrum fetal control D) Plasma fetal

En els líquids amniòtics, els valors relatius de cada isoforma de la transferrina són molt diferents respecte als valors de referència obtinguts en sèrum (taula 16), encara que des del punt de vista qualitatiu els perfils són molt semblants (Fig. 38). Una de les causes d'aquesta variació quantitativa és la baixa concentració de transferrina, que dóna lloc a uns pics molt baixos i difícils de quantificar, això fa que petites variacions en la delimitació del pic resultin en valors de %AUC molt diferents.

El fet d'haver detectat líquids amniòtics amb patrons de transferrina alterats, deguts a polimorfismes de la transferrina, ens permet afirmar que la tècnica és prou sensible per detectar canvis en el patró de sialotransferrines, i que per tant seriem capaços de detectar mostres patològiques especialment si presentessin patró molt alterat.

Si observem els valors de referència obtinguts en sèrums fetals, així com el seu perfil, veiem que la trisialotransferrina és molt més elevada que en sèrum de nens o adults (Fig. 1A article 1 apartat 4.1.2). Això està en concordança amb el que molts autors han descrit, i nosaltres també hem observat, en pacients neonats molt immadurs, en que el patró de sialotransferrina pot presentar un increment de les bandes menys sialilades, semblant a un tipus 2, secundari a aquesta immaduresa (*van Pelt i col 1996*). Aquest patró posteriorment es normalitza.

4.4.1. Estudi molecular del gen *PMM2*

En tots els pacients seleccionats amb malformacions ecogràfiques i nadons o fetus inviàbles dels quals hem pogut disposar de DNA, hem realitzat una cerca de mutacions del gen *PMM2* per tal de descartar la forma més freqüent de CDG (CDG-Ia). El treball anava orientat a detectar pacients afectes de les formes greus de CDG, portadors d'alguna de les mutacions més severes i freqüents: p.R141H, p.R123Q i p.T237R. El cribratge de mutacions es va fer en els exons 3, 5 i 8. Els exons 5 i 8 es van escollir pel fet de ser on s'acumulen més mutacions descrites i amb una freqüència més gran, i perquè en aquests es troben les mutacions conegudes com a més severes. Pel que fa l'exó 3 el vam escollir perquè és on es troben algunes de les mutacions d'origen espanyol i que són freqüents entre els nostres pacients (p.D65Y i p.Y64C) (Fig. 39).

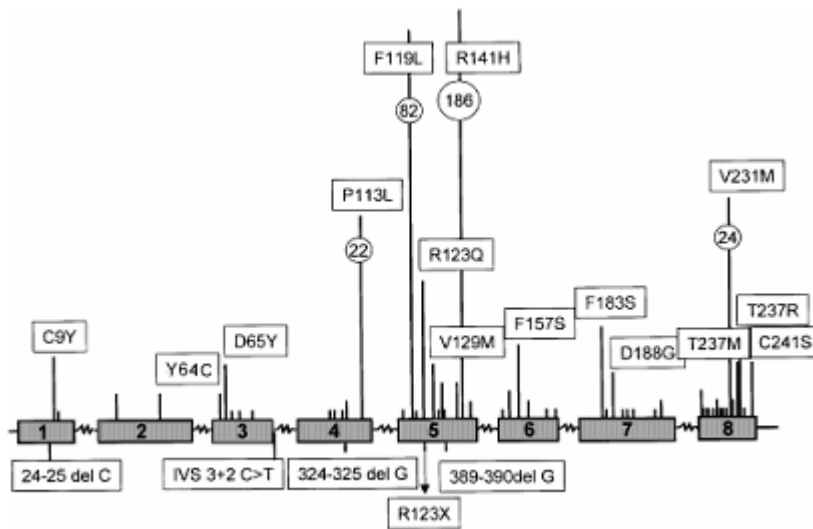


Figura 39. Freqüència i posició de les mutacions descrites en el gen *PMM2*. La llargada de la barra és representatiu de la freqüència de la mutació. Extret de *Matthijs i col 2000*.

Per realitzar el cribratge de mutacions en aquests exons, buscàvem una tècnica ràpida que ens permetés analitzar moltes mostres alhora i per això vam posar a punt la detecció de canvis a nivell de DNA mitjançant corbes de punt de fusió o *melting* treballant amb PCR a temps real i utilitzant SYBR Green I (Applied Biosystems, UK) com a intercalador.

Els estudis de *melting* d'alta resolució s'utilitzen per detectar diferències entre dobles cadenes de DNA. Consisteix en una amplificació per PCR, per tal d'aconseguir moltes còpies del fragment a estudiar, seguida d'un escalfament gradual de les mostres des de 60°C fins a 95°C. Durant aquest escalfament les dobles cadenes de DNA es separen donant lloc a cadenes simples, on ja no s'uneixen els intercaladors de DNA. La temperatura en la qual el 50% de les cadenes estan separades s'anomena temperatura de *melting* (T_m). Una seqüència de DNA

portadora d'alguna mutació o polimorfisme, presentarà una T_m diferent de la considerada salvatge degut a la diferent composició de les cadenes.

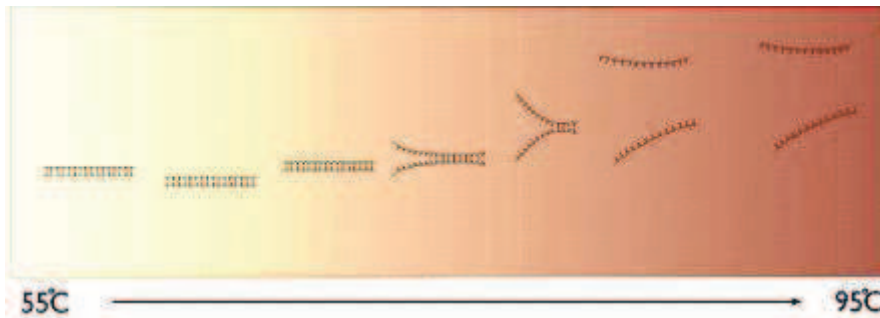


Figura 40. En l'anàlisi de corba de *melting* s'aplica un increment gradual de temperatura des de 55 - 60°C fins a 95°C per tal de desnaturalitzar les dobles cadenes de DNA. La temperatura de *melting* (T_m) s'estableix quan el 50% de les cadenes estan ja desnaturalitzades i és específica de cada seqüència.

Vam començar treballant amb l'exó 5 (on es troben més nombre de mutacions i on també es troba la mutació més freqüent p.R141H). Com a controls positius disposàvem de 6 pacients amb 3 mutacions diferents en aquest exó, i per validar la tècnica necessitàvem observar una temperatura de *melting* (T_m) diferent entre els controls i els pacients heterozigots per aquestes mutacions.

Vàrem establir un rang de T_m en controls per comparar amb les T_m dels pacients:

n=16 T_m rang control: 78,06°C –78,32°C

Pacient	Mutació a l'exó 5	T_m (°C)
CDG33	p.R141H	77,90
CDG34	p.R141H	77,90
CDG35	p.R141H	77,90
CDG36	p.R141H	77,90
CDG32	p.R123Q	78,05
CDG38	p.V129M	77,75

Quan comparàvem els pacients amb el rang control vèiem que realment es trobaven fora dels valors control, però amb temperatures de *melting* més properes a les dels controls del que esperàvem. Però els valors no van ser totalment repetitius, encara que la T_m dels pacients

continuaven estant fora del rang control i visualment el perfil de la corba de *melting* era clarament diferent a la dels controls (Fig. 41).

En la literatura es troben molts exemples d'anàlisi de temperatures de *melting* per la detecció de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) i tots ells mostren diferències molt clares de T_m que mai es superposen degut a les diferències interdia (Reed i col 2004; Vandersteen i col 2007; Erali i col 2008). Per intentar millorar la nostra tècnica i incrementar les diferències de *melting* observades vam canviar l'intercalador de DNA, substituint el SYBR Green I pel SYTO9 (Invitrogen, USA), ja que millora la reproductibilitat de les temperatures de *melting* i les diferències de concentració de l'intercalador no afecten tant als resultats finals (Monis et al 2005).

Amb la incorporació del SYTO9 tampoc vam millorar les diferències de temperatura de *melting* però vam aconseguir uns perfils de les corbes de *melting* més diferenciats entre controls i pacients. Tots els pacients estudiats són heterozigots per una mutació en l'exó 5, per tant presenten un al·lel mutat i un al·lel control, és per això que en la seva corba de *melting* trobem dues pendents diferents que corresponen a cadascun dels al·lels (Fig. 41 i 42).

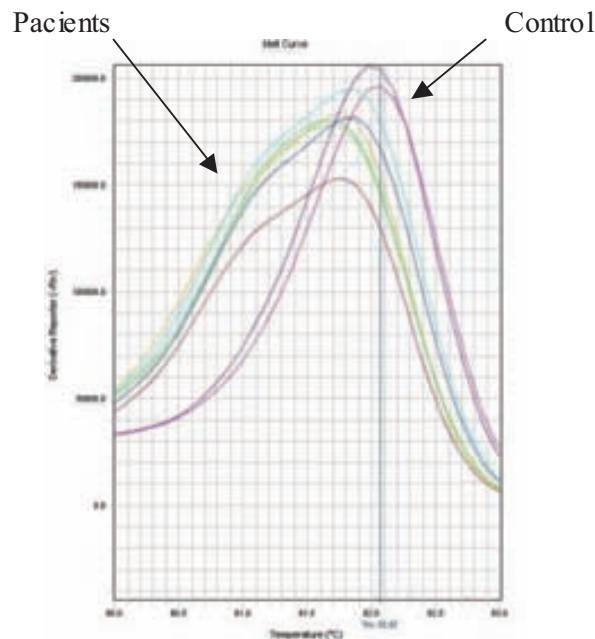


Figura 41. Comparació de les corbes de melting entre pacients i un control amb SYTO9

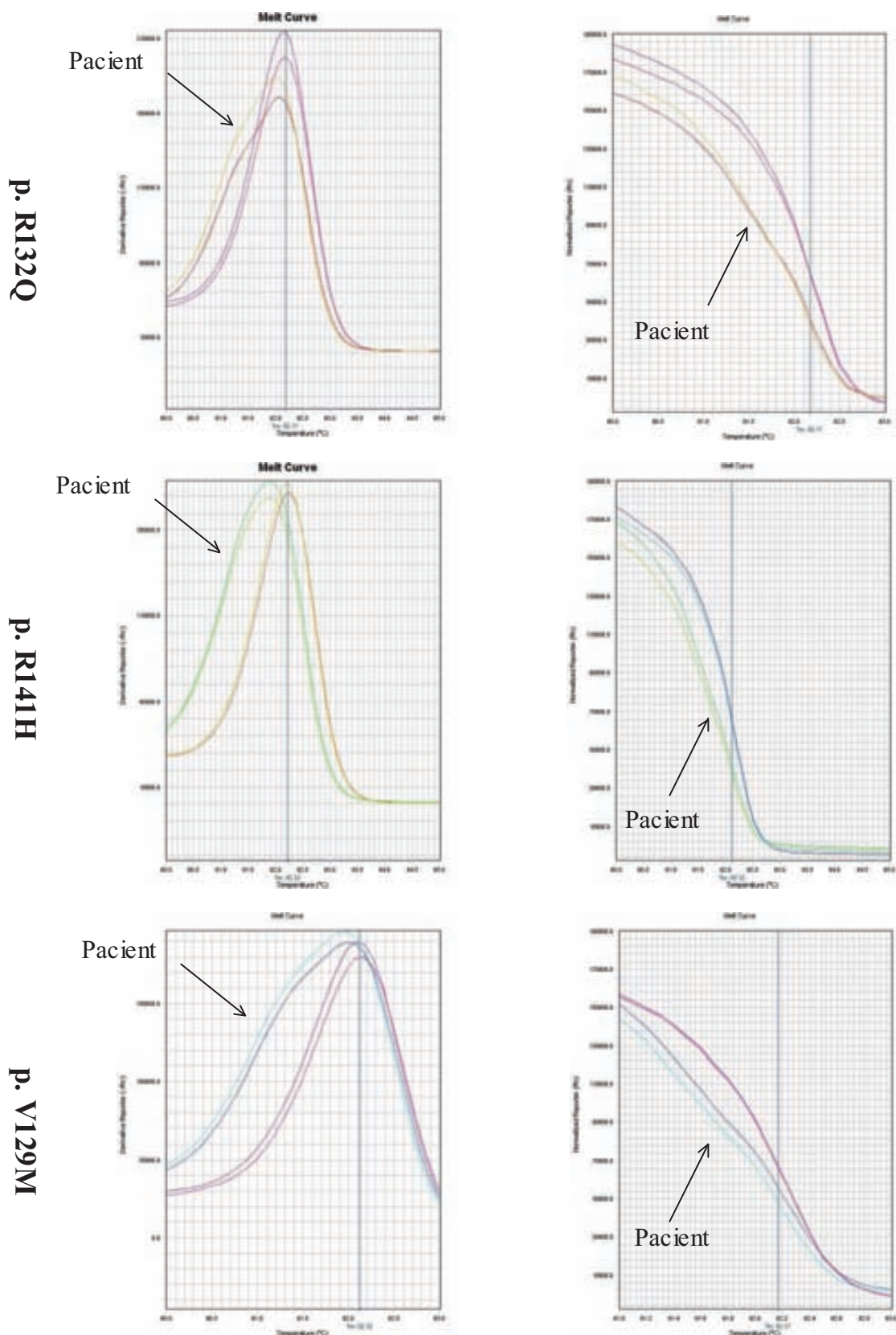


Figura 42. Comparació de corbes de *melting* amb SYTO9 entre cada una de les mutacions i un control, en forma logarítmica (esquerra) i normalitzada (dreta).

Utilitzant aquesta metodologia vam estudiar possibles canvis en l'exó 5 en 215 fetus, i només en un vam observar una T_m i una corba de *melting* diferent a les observades en els controls.

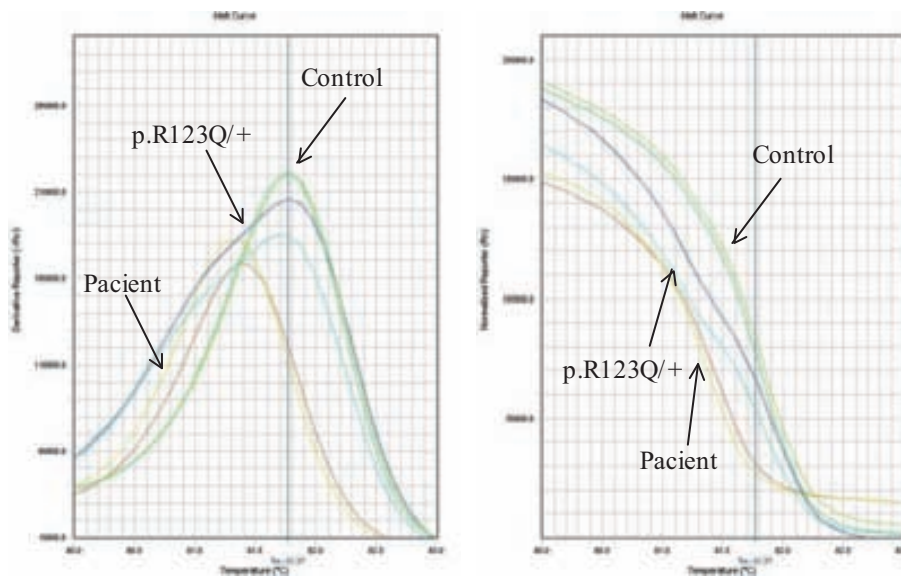


Figura 43. Comparació de corbes de *melting* entre un control (verd) un pacient heterozigot per la mutació R123Q (blau) i el líquid amniòtic (groc i vermell) amb un patró de corba de *melting* que difereix de la corba control, en forma logarítmica (esquerra) i normalitzada (dreta).

En la figura 43 es mostra el perfil de corba de *melting* del fetus amb un pic de T_m desplaçat respecte el control i també desplaçat respecte l'al·lel control del pacient portador de la mutació p.R123Q. A més a més la forma del pic no mostra dos pic superposats, sinó que mostra un sol pic amb amplada normal però desplaçat. Aquest perfil ens va fer pensar que el fetus devia portar un canvi en homozigosi. Amb el resultat de la corba de *melting* normalitzada (Fig. 43 dreta) observem els mateixos resultats. En el pacient portador de la mutació p.R123Q podem diferenciar dues pendents que corresponen als dos al·lells, el control mostra una sola pendent paral·lela a la segona del pacient heterozigot, i per últim, el fetus presenta una sola pendent paral·lela a la primera pendent del pacient heterozigot per la p.R123Q. Per conèixer aquest canvi vam seqüenciar l'exó 5, obtenint, sorprenentment, una seqüència sense cap canvi.

Aquest fet ens va fer posar en dubte els resultats obtinguts fins al moment, i ens va fer replantejar la continuació de la cerca de mutacions amb el sistema de corbes de *melting* amb PCR a temps real. L'aparell de PCR a temps real amb el que hem treballat, StepOne Plus (Applied Biosystems, UK), no disposa del software d'alta resolució necessari per poder detectar clarament les diferències de T_m causades pels SNPs. Així doncs, el mètode de PCR a temps real amb el sistema de StepOne Plus no ha resultat adequat per la indentificació de

SNPs, la qual cosa ens ha dut a un canvi de metodologia. A partir d'aquest moment realitzarem l'anàlisi de SNPs mitjançant PCR convencional, SSCP per detectar els canvis i seqüenciació per la confirmació d'aquests.

Per l'estudi de SNPs mitjançant SSCP disposàvem de dos sistemes: Hoefer (Hoefer Scientific Instruments, USA) i GenePhor (Pharmacia Biotech, Suècia). Ja hem comentat abans que buscàvem un mètode ràpid i eficaç, per això vam buscar les condicions adequades per la detecció de canvis amb el sistema GenePhor, ja que amb aquest sistema les mostres corren a gran voltatge (600V) durant només 1h 45 min i per tant escurça molt el temps de l'anàlisi (amb el sistema de Hoefer les mostres corren durant 15 – 22 h).

Després de provar diferents temperatures, temps i voltatges vam concloure que les condicions òptimes per detectar canvis eren de 10°C durant 1h 45min i a 600V 150 mA per l'exó 3 i 5 (Fig. 44A). Però, per l'exó 8 vam ser incapaçs de detectar la mutació p.T237M amb el sistema GenePhor. Per tant aquest exó l'hem analitzat amb el sistema de Hoefer, a temperatura ambient i a 4°C (Fig. 44B).

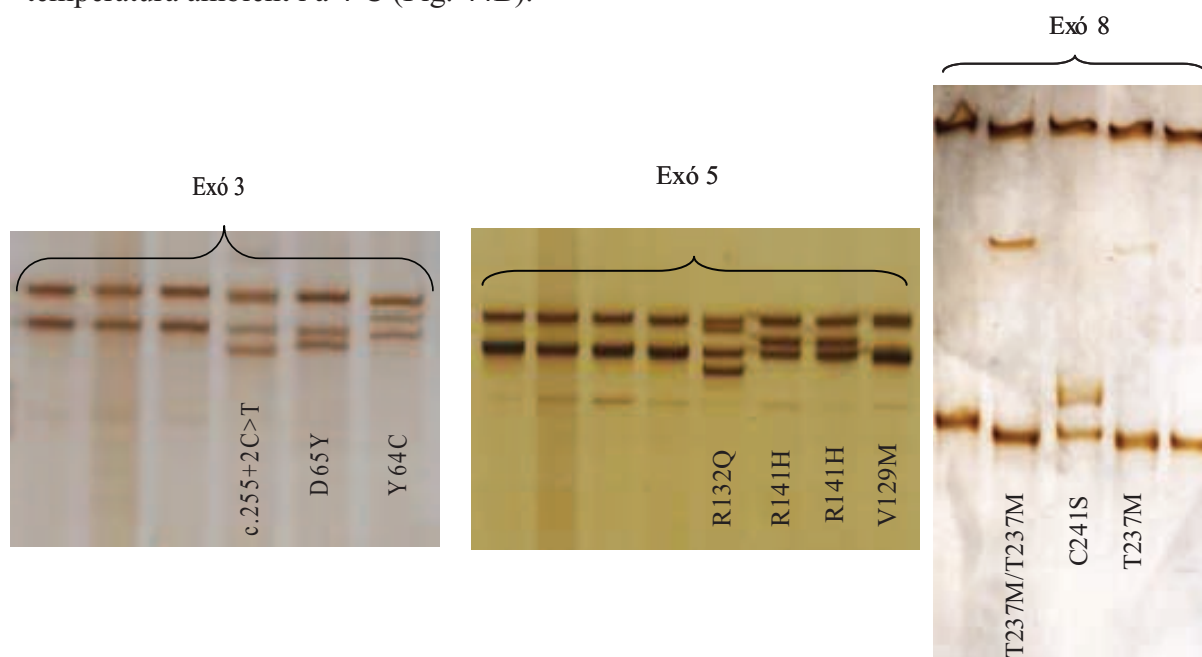


Figura 44. (A) SSCP dels exons 3 i 5 de pacients patològics i controls amb sistema GenePhor i tinció de plata. (B) SSCP de l'exó 8 de pacients patològics i controls amb sistema Hoefer i tinció de plata.

Una vegada optimitzades les condicions vam analitzar els tres exons (3, 5 i 8) dels 215 fetus d'avortaments espontanis o amb malformacions observades ecogràficament. En 4 casos vam detectar el canvi c.179-22dupT en l'intró 2 (Fig. 45 i 46). Com que aquest duplicació d'una T es troba seguida de 7T's, vam pensar que podia ser un error de la Taq polimerasa utilitzada per l'amplificació o per la seqüenciació, ja que les Taq's que s'utilitzen habitualment no tenen

activitat correctora i ocasionalment introdueixen errors quan troben moltes bases repetides. No obstant, habitualment l'error depèn de la seqüència que s'ha de copiar, i aquí eren tant sols 4 pacients els que duplicaven aquesta T mentre que la resta mantenien la seqüència normal. Per confirmar la presència d'aquesta duplicació vam tornar a realitzar l'estudi de l'exó amb una Taq polimerasa que disposa de activitat correctora, la clonada Pfu DNA polimerasa AD, (Stratagene, USA) que va confirmar la presència de la duplicació.

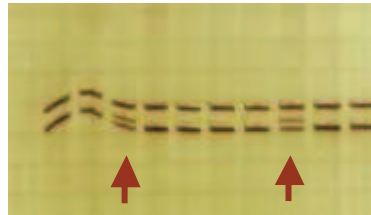


Figura 45. Patró de SSCP obtingut pels pacients portadors del canvi c.179-22dupT

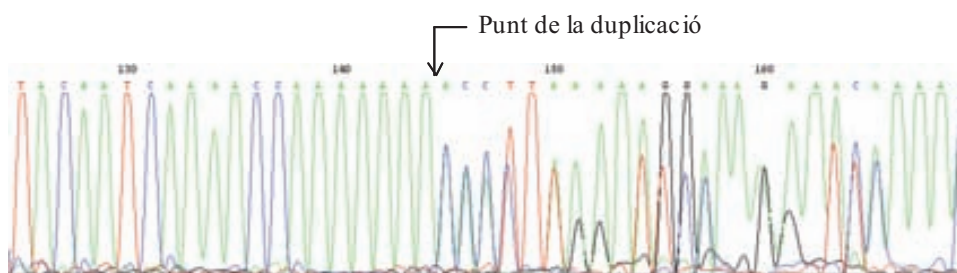


Figura 46. Seqüència reversa de l'exó 3. La fletxa indica el punt de la duplicació de la T, des d'aquest moment els 2 al·lels no presenten la mateixa pauta de lectura i això es veu representat amb un doble pic.

En estudiar 100 al·lels control per aquest canvi vam trobar-ne 2 que també el portaven, per tant el canvi possiblement correspongui a un polimorfisme no descrit fins al moment i que es troba amb una freqüència d'un 2% aproximadament en la població control.

En quatre casos vam detectar canvis / mutacions:

- 3'UTR+54 G>C
- 3'UTR+10 G>A
- p.T237R
- p.R238H

En dos d'ells (3'UTR+54 G>C i 3'UTR+10 G>A) es tracta de canvis no descrits com a polimorfismes i localitzats fora de la zona codificant del gen. Per conèixer el seu possible efecte patològic seria necessari realitzar altres estudis que estan fora de l'abast d'aquesta tesi. També hem detectat, en heterozigosi, el canvi p.T237R, mutació coneguda i considerada severa.

Per últim, vam detectar un altre cas portador del canvi p.R238H, no descrit com a polimorfisme ni present en 100 al·lells control. Consisteix en el canvi d'una arginina per l'aminoàcid aromàtic histidina, i està considerat com a possible causa de patologia pel programa informàtic predictor de l'efecte de les mutacions PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>), però estudis d'expressió realitzats pel grup de CEDEM (Universidad Autónoma de Madrid) han demostrat que el canvi no disminueix l'activitat de PMM2.

En cap d'aquests quatre pacients s'ha trobat la segona mutació en els tres exons que hem estudiat. Els DNAs han estat enviats al grup de la Dra Pérez-Cerdá (Universitat Autònoma de Madrid) per completar l'estudi de la resta d'exons del gen *PMM2*.

Per tant, després d'analitzar 215 fetus amb malformacions ecogràfiques i avortaments espontanis i 108 mostres de sèrum fetal o líquid amniòtic, no hem trobat cap alteració ni en patró de transferrines en líquid amniòtic ni cap cas amb genotip que confirmi un CDG. Així doncs, potser aquesta tampoc era la població diana on buscar aquestes formes tant severes de CDGs. Estudis en ratolins han demostrat que el knock-out pel gen *PMM2* és inviable ja al voltant del 3er dia de gestació (*Thiel i col 2006*), per tant és possible que els casos inviubles amb una combinació de mutacions severes es trobin entre parelles amb problemes de fertilitat.

4.5. ESTUDI DE PDHc

El complex PDHc és un enzim limitant de la via oxidativa de la glucosa, i es troba en una posició clau entre la glicolisis i el cicle de Krebs. És especialment important a nivell de cervell, on la majoria d'energia s'obté per aquesta via.

Existeixen tècniques bioquímiques específiques per determinar l'activitat de PDHc i també d'algunes subunitats concretes (E1 i E3). Però a vegades hi ha casos de deficiències no detectables en els teixits analitzats (majoritàriament fibroblasts i/o múscul), però que van associats a manifestacions clíniques encefalopàtiques. Per això és imprescindible l'estudi molecular per confirmar o descartar aquestes deficiències.

Pel fet que la majoria de deficiències de PDHc s'associen a mutacions en el gen *PDHAI*, inicialment l'estudi molecular d'aquestes deficiències en el nostre centre consistia només en l'anàlisi d'aquest gen i es realitzava en DNA genòmic. Durant la realització d'aquesta tesi, hem estudiat així un total de 32 pacients amb deficiència de PDHc, entre els quals hem arribat a un diagnòstic final en 8.

Però aquest estudi no serveix per posar de manifest possibles conseqüències a nivell de mRNA de canvis sinònims que inicialment semblaven innocus, ni tampoc per detectar mutacions intròniques profundes causants d'alteracions en el *splicing*. És per això que vam posar a punt l'estudi del gen *PDHAI* en cDNA. Vam escollir 26 pacients amb forta sospita de deficiència de PDHc i dels quals disposàvem de fibroblasts. Aquests fibroblasts van estar tractats amb cicloheximida per incrementar la detecció de mRNAs aberrants, que normalment haurien estat eliminats pel sistema de NMD (nonsense mediated decay). Això ens va permetre diagnosticar 2 pacients més amb mutacions causants de patologia i detectar el *skipping* d'un exó en una pacient amb una mutació missense.

En paral·lel a l'estudi mutacional, per poder descartar possibles alteracions en les diverses subunitats de PDHc, hem realitzat l'estudi de western blot del complex. En total hem analitzat 44 pacients, trobant diferents graus de deficiència en 6, afectant en tots els casos a la subunitat α .

Després d'aquests estudis ens quedava encara un grup de pacients amb deficiència de PDHc pels quals havia estat impossible establir un diagnòstic definitiu. És per això que vam introduir l'estudi mutacional dels gens corresponents a les altres subunitats de PDHc (*PDHB*, *DLAT*, *DLD*, *PDHX*). Vam seleccionar un total de 17 pacients amb clara deficiència de PDHc i/o un perfil metabòlic compatible amb una deficiència de PDH-E3. Aquest estudi ha permès

identificar un pacient amb una deficiència de *PDHB* i una altra pacient amb deficiència de *DLD* (dihidrolipoamida deshidrogenasa, PDH-E3).

L'estudi també ha posat de manifest entre els nostres pacients amb deficiència de PDHc sense diagnòstic definitiu, la presència d'un ampli ventall de polimorfismes en els diferents gens, més o menys freqüents en població control. En alguns d'ells la quantitat de canvis és sorprenent.

Gen	Pacients analitzats	Diagnòstics finals	Pacients amb combinació de polimorfismes rellevant
<i>PDHA1</i>	32	10	8/13*
<i>PDHB</i>	17	1	-
<i>DLAT</i>	17	-	-
<i>DLD</i>	17	1	2
<i>PDHX</i>	17	-	3

Taula 17. Resum de l'estudi mutacional dels gens de PDHc. * 8 pacients sense mutacions en *PDHA1* però que presenten polimorfismes / 5 pacients amb mutacions en *PDHA1* i polimorfismes, que resulta en un total de 13 pacients amb combinació de polimorfismes rellevant.

4.5.1. Estudi mutacional del gen *PDHA1*

Al nostre centre es realitza el diagnòstic de les deficiències de PDHc des de l'any 1989. Aquesta llarga experiència ha permès seleccionar un total de 40 pacients amb deficiència de PDHc o amb característiques clíniques molt suggestives d'aquesta deficiència, d'entre els quals s'han detectat mutacions causants de patologia en 20.

Dels 40 pacients escollits, 34 mostraven deficiència de PDHc en múscul i/o fibroblats, entre els quals 32 mostraven activitat de PDH-E1 disminuïda. En 17 dels 32 pacients del darrer grup es va detectar la mutació causant de la malaltia; i entre els 15 restants un presentava un canvi sinònim no descrit (p.R132R), 7 individus eren portadors de combinacions de polimorfismes poc freqüents, i 7 més no mostraven alteracions. Els dos pacients restants, amb deficiència de PDHc però amb E1 normal, van ser introduïts a l'estudi per ser E1 la subunitat de PDHc més freqüentment descrita amb mutacions.

Quatre pacients més van estar seleccionats per l'estudi malgrat presentar activitat de PDHc normal, però deficient taxa d'oxidació de piruvat. D'aquests, en dues femelles es va detectar mutació en *PDHA1*, i un pacient mascle presentava la combinació de polimorfismes poc freqüent descrit anteriorment; el quart pacient no va mostrar alteracions.

I per últim, també vam incloure en l'estudi, dos pacients amb activitat PDHc i taxa d'oxidació de piruvat normals però amb una forta sospita clínica d'aquesta deficiència. Es va trobar mutació causant de malaltia en un d'ells.

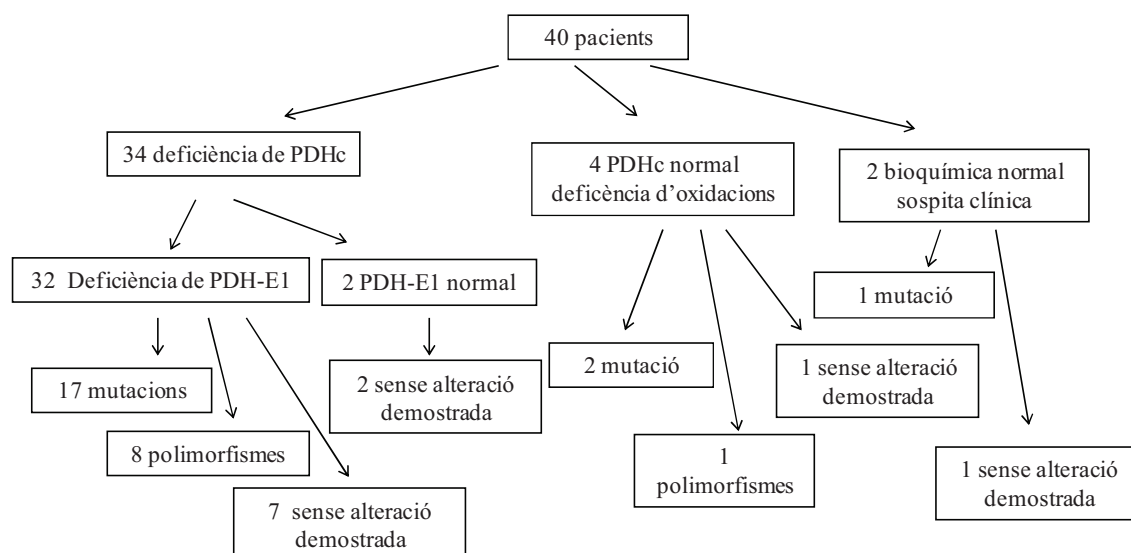


Figura 47. Esquema de la selecció de pacients i resultats mutacionals

Article:

Mutational study in the *PDHA1* gene of forty patients with PDH deficiency. Quintana E, Gort L, Navarro-Sastre A, Lissens W, Busquets C, Moliner S, Lluch M, Ozaez L, Vilaseca MA, De Meirleir L, Ribes A, Briones P, and PDH working group. Clin Genet acceptat agost 2009.

És un treball que vol reflectir 20 anys d'experiència en el diagnòstic de les deficiències de PDHc a l'Institut de Bioquímica Clínica. Inicialment el diagnòstic es basava únicament en l'estudi enzimàtic de PDHc, i amb el pas del anys es va incorporar l'estudi molecular del gen *PDHA1*, la subunitat més freqüentment alterada, per la confirmació d'aquesta deficiència.

Aquesta tesis ha contribuït amb la introducció de l'estudi a nivell de cDNA, la qual cosa ens ha permès detectar alteracions en el *splicing* que haurien estat indetectables fins al moment.

El treball recull un total de 40 pacients amb deficiència de PDHc vint dels quals han sigut estudiats durant els 4 anys de realització d'aquesta tesi. Hem aconseguit detectar mutacions en *PDHA1* causants de malaltia en 20. Els 20 pacients restants no han mostrat canvis patològics, encara que un 40 % és portador d'un haplotip que hem detectat significativament més freqüent ($p < 0,5$) entre els pacients amb deficiència de PDHc que entre els individus control.

SÍNTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tal i com estava descrit anteriorment, hem trobat una proporció semblant de pacients mascles i femelles (9/11), encara que s'han observat presentacions clíniques més severes entre els mascles. Tres femelles amb mutacions en el gen *PDHA1* van mostrar activitat PDHc dins el rang dels controls. En dues l'estudi mutacional es va realitzar degut als valors baixos de les oxidacions de piruvat i en la tercera per les característiques clíniques que suggerien clarament una deficiència de PDHc.

L'estudi mutacional del gen *PDHA1* de 40 pacients amb deficiència de PDHc ha permès la detecció de 5 mutacions noves: p.A169V, c.932_938del, c.1143_1144ins24, c.1146_1159dup i c.510-30G>A; i quatre mutacions havien estat prèviament descrites només en els nostres pacients: p.H113D, p.P172L, p.Y243del i p.Y369Q. Onze pacients presentaven set mutacions ja conegudes: p.R127Q, p.I166I, p.A198T, p.R263G, p.R302C, p.R378C i c.1142_1145dup.

Tres de les mutacions han estat detectades en més d'un pacient no emparentats:

- p.R302C, només descrita en femelles, l'hem detectat en una nena en heterozigosi i també en un nen amb mosaïcisme per la mutació.
- p.R378C detectada en dos nens amb síndrome de Leigh.
- c.1142_1145dup present en tres femelles en heterozigosi.

La majoria de mutacions s'han produït *de novo*, això ho demostra el fet que només una de les vint mares era portadora (p.R263G), la qual cosa representa una proporció extremadament baixa de mutacions heretades (5%) respecte el 25 % descrit en altres poblacions (*Lissens i col 2000*).

En relació a la nova mutació p.A169V, el fet que l'alanina de la posició 169 estigui altament conservada al llarg de l'evolució, i que a més estigui localitzada en la regió d'unió a TPP reforça la seva presumpció de mutació causant de malaltia.

Gràcies a la posada al punt de l'estudi del gen *PDHA1* en cDNA es va poder detectar la mutació c.510-30G>A, que causa *skipping* de l'exon 6, en un pacient amb una clara deficiència de l'activitat PDHc i PDH-E1, i amb una disminució de la subunitat E1 en el western blot. Està demostrat que l'acceptor de *splicing* de l'intró 5 és molt dèbil, degut a la poca homologia que presenta amb la seqüència consens dels acceptors de *splicing*. La nova mutació trobada crea un nou lloc acceptor de *splicing*, tant dèbil com l'acceptor natural. El fet que la maquinària de *splicing* es trobi dos acceptors dèbils molt propers fa que els ignori i busqui un acceptor més fort, fins a trobar el de l'intró 6.

Dues mutacions més, p.I166I i p.A198T, trobades en els nostres pacients i ja descrites anteriorment, són causants de *skipping* dels exons 5 i 6 respectivament.

Com hem indicat abans, en un mascle hem detectat la mutació p.R302C. Aparentment, aquesta mutació estava en heterozigosi en fibroblasts, la qual cosa ens indicava mosaicisme que també es va confirmar en DNA extret de sang, però en canvi en DNA extret de múscul no es va detectar la mutació. Aquest canvi p.R302C ha estat àmpliament reportat però sempre en femelles. La condició de mosaic d'aquest nen ha permès la viabilitat d'un mascle amb aquesta mutació severa.

En una pacient amb deficiència parcial però clara de PDHc i E1 només hem trobat el canvi sinònim p.R132R en l'estudi molecular, sense observar cap alteració a nivell de cDNA. Es tracta d'un canvi no detectat en 100 al·lels control i que els estudis dels motius ESE li atribueixen una ruptura de la unió d'un motiu SF2/ASF. Però l'estudi molecular dels pares va posar de manifest la presència del canvi en el pare (asimptomàtic), la qual cosa resta importància al canvi i suggereix que es deu tractar d'un polimorfisme.

Entre els 20 pacients amb deficiència de PDHc als quals no se'ls ha detectat cap mutació en el gen *PDHA1*, hem observat un increment significatiu ($p < 0,5$) en la freqüència d'un grup de minihaplotips formats per combinacions dels polimorfismes intrònics c.759+26GGCCAA(2_4) i c.760-15A>C junt amb l'exònic c.795G>A. La forma més trobada en població control és 3CA (c.759+26GGCCAA[3]; c.760-15C; c.795), mentre que en els pacients trobem una elevada freqüència de les combinacions 2AG (c.759+26GGCCAA[2];

c.760-15A; c.795G) i 4CA (c.759+26GGCCAA[4]; c.760-15C; c.795). Tot i tractar-se de polimorfismes ja descrits, cal ressaltar l'increment de la seva freqüència entre els pacients amb deficiències de PDHc.

Durant els anys de realització d'aquesta tesis s'han estudiat 20 dels 40 pacients recollits en l'article, entre els quals 10 presentaven 9 mutacions diferents (p.R127Q, p.I166I, p.V171_Q201del, p.A198T, p.R302C, p.R311TfsX11, p.R378C, p.W383SfsX6, p.K387TfsX6) tres de les quals eren noves. També hem detectat el canvi sinònim p.R132R i en quatre casos els minihaplotips 2AG i 4CA. En altres cinc pacients no hem trobat cap alteració.

El fet que la meitat dels pacients reportats en l'article hagin estat diagnosticats durant la realització d'aquesta tesis, posa de manifest la importància de realitzar un estudi molecular ampli, també incloent pacients amb activitats PDHc en el límits dels controls si van acompanyades d'una sospita clínica rellevant o d'activitats d'oxidació de piruvat també deficients.

A més a més, la introducció de l'estudi molecular amb cDNA ha permès detectar alteracions en el *splicing*. És el cas de la pacient que presentava el canvi sinònim p.I166I, que no es va demostrar la seva patogenicitat fins que no es va observar *skipping* de l'exó 5 en cDNA tractat amb cicloheximida. L'estudi de cDNA també va permetre detectar *skipping* de l'exo 6 en un pacient amb deficiència clara de PDHc però sense canvis detectats en l'estudi de DNA genòmic. Un cop observat el *skipping* de l'exó 6 es va realitzar l'anàlisi de l'intró 5 on es va identificar la mutació c.510-30 G>A causant del *splicing* aberrant.

Tot i que l'article presenta un important nombre de pacients amb mutacions en el gen *PDHA1*, encara resten 20 pacients sense alteració genètica associada. Potser l'explicació als defectes observats en aquest grup de pacients es trobava en la resta de subunitats que conformen el complex piruvat deshidrogenasa. És per això que vam posar a punt l'estudi mutacional dels gens *PDHB*, *DLD*, *DLAT* i *PDHX*.

Mutational study in the *PDHA1* gene of forty patients suspected of pyruvate dehydrogenase complex deficiency.

Ester Quintana^{1,5}, Laura Gort^{1,5}, Christiane Busquets¹, Aleix Navarro-Sastre^{1,5}, Willy Lissens², Sonia Moliner^{1,5}, Montse Lluch^{1,5}, Maria Antonia Vilaseca³, Linda De Meirleir², Antonia Ribes^{1,5}, and Paz Briones^{1,4,5}, and PDH working group*.

*PDH working group includes physicians who provided patients' samples and clinical data: JL Tarazona (Hospital General d'Alacant), Mercé Pineda, MA García-Cazorla, P Poo (Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona), Navarro-Morón (Hospital Puerta del Mar, Cadiz), MT García-Silva, E Martín (Hospital 12 de Octubre, Madrid), M Aritmendi (Hospital General Gregorio Marañón, Madrid), M Martínez-Pardo (Hospital Ramón y Cajal, Madrid), A García-Alix (Hospital La Paz, Madrid), R Domingo (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia), MA Ruiz (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca), E Lewis, CF Moura de Souza (Porto Alegre – Brasil), ME Yoldi (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), MR Rodrigues (IG Jacinto Magalhaes, Porto - Portugal), A Martínez-Carrascal (Hospital de Requena) M Castro-Gago (Hospital Clínico, Santiago de Compostela), JI Muñoz, C Martínez-Costa (Hospital Clínico, Valencia).

¹Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

²UZ Brussel, Vrije Universiteit Brussel, Belgium.

³Servei de Bioquímica, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

⁴Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.

⁵CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

Running head: Mutational study in the *PDHA1* gene

Address for correspondence:

Paz Briones
Institut de Bioquímica Clínica
Edificio Helios III
c/ Mejia Lequerica s/n
08028 Barcelona
Spain
Tel 932279342 Fax 932275668
Email: pbriones@clinic.ub.es

ABSTRACT

We screened for *PDHA1* mutations in forty patients with biochemically demonstrated PDHc deficiency or strong clinical suspicion, and found changes with probable pathological significance in twenty. Five patients presented new mutations: p.A169V, c.932_938del, c.1143_1144 ins24, c.1146_1159dup and c.510-30G>A, this latter is a new undescribed cause of exon 6 skipping. Another four mutations have been found, and previously reported, in our patients: p.H113D, p.P172L, p.Y243del and p.Y369Q. Eleven patients presented seven known mutations: p.R127Q, p.I166I, p.A198T, p.R263G, p.R302C, p.R378C and c.1142_1145dup. The latter three were found in more than one unrelated patient: p.R302C was detected in a heterozygous girl and a mosaic male, p.R378C in two males and finally, c.1142_1145dup in three females; only one in twenty mothers was found to be a carrier (p.R263G).

Apart from those twenty patients, the only alteration detected in one girl with clear PDHc and PDH-E1 deficiency, was the silent change c.396A>C (p.R132R); and other eight PDHc deficient patients carry combinations of known infrequent polymorphisms that are overrepresented among our twenty unsolved patients. The importance of these changes on PDH activity is unclear.

Investigations in the other PDHc genes are in course in order to elucidate the genetic defect in the unresolved patients.

Keywords:

Mosaicism; mutation analysis; *PDHA1* gene; PDH activity; PDHc deficiency.

1. Introduction

Pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate forming acetyl-CoA, with a key regulatory role in mitochondrial energy metabolism. Most PDHc deficiencies result from mutations in the E1 component (EC 1.2.4.1), and specifically in the E1 α subunit gene (*PDHA1*) which is X-linked, but they may also be due to defects in the other components of the complex: E2 (EC 2.3.1.12), E3 (EC 1.8.1.4), or E3BP (E3 binding protein, X-lipoate) or in PDH phosphatase (EC 3.1.3.43) that activates the enzyme (1-5). PDHc defects are an important cause of primary lactic acidosis, frequently with encephalopathic effects. The central nervous system is highly dependent on glucose, and PDHc is a limiting enzyme in the pathway. For this reason, slight changes in PDHc activity can have pathologic significance (6- 8).

PDHA1 is mapped to Xp22.1. In spite of its location on the X chromosome, equal numbers of affected males and females have been identified, with a wide spectrum of clinical features, ranging from fatal neonatal lactic acidosis to mild ataxia or neuropathy, including Leigh syndrome, or different degrees of congenital brain malformations (9).

The clinical presentations differ between sexes. Neonatal lactic acidosis predominates in males, where cells are affected and the degree of residual PDHc activity depends on the *PDHA1* mutation. Very severe mutations are not found in males, probably because they are not compatible with life. But in heterozygous females, the residual PDHc activity in females is both related to the mutation and to the random pattern of X-inactivation, which leads to variable expression of the mutant and normal genes in different tissues (10). Females however can have a severe clinical picture with early onset microcephaly, spastic quadriplegia, severe epilepsy and cortical /subcortical atrophy (11).

The first clue for recognition of a possible PDHc deficiency is the finding of elevated lactate and pyruvate in blood and cerebral spinal fluid, with normal or low lactate to pyruvate ratio. Measurement of enzyme activity, usually in cultured skin fibroblasts or muscle, is essential for diagnosis. However, enzyme activity results are not always unequivocal since some affected males present high residual PDHc activity; moreover, female patients may present clinical features suggestive of PDHc deficiency but normal levels of enzymatic activity in fibroblasts (10, 12). Therefore, mutational analysis is usually essential to confirm the diagnosis.

Our aim is to describe our experience on the study of forty patients with demonstrated or strongly suspected PDHc deficiency.

2. Methods

2.1. Enzyme studies

PDHc and E1 activities were determined in cultured fibroblasts or muscle tissue by measuring the $^{14}\text{CO}_2$ production from [1- ^{14}C]-labelled pyruvate after activation with Ca^{++} and Mg^{++} and addition of carnitine and cytochrome C (13, modified as described in 14). Muscle activities were related to the mitochondrial content as expressed by the citrate synthase activity, which was analysed spectrophotometrically (15). Fibroblast activities were given as mU per milligram protein. One unit (U) corresponds to one millimol of substrate transformed per minute.

As a global measurement of the pyruvate pathway through PDHc we evaluated 1- ^{14}C pyruvate oxidation rates by intact fibroblasts (16).

For Western blotting, proteins were separated in 10% acrylamide/SDS gel, transferred to a nitrocellulose membrane, incubated with primary rabbit polyclonal antibody against subunits of PDH complex (donated by Dr. Ruitenbeek, Nijmegen), and detected with chemiluminescence (ECL system, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) (14).

2.2 Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from whole blood, cultured skin fibroblasts or tissues using standard protocols. Each of the eleven exons and intron boundaries of the *PDHA1* gene was PCR-amplified and analysed by SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) according to standard protocols. PCR products with shifted mobility were sequenced using the dye-terminator technology, following the protocol supplied by the manufacturer (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). In case of negative pre-screening of mutations, all eleven exons and intron boundaries were sequenced.

Total RNA was isolated from cultured fibroblasts using QIAshredder and RNeasy kits (Qiagen, Hilden, Germany) and cDNA was synthesized using standard protocols. We also isolated RNA from fibroblasts treated during 7 h with a solution containing 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (CHX), to inhibit mRNA degradation by the nonsense mediated

decay (NMD) process. Overlapping segments of the *PDHA1* cDNA were amplified by PCR and sequenced.

All oligonucleotides used for PCR were self-designed and available on request.

The protocol of study has changed along the years. Initially, the search for mutations in our laboratory was performed in genomic DNA. During the last four years, we revised the unsolved patients, and prepared cDNA from their fibroblasts when available, for screening of mutations. Nowadays, we start the analysis of new PDHc deficient patients with cDNA extracted from fibroblasts treated with cycloheximide.

Gene nucleotide numbering is according to reference sequence RefSeq NM_000284, with the A of the ATG start codon as position +1. The ATG codon represents position +1 for the amino acid numbering according to PDHE1-A preprotein sequence NP_000275.

3. Results and discussion

3.1. Selection of patients and general results

During the last twenty years, multiple samples from patients suspected of primary lactic acidemia were remitted for metabolic investigation, which included analysis of urine organic acids (GC/MS), and plasma, urine and/or CSF aminoacids (HPLC or ion exchange chromatography with ninhydrin detection), followed by enzymatic studies.

40 patients were selected for study of the *PDHA1* gene, all them were Spanish from origin except 3 (2 Portuguese and 1 Brazilian):

34/40 patients presented decreased PDHc activity in muscle (0.5–7.6 mU/U CS; control mean 16.2, range 9.1–35.5 mU/U CS) and/or fibroblasts (undetectable-0.31 mU/mg prot; control mean 0.87, range 0.34-2.41 mU/mg prot).

32/34 patients showed specific deficiency of the PDH-E1 component in muscle (0.037-0.38 mU/U CS; control mean 1.18, range 0.5-3.1 mU/U CS) and/or in fibroblasts (0.012-0.035 mU/mg prot; control mean 0.086, range 0.04–0.28 mU/mg prot). 17/32 patients showed mutations in the *PDHA1* gene (tables 1 A and B); 1/32 patient showed only a previously unreported synonymous change without apparent pathological importance; 7/32 presented infrequent polymorphisms; and no changes were found in the other remaining 7/32 (though cDNA has not been available for study in six of these latter).

The other 2/34 PDHc deficient patients showed normal E1 activity, even so they were also included for *PDHA1* investigation because it is the most probable gene to cause PDHc deficiency, but no changes were found in their cDNA.

In addition, 4/40 patients were also included in the mutational study because, although their measured PDHc activity was in the control range, the rates of 1-¹⁴C pyruvate oxidation by their fibroblasts were decreased (3.8 – 7.6 nmol/hour.mg prot, control mean 14, range 8 - 34 nmol/hour.mg prot). We also investigated 2/40 patients with normal results for both PDHc activity and pyruvate oxidation rates, because their clinical features were very suggestive of PDHc deficiency. For these latter six patients with normal PDHc activity, we found *PDHA1* mutations in three girls: two of them had shown decreased pyruvate oxidation in their fibroblasts (patients F-8 and 9, table 1B), but the third one did not show deficiencies in muscle or fibroblasts (patient F-4, table 1B). One male patient with decreased pyruvate oxidation presented an infrequent *PDHA1* polymorphism, and in the other two patients we did not detect changes, although cDNA was not available in one of them.

3.2. Clinical features of our patients with mutations in *PDHA1*

Tables 1 A and B summarize the main features of the twenty patients with changes in *PDHA1* gene suggestive of being disease-causing mutations.

As described in other series (6, 7), about half of our patients were males and half females, though males were more severely affected, with *exitus* in four of nine. The clinical spectrum is very wide for both sexes, from fatal neonatal lactic acidemia in two of the males, to much milder presentation in patients M-8 and M-9. Leigh syndrome, that is usual in PDH-E1 deficiency (6), was the clinical presentation in four of the males, but curiously, none of the eleven females showed this presentation. Patient M-8, with slight mental retardation, dystonia and symmetric necrotic lesions in the globus pallidus and substantia nigra, suggesting also a Leigh syndrome, resembles the patients described by Head et al (4) with dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) deficiency.

Although, all the eleven girls are alive, they present very diverse clinical symptoms, with variable psychomotor retardation including cases with severe encephalopathy. Cerebral malformations of different degree were present in nine of them.

Eight patients of both sexes presented facial dysmorphism, including hypertelorism and long narrow prominent forehead, and in some cases long philtrum, thin lips or scarce eyelashes. Cranial asymmetry was remarkable in patients F-6 and 10, and

other physical dysmorphisms included small hands and feet (patient F-7), short inferior limbs (F-10) and hypospadias (M-1).

It is to note that patient F-4, with dysmorphism, cerebral malformations and severe psychomotor retardation (17), presented normal PDHc activities (both in muscle and fibroblasts) and pyruvate oxidation rates. In spite of that, mutations in *PDHA1* were investigated, due to the clear clinical suspicion, which led to the finding of the p.P172L mutation. Patients F-8 and F-9 did neither present clear PDHc deficiency in fibroblasts, but they were investigated because of diminished pyruvate oxidation rates. These three cases are new examples of the difficult challenge of diagnosis of PDH-E1 deficiency in females (6, 9, 10, 18). We would like to stress the utility of measuring ¹⁴C-pyruvate oxidation rates. In our hands, this test has been the clue for the diagnosis in these two latter patients, and has helped to reinforce the diagnosis of PDHc deficiency in other doubtful cases with high PDHc residual activity.

Treatment with thiamine, carnitine and ketogenic diet has resulted in variable, usually mild, clinical response.

3.3 Molecular analysis

Molecular analysis of *PDHA1* in forty PDHc deficient patients allowed the identification of 16 different changes in twenty patients (Tables 1 A and B). Changes c.506C>T (p.A169V), c.510-30G>A (p.V171_Q201del), c.932_938del (p.R311TfsX11), c.1143_1144ins24 (p.381_382insPFEVRGAN) and c.1146_1159dup (p.K387TfsX6) are first reported here. Mutations p.H113D, p.P172L, p.Y243del and p.Y369Q have only been found in our patients, though they have been reported previously (19, 20, 17). None of the new changes was found in 100 normal chromosomes. Eleven patients presented with seven previously described mutations: p.R127Q, p.I166I, p.A198T, p.R263G, p.R302C, p.R378C and c.1142_1145dup. Mutation p.A198T is present in a girl (F-5) who is also a carrier of UTR5'-98C>T; this latter is an unreported change absent in 100 control alleles which is also present in the patient's mother

As previously reported for other PDH-E1 deficient patients (6, 20), molecular results in our patient series show a broad spectrum of disease causing mutations in the *PDHA1* gene, and few of them are present in more than one patient. In fact, we only detected three such recurrent mutations: p.R278C, p.R302C and c.1142_1145dup, that had been reported in other populations (19, 20). As described for other patients (6, 20), the majority of our cases – eighteen out of twenty - carry mutations located in

the last half of the *PDHA1* gene, exons 5 to 11; and only two (girls) present changes in exon 4. Most of the mutations are “de novo” as only in one case (p.R263G; patient M-3) the mother was a carrier. This is an expected trait as *PDHA1* is an X-linked gene, and it is well established that X-linked diseases are usually caused by a high percentage of “de novo” mutations (6, 8, 20). Nevertheless, this is especially marked in our patients (only 5% inherited), as the percentage of inherited mutations reported for *PDHA1* is about 25 % (20). In order to detect possible mosaicism in germinal maternal cells, new pregnancies were monitored in nine families with normal results in all cases.

The fact that alanine 169 is highly conserved through evolution and is situated in the TPP binding region supports the presumption pathogenicity of the new missense mutation p.A169V. The patient died before diagnosis had been established and therefore he did not benefit of the possible treatment with thiamine.

Patient M-8, with an insertion of 8 amino acids (p.381_382insPFEVRGAN), presents a mild affectation – who is now 10 years old – but his immunoblot reveals absent E1 α subunit. Other patients have been reported with mutations in C-terminal, and all of them showed a high decrease of E1 α . Marsac et al (21) proposed that the last amino acids are very important for the conformation of the tetrameric PDH-E1 enzyme, causing a deficiency in the immunoblot.

In case M-2 no alterations were present in his 11 *PDHA1* exons and intron boundaries, but, as activity of the PDH-E1 component was clearly diminished and the Western Blot results showed moderate decrease of the E1 α protein (Fig 1A), *PDHA1* cDNA was analysed, which showed two bands (Fig. 1B), one corresponding to the normal sequence, and a second shorter species with complete deletion of exon 6 (Fig. 1C). After that, we analysed intron 5 and found the change c.510-30G>A (IVS5-30G>A) (Fig. 1D), which was not found in 100 normal chromosomes and is presumably the cause of the loss of exon 6.

In silico studies of ESE motif prediction tool (ESE finder www.rulai.cshl.edu/tools/ESE.html) showed that the SF2/ASF and SC35 binding motives were lost and the overlapping SRp40 binding site showed a little decrease of its score. It is reported that a significant enrichment of ESE is associated with weak splice acceptor sites (22), and the exon 6 acceptor splice site has a low Shapiro and Senapathy score (23, 24). It has been demonstrated that the intron 5 splice acceptor site is very weak due to the poor homology with the splice acceptor site consensus

sequence (25). The intronic change in our patient (c.510-30G>A), creates a weak novel splice acceptor site that is as weak as the natural acceptor of intron 5. The presence of such two weak and close acceptors may induce the splicing machinery to ignore both and search for the next stronger splice acceptor site, i.e. that of intron 6. This might be an explanation for the loss of exon 6 identified in our patient, however, further studies are necessary to confirm this hypothesis. Several other mutations causing exon 6 loss have been reported (26-29); two of them are exonic and they each create SRp40 specific exonic splice enhancer sites that lead to the loss of exon 6 (26, 27). That is the case of mutation p.A198T present in our patient F-5 and previously reported in another patient by Okajima et al (26). The easiness for exon 6 to be skipped reinforces our observation that the acceptor site in intron 5 is weak, and that any mutation that minimally changes the splicing conditions, is taken into account by the splicing machinery causing the partial or entire loss of this exon. The skipping of exon 6 causes the in-frame deletion of 31 amino acids (p.V171_Q201del).

Case M-4 was found to present somatic mosaicism for mutation p.R302C, which was detected by the finding of coexisting wild type and mutated species both in fibroblasts and blood (Fig. 1E and 1F). It was surprising that DNA extracted from muscle did not show the mutation in spite of clear PDHc deficiency in this tissue. This might also be explained by mosaicism, as the enzymatic study and the DNA extraction were made in two different pieces of muscle. Other cases of somatic mosaicism in PDHc deficiency patients have previously been reported (26, 30). Mutation p.R302C had been detected only in females with variable psychomotor retardation (20), and is also present in our patient F-7, with severe encephalopathy. Its presence in patient M-4, a male with long survival, is probably possible because of his mosaicism.

Other recurrent mutations are p.R263G, present in our patient M-3, that had already been reported in other male patients presenting Leigh syndrome (20); and also the c.1142_1145dup, that we have found in three unrelated females (F-9, 10 and 11) and had already been described in females with variable degree of encephalopathy.

In two female patients with low PDHc and E1 activities we only found the synonymous changes p.I166I and p.R132R, respectively; p.I166I has been described as a variant causing exon 5 skipping (31). The other change p.R132R (c.396A>C) was not found in 100 control chromosomes. After splice site prediction programs BDGP (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) and Splice Sites Score Calculation (rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html), this change does not seem to

create a new splicing site. On the other hand, studies with ESE finder (www.rulai.cshl.edu/tools/ESE.html) showed that the mutation causes the disruption of a SF2/ASF binding motif and decreases the score of another overlapping SF2/ASF binding motif. Nevertheless, studies on cDNA extracted from fibroblasts grown with and without cycloheximide showed normal sequences. Moreover, when DNA from patient's parents was studied, the change was detected on the paternal DNA. Therefore, we had to conclude that most probably the change is not pathologic.

3.4 Polymorphisms and haplotype analysis

We have identified one exonic and four intronic polymorphisms in our patient series. These changes are UTR5'-88G/A polymorphism (rs5955751 in the dbSNP database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>), the previously reported c.58-84C/T (32), the change c.760-15A/C (rs7058209) localized in intron 7, and the exonic change c.795G/A (rs1126565) (20). In addition, concerning the previously described short sequence repeat in/del c.759+26GGCCAA(2_3) (rs11278403), we found it also as c.759+26GGCCAA(4). We observed that the alleles for the three variants [c.759+26GGCCAA(2_4), c.760-15A>C; c.795G>A] conform four minihaplotypes. We have established the frequencies of these and the UTR5'-88G>A variants in control Spanish population and in our twenty patients without demonstrated *PDHA1* mutation (Table 2), showing a significantly higher presence in those patients for the less frequent minihaplotypes (2AG: [c.759+26GGCCAA[2]; c.760-15A; c.795G] and 4CA: [c.759+26GGCCAA[4]; c.760-15C; c.795A]) ($p < 0.5$) and for the UTR5'-88G>A change ($p < 0.5$), but those frequencies did not differ between controls and the twenty patients with mutations in *PDHA1* (data not shown). It would be interesting to investigate to what extent these combinations of polymorphisms affect PDH-E1 activity.

For the moment, investigations in the other PDHc genes are in course in order to elucidate the genetic defect in the unresolved patients.

4. Acknowledgements

This study was supported in part by grants FIS PI041351 and FIS AI079007 from the Spanish Ministry of Health. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the

ISCI, Spain. We acknowledge the critical review of the manuscript by Dr MJ Coll. This work has been performed in the context of the PhD program of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona. The help of Laura Ozaez with fibroblast culture is acknowledged.

5. References

1. Hong YS, Kerr DS, Liu T, Lusk M, Powell BR, Patel MS. Deficiency of dihydropyridine dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del) Analysis of a family and prenatal testing. *Biochim Biophys Acta* 1997: 160-168.
2. Brown RM, Head RA, Boubriak II, Leonard JV, Thomas NH, Brown GK. Mutations in the gene for the E1beta subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 2004: 115: 123–7.
3. Brown RM, Head RA, Morris AAM, Raiman JAJ, Walter JH, Whitehouse WP, Brown GK. Pyruvate dehydrogenase E3 binding protein (protein X) deficiency. *Dev Med Child Neurol* 2006: 48: 756-760.
4. Head RA, Brown RM, Zolkipli Z, Shahdadpuri R, King PT, Clayton MD, Brown GK. Clinical and genetic spectrum of pyruvate dehydrogenase deficiency: dihydropyridine acetyltransferase (E2) deficiency. *Ann Neurol* 2005: 58: 234–241.
5. Maj MC, MacKay N, Levandovskiy V, Addis J, Baumgartner ER, Baumgartner MR, Robinson BH, Cameron JM. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: Identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4101-07.
6. Robinson BH. Lactic acidemia: Disorders of Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Dehydrogenase. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: Graw-Hill, 2001: 2275-2295.

7. Brown GK. Pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 625-33.
8. Patel MS, Harris RA. Mamalian α -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *J FASEB* 1995: 1164-72.
9. Brown GK, Otero LF, LeGris M, Brown RM. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* 1994; 31: 875-9.
10. Dahl HH. Pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency: males and females differ yet again. *Am J Hum Genet* 1995; 6: 3-57.
11. De Meirleir LJ, Van Coster R, Lissens W. Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle. In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G, Walters JH, eds. *Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment*. Fourth revised edition. Heidelberg: Springer, 2006: 161-174 (Chapter 12).
12. De Vivo DC. Complexities of the pyruvate dehydrogenase complex. *Neurology* 1998; 1: 247-49.
13. Sperl W, Ruitenbeek W, Kerkhof CM, et al. Deficiency of the alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase in a patient with lactic acidosis and unexpected sudden death. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 478-92.
14. Guitart M, Andreu AL, García-Arumi E, Briones P, Quintana E, Gómez-Foix AM, García-Martínez C. FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes. *Mitochondrion* 2009; 9: 266-272.
15. Srere PA. Citrate synthase. In: *Methods Enzymology* 1969; 13: 3-11.
16. Willems HL, Dekort TFM, Trijbels FJM, Monnens LAH, Veerkamp JH. Determination of pyruvate oxidation rate and citric acid cycle activity in intact human leukocytes and fibroblasts. *Clin Chem* 1978; 24: 200-203.

17. Blanco-Barca O, Gomez-Lado C, Rodrigo-Saez E, Curros-Novos C, Briones-Godino P, Eiris-Punal J, Castro-Gago M. Déficit de piruvato deshidrogenasa asociado a la mutación C515T en el exón 6 del gen E1 α . Rev Neurol 2006; 43: 341-5
18. Willemsen M, Rodenburg RJT, Teszas A, van den Heuvel L, Kosztolanyi G, Morava E. Females with *PDHA1* gene mutations: A diagnostic challenge. Mitochondrion 2006; 6: 155-159
19. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, et al. Mutation analysis of the pyruvate dehydrogenase E1 α gene in eight patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Hum Mutat 1996; 7: 46-51.
20. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, et al. Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) α subunit gene (*PDHA1*) in patients With a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Hum Mutat 2000; 15: 209-219.
21. Wu Y, Zhang Y, Zhang J. Distribution of exonic splicing enhancer elements in human genes. Genomics 2005; 86: 329-36.
22. Marsac C, Benelli C, Desguerre I, et al. Biochemical and genetic studies of four patients with pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency. Hum Genet 1997;99:785-92.
23. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acids Res 1987; 15: 7155-74.
24. Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. Methods Enzymol 1990; 183: 252-78.

25. Ridout CK, Keighley P, Krywawych S, Brown RM, Brown GK. A putative exonic splicing enhancer in exon 7 of the *PDHA1* gene affects splicing of adjacent exons. *Hum Mutat* 2008; 29: 451
26. Okajima K, Warman ML, Byrne LC, Kerr DS. Somatic mosaicism in a male with an exon skipping mutation in *PDHA1* of the pyruvate dehydrogenase complex results in a milder phenotype. *Mol Genet Metab* 2006; 87: 162-168.
27. Cardozo AK, Meirleir L, Liebaers I, Lissens W. Analysis of exonic mutations leading to exon skipping in patients with pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency. *Pediatr Res* 2000; 6: 748:53.
28. De Meirleir L, Lissens W, Benelli C, et al. Aberrant splicing of exon 6 in the pyruvate dehydrogenase-E1 alpha mRNA linked to a silent mutation in a large family with Leigh's encephalomyelopathy. *Pediatr Res* 1994; 36: 707-12.
29. Miné M, Brivet M, Touati G, Grabowski P, Abitbol M, Marsac C. Splicing error in E1alpha pyruvate dehydrogenase mRNA caused by novel intronic mutation responsible for lactic acidosis and mental retardation. *J Biol Chem* 2003; 278: 11768-72.
30. Seyda A, Chun K, Packman S, Robinson BH. A case of PDH-E1a mosaicism in a male patient with severe metabolic lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 551-559.
31. Boichard A, Venet L, Naas T, et al. Two silent substitutions in the *PDHA1* gene cause exon 5 skipping by disruption of a putative exonic splicing enhancer. *Mol Genet Metab* 2008; 93: 323-30.
32. Otero LJ, Brown RM, Brown GK. Arginine 302 mutations in the pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit gene: identification of further patients and in vitro demonstration of pathogenicity. *Hum Mutat* 1998; 12: 114-21.
33. Briones P, López MJ, De Meirleir L, A. et al. Leigh syndrome due to pyruvate dehydrogenase E1 alpha deficiency (point mutation R263G) in a Spanish boy. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19: 795-6.

34. Soares-Fernandes JP, Teixeira-Gomes R, Cruz R, Ribeiro M, Magalhães Z, Rocha JF, Leijser LM. Neonatal pyruvate dehydrogenase deficiency due to a R302H mutation in the *PDHA1* gene: MRI findings. *Pediatr Radiol* 2008; 38: 559-62.

35. Eiris J, Alvarez Moreno A, Briones P, Alonso-Alonso C, Castro-Gago M. Deficiencia de piruvato deshidrogenasa con malformaciones cerebrales. *Rev Neurol* 1996; 24: 1272-5.

Figure captions

Fig 1 A) Western blot with moderate decrease of subunit E1 α in patient M-2 and absence in patient M-8. B) cDNA electrophoresis of patient M-2 and a control; the arrow points to the fragment with the exon 6 skipped. C) Patient M-2: cDNA sequence from the band lacking exon 6. D) Patient M-2: intron sequence with the change c.510-30G>A. E) Mosaicism: molecular sequence shows the mutation p.R302C apparently in heterozygous form in DNA extracted from blood. F) SSCP analysis of DNA extracted from different tissues (c:control; F:fibroblast; M:muscle; B:blood;)

Table 1A Genotype, clinical and biochemical traits in 9 male PDHc deficient patients

Case	Nucleotide Change	Mutations Effect on protein	Exon	Main clinical traits	Lactate		Enzyme activity [@]		Western blot		
					Blood	CSF	Urine	Muscle		Fibroblasts (E1)	1- ¹⁴ C pyruvate oxidation ^{@@} fibroblasts Control range: 8 - 34
M-1	c.506C>T	p.A169V*	5	IGR, CMF, MC, facial dysmorphism, c.callosum agenesis, hypospadias, convulsions, fatal neonatal LA	++	nd	+	1.1 (0.08)	0.01 (0.03)	2.5	E1 α decreased
M-2	c.510-30 G>A	p.V171_Q201del*	In5	IGR, CMF, MC, facial dysmorphism, petechiae, c.callosum agenesis, lethargy, fatal neonatal LA	++	nd	++	2.2 (0.04)	0.13 (0.014)	4.4	E1 α moderately decreased
M-3	c.787C>G	p.R263G#	8	Psychomotor retardation, dysmorphism, Leigh S., exitus (33)	+++	nd	+++	6.4 (0.03)	0.17 (0.02)	nd	E1 α severely decreased
M-4	c.904C>T <i>mosaicism</i>	p.R302C <i>mosaicism</i>	10	3 years, neonatal LA, CMF, colpocephaly, c.callosum agenesis, facial dysmorphism, severe PMR (34)]	++	++	+	0.5 (nd)	0.27 (0.035)	5.5	Normal
M-5	c.1105T>C; c.1107C>A	p.Y369Q**	11	Severe PMR, hypotonia, fasting hypoglycaemia, Leigh S.	++	++	+	1.2 (undetectable)	0.36 (0.05)	6.1	Normal
M-6	c.1132C>T	p.R378C	11	IGR, hypotonia, Leigh S., exitus at 1.5 years.	+++	++	nd	nd	undetectable (0.012)	6.8	E1 α severely decreased
M-7	c.1132C>T	p.R378C	11	3 years, failure to thrive, fasting hypoglycaemia, PMR, Leigh S. Maternal HELLP S.	+	nd	+	nd	0.24 (0.08)	7.5	E1 α moderately decreased
M-8	c.1143_1144ins24	p.381_382insPFEVR_GAN*	11	10 years, slight mental retardation, arreflexia, dystonic hemiplegia, bilateral lesions in globus pallidum and substantia nigra, Guillain Barre episode at 18 months.	+	+	+	3.4 (0.7)	0.11 (0.03)	5.8	E1 α absent
M-9	c.1146_1159dup	p.K387TfsX6*	11	4 years, PMR, LA	++	nd	+	nd	0.18 (0.028)	8.7	E1 α absent

Gene nucleotide numbering is according to sequence RefSeq NM_000284, with +1 as A of the ATG start codon. *novel mutations first reported here; **mutations only reported in our patients (19, 20); # inherited mutation, his mother was a carrier. @ PDHc and E1 activities in muscle are expressed as mU/U citrate synthase; and in fibroblasts are expressed as mU/mg prot @ tax of pyruvate oxidation expressed as nmols/hour.mg prot. nd: not done or no data. IGR: intrauterine growth retardation, CMF: Cerebral malformations; EP: encephalopathy; LA: lactic acidosis; MC: microcephaly; PMR: psychomotor retardation; S: syndrome.

Table 1B Genotype, clinical and biochemical traits in 11 female PDHc deficient patients

Case	Nucleotide Change	Mutations Effect on protein	Exon	Main clinical traits	Lactate			Enzyme activity [@] PDHc (E1)		1- ¹⁴ C pyruvate oxidation ^{@@} fibroblasts Control range: 8 – 34	Western blot
					Blood	CSF	Urine	Muscle Control range: 9 - 35 (0.5 – 3.1)	Fibroblasts Control range: 0.34 – 2.4 (0.04 – 0.28)		
F-1	c.337C>G	p.H113D**	4	23 years, severe spastic-ataxic tetraparesis, dysarthria, mental retardation, cerebellum atrophy.	+	++	+	nd	0.094 (0.022)	nd	E1α slightly decreased
F-2	c.380G>A	p.R127Q	4	Moderate neonatal EP	+	+	nd	nd	0.05 (0.029)	4	Normal
F-3	c.498C>T	p.I166I	5	IGR, multicystic EP, no visual contact, global hypotonia, progressive MC, severe PMR.	+	++	+	2.9 (0.08)	0.15 (0.03)	5.2	Normal
F-4	c.515C>T	p.P172L**	6	4 years, IGR, CMF, EP, MC, dysmorphism, convulsions, severe PMR (17)	++	++	++	∞	0.95 (0.04)	8.5	nd
F-5	c.592G>A	p.A198T	6	7 years, EP, MC, PMR, progressive cerebral + cerebellar atrophy, West S, hypotonia, ataxia.	++	++	-	nd	0.23 (0.028)	2.8	E1α clearly decreased
F-6	c.727_729del	p.Y243del**	7	IGR, hypotonia, CMF, EP, MC, mild dysmorphism, severe PMR (35)	++	+++	+	6.2 (nd)	0.06 (0.01)	7.4	Normal
F-7	c.904C>T	p.R302C	10	CMF, EP, MC, facial dysmorphism, hypotonia, myoclonic seizures, spastic tetraparesis, severe PMR.	++	++	++	nd	0.31 (0.02)	4.3	Normal
F-8	c.932_938del	p.311TfsX11*	10	CMF, colpocephaly, facial dysmorphism, hypotonia, severe PMR.	+	++	+	nd	0.51 (0.019)	7.6	Normal
F-9	c.1142_1145dup	p.W383SfsX6	11	2 years, MC, CMF, severe EP+PMR, West S, blindness, deafness.	+	++	+	nd	0.36 (0.045)	5.3	E1α decreased
F-10	c.1142_1145dup	p.W383SfsX6	11	EP, MC, PMR, cerebral and cerebellar atrophy.	++	++	+	4.8 (0.15)	nd	nd	E1α clearly decreased
F-11	c.1142_1145dup	p.W383SfsX6	11	EP	+	nd	nd	nd	0.14 (0.02)	4.7	E1α clearly decreased

Gene nucleotide numbering is according to sequence RefSeq NM_000284, with +1 as A of the ATG start codon. *novel mutations first reported here; **mutations only reported in our patients (19, 20, 17, 35); # inherited mutation, his mother was a carrier. @ PDHc and E1 activities in muscle are expressed as mU/U citrate sintase; and in fibroblasts are expressed as mU/mg prot @@taxes of pyruvate oxidation expressed as nmols/hour.mg prot.nd: not done or no data. IGR: intrauterine growth retardation, CMF: Cerebral malformations; EP: encephalopathy; LA: lactic acidosis; MC: microcephaly; PMR: psychomotor retardation; S: syndrome.

∞PDHc activity in this patient's muscle was in the control range: 1.05 mU/mg prot (control range 0.8-3.4 mU/mg prot), but citrate synthase was not measured.

Table 2 Frequency of polymorphisms detected in *PDHA1* gene in controls and PDHc deficient patients without mutations in *PDHA1*

	<u>Exon 1</u>	<u>Intron7-exon8 minihaplotypes</u>			
	UTR5'-88G>A	2AG	3CA	3CG	4CA
Controls (n=137)	3.0%	9.5%	86.1%	0.7%	3.6%
Patients (n=20)	9.1%	18.2%	75.5%	0%	6.0%

Intron7-exon8 minihaplotypes:

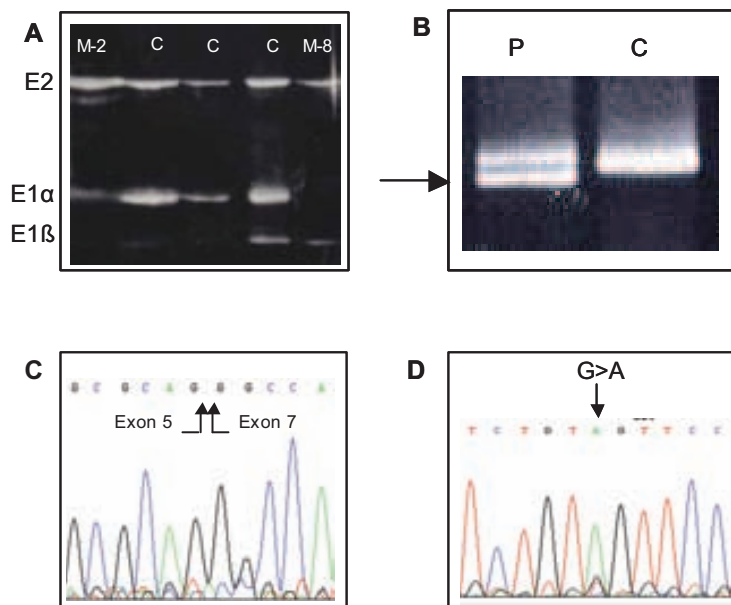
2AG: [c.759+26GGCCAA[2]; c.760-15A; c.795G]

3CA: [c.759+26GGCCAA[3]; c.760-15C; c.795A]

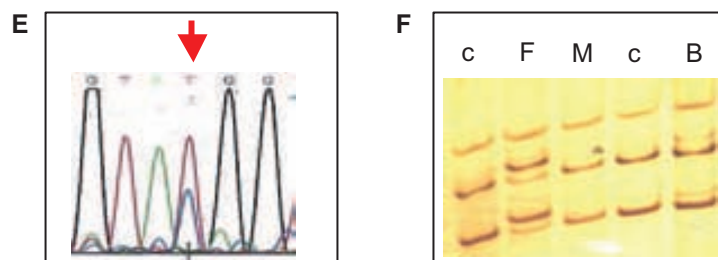
3CG: [c.759+26GGCCAA[3]; c.760-15C; c.795G]

4CA: [c.759+26GGCCAA[4]; c.760-15C; c.795A]

EXON SKIPPING



MOSAICISM



4.5.2. Deficiència de PDHB

Presentem dos pacients amb una deficiència clara de PDHc i d'E1, dels quals el pacient 1 ha estat estudiat i diagnosticat en el nostre centre. L'estudi de western blot mostrava una clara disminució de la subunitat E1 α acompanyada de disminució d'E1 β . Aquestes observacions junt amb el fet que la subunitat més habitualment alterada és la PDH-E1 α va portar a l'estudi molecular del gen *PDHAI*. Primerament es va fer l'anàlisi mutacional del gen en DNA genòmic, sense detectar-se cap alteració. Al cap d'uns anys, després d'haver posat a punt l'anàlisi molecular de *PDHAI* en cDNA, es va reprendre l'estudi d'aquest pacient, esperant que la causa de la seva patologia estigués localitzada a nivell d'alteracions en el *splicing*. Però tampoc es va detectar cap alteració.

Finalment, i amb la posada al punt de l'estudi de tots els gens del complex PDHc, es va poder detectar el canvi causant de patologia, localitzat en la subunitat PDH-E1 β , del qual solsament hi havia set pacients descrits.

Les característiques clíniques i bioquímiques dels nous pacients, així com la demostració de la patogenicitat de les mutacions p.M101T presentada pel nostre pacient, i de p.M101V i p.R105Q presentades pel segon pacient, s'han recollit en un article enviat a la revista Journal of Inherited Metabolic Disease.

Article:

PDH E1 β deficiency with novel mutations in two patients with Leigh syndrome. Quintana E, Mayr JA, García Silva MT, Font A, Tortoledo MA, Moliner S, Ozaez L, Lluch M, Cabello A, Ricoy J R, Ribes A, Sperl W, Briones P. J Inherit Metab Dis acceptat setembre 2009.

SINTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest article presentem dos nous casos de deficiència de PDH-E1 β , éssent el pacient 1 el primer cas espanyol.

El pacient 1 és un nen que va ser hospitalitzat just després del naixement. Presentava distrés respiratori, hipotonia severa i encefalopatia. Els estudis bioquímics van mostrar acidosis metabòlica i hiperlactacidèmia amb una relació lactat/piruvat normal, i alts nivells d'alanina en plasma així com lactat en orina. La ressonància magnètica va posar de manifest una hipoplasia del cos callós. Posteriorment es va produir un deteriorament neurològic que va causar l'entrada del pacient en un coma profund i finalment va ser *exitus* als 5 mesos d'edat. La necròpsia va revelar característiques de síndrome de Leigh amb dany sever en el tronc cerebral.

El pacient 2 és un nen austríac, segon fill de pares no consanguinis. La mare havia patit dos avortaments previs. Va mostrar un desenvolupament normal fins als 16 mesos, quan va evidenciar-se hipotonia muscular i hiperlactacidèmia. Posteriorment el pacient va patir episodis recurrents d'acidosis metabòlica, vòmits, tetrapresia intermitent i febre associada a infeccions respiratòries. Les analítiques mostraven lactat i alanina elevats amb una relació lactat/piruvat normal. Als 30 mesos presentava ptosis i estrabisme. Estudis de MRI van mostrar alteracions compatibles amb síndrome de Leigh

La síndrome de Leigh és una presentació clínica habitual en les deficiències de *PDHA1*, però fins al moment no s'havia descrit en les deficiències de *PDHB*.

Les alteracions clíniques i bioquímiques dels pacients van suggerir una deficiència de PDHc que es va confirmar amb l'estudi enzimàtic en fibroblasts pel pacient 1: activitat PDHc: 0.006 nmols/min x mg prot; mitja dels controls 0.87, rang 0.34-2.41 nmols/min x mg prot; activitat PDH-E1: 0,012 nmols/min x mg prot; mitja dels controls 0.086, rang 0.04 – 0.28 nmols/min x mg prot. I en múscul pel pacient 2: activitat PDHc: 3.7 nmol/min x mg proteïna; rang 5.3 – 19.8 nmol/min x mg proteïna.

En els dos casos es va realitzar l'estudi molecular del gen *PDHA1* sense mostrar alteració.

Degut a la deficiència clara de PDH-E1 en ambdós casos, i la consanguinitat dels pares en el pacient 1, es va pensar en una deficiència de *PDHB*, gen d'herència autosòmica recessiva. L'estudi molecular en cDNA va mostrar el canvi c.302 T>C (p.M101T) en homozigosi en el pacient 1, i els canvis c.301A>G (p.M101V) i c.313 G>A (p.R105Q) en el pacient 2. L'anàlisi de DNA genòmic va confirmar les observacions, i la condició de portadors dels pares i de les germanes respectivament. El canvi p.M101T es va trobar en un individu control de 200 al·lels estudiats.

La metionina 101 i l'arginina 105 són aminoàcids altament conservats entre les espècies, tal i com s'observa en la base de dades <http://coot.embl.de/PolyPhen/>. El canvi observat en el pacient 1 substitueix la metionina inerta de la posició 101 per un residu de treonina més petit, polar i amb un grup hidroxil, mentre que en el pacient 2 la metionina és substituïda per un residu menys polar de valina. Pel que fa a la segona mutació del pacient 2 consisteix en el canvi d'una arginina per un àcid glutàmic que altera la càrrega d'una aminoàcid molt conservat. A més a més, el fet que tant la metionina 101 com l'arginina 105 estiguin situades molt a prop de la leucina 144 de la cadena α , ens permet hipotetitzar que el seu canvi altera la unió entre les dues cadenes α i β , per tant, l'estabilitat de l'heterotetramer E1, ja que cal la presència de les dues subunitats per tal que l'heterotetramer sigui estable (*Fuji i col 1996*). A més a més, la nostra teoria es veu recolzada pels resultats de l'immunoblot, que mostren una

clara disminució tant de la subunitat α com respecte a la subunitat E2, només observada prèviament en mutacions que alteren la unió entre les dues subunitats (*Brown i col 2004*).

PDH E1 β deficiency with novel mutations in two patients with Leigh syndrome

E. Quintana^{1,2}, J.A. Mayr³, M.T. García Silva⁴, A. Font¹, M.A. Tortoledo⁴, S. Moliner^{1,2}, L. Ozaez^{1,2}, M. Lluch^{1,2}, A. Cabello⁴, J.R Ricoy⁴, J. Koch³, A. Ribes^{1,2}, W. Spert³, P. Briones^{1,2,5}.

¹Institut de Bioquímica Clínica, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

³Department of Pediatrics, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria

⁴Departamento de Pediatría, Unidad Pediátrica de Enfermedades Raras. E. Mitocondriales y Metabólicas Hereditarias, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

⁵Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.

Address for correspondence:

Paz Briones
Institut de Bioquímica Clínica
Edificio Helios III
c/ Mejía Lequerica s/n
08028 Barcelona
Spain
Tel 932279342 Fax 932275668
Email: pbriones@clinic.ub.es

Word counts for the text: 1776 words

Word counts for the summary: 256 words

2 figures

ABSTRACT

Most cases of pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) deficiency are attributable to mutations in the *PDHA1* gene which encodes the E1 α subunit, with only a few cases of mutations in the genes for E3, E3BP, E2 and E1-phosphatase being reported. Only seven patients with deficiency of the E1 β subunit have been described, with mutations in the *PDHB* gene in six of them. Clinically they presented with a non-specific encephalomyopathy.

We report two patients with new mutations in the *PDHB* gene and Leigh syndrome. Patient 1 was a boy with neonatal onset of hyperlactatemia, corpus callosum hypoplasia and a convulsive encephalopathy. After neurologic deterioration, he died at age 5 months. Autopsy revealed the characteristic features of Leigh syndrome. Patient 2, also a boy, presented a milder clinical course. First symptoms were noticed at age 16 months with muscular hypotonia, lactic acidosis and recurrent episodes of somnolence and transient tetraparesis. MRI revealed bilateral signal hyperintensities in the globus pallidus, midbrain and crura cerebri.

PDHc and E1 activities were deficient in fibroblasts in patient 1; in patient 2 PDHc deficiency was found in skeletal muscle. Mutations in *PDHA1* were excluded. Sequencing of *PDHB* revealed a homozygous point mutation (c.302T>C), causing a predicted amino acid change (p.M101T) in patient 1. Patient 2 is a compound heterozygote for the mutations c.301A>G (p.M101V) and c.313G>A (p.R105Q). All three mutations appear to destabilize the E1 enzyme with a decrease of both E1 α and E1 β subunits in immunoblot analysis. To our knowledge, these patients with novel *PDHB* mutations are the first reported with Leigh syndrome.

Sentence to take-home message: PDH E1 β deficiency should be considered in the differential diagnosis of Leigh syndrome

Abbreviated title: PDH E1 β deficiency and Leigh syndrome.

Reference to electronic database: PDHbeta deficiency, OMIM 179060; PDH-E1, EC 1.2.4.1; PDHE2, EC 2.3.1.12; PDH-E3, EC 1.8.1.4; E3BP, EC 3.1.3.43

Abbreviations: PDHc: Pyruvate dehydrogenase complex
E3BP: E3 binding protein
MRI: magnetic resonance imaging

INTRODUCTION

Pyruvate dehydrogenase is a multienzyme complex (PDHc) with a key regulatory role in the mitochondrial oxidative metabolism of carbohydrate, catalyzing the irreversible decarboxylation of pyruvate and formation of acetyl-CoA and NADH. Although PDHc is located in the mitochondrion, its subunits are encoded by nuclear genes. It is composed of multiple copies of three catalytic components: E1 (EC 1.2.4.1), which includes subunits α and β forming a heterotetramer with thiamine pyrophosphate as a cofactor; dihydrolipoamide acetyltransferase (E2, EC 2.3.1.12) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3, EC 1.8.1.4). A fourth component, E3-binding protein (EC 3.1.3.43), plays a role in the attachment of E3 to the E2 core. Activity of PDHc is subject to a complex regulation; in the short term, it is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of three serine residues on the E1 α subunit. These reactions are catalyzed by specific kinases which phosphorylate and inactivate the complex and phosphatases which remove the phosphates and reactivate it (Robinson 2001; Patel and Roche 1990; Patel and Korotchkina 2006).

PDHc is particularly important in the brain in which, under normal conditions, essentially all the energy is derived from aerobic glucose oxidation. For this reason, slight changes in PDHc activity have pathologic significance (Brown et al 2004).

PDHc deficiency is a well defined biochemical defect that is clinically highly heterogeneous (Brown et al 1994; Robinson 2001). It is an important cause of primary lactic acidosis in the newborn period and infancy, but it can also present as a more chronic neurodegenerative disease with extensive cerebral atrophy and structural anomalies in the brain, as Leigh syndrome, or as episodic ataxia (Brown et al 2004).

The great majority of cases with PDHc deficiency are attributable to mutations in *PDHA1*, the X-linked gene for the E1 α subunit, where more than a hundred different mutations have been identified (Lissens et al 2000, Brown et al 2004). Few cases of mutations in E3, E3BP, E2 and E1phosphatase have been described. Only seven E1 β deficient patients have been described, with mutations in the *PDHB* gene in six of them (Brown et al 2006, Okajima et al 2008). The deficiency in the seventh patient was due to an increased proteasome-mediated degradation of the ubiquitinated E1 β subunit (Han et al 2008).

In this report, we describe two patients with Leigh syndrome who have PDHc deficiency attributable to new mutations in *PDHB*.

MATERIAL AND METHODS

Patients:

Patient 1 was a boy, the second child of healthy parents who are consanguineous in the 2nd degree; a previous miscarriage was reported. His older sister was monitored during the first year of life because of hypotonia, but she is now healthy with normal development. During pregnancy the mother had bleeding and she developed eclampsia. Birth weight was 2,660 g, Apgar score was 7 at one minute and 8 at five minutes and he needed resuscitation. He was hospitalized soon after birth because of respiratory distress, severe hypotonia and encephalopathy. He was lethargic, hyporeactive and did not fix visually. He developed seizures that were treated with phenobarbital. Biochemical studies showed metabolic acidosis, hyperlactatemia (ranging from 3.2 to 10.4 mmol/L) with normal lactate/pyruvate ratio (20.4) and high levels of plasma alanine and urinary lactate. Magnetic resonance imaging (MRI) showed hypoplasia of the corpus callosum. Subsequently, he suffered from progressive neurologic deterioration, with signs of brain stem damage: supranuclear ophthalmoparesis, nystagmus, abnormal conjugated eye movements and central respiratory failure, leading to deep coma. He died at 5 months of age and necropsy revealed characteristic features of Leigh syndrome with severe brain stem involvement (Figure 1A-C).

Patient 2 was a boy, second child of healthy non consanguineous parents, born at term after an uneventful pregnancy. A sister is healthy at age 7 years. His mother had suffered from one stillbirth and two uncles on the paternal side had died in the neonatal period from unknown causes. There was initially normal development until first symptoms were noticed at age 16 months with muscular hypotonia and hyperlactatemia. In the subsequent course there were recurrent episodes of metabolic acidosis, vomiting, transient tetraparesis and fever associated with upper respiratory tract infections. Lactate in plasma ranged between 2.8 and 8.5 mmol/L, alanine was elevated (759 μ mol/L), lactate/pyruvate ratio was normal. At an age of 30 months ptosis and strabismus were noted. MRI of the brain revealed signal hyperintensities in a distribution compatible with Leigh syndrome (Fig 1 D). A muscle biopsy performed at 3 years to exclude a mitochondrial defect showed normal respiratory chain enzyme activities. Six months later, the patient was re-evaluated for PDHc deficiency. After the diagnosis was established, treatment with ketogenic diet (4:1) and thiamine (300 mg/day) was started. The patient was clinically stable

thereafter without any neurometabolic decompensation. He is now aged 6 years and has psychomotor retardation and moderate ataxia.

Enzyme studies:

PDHc activity was determined in muscle and/or fibroblasts by measuring $^{14}\text{CO}_2$ production from (1- ^{14}C)-labelled pyruvate after activation with Ca^{2+} and Mg^{2+} and addition of carnitine and cytochrome c (Sperl et al 1990, modified as described in Guitart et al 2009).

Western blotting:

Western blotting was performed to test for the presence of the PDHc subunits. Protein homogenate was separated on 10% acrylamide/SDS gel, and then transferred to a nitrocellulose membrane, incubated either with primary rabbit antibody against subunits of the complex (kindly provided by Dr Ruitenbeek, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands), and finally detected with chemiluminescence using the ECL system (Amersham Biosciences, Piscataway, USA), or with pyruvate dehydrogenase Western blot antibody cocktail (Mitosciences, Eugene, USA) and detection with Lumi-LightPLUS POD substrate (Roche).

Molecular analysis:

Total RNA was extracted from patient and control fibroblasts using QIAshredder and RNeasy kits (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded cDNA was obtained using oligo-dT primers and MMLV reverse transcriptase, RNase H minus, point mutant (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol.

Standard PCR techniques were employed with self-designed specific primers (sequences available on request). The amplified products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gels. The same PCR primers were used for sequencing.

In order to confirm the change observed in cDNA, we also sequenced the corresponding sections of the gene in genomic DNA. Gene nucleotide numbering is according to sequence RefSeq NM_000925.

RESULTS AND DISCUSSION

There are six reported patients with mutations in *PDHB*, and between them there are seven different mutations (Brown et al 2004, Okajima et al 2008). All these patients presented with typical clinical, biochemical and neuroradiological features of PDHc deficiency: encephalopathy, hypotonia, respiratory difficulties, seizures and lactic acidosis. Agenesis of the corpus callosum was present in four out of the six patients. This was also a neuroradiological finding in one of our patients, who presented at birth with severe muscular hypotonia and a rapidly progressive neurological course. This patient also showed brain stem abnormalities and typical pathological findings of Leigh syndrome, confirmed at necropsy (Figure 1 A-C). In the second patient, a more moderate clinical course was observed, with slowly progressive neurological features reflecting basal ganglia and brainstem involvement associated with typical findings of Leigh syndrome lesions in MRI of the brain (Figure 1 D). Although Leigh syndrome may be a common presentation in *PDHA1* deficiency, it has not previously been reported in *PDHB* patients.

The clinical features in our patients, together with elevated plasma alanine and lactic acidosis, prompted the biochemical investigations of mitochondrial energy metabolism. In both patients respiratory chain enzymes were normal in skeletal muscle tissue. Fibroblast PDHc activity was clearly deficient in patient 1 (0.006 nmol/min/mg protein, control mean 0.87, range 0.34-2.41). Individual E1 enzyme activity was also reduced (0.012 nmol/min/mg protein, control mean 0.086, range 0.04 – 0.28). In patient 2, a deficiency of PDHc activity was found in skeletal muscle (3.7 nmol/min/mg protein, control range 5.3-19.8). Remarkably the PDHc activity was normal in cultured skin fibroblasts in this patient.

Sequence analysis of the most frequently affected *PDHA1* gene revealed no alterations in either patient, however, we identified novel mutations in the *PDHB* gene in both. In patient 1 we identified a homozygous point mutation (c.302T>C), causing a predicted amino acid change (p.M101T) (Fig. 2A). This change was confirmed by analysis of exon 5 in genomic DNA from the patient and both parents were shown to be heterozygous carriers. It is notable that the daughter, who is also heterozygous for this mutation, presented with mild neurological abnormality (hypotonia) during the first year of life. This might be related to her heterozygous state, as the central nervous system is highly dependent on glucose oxidation and slight changes in PDHc activity can have pathologic significance (Brown et al 2004). In patient 2, two novel compound heterozygous mutations c.301A>G (p.M101V) and c.313G>A

(p.R105Q) were identified. Each parent is a heterozygous carrier of one of these mutations.

To determine the pathogenicity of these genetic changes, we analysed 200 control chromosomes and detected only a single heterozygous carrier for the p.M101T change. Both mutated amino acids 101 and 105 are highly conserved between species (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) (Fig. 2B). The changes observed in our patients result in the replacement of the inert methionine in position 101 by either a polar residue of threonine with a hydroxyl group (patient 1) or by a less polar valine (patient 2). In patient 2 a second mutation was found at position 105 where a arginine is replaced by a glutamic acid which changes the charge at this highly conserved position. Both amino acids are in close approximation with the α subunit in the E1 tetramer (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) and we hypothesize that the changes modify the interrelation between the α and β chains causing instability of the whole E1 enzyme. This is supported by the findings of Western blot analysis, which revealed a severe decrease of both the E1 α and E1 β proteins compared to the E2 subunit (Fig. 2 C). Subunits E1 α and E1 β form the heterotetramer of PDH-E1 and it has been reported that, with a reduced amount or with decreased stability of the E1 α subunit, the E1 β is often incapable of autonomous existence (Fujii et al 1996). However, for the previously reported E1 β deficient patients, with reduced or absent E1 β protein, no decrease in E1 α protein was described by Han et al (2008). A modest reduction of E1 α protein was reported by Brown et al (2004) for two mutations that are proposed to alter the interaction between the α and β chains. Therefore the concerted loss of E1 α and E1 β proteins in the immunoblot analysis of our patients reinforces our hypothesis that the mutations at position 101 and 105 may alter the interrelation between these two subunits.

In conclusion, with this report we add two further patients with novel mutations of *PDHB* who are the first to be described with the neurological and neuropathological features of Leigh syndrome.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by grants FIS PI041351, FIS AI079007 and FIS PI080307 from the Spanish Ministry of Health, the “Oesterreichische Nationalbank-Jubiläumsfonds” grant number 12568 and the “Vereinigung zur Pädiatrischen Forschung und Fortbildung Salzburg”. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII, Spain. This work has been performed in the context of the PhD

program of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona. We acknowledge Dr. W. Lissens for his kind critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Brown GK, Otero LF, LeGris M, Brown RM (2004) Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* **31**: 875-9.
- Brown RM, Head RA, Boubriak II, Leonard JV, Thomas NH, Brown GK (2004) Mutations in the gene for the E1 α subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* **115**: 123-27.
- Fujii T, Garcia Alvarez MB, Rex Sheu KF, Kranz-Eble PJ, De Vivo DC (1996) Pyruvate dehydrogenase deficiency: The relation of the E1 α mutation to the E1 β subunit deficiency. *Pediatr Neurol* **14**: 328-334.
- Guitart M, Andreu AL, García-Arumi E, Briones P, Quintana E, Gómez-Foix AM, García-Martínez C (2009). Fatp1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes. *Mitochondrion* **9**: 266-272.
- Han Z, Zhong L, Srivastava A, Stacpoole PW (2008) Pyruvate dehydrogenase complex deficiency caused by ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the E1 α subunit. *J Biol Chem* **283**: 237-43.
- Lissens W, De Meirleir L, Seneca S (1996) Mutation analysis of the pyruvate dehydrogenase E1 α gene in eight patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mutat* **7**: 46-51.
- Okajima K, Korotchkina LG, Prasad C (2008) Mutations of the E1 β subunit gene (PDHB) in four families with pyruvate dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* **93**: 371-80.
- Patel MS, Roche TE (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* **4**: 3224-33.
- Patel MS, Korotchkina LG (2006) Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* **34**: 217-22.
- Robinson BH (2001) Lactic acidemia: disorders of pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. New York; McGraw-Hill, 2275-2295.
- Sperl W, Ruitenbeek W, Kerkhof CM, et al (1990) Deficiency of the alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase in a patient with lactic acidosis and unexpected sudden death. *Eur J Pediatr* **149**: 478-92.

Figure 1

Patient 1: A) Gross view of the brain. Cavitation of the walls of the third ventricle, thalamus and basal ganglia is seen. Note the sparing of the mamillary bodies and thinning of corpus callosum

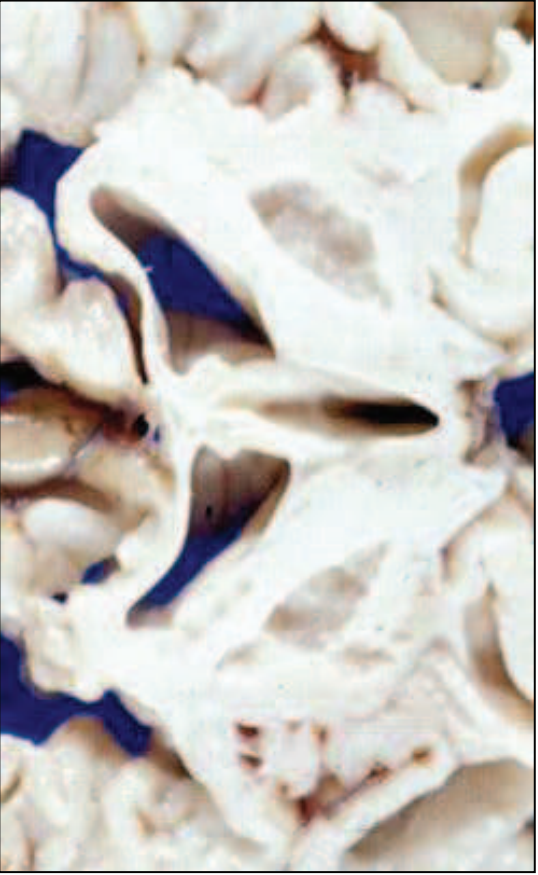
B) Low magnification of the midbrain. Lesions of the tegmentum and ventral portion that involve both the gray and the white matter. (Hematoxylin-Eosin x25). C) Spongy and necrotizing lesions, loosening of neuropil and vascular proliferation with relative preservation of neurons. (Hematoxylin-Eosin x400).

Patient 2: D) MRI of T2 weighted images revealed bilateral signal hyperintensities in the globus pallidus, mesencephalon and crura cerebri.

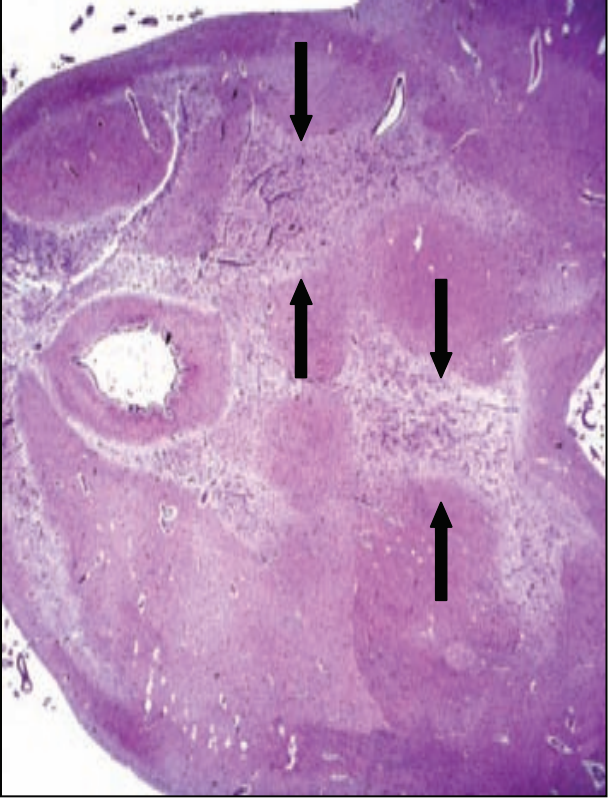
Figure 2.- A) cDNA sequence of *PDHB* gene from the two patients and a control. The frame indicates the position of the change. B) Alignment for position 101 and 105 of the *PDHB* gene between species. Data obtained from <http://coot.embl.de/PolyPhen/>. C) Western blotting of the PDHc of patient 1 (fibroblasts) and patient 2 (muscle) shows a decrease of both E1 α and E1 β subunits.

(For interpretation of the colors mentioned in this figure legend the reader is referred to the web version of the article).

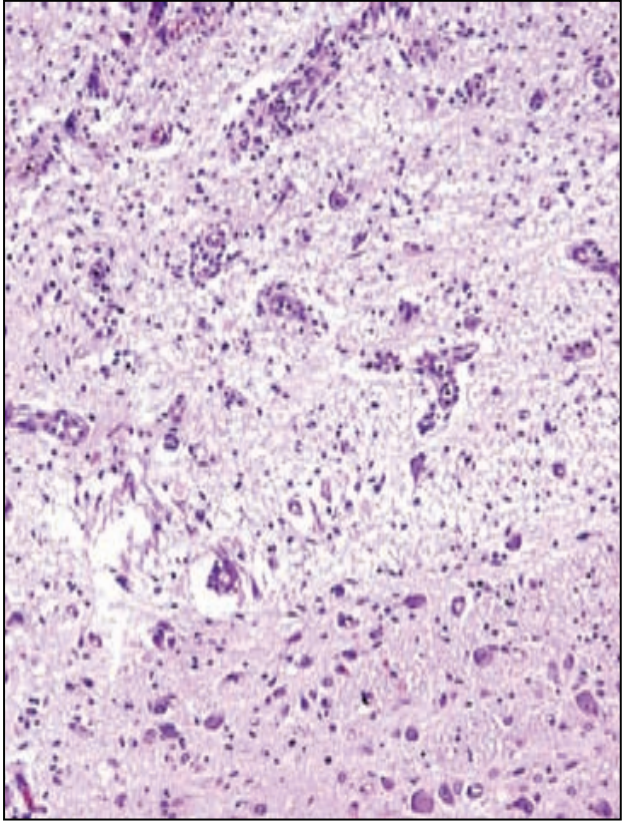
A



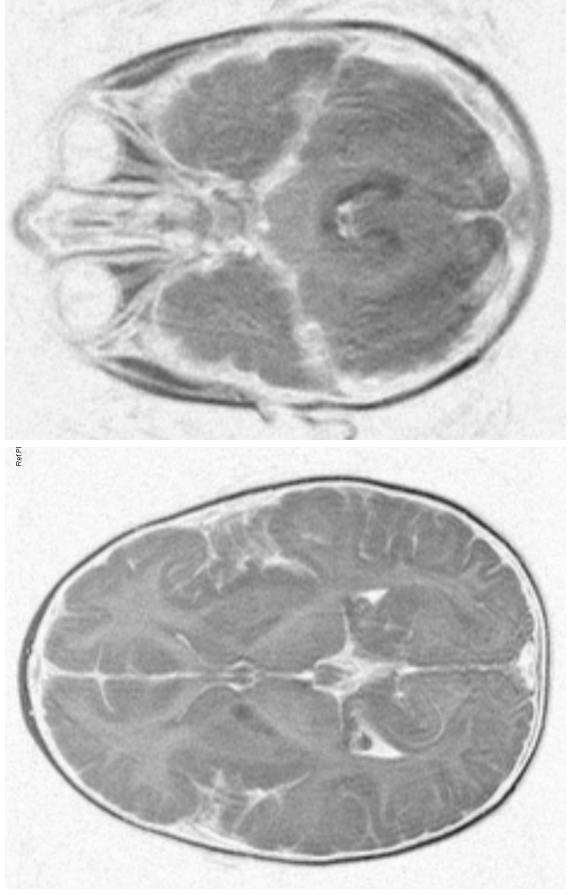
B

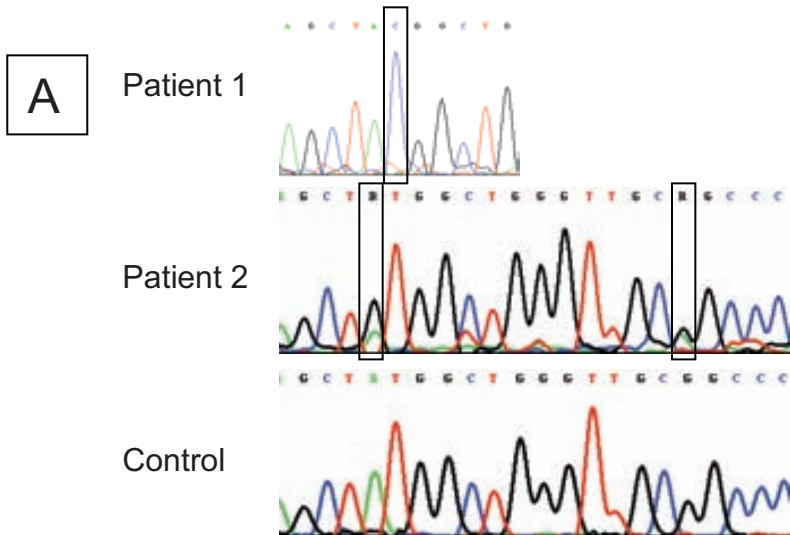


C



D

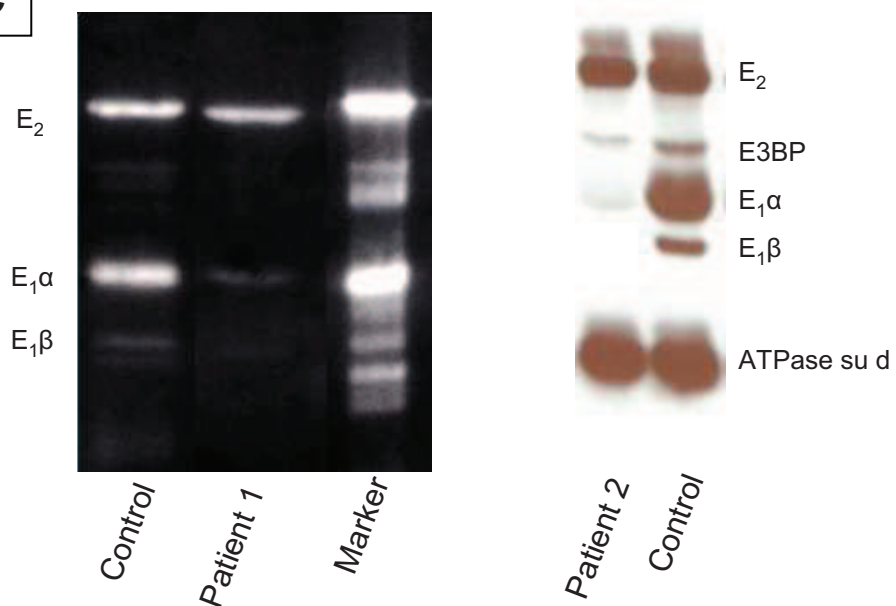




B

Source	Amino acid sequence
Bovine	EMGFAGIAVGAAMAGLRPICEFMTFNFSMQ
M. Musculus	EMGFAGIAVGAAMAGLRPICEFMTFNFSMQ
G. Gallus	EMGFAGIAVGAAMAGLRPVCEFMTFNFSMQ
D. Melanogaster	EMGFAGIAVGAAMAGLRPVCEFMTWNFSMQ
C. Elegans	EMGFAGIAVGAAFAGLRPICEFMTFNFSMQ
Human	EMGFAGIAVGAAMAGLRPICEFMTFNFSMQ
Patient 1	EMGFAGIAVGAATAGLRPICEFMTFNFSMQ
Patient 2	EMGFAGIAVGAAVAGLQPICEFMTFNFSMQ

C



4.5.3. Deficiència de *DLD* (PDH-E3)

Presentem una pacient que als 32 anys d'edat s'ha diagnosticat de deficiència de *DLD* (pendent de publicació).

L'enzim dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3, EC 1.8.1.4) és una oxidoreductasa altament versàtil, amb molts papers crítics en el metabolisme energètic i en l'equilibri redox. E3 és un homodímer que forma part de varis complexos enzimàtics mitocondrials: PDHc, α -cetoglutarat deshidrogenasa i deshidrogenasa dels α -cetoàcids de cadena ramificada, on es coneix com a E3 ja que catalitza la tercera part de la reacció. I també en el sistema de fragmentació de la glicina, on se l'anomena proteïna L, i en algunes ocasions es troba també en forma monomèrica amb un paper oxidant (*Cameron i col 2006; Babady i col 2007*).

El fet que participi en tants complexos enzimàtics fa que la seva deficiència es manifesti amb acidosis làctica, elevats nivells de amino àcids ramificats en plasma, i de α -ceto i α -hidroxi àcids en orina. Els primers pacients descrits mostraven una clínica molt severa i de presentació neonatal, amb afectació neurològica (microcefalia, síndrome de Leigh) retard mental, atàxia, hipotonia, i *exitus* durant la primera infància. Més endavant es van descriure pacients amb clínica menys severa, fatiga i episodis de descompensació amb concentracions elevades d'amino àcids ramificats en plasma i de α -cetoàcids en orina, en períodes de descompensació clínica (*Hong i col 1997; Elpeleg i col 1995; Cameron i col 2006*).

La pacient, filla de pares consanguinis, va debutar als 7 mesos amb fotofobia i ptosis en l'ull esquerre. Als tres anys li va aparèixer ptosis en l'ull dret junt amb dificultats en la deambulació, que va anar incrementant fins al punt que als 6 anys era incapaç de caminar sense ajuda; també mostrava debilitat muscular i rampes. El seu desenvolupament mental era normal i amb bon rendiment escolar.

Bioquímicament mostrava increments de làctic i pirúvic únicament després dels tests d'esforç. I també lleus increments intermitents d'amino àcids ramificats i α -cetoglutarat independents de l'esforç. Es van observar uns valors de PDHc just en el rang dels controls (0,33 nmols/min x mg prot; mitja dels controls 0.87, rang 0.34-2.41 nmols/min x mg prot) igual que la activitat E1 (0,048 nmols/min x mg prot; mitja dels controls 0.086, rang 0.04 – 0.28 nmols/min x mg prot), però amb unes oxidacions de piruvat baixes: P1 5,7 nmols / hora x mg prot (65% control) i P2 1,3 nmols / hora x mg prot (53 % control). Aquests resultats van conduir al diagnòstic de deficiència de piruvat deshidrogenasa.

Als 6 anys es va pautar tractament amb cofactors: tiamina, riboflavina, carnitina i vitamines E i K3 juntament amb dieta cetogènica (40 % hidrats de carboni, 40 % grasses i 20 % proteïnes), amb la qual la pacient va millorar clínicament mostrant més tolerància a l'esforç.

L'estudi mutacional del gen *PDHA1* només va mostrar el canvi intronic c.604-14 G>A, que no causa alteració en el *splicing* segons els resultats en cDNA. L'immunoblot no mostrava variació en cap subunitat.

Anys després, i amb la posada al punt de l'estudi de tots els gens del complex PDHc, es va detectar en homozigosi un canvi no descrit prèviament c.1440 A>G (p.I480M) en *DLD* que presumiblement és el causant de la patologia, ja que no l'hem trobat en 100 al·lels control, està localitzat en una zona molt compromesa per la formació de l'homodímer actiu (en la interfase) (Fig. 48), i es tracta d'un amino àcid àmpliament conservat entre les espècies. *A posteriori* s'ha analitzat l'activitat PDH-E3 que ha resultat indetectable (rang control: 20 – 97 mmols/min x mg prot), mesurada en el nostre laboratori espectrofotomètricament. Aquesta deficiència tan severa és sorprenent, sobretot tenint en compte les lleus característiques clíniques i bioquímiques de la pacient.

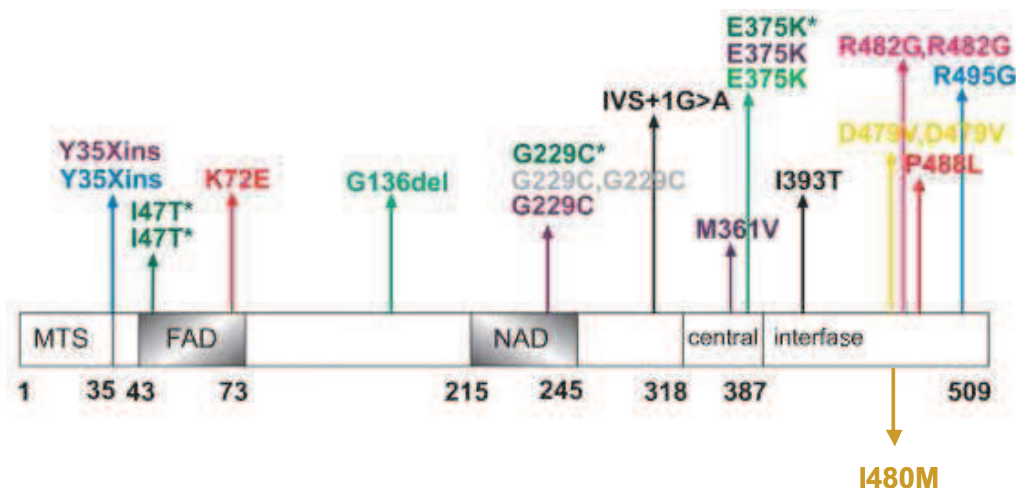


Fig 48. Esquema del gen *DLD* i localització de les mutacions descrites. A la part inferior s'indica la mutació trobada en la nostra pacient. Modificat de *Cameron i col 2006*

Prèviament han estat reportades altres mutacions en el domini de la interfase d'unió de les dues subunitats d'E3 per la formació de l'homodímer (*Babady i col 2007*). Dues d'aquestes mutacions, p.D479V i p.R482G, estan localitzades en llocs molt propers a la nova mutació trobada en la nostra pacient, i els pacients afectes tampoc presentaven nivells elevats d'amino àcids ni de α -cetoglutarat (*Shany i col 1999; Odièvre i col 2005*). Malgrat tractar-se d'un canvi aparentment poc sever, ja que els residus de isoleucina i metionina no presenten grans diferències estructurals, està localitzat en un domini molt important. *Babady i col (2006)* van posar de manifest el fet que la proteïna *DLD* quan es troba en estat monomèric adopta activitat proteolítica, demostrant la seva participació en el trencament del domini actiu situat

en N-terminal de la frataxina (proteïna mitocondrial involucrada en el metabolisme del ferro i amb un paper antioxidant). Així doncs les mutacions localitzades en el domini interfase de E3 tenen una importància especial ja que no només causen patologia per la pèrdua de la seva funció dihidrolipoamida deshidrogenasa, sinó que incrementen la seva patogenicitat per l'aparició de formes monomèriques que causen dany oxidatiu.

4.5.4 Estudi de polimorfismes

A part de les mutacions detectades en els diferents gens relacionats amb PDHc hem trobat un gran nombre de polimorfismes en tots els gens, sobretot en els 17 pacients als que hem analitzat totes les subunitats de PDHc sense trobar mutacions causants de patologia. Alguns polimorfismes els hem detectat amb igual freqüència en controls que en pacients, però en volem mencionar alguns per la seva elevada presència en pacients o per ser canvis no descrits com a polimorfismes però que aparentment no causen alteració en la proteïna. Els polimorfismes a destacar són:

Els minihaplotips 2AG (c.759+26GGCCAA[2]; c.760-15A; c.795G) i 4CA (c.759+26GGCCAA[4]; c.760-15C; c.795) presents també en població control però amb presència significativament més elevada ($p < 0.5$) en pacients amb deficiència de PDHc però sense mutacions trobades (apartat 4.5.1).

c.507 C>T (p.I169I) en heterozigosi en el gen *PDHX*. Es tracta d'un canvi de base no descrit que no provoca canvi d'amino àcid. El fet que l'estudi hagi estat realitzat amb cDNA procedent de fibroblasts tractats amb cicloheximida, descarta, en principi, que el canvi afecti al *splicing*.

Tres canvis a nivell de DNA genòmic que no causen canvi d'amino àcid: c.698 T>C (p.P266P) en heterozigosi en el gen *PDHX* i c.543 A>T (p.I181I) i c.1422 A>C (p.G474G) en heterozigosi en el gen *DLD*. Es tracta de polimorfismes descrits per la base de dades ensembl (www.ensembl.org), però no s'estableix amb quina freqüència es presenten en població control. Com en el cas anterior, hem descartat un efecte en el *splicing* utilitzant cDNA tractat amb cicloheximida.

c.70 C>G (p.R24G) en heterozigosi en el gen *PDHX*. També es tracta d'un polimorfisme descrit però que presenta una freqüència molt baixa en població control. En aquest cas es produeix un canvi d'amino àcid considerat com a probablement patològic per la base de dades (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>), basant-se en la comparació de l'amino àcid amb altres espècies. Es tracta del canvi d'un arginina, un amino àcid polar i gran, per una glicina petita i sense càrrega en la regió del pèptid senyal. Aquest canvi l'hem trobat en una pacient en heterozigosi i no està en combinació amb cap altre polimorfisme d'efecte dubtós.

És dubtós que existeixi relació entre la falta d'activitat PDHc i aquests polimorfismes, però també és curiós que es trobin amb una freqüència més alta en aquests pacients. Seria interessant estudiar aquests canvis amb més profunditat.

4.5.5 Altres estudis

La nostra experiència amb l'anàlisi de PDHc ens va portar a col·laborar amb el grup de la Dra García-Martínez del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona en un estudi encaminat a comprovar si el transportador d'àcids grassos 1 (FATP1), responsable de l'entrada i l'emmagatzematge d'àcids grassos, estava localitzat en la mitocondria i quin era el seu efecte sobre el metabolisme de la glucosa. Es va demostrar la localització de FATP1 en la mitocondria mitjançant immunoblot de diferents fraccions subcel·lulars i també mitjançant citolocalització. Amb la sobreexpressió de FATP1 en miotubuls es va observar una producció de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucosa tres vegades superior a la de les cèl·lules sense aquesta sobreexpressió. Per saber quin punt concret es veia alterat per la sobreexpressió de FATP1 i que afectés el metabolisme de la glucosa, vam estudiar l'activitat PDHc en aquestes cèl·lules havent-se detectat un augment important de la seva activitat. L'immunoblot va permetre relacionar aquest augment d'activitat amb una major abundància de la subunitat PDH-E1 β . Aquest treball ha estat publicat sota el nom de "FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes" *Mitochondrion* 2009;9:266-72 (Annex 2)

5. CONCLUSIONS

I. En l'estudi de les isoformes de la transferrina la substitució del gel d'acrilamida pel d'agarosa va suposar una millora considerable, però la implementació de mètodes semi-quantitatius, Tf-HPLC i Tf-CZE, ha estat un pas endavant en la interpretació objectiva dels perfils i també en la capacitat de detecció de patrons CDG lleument alterats. Destaquem que aquestes tècniques han permès el control de tractament en la intolerància hereditària a la fructosa i també la utilització de plasmes amb EDTA, que són mostres no aptes per IEF.

II. La incorporació de tècniques enfocades a l'estudi de CDG-II (isoformes d'apoC-III i estudi de glicans) ha resultat un avanç en el diagnòstic d'aquests pacients malgrat no haver pogut arribar a un diagnòstic final en cap dels casos. Aquestes dades apunten a l'existència de defectes que causen patró de sialotransferrines tipus 2 no caracteritzats fins al moment.

III. La freqüència observada en població clínicament seleccionada ha estat de 1:136. L'ampliació del cribratge en pacients amb manifestacions clíniques no descrites en els CDG no ha incrementat el nombre de pacients detectats.

IV. Hem definit dues causes no descrites prèviament d'alteració secundària de les isoformes de la transferrina: meningitis bacteriana i deficiències de fructosa-1,6-bisfosfatasa. Cal ressaltar la importància de descartar causes secundàries per tal d'evitar un retard en els diagnòstics dels pacients.

V. Hem establert valors de referència per l'estudi d'isoformes de la transferrina en sèrums fetals i líquids amniòtics. La cerca de pacients amb formes severes de CDG en fetus polimalformats i avortaments espontanis no ha mostrat cap pacient positiu. Possiblement aquestes formes deixin de ser viables en estadis més primerencs de l'embaràs.

VI. L'estudi mutacional és essencial pel diagnòstic de les deficiències de PDHc, sobretot en femelles heterozigotes per mutacions en *PDHA1*, en les que la lionització favorable pot emascarar una activitat deficient. Per aquest motiu, en casos de sospita clínica i/o bioquímica rellevant, cal descartar la presència de mutacions en totes les subunitats de PDHc malgrat haver obtingut activitats enzimàtiques dins el rang dels controls.

VII. L'estudi del gen *PDHAI* ens ha permès finalitzar el diagnòstic de 10 pacients. Així mateix, l'anàlisi mutacional de les altres subunitats ha donat lloc al diagnòstic dels primers pacients espanyols amb mutacions en *PDHB* i *DLD*.

VIII. La millor mostra per un estudi genètic complet ha demostrat ser el cDNA procedent de fibroblasts tractats amb cicloheximida, ja que la inhibició del sistema de NMD permet detectar mRNA aberrants que serien destruïts per la cèl·lula.

IX. L'ampliació i millora del diagnòstic dels CDG i de les deficiències de PDHc dut a terme en el decurs d'aquesta tesis, ha contribuït positivament al coneixement bioquímic i genètic, i alhora ha desvelat formes clíniques no conegudes d'aquests defectes.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- M. Adamowicz, R. Ploski, D. Rokicki, E. Morava, M. Gizewska, H. Mmerzewsda, A. Pollak, D.J. Lefeber, R.A. Wevers, E. Pronicka. Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: Using the clues and avoiding the pitfalls. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:407

- M. Aebi, A. Helenius, B. Schenk, R. Barone, A. Fiumara, E. G. Berger, T. Hennet, T. Imbach, A. Stutz, C. Bjursell, A. Ulle, J.G. Wahlström, P. Briones, E. Cardo, P. Clayton, B. Winchester, V. Cormier-Dalre, P. De Lonlay, M. Cuer, T. Dupré, N. Seta, T. De Koning, L. Dorland, F. De Loos, L. Kupers. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J* 1999;16:669-671

- A. Aevansson, K. Seger, S. Turley, J.R. Sokatch, W.G.J. Hol. Crystal structure of 2 oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nat Struct Biol* 1999;6:785-92

- Z. Albahri, E. Marklová, H. Vaníček, L. Minxová, P. Dedek, S. Skálová. Genetic variants of transferrin in the diagnosis of protein hypoglycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:1184-1188

- R. Aweiler, H. Hermjakob, N. Sharon. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:4-8

B

- N.E. Babady, Y.P. Pang, O. Elpeleg, G. Isaya. Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *PNAS* 2007;104:6158-63

- W. Blom, J.C. Lutey, H.H. Kelhot-Kijkman, J.G. H. Huijmans, M.C.B. Leonen. Thin-layer chromatography oligosaccharides in urine as a rapid indication for the diagnosis of lysosomal acid maltase deficiency (Pompe's disease). *Clin Chim Acta* 1983;134:221-227

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

- P. Briones, M.A. Vilaseca, M.T. García-Silva, M. Pineda, J. Colomer, I. Ferrer, J. Artigas, J. Jaeken, A. Chabàs. Congenital disorders of glycosylation (CDG) may be underdiagnosed when mimicking mitochondrial disease. *Eur J Paediatr Neurol* 2001;5:127-131

- P. Briones, A. Ribes, M. Rodés. Deficiencias del complejo piruvato deshidrogenasa. En: M.T. Garcia-Silva, editor. Enfermedades mitocondriales (2006). Madrid: Pediatría global, pp 108-18
- G.K. Brown, R.M. Brown, R.D. Scholem, D.M. Kirby, H.H.M. Dahl. The clinical and biochemical spectrum of human pyruvate dehydrogenase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 1989;573:360-8
- G.K. Brown. Pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 625-33
- G.K. Brown, L.J. Otero, M. LeGris, R.M. Brown. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* 1994;31:875-79
- R.M. Brown, G.K. Brown. Prenatal diagnosis of pyruvate dehydrogenase E1 α subunit deficiency. *Prenat Diagn* 1994;14:435-42
- R.M. Brown, R.A. Head, I.I. Boubriak, J.V. Leonard, N.H. Thomas, G.K. Brown. Mutations in the gene of the E1 β subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 2004;115:123-127
- G. Brown, W. Sperl. New aspects of pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *EMG workshop proceedings* 2008: 49-54
- P. Burda, M. Aebi. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1426:239-257
- P. Burda, L. Borsig, J. De Rijk-van Andel, R. Wevers, J. Jaeken, H. Carchon i col A novel carbohydrate glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glycosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J Clin Invest* 1998;102:647-652

C

J.M. Cameron, V. Levandoskiy, N. MacKay, J. Riaman, D.L. Renaud, J.T.R. Clarke, A. Feigenbaum, O. Elpeleg, B.H. Robinson. Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity. *Am J Med Genet A* 2006;140:1542-52

A.E. Collins, D.M. Ferreira. The expanding spectrum of congenital disorders of glycosylation. *J Pediatr* 2005;47:728-730

M. Crimi, S.F. O'Hearn, D.C. Wallace, G.P. Comi. Molecular research technologies in mitochondrial disease: the microarray approach. *IUBMB Life* 2005;57:811-818

D

- H.H.M. Dahl. Pyruvate dehydrogenase E1 α deficiency: males and females differ yet again. *Am J Hum Genet* 1995;56:553-7
- C.M. De Praeter, G.J. Gerwig, E. Bause, L.K. Nuytinck, J.F. Vliegenthart, W. Breuer, J.P. Kamerling, M.F. Espeel, J.J. Martin, A.M. De Paepe, N.W. Chan, G.A. Dacremont, R.N. van Coster. A new disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glycosidase I deficiency. *Am J Hum Genet* 2000;66:1744-1756
- T. Dupre, A. David, S. Viullaumier-Barrot, C. Le Bizec, A. Barnier, G. Durand, N. Seta. About an asymptomatic congenital disorder of glycosylation (CDG-Ia) subject. *J Inherit Metab Dis* 2005;28 suppl.1:197

E

- E.A. Eklund and H.H. Freeze. The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. *NeuroRx* 2006;3:254-263
- O.N. Elpeleg, W. Ruitenbeek, C. Jakobs, V. Barash, D.C. De Vivo, N. Amir. Congenital lacticacidemia caused by lipoamide dehydrogenase deficiency with favorable outcome. *J Pediatr* 1995;126:72-74
- O.N. Elpeleg, W. Ruitenbeek, C. Jakobs, V. Barash, D.C. de Vivo, N. Amir. Congenital lacticacidemia caused by liopamide dehydrogenase deficiency with favorable outcome. *J Pediatr* 1995;126:72-74
- M. Erali, K.V. Voelkerding, C.T. Wittwer. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* 2008;85:50-58

F

- F. Foulquier, E. Vasile, E. Schollen, N. Callewaert, T. Raemaekers, D. Quelhas, J. Jaeken, P. Mills, B. Winchester, M. Krieger, W. Annaert and G. Matthijs. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 dificiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3764-3769
- F. Foulquier, D. Ungar, E. Reynders, R. Zeevaert, P. Mills, M.T. García-Silva, P. Briones, B. Winchester, W. Morelle, M. Krieger, W. Annaert, G. Matthijs. A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Hum Mol Genet* 2007;16:717-730
- F. Foulquier. COG defects, birth and rise! *Biochim. Biophys. Acta* 2008; doi:10.1016/j.bbadis.2008.10.020

- H.H. Freeze and M. Aebi. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *C Opin In Struct Biol* 2005;15:490-498

G

- M.T. García-Silva, G. Matthijs, E. Schollen, J.C. Cabrera, J. Sanchez del Pozo, M. Martí-Herreros, R. Simón, M. Maties, E. Martín-Hernández, T. Hennet and P. Briones. Congenital disorders of glycosylation (CDG) type Ie. A new patient. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:591-600

M. Garshasbi, V. Hadavi, H. Habibi, K. Kahrizi, R. Kariminejad, F. Behjati, A. Tzschach, H. Najmabadi, H.H. Ropers, A.W. Kuss. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008;82:1158-64

S. Grünewald. Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early Hum Dev* 2007; 83:825-830

- S. Grünewald. The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim Biophys Acta* 2009; doi:10.1016/j.bbadis.2009.01.003

- M. Guillard, A. Dimopoulou, B. Fischer, E. Morava, D.J. Lefeber, U. Konak, R.A. Wevers. Vacuolar H⁺-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, doi:10.1016/j.bbadis.2008.12.009

H

- R.S. Haltiwanger and J.B. Lowe. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 2004;73:491-537

- R.A. Head, R.M. Brown, Z. Zolkipli, R. Shahdadpuri, M.D. King, P.T. Clayton, G.K. Brown. Clinical and genetic spectrum of pyruvate dehydrogenase deficiency: dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) deficiency. *Ann Neurol* 2005;58:234-241

- R. Head, R. Brown, G. Brown. Pyruvate dehydrogenase E3-binding protein deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:121

- A. Helander, A. Husa and J. Jeppsson. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-1890

- A. Helander, J. Bergström, H.H. Freeze. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. *Clin Chem* 2004;50:954-958

- A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler, J.O. Jeppsson. Interference of transferrin isoform

types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001;47:1225-1233

- J. Helenius, D.T. Ng, C.L. Maolda, P. Walter, M.A. Valvano, M. Aebi. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 2002;415:447-50

- A. Helenius i M. Aebi. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004;73:1019-49

- C.B. Hirschberg, P.W. Robbins, C. Abeijon. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulphate in the endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 1998;67:49-69

- Y.S. Hong, D.S. Kerr, TC. Liu, M. Lusk, B.R. Powell, M.S. Patel. Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del) analysis of a family and prenatal testing. *Biochim Biophys Acta* 1997;1362:160-168

I

- T. Imbach, S. Grünewald, B. Schenk, P. Burda, E. Schollen, R.A. Wevers, J. Jaeken, J.B. de Klerk, E.G. Berger, G. Matthijs, M. Aebi, T. Hennet. Multi-allelic origin of congenital disorder of glycosylation (CDG)-Ic. *Hum Genet* 2000;106:438-45

J

- J. Jaeken, M. Vanderschueren-Lodeweyckx, P. Casaer, L. Snoedk, L. Corbeel, E. Eggermont, R. Eeckels. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBF-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr Res* 1980;14:179

- J. Jaeken, H.G. van Eijk, C. van der Heul, L. Corbeel, R. Eeckels, E. Eggermont. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *ClinChim Acta* 1984;144:245-247

- J. Jaeken, M. Pirard, M. Adamowicz, E. Pronicka, E. Van Schaftingen. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* 1996;40:764-766

- J. Jaeken i P. Casaer. Carbohydrate-deficient glycoconjugate (CDG) syndromes: a new chapter of neuropaediatrics. *Eur J Paediatr Neurol* 1997;2:61-6

- J. Jaeken and G. Matthijs. Congenital disorders of glycosylation. *Annu. Rev. Genomics*

Hum. Genet. 2001;2:129-151

- J. Jaeken, G. Matthijs, H. Carchon, E. Van Schaftingen. Defects of N-glycan synthesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: Mc Graw-Hill 2001:1601-22
- J. Jaeken. Congenital disorders of glycosylation (CDG): It's all in it! J Inherit Metab Dis 2003;26:99-118
- J. Jaeken, T. Hennet, H. Freeze, G. Matthijs. On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). J Inherit Metab Dis 2008;31:669-72

K

G. Keir, B.G. Winchester, P. Clayton. Carbohydrate-deficient syndromes: inborn errors of protein glycosylation. Ann Clin Biochem 1999;36:20-36

G. Kikuchi, K. Higara. The mitochondrial glycine cleavage system. Unique features of the glycine decarboxylation. Mol Cell Biochem 1982;45:137-49

M.k. Koenig. Presentation and Diagnosis of Mitochondrial disorders in children. Pediatr Neurol 2007;38:308-313

- U. Kornak, E. Reynders, A. Dimopoulou, J. Van Reeuwijk, B. Fischer, A. Rajab, B. Budde, P. Nürneberg, F. Foulquier, the ARCL Debré-type Study Group, D. Lefeber, Z. Urban, S. Grünewald, W. Annaert, H.G. Brunner, H. Van Bokhown, R. Wevers, E. Morava, G. Matthijs, L. Van Maldergem, S. Mundlos. Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. Nat Genet 2008;40:32-34
- C. Kranz, B.G. Ng, L. Sun, V. Sahrma, E. Eklund, Y. Miura, D. Ungar, V. Lupashin, R.D. Winkel, J.F. Cipollo, C.E. Costello, E. Loh, W. Hong and H.H. Freeze. COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. Hum Mol Genet 2007;16:731-741

L

- J.G. Leroy. Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects. Pediatr Res 2006;60:643-656
- W. Lissens, L. De Meirleir, S. Seneca, C. Benelli, C. Marsac, B.T. Poll-The, P. Briones, W. Ruitenbeek, O. van Diggelen, D. Chaigne, V. Ramaekers, I. Libaers. Mutation analysis of the pyruvate dehydrogenase E1 α gene in eight patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Hum Mutat 1996;7:46-51

- W. Lissens, L. De Meirleir, S. Seneca, I. Libaers, G. Brown, R.M. Brown, M. Ito, E. Naito, Y. Kuroda, D.S. Kerr, I.D. Wexler, M.S. Patel, B.H. Robinson, A. Seyda. Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) α subunit gene (*PDHA1*) in patients With a pyruvate dehydrogenase complex deficiency, *Hum Mutat* 2000;15:209-219
- J.B. Lowe, J.D. Marth. A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 2003;72:643-691

M

- M.C. Maj, N. MacKay, V. Levandovskiy, J. Addis, E.R. Baumgartner, M.R. Baumgartner, B.H. Robinson, J.M. Cameron. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: Identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4101-07
- M.C. Maj, J.M. Cameron, B.H. Robinson. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: Orphan disease or an under-diagnosed condition? *Mol Cell Endocrinol* 2006;249:1-9
- E. Marklova, Z. Albahri. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 2007;385:6-2
- T. Marquardt, T. Brune, K. Luhn, K. P. Zimmer, C. Körner, L. Fabritz, N. van der Werft, J. Vormoor, H.H. Freeze, f. Louwen, B. viermann, E. Harms, K. von Figura, D. Vestweber, H.G. Koch. Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 1999;134:681-688
- T. Marquardt i J. Denecke. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr* 2003;162:359-79
- E. Martín Hernández, A.I. Vega Pajares, B. Pérez González, M.J. Ecay Crespo, F. Leal Pérez, J. Manzanares López-Manzanares, M. Ugarte Pérez y C. Pérez-Cerdá Silvestre. Defecto congénito de glucosilación tipo Ib. Experiencia en el tratamiento con manosa. *An Pediatr* 2008;69:358-65
- P.M. Matthews, R.M. Brown, L.J. Otero, D.R. Marchington, M. LeGris, R. Howes, L.S. Meadows, M. Shevell, C.R. Scriver, G.K. Brown. Pyruvate dehydrogenase deficiency: clinical presentation and molecular genetic characterisation of five new patients. *Brain* 1994;117:435-43
- G. Matthijs, E. Schollen, C. Bjursell, A. Erlandson, H. Freeze, F. Imtiaz, S. Kjaergaard, T. Martinsson, M. Schwatz, N. Seta, S. Vuillaumier-Barrot, V. Westphal, B. Winchester. Mutations in *PMM2* that cause Congenital Disorders of Glycosylation type Ia. *Hum Mutat* 2000;16:385-94

- G. Matthijs, E. Schollen, C. Bjursell, A. Erlandson, H. Freeze, F. Imtiaz, S. Kjaergaard, T. Martinsson, M. Schwartz, N. Seta, S. Vuillaumier-Barrot, V. Westphal, and B. Winchester. Mutations in PMM2 That Cause Congenital Disorders of Glycosylation, Type Ia (CDG-Ia). *Hum Mut* 2000;16:386-394
- E. Miossec-Chauvet, Y. Mikaeloff, D. Heron, V. Merzoug, V. Cormier-Daire, P. de Lonlay, G. Matthijs, C. Van Hulle, G. Ponsot, N. Seta. Neurological presentation in pediatric patients with congenital disorders of glycosylation type Ia. *Neuropediatrics* 2003;34:1-6
- M. Miné, M. Brivet, M. Schiff, H. Ogier de Baulny, N. Chuzhanova, C. Marsac. A novel gross deletion caused by non-homologous recombination of the PDHX gene in a patient with pyruvate dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2006;89:106-110
- F. Molinari, F. Foulquier, P.S. Tarpey, W. Morelle, S. Boissel, J. Teague, S. Edkins, P.A. Futreal, M.R. Stratton, G. Turner, G. Matthijs, J. Gecz, A. Munnich, L. Colleaux. Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* 2008;82:1150-57
- E. Morava, H. Wosik, J. Kárteszi, M. Guillard, M. Adamowicz, J. Sykut-Cegielska, K. Hadzsiev, R.A. Wevers, D.J. Lefeber. Congenital disorders of glycosylation type IX: Review of clinical spectrum and diagnostic steps. *J Inher Metab Dis* 2008;31:450-456

N

- B.G. Ng, C. Kranz, E.E.O. Hagebeuk, M. Duran, N.G.G.M. Abeling, B. Wuyts, D. Ungar, V. Lupashin, C.M. Hartdorff, B.T. Poll-The, H.H. Freeze. Molecular and clinical characterization of a Moroccan Cog7 deficient patient. *Mol Genet Metab* 2007-08-17
- R. Niehues, M. Hasilik, G. Alton, C. Corner, M. Schiebe-Sukumar, H.G. Koch, K.P. Zimmer, R. Wu, E. Harms, K. Reiter, K. von Figura, H.H. Freeze, H.K. Harms, T. Marquardt. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 1998;101:1414-20

O

- K. Okajima, L.G. Korotchkina, C. Prasad, T. Rugar, J.A. Phillips III, C. Ficicioglu, J. Hertecant, M.S. Patel, D.S. Kerr. Mutations of the E1 β subunit gene (*PDHB*) in four families with pyruvate dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2008;93:371-80
- MH. Odièvre, D. Chretien, A. Munnich, B.H. Robinson, R. Dumoulin, S. Masmoudi, N. Dadhon, A. Rötig, P. Rustin, JP. Bonnefont. A novel mutation in the dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (*DLD*) resulting in an atypical form of α -ketoglutarate dehydrogenase deficiency. *Hum Mutat* 2005;25:323-34

P

- M.S. Patel, R.A. Harris. Mamalian α -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *J FASEB* 1995: 1164-72
- M.S. Patel, T.E. Roche. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J* 1990;4:3224-33
- J. van Pelt, J.A. Bakker, M.H. Velmans, L.J.M. Spaapen. Carbohydrate-deficient transferrin values in neonatal and umbilical cord blood. *J Inher Metab Dis* 1996;19:253-56
- M. Pirard, G. Matthijs, L. Heykants, E. Schollen, S. Grünewald, J. Jaeken, E. Van Shaftingen. Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett* 1999;452:319-22
- M. Pithukpakorn. Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle. *Mol Genet Metab* 2005;85:243-46

R

- V.T. Ramaekers, H. Stibler, J. Kint and J. Jaeken. A new variant of the carbohydrate deficient Glycoproteins syndrome. *J Inher Metab Dis* 1991;14:385-388
- P.J. Randle. Phosphorylation-dephosphorylation cycles and the regulation of fuel selection in mammals. En: Eastabrook i Srere editors. *Current topics in cellular regulation* (1981) New York: Academic press, pp107-129
- G.H. Reed, C.T. Wittwer. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2004;50:1748-54
- C. Ridout, R. Brown, R. Head, G. Brown. Splicing mutations in the pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit gene. *J Inher Metab Dis* 2005;28:122
- B.H. Robinson, W.G. Sherwood. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr Res* 1975;9:935-39
- B.H. Robinson, J. Taylor, W.G. Sherwood. Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase (a component of the pyruvate and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes): a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr Res* 1977;11:1198-1202
- B.H. Robinson, N. MacKay, R. Petrova-Benedict, I. Ozalp, T. Coskun, P.W. Stacpoole. Defects in the E2 lipoyl transacetylase and the X-lipoyl coaining component of the pyruvate dehydrogenase complex in patients with lactic acidemia. *J Clin Invest* 1990;85:1821-24

- B.H. Robinson. Lactic acidemia: Disorders of Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Dehydrogenase. En: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease (2001) New York: McGraw-Hill, pp 2275-2295

- B.H. Robinson. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Clin Genet Metab* 2006;89:3-13

S

- E. Van Schaftingen, J. Jaeken. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficiency glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett* 1995;377:318-320

- P.J. Schofield, L.R. Griffiths, S.H. Rogers, G. Wise. An improved method for the assay of platelet pyruvate dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 1980;108:219-27

- E. Schollen, S. Kjaergaard, T. Martinsson, S. Vuillaumier-Barrot, L. Keldermans, N. Seta, G. Matthijs. Increased recurrence risk in congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia) due to a transmission ratio distortion. *J Med Genet* 2004;41:877-880

- E. Schollen, S. Kjaergaard, E. Legius, M. Schwartz, G. Matthijs. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia. *Eur J Hum Genet* 2000;8:367-71

- E. Schollen, L. Keldermans, F. Foulquier, P. Briones, A. Chabas, F. Sánchez-Valverde, M. Adamowicz, E. Pronicka, R. Wevers and G. Matthijs. Characterization of two unusual truncating PMM2 mutations in two CDG-Ia patients. *Mol Genet Metab* 2007;90:408-413

- E. Shany, A. Saada, D. Landau, A. Shaag, E. HersHKovitz, O.N. Elpeleg. Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:163-166

- M.J. Silva, A. Pinheiro, F. Eusébio, A. Gaspar, I. Tavares de Almeida, I. Rivera. Pyruvate dehydrogenase deficiency: identification of a novel mutation in the PDHA1 gene which responds to amino acid supplementation. *Eur J Pediatr* 2009;168:17-22

- L.J. Spaapen, J.A. Bakker, S.B. Van der Meer, H.J. Sijstermans, R.A. Steet, R.A. Wevers, J. Jaeken. Clinical and biochemical presentation of siblings with COG-7 deficiency, a lethal multiple O- and N- glycosylation disorder. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:707-14

- H. Stibler i J. Jaeken. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systematic hereditary syndrome. *Arch Dis Child* 1990;65:107-111

- A.L. Summerfield, G.L. Hortin, C.H. Smith, T.R. Wilhite, M. Landt. Automated

enzymatic analysis of inulin. *Clin Chem* 1993;39:2333-37

T

- C. Thiel, T. Lübke, G. Matthijs, K. von Figura, C. Körner. Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2006;26:5615-20

U

- D. Ungar, T. Oka, E. Vasile, M. Krieger, F.M. Hughson. Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. *J Biol Chem* 2005; 280: 32729-32735

V

- J.G. Vandersteen, P. Bayrak.Toydemir, R.A. Palais, C.T. Wittwer. Identifying common genetic variants by high-resolution melting. *Clin Chem* 2007;53:1191-98

- A. Varki. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97-130

- M.A. Vilaseca, R. Artuch i P. Briones. Defectos congénitos de la glicosilación: últimos avances y experiencia española. *Med Clin (Barc)* 2004;122:707-716

W

- Y. Wada, A. Nishikawa, N. Okamoto i colaboradores. Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:832-836

- M. Willemsen, R.J.T. Rodenburg, A. Teszas, L. van den Heuvel, G. Kosztolanyi, E. Morava. Females with PDHA1 gene mutations: A diagnostic challenge. *Mitochondrion* 2006;6:155-59

- S. Wopereis, S. Grünewald, E. Morava, J.M. Penzien, P. Briones, M.T. García-Silva, P.N.M. Demacker, K.M.L.C. Huijben, R.A. Wevers. Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan Biosynthesis. *Clin Chem* 2003;49:1839-1845

- S. Wopereis, E. Morava, S. Grünewald, P. Mills, B.G. Winchester, P. Clayton, P.Couke, K.M.L.C. Huijben, R.A. Wevers. A combined defect in the biosynthesis of N- and O-glycans in patient with cutis laxa and neurological involvement: the biochemical characteristics. *Biochim et Biophys* 2005;1741:156-164

- S. Wopereis, E. Morava, S. Grünewald, M. Adamowicz, K.M.L.C. Huijben, D.J. Lefeber, R.A. Wevers. Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be

subdivided in six distinct biochemical groups. *Glycobiology* 2005;15:1312-1319

- S. Wopereis, D.J. Lefeber, E. Morava, R.A. Wevers. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *Clin Chem* 2006;52:1-26

- S. Wopereis, U.M. Abd Hamid, A. Critchley, L. Royle, R.A. Dwek, E. Morava, J. Leroy, B. Wilcken, A.J. Lagerwerf, K.M.L.C. Huijben, D.J. Lefeber, P.M. Rudd, R.A. Wevers. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycan in patients with sialuria. *Biochim et Biophys* 2006;1762:598-607

- X. Wu, R.A. Steet, O. Bohorov, J. Bakker, J. Newell, M. Krieger, L. Spaapen, S. Kornfeld, H.H. Freeze. Mutation of the COG complex subunit gene *COG7* causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 2004;5:518-523

Annex 1:

Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis.

Quintana E, Gala S, García-Cazorla A, Montero R, Muñoz-Almagro C, Vilaseca MA, Briones P, Artuch R.

J Inherit Metab Dis 2007;30:267

Secondary alteration of the transferrin isoelectric focusing pattern in a case of bacterial meningitis

E. Quintana · S. Gala · A. García-Cazorla · R. Montero · C. Muñoz-Almagro · M. A. Vilaseca · P. Briones · R. Artuch

Received: 5 December 2006 / Submitted in revised form: 27 December 2006 / Accepted: 29 December 2006
© SSIEM and Springer 2007

Summary Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a group of inherited defects in the synthesis and processing of the linked glycans of glycoproteins and other glycoconjugates. The phenotypic spectrum presents wide variability, and clinical diagnosis is not reliable in most cases. Isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin is widely used as a tool to detect CDG. We describe a paediatric patient presenting an altered serum transferrin pattern due to a secondary disorder of glycosylation caused by pneumococcal meningitis (*Streptococcus pneumoniae*, serotype 19A). During admission, brain CT scan and MRI showed acute ischaemic lesions in brain frontotemporal parenchyma, and enlarged subarach-

noidal spaces in the frontal area resembling a chronic injury. This led us to screen for inborn errors of metabolism potentially associated with these findings (homocystinuria, glutaric aciduria, CDG syndromes). Biochemical studies for the screening of these inborn errors of metabolism were normal except for sialotransferrin isoelectric focusing, which showed a type 2 pattern. However, 16 days later, together with the remission of the meningitis process, the sialotransferrin pattern had normalized. The apolipoprotein C-III (an O-glycoprotein) profile was normal in all samples analysed. In conclusion, infectious events should be ruled out in the differential diagnosis of CDG syndromes. Furthermore, our findings highlight the possibility that the type 2 IEF pattern of serum sialotransferrin detected in some patients with neonatal death due to organ failure and septic events might be secondary to the infectious process.

Communicating editor: Jaak Jaeken

Competing interests: None declared

E. Quintana
Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

S. Gala
Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

A. García-Cazorla
Neuropediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

R. Montero · M. A. Vilaseca · R. Artuch (✉)
Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
e-mail: rartuch@hsjdbcn.org

C. Muñoz-Almagro
Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

P. Briones
Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain;
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

Abbreviations

apoC-III	apolipoprotein C-III
CDG	congenital disorder(s) of glycosylation
ICU	intensive care unit
IEF	isoelectric focusing

Introduction

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are an expanding group of inherited defects in the synthesis and processing of the linked glycans of glycoproteins and other glycoconjugates (Jaeken et al 2001). The phenotypic spectrum presents wide variability, and clinical diagnosis is not reliable in most cases. Isoelectric focusing (IEF) of serum transferrin is widely used as a tool to detect CDG (Jaeken et al 2001). Nevertheless, when finding an altered pattern, it is very important to rule out other causes of the alteration, such as transferrin

polymorphisms, liver immaturity and hepatic disease, sepsis, or some inborn errors of carbohydrate metabolism such as galactosaemia or fructosaemia (Jaeken et al 1996). Among these disorders, septic events have been associated with rapid alterations in transferrin sialylation caused by increased neuraminidase activity (Piagnerelli et al 2005). On the other hand, severe infectious events may induce some inborn errors of metabolism (including CDG syndromes) (Blank et al 2006) and, since the mortality rate by sepsis is still high in intensive care units (ICUs), this can interfere with the diagnosis of these patients. It is important to differentiate whether the alteration of the transferrin pattern detected in 'CDG Ix' patients with neonatal death from acute organ failure is in fact secondary to a septic process or whether the sepsis is a complication of a CDG.

We describe a paediatric patient exhibiting an altered serum transferrin pattern due to a secondary disorder of glycosylation caused by pneumococcal meningitis.

Case report

We report a 5-month-old patient who was admitted to our paediatric ICU under suspicion of bacterial meningitis. He presented with fever of 3 days' duration, seizures, clonic movements of the limbs and left hemiparesis. He showed normal haemodynamic profiles without clinical signs of sepsis (SOFA score = 1). Blood culture and cerebrospinal fluid analysis demonstrated bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* (serotype 19A: cefotaxime-susceptible and intermediate penicillin resistance (MIC = 0.5 µg/ml)). Antibiotic therapy was started with cefotaxime and vancomycin, as well as corticotherapy with dexamethasone according to the pneumococcal meningitis guidelines of our hospital. The cerebrospinal fluid culture was still positive on

the second day in our hospital and, on the ninth day, pneumococcal DNA was still detected by real-time PCR. Moreover, during admission, brain CT scan and MRI showed acute ischaemic lesions in brain frontotemporal parenchyma, and enlarged subarachnoidal spaces in the frontal area resembling a chronic injury. This led us to screen for inborn errors of metabolism potentially associated with these findings (homocystinuria, glutaric aciduria, CDG syndromes). Apart from the residual neurological lesions caused by the meningitis (localized ischaemic stroke), the patient evidences normal neurodevelopment at present (10 months of age).

Methods

Serum transferrin isoforms (sialotransferrin) were detected after IEF, immunofixation and Coomassie brilliant blue staining (Colomé et al 2000). Isoforms of serum apolipoprotein C-III (apoC-III, an *O*-glycoprotein) were analysed by IEF, western blotting and detection by chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, Bucks., UK) (Wopereis et al 2003). Diagnosis of pneumococcal meningitis was made by isolation of *Streptococcus pneumoniae* from culture and by DNA detection by real-time PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) of a specific fragment of pneumolysin gene in plasma and cerebrospinal fluid, according to standard procedures.

Results

Biochemical studies for the screening of inborn errors of metabolism were normal except for sialotransferrin IEF, which showed a type 2 pattern (Fig. 1). In a second sample (5 days later), the sialotransferrin profile remained clearly

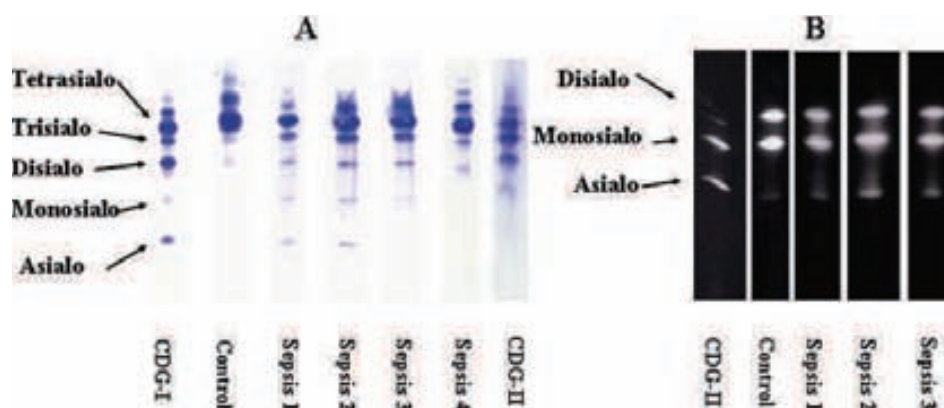


Fig. 1 Isoelectric focusing of serum sialotransferrin (A) and apoC-III (B). CDG I and CDG II are type 1 and 2 sialotransferrin profiles from CDG patients. Sepsis 1, 2, 3 and 4 are the profiles from our patient with meningitis at days 1, 5 and 16, and at 3 months following admission to our hospital, respectively. A clear type 2 transferrin profile, with an

increase of the more hyposialylated bands, was observed, which was normalized together with the resolution of meningitis (16th day and 3rd month). The apoC-III pattern was normal in samples 1–3. Sample 4 apoC-III was not studied

altered. Sixteen days later, together with the remission of the meningitis process, the sialotransferrin pattern had normalized, and it remained completely normal 3 months after the first study. The apoC-III profile was normal in all samples analysed (Fig. 1).

Discussion

The altered serum transferrin pattern observed in our patient was very similar to those reported in some CDG II patients and to those we have found in several CDG X patients under investigation. CDG X refers to patients who show impaired serum sialotransferrin profile but without a demonstrated underlying molecular defect.

It is well known that the inflammatory process is associated with alterations in iron metabolism and that transferrin, an acute-phase N-glycosylated glycoprotein, plays an important role in iron transport; the hepatic uptake of iron is greater for desialylated transferrin isoforms and sepsis may cause hyposialylation of serum transferrin through neuraminidase activity (Piagnerelli et al 2005). However, no data regarding meningitis and impaired sialotransferrin profile have been reported to our knowledge. In our patient the most probable cause of serum transferrin hyposialylation was the action of neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* found in the blood culture.

Furthermore, our findings highlight the possibility that the type 2 IEF pattern of serum sialotransferrin detected in some patients with neonatal death due to organ failure and infectious events might be secondary to the infectious process. If the hyposialylation in sepsis is due to neuraminidase activity, we should expect the alteration to affect also other glycoproteins. To test this, we studied the apoC-III IEF pattern in the mentioned three patient's sera, and it was completely normal. It is difficult to imagine that the hyposialylation in sepsis is

limited to serum transferrin. It is more likely that other glycoproteins are also altered, but it may be that neuraminidase is not able to reach the LDL–apoC-III complex for degradation.

Thus, from our experience, we can conclude that for deceased patients with altered transferrin and apoC-III patterns, the suspicion of a primary CDG syndrome is reasonable. However, for CDG IIx patients with normal apoC-III, infection remains a possible explanation. In our case, the confirmation of a normal serum transferrin pattern after only 3 months was very useful in allowing us to completely rule out the initial diagnosis of CDG.

Acknowledgements This work has been supported by grants FIS PI041845, FIS PI041339, CIBERER-ISCIII from Ministry of Health, Spain, and LSHM-CT2005–512131; Euroglycanet from the European Community.

References

- Blank C, Smith LA, Hammer DA, et al (2006) Recurrent infections and immunological dysfunction in congenital disorder of glycosylation Ia (CDG Ia). *J Inherit Metab Dis* **29**(4): 592.
- Colomé C, Ferrer I, Artuch R, Vilaseca A, Pineda M, Briones P (2000) Personal experience with the application of CDT assays to the detection of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chem Lab Med* **38**: 965–969.
- Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E (1996) Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* **40**: 764–766.
- Jaeken J, Matthijs G, Carchon H, Van Schaftingen E (2001) Defects of N-glycan synthesis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 1601–1622.
- Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, et al (2005) Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock* **24**: 48–52.
- Wopereis S, Grünewald S, Morava E, et al (2003) Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem* **49**: 1839–1845.

Annex 2:

FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes

Guitart M, Andreu AL, García-Arumi E, Briones P, Quintana E, Gómez-Foix AM, García-Martínez C.

Mitochondrion 2009;9:266-72.



FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes

Maria Guitart ^{a,*}, Antonio L. Andreu ^b, Elena García-Arumi ^b, Paz Briones ^c, Ester Quintana ^c, Anna M. Gómez-Foix ^a, Celia García-Martínez ^a

^a *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), IBUB, Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain*

^b *Centre d'Investigació en Bioquímica i Biologia Molecular, University Hospital Vall d'Hebron, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCH, Barcelona, Spain*

^c *Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, CSIC, CIBERER, Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2008

Received in revised form 9 March 2009

Accepted 24 March 2009

Available online 8 April 2009

Keywords:

Palmitate

Fatty acid transport protein 1

Fatty acid translocase

ABSTRACT

Fatty acid transport protein 1 (FATP1) has been previously immunolocalized in intracellular compartments. Here we show that FATP1 localizes to the mitochondria in cultured myotubes, by immunoblots of subcellular fractions and immunocytology of the fusion protein FATP1-GFP. FATP1 strongly stimulates CO₂ production from glucose whereas nonmitochondrial metabolism of glucose is only slightly enhanced. FATP1 raises the activity and activates the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex and the pyruvate decarboxylase PDH-E1 catalytic subunit, without changing E2, E3BP or E1alpha and increasing E1beta protein content. These data reveals the localization and points to a regulatory function of FATP1 in myotube mitochondria.

© 2009 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

Fatty acid (FA) uptake and utilization is facilitated by membrane-bound FA-binding proteins. In skeletal muscle, several such genes, including fatty acid transport protein 1 (FATP1) (Gimeno, 2007) and fatty acid translocase FAT/CD36 (FAT) (Bonen et al., 2002), are expressed.

FATP1 was originally considered an integral plasma membrane protein (Schaffer and Lodish, 1994) and it was localized on the plasma membrane in 293 cells (Hatch et al., 2002). However it has since been immunolocalized in internal membranes of adipocytes (Stahl et al., 2002) and skeletal muscle cells (García-Martínez et al., 2005; Wu et al., 2006) and it has been shown to translocate to plasma membranes following insulin stimulation in skeletal muscle (Wu et al., 2006) and adipocytes (Stahl et al., 2002). We had previously shown (García-Martínez et al., 2005) that FATP1 displays both an endoplasmic reticulum and a reticular localization pattern in cultured myotubes, which partly overlaps with the Golgi

Abbreviations: FATP1, fatty acid transport protein 1; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; FA, fatty acid; FAT, fatty acid translocase FAT/CD36; TAG, triacylglyceride; GFP, green fluorescent protein; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; CO, cytochrome c oxidase; E2, dihydrolipoamide acetyltransferase; E3, dihydrolipoamide dehydrogenase; E3BP, E3-binding protein; BSA, FA-free bovine serum albumin.

* Corresponding author. Tel.: +34 934039283.

E-mail address: maguaita022002@yahoo.es (M. Guitart).

marker GM-130, similar to that observed in 3T3L1-adipocytes (Stahl et al., 2002) and COS7 (Lewis et al., 2001) cells. FAT, which was also considered a protein that facilitates the import of FA, has been immunolocalized in basal conditions in the extracellular membrane in skeletal (Bonen et al., 2000; García-Martínez et al., 2005; Luiken et al., 2002) or cardiac (Luiken et al., 2003) muscle cells, but has been localized also on skeletal muscle mitochondrial membranes (Bezaire et al., 2006).

The control role of FATP1 in metabolism has been partly elucidated by gene manipulation. When overexpressed in cultured skeletal human myotubes, FATP1 stimulated FA uptake and storage as TAG, but not oxidation (García-Martínez et al., 2005). In FATP1 null mice, basal uptake of palmitate in skeletal muscle was unchanged, while insulin-stimulated FA uptake was greatly reduced (Wu et al., 2006). After fat-feeding, fatty acyl-CoA and TAG accumulation in skeletal muscle (Kim et al., 2004) and whole body insulin-resistance (Wu et al., 2006) was prevented in FATP1 null mice. Overall, these data indicate that FATP1 promotes FA storage as TAG in skeletal muscle (García-Martínez et al., 2005; Kim et al., 2004). However, cardiac-specific overexpression of FATP1 in transgenic mice increased myocardial FA uptake and free FA accumulation, but not triacylglyceride (TAG) levels (Chiu et al., 2005). Moreover, palmitate oxidation was enhanced (Chiu et al., 2005) in isolated working heart preparations from transgenic mice.

In summary, we had previously shown that FATP1 was located intracellularly in cultured human myotubes where it promoted

fatty acid storage. Here we examine whether FATP1 was localized to the mitochondria and could affect glucose metabolism. We report the immunolocalization of FATP1 to mitochondria in human and C2C12 myotubes and show that FATP1 strongly stimulates CO₂ production from glucose and lactate and enhances mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) activity.

2. Methods

2.1. Muscle samples and cell culture

Biopsies from gastrocnemius and peronæus muscles were taken during surgery from four donors devoid of muscle disease. Biopsies were obtained with the approval of the Ethics Committee of the Hospital Vall d'Hebron, Barcelona. Myoblast cell populations were isolated from muscle biopsies using the explant culture technique (Askanas and Gallez-Hawkins, 1985), as described in García-Martínez et al. (2005). Twenty-four hours before experiments, cells were depleted of insulin and FBS. Palmitate-free bovine serum albumin (BSA) was prepared at a molar ratio of 5:1 (García-Martínez et al., 2005). C2C12 cells were grown in DMEM medium with 10% FBS and induced to differentiate in DMEM with 10% horse serum.

2.2. Gene constructs and recombinant adenoviruses

Adenoviruses Ad-FATP1, including the mouse cDNA of FATP1, and Ad-FAT, containing the rat cDNA of FAT and plasmid pFATP1-GFP including an NH₂-terminal fusion protein construct with the enhanced green fluorescent protein (GFP) have been previously described (García-Martínez et al., 2005). Ad-βgal, containing the *Escherichia coli* lacZ gene expressing β-galactosidase, was used as a control virus. pGFP contained the GFP coding sequence inserted in the multi-cloning site of the plasmid pACCMVpLpA (Becker et al., 1994). Seven-day-old myotubes were transduced with adenoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 50 for 2 h. In all studies, cells were used 2 days after transduction. C2C12 myoblasts were transfected with plasmids by means of FuGENE (Roche, Mannheim, Germany) and differentiation was then induced.

2.3. Western blotting

Total cell extracts were prepared by scraping cells into a homogenization buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 2 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml aprotinin, 1% (v/v) Nonidet P40, and 1 mM dithiothreitol. Lysates were then gently rocked for 60 min at 4 °C; the resulting homogenates were centrifuged at 13,000g for 5 min at 4 °C and the supernatants were collected. Mitochondrial extracts were prepared by scraping cells into a homogenization buffer consisting of 250 mM sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.4) and 1 mM EDTA, as well as the protease inhibitors PMSF, leupeptin, pepstatin A, and aprotinin; homogenizing the extracts with the aid of a syringe 22 G; centrifuging homogenates at 1500g for 10 min to obtain a pellet highly enriched in mitochondria that also contained nuclei; and further centrifuging the supernatant at 10,000g for 10 min to obtain a pellet enriched in mitochondria and other organelles (Lanni et al., 1996); 20 μg of protein was resolved in 10% SDS-PAGE and immunoblotting was performed with antibodies (Molecular Probes) against subunits of complex I (anti-NDUFA9), complex II (anti-Fp, 70 kDa subunit), complex III (anti-core 2), complex IV (anti-cytochrome c oxidase subunit I (COI) and subunit II (COII)), and complex V (anti-subunit α from H⁺-F₁-ATP synthase). Polyclonal antibody against PDH was kindly provided by Dr. W. Ruitenbeek

(Sperl et al., 1990). Antibody against FATP1 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

2.4. Cytolocalization

C2C12 cells grown on coverslips, transfected with pFATP1-GFP or incubated with MitoTracker, were fixed for 15 min with 3% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). For COI analyses, fixed cells were subsequently incubated for 10 min periods in PBS-50 mM NH₄Cl, PBS-20 mM glycine, PBS containing 0.1% triton X-100 and 0.05% colic acid, and for 30 min in PBS-10% goat serum. Cells were then incubated with anti-COI antibodies (0.5–1.0 μg/ml) and revealed with fluorochrom-conjugated (Texas Red) goat antibodies. Cells were mounted in medium for fluorescence microscopy (Vectashield) and images were obtained with a Leica TCS 4D confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope and 63× (NA 1.4 oil) Leitz Plan-Apo objectives. The light source was an argon/krypton laser (75 mW) with which optical sections (0.1 μm) were obtained.

2.5. RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

Total RNA was extracted from tissue and cell samples with the RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and homogenized using a Polytron (Kynematica Polytron, Westbury, NY). Total RNA (0.5 μg) was retro-transcribed (RT) with TaqMan reverse transcription reagents from Applied Biosystems (Branchburg, NY, USA) using random hexamers. Real-time PCR was performed using the ABI PRISM 7700 sequence detection system with the TaqMan universal PCR master mix and probes (Applied Biosystems) for human FATP1, FAT, PDK2 and PDK4, mouse FATP1, and rat FAT genes. Human beta2-microglobulin was used as the endogenous control to normalize the threshold cycle (CT) for each probe assay, as stated. Relative gene expression was estimated as 2^{-ΔCT} and fold change was estimated by the 2^{-ΔΔCT} method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6. Metabolic analysis

For metabolic analysis we used [U-¹⁴C]-glucose or [1-¹⁴C]-palmitate. For total incorporation, cells were lysed with 1% SDS and their radioactivity was counted. Incorporation of radioactivity into glycogen and into CO₂ was determined as previously described (Baque et al., 1996), except that for CO₂ measurement cells were grown in 24-well plates. 2-Deoxy-D-glucose uptake was measured as described (Baque et al., 1998). Cellular oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Hansatech, Norfolk, England) at 37 °C, with continuous stirring. C2C12 myotubes were collected by trypsinization, pelleted by centrifugation, counted, and resuspended in DMEM containing 1 mM pyruvate. Respiration rates were monitored before and after addition of 3 μM carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), a mitochondrial uncoupler, or of 1.5 mM KCN, the latter to subtract any oxygen consumption not due to mitochondrial respiration.

2.7. Pyruvate dehydrogenase (PDH) assay

The active form of PDH activity was assessed as described elsewhere (Sterk et al., 2003). Forty microliters of cell extract (prepared by scraping 6-cm plates into 100 μl of homogenization buffer) was incubated for 30 min at 37 °C with 80 μl of the assay mixture 1 mM [2-¹⁴C]-pyruvate (6 μCi/μmol), 50 mM Hepes (pH 7.2), 2 mM MgCl₂, 3.35 mM NAD, 0.4 mM CoA, 10 mM L-carnitine, 0.16 mM EDTA, 2.5 mM NaF, 0.8 U of carnitine acetyltransferase, and 0.4 mM TPP. The reaction was halted with 200 μl cold methanol. The whole reaction mixture was applied to a Dowex 2 × 8 column

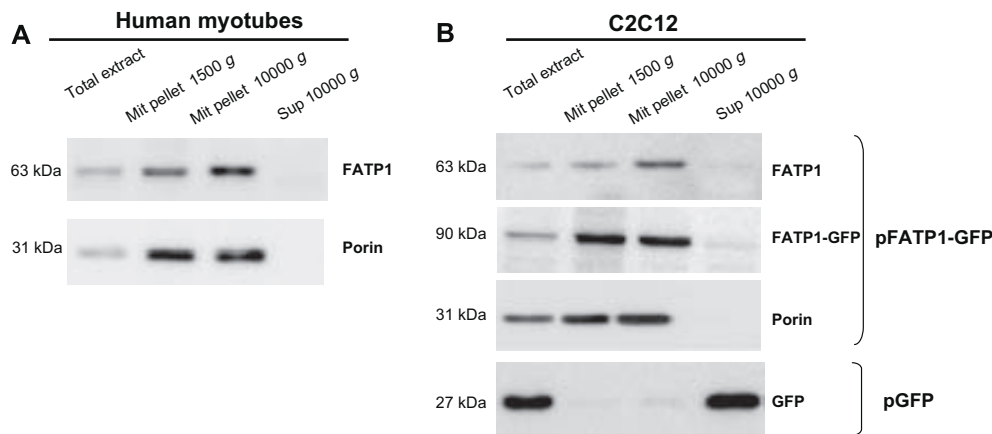


Fig. 1. Localization of FATP1 by Western blot analysis. (A) Human myotubes. (B) C2C12 cells were transfected with pFATP1-GFP or pGFP and were studied 48 h post-transfection. Western blot analyses were performed on total cell extracts (35 μ g protein), mitochondrial enriched fractions (mit pellet) (35 μ g protein) after centrifugation at 1500g and 10,000g or the supernatant (sup) of the 10,000g pellet (35 μ g) and membranes hybridized with antibodies against FATP1, GFP or porin as indicated.

(Cl⁻ form, 200–400 mesh) and eluted radioactivity quantified and corrected for protein concentration to calculate PDH activity. Alternatively, active and total PDH and PDH-E1 activities were determined by measuring the ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C]-pyruvate according to the methods described by van Laack et al. (1988), and Sperl et al. (1993), with modifications. Cell extracts were prepared by scraping 6-cm plates into 400 μ l of buffer and homogenized manually with 20–25 strokes of a glass pestle. For active PDH, 100 μ l of cell extract was preincubated at 37 °C with 50 μ l of an assay mixture containing 400 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 3 mM TPP, 2 mM NAD, 8 mM CoA, 4 mM L-carnitine, 80 μ M cytochrome c, 20 mM β -mercaptoethanol, 4 mM Na₂SO₃ and 5 μ l neonatal calf serum. For active PDH-E1 activity, cell extract was preincubated with 400 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 8 mM MgCl₂, 3 mM TPP, 80 mM KFeCN and 10 μ l neonatal calf serum. For total PDH and PDH-E1, activation was obtained by preincubation with 8 mM CaCl₂ and 16 mM MgCl₂ added to the corresponding assay mixtures. After 10 min of preincubation, 50 μ l 2 mM [1-¹⁴C]-pyruvate (0.7 μ Ci/ μ mol) was added and the reaction continued at 37 °C, 15 min for PDH and 1 h for PDH-E1, in tubes placed in closed vials. The reaction was stopped by injecting 200 μ l 20% trichloroacetic acid (TCA) into the tubes. The ¹⁴CO₂ released was trapped in 1 cm² filter papers, soaked with 0.5 M NaOH and stuck to the vial wall, for 30 min. The radioactivity in filter papers was counted and corrected for protein concentration to calculate PDH activity.

2.8. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM, and the significance of the difference was analyzed by Student's *t* test. Differences were considered significant at *p* < 0.05. Results for gene expression (fold change from the real-time PCR analysis) were examined using Relative Expression Software Tool (REST).

3. Results

3.1. Intracellular localization of FATP1

We studied the intracellular distribution of FATP1 in human and C2C12 myotubes by immunoblot of subcellular fractions (Fig. 1A, B). Endogenously expressed FATP1 was shown mostly in the 1500g and 10,000g mitochondrially-enriched pellets, but was hardly detected in the 10,000g supernatant fraction, similarly to the mitochondrial marker porin. A transfected fusion construct of

FATP1 and GFP also showed this distribution: FATP1-GFP was present in the 1500g and 10,000g mitochondrially-enriched pellets, whereas a faint signal was observed in the 10,000g supernatant fraction. In contrast, transfected GFP was present in the supernatant cytosolic fraction.

Then we examined whether FATP1-GFP localized to mitochondria in C2C12 myotubes (Fig. 2) by cytolocalization. As a marker we used subunit I of CO, a multi-heteromeric enzyme located in the mitochondrial inner membrane (Capaldi et al., 1995; Eytan et al., 1975) (Fig. 2b). Transfected FATP1-GFP into C2C12 cells showed fluorescence concentrated in the perinuclear region (Fig. 2a, d), while merging with the mitochondrial marker COI revealed extensive overlap of these two proteins (Fig. 2c, yellow).¹ We also used MitoTracker as a probe for mitochondria (Fig. 2e). The mitochondrial network was concentrated in the perinuclear region and superposition of MitoTracker and FATP1-GFP images clearly showed co-localization of FATP1-GFP with the mitochondrial network (Fig. 2f, yellow). No co-localization was observed with GFP (data not shown).

3.2. Effects of FATP1 overexpression on glucose metabolism

FATP1 mRNA levels in cultured human myotubes were 3-fold lower than in human muscle biopsy samples, as were FAT mRNA levels (8-fold) (Table 1). Palmitate did not significantly affect the expression of either gene.

Adenoviruses were used to overexpress mouse FATP1 (Ad-FATP1) and rat FAT (Ad-FAT) genes in cultured human myotubes. Using RT-PCR, we detected none of these mRNAs in cells transfected with the control virus, whereas in Ad-FATP1 and Ad-FAT transfected myotubes both mRNA levels were higher than the endogenous mRNA by a factor of 7.02 (*p* < 0.001) for FATP1 and 10.6 (*p* < 0.05) for FAT, respectively.

Overexpression of FATP1 induced a 3-fold rise in ¹⁴CO₂ release from [U-¹⁴C]-glucose, whereas FAT overexpression induced a slightly increase (20%) (Table 2). CO₂ production from glucose by FATP1 was also stimulated in C2C12 myotubes: C2C12 myotubes transfected with Ad-FATP1 (7.7-fold increase in FATP1 mRNA levels, *p* < 0.05) showed 2-fold higher (*p* < 0.0001) ¹⁴CO₂ production from [U-¹⁴C]-glucose than control cells (128 \pm 1 pmol/min/mg protein). In contrast and according to our previous data (García-Martínez et al., 2005), the production of ¹⁴CO₂ from 0.5 mM [1-¹⁴C]-

¹ For interpretation of the references of colours in this figure, the reader is referred to the web version of this paper.

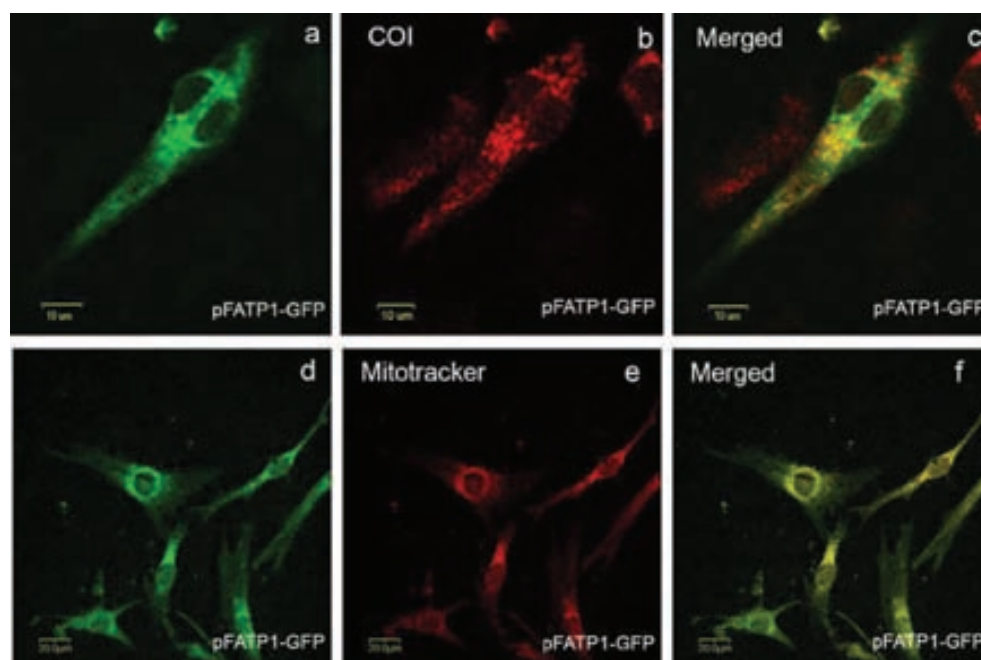


Fig. 2. Mitochondrial co-localization analysis of FATP1-GFP. C2C12 cells were transfected with pFATP1-GFP. Forty-eight hours post-transfection myotubes were incubated with 500 nM MitoTracker during 30 min (d–f). (a and d) Image of fluorescent FATP1-GFP. Bar represents 10 μm (a–c) and 20 μm (d–f); (b) image of mitochondrial network by staining with antibodies against COI; (c) co-localization of the signal of FATP1-GFP and COI; (e) image of mitochondrial network by fluorescent MitoTracker; (f) co-localization of the signal of FATP1-GFP and MitoTracker.

Table 1

Endogenous expression of FATP1 and FAT genes in human muscle biopsies and cultured human myotubes. The relative expression of genes was analyzed in muscle biopsies and cultured myotubes by RT-PCR. Cultured cells were incubated for 18 h with 10 mM glucose, and when stated 0.5 mM palmitate. The CT values for the reference probe beta2-microglobulin were subtracted from each probe CT (ΔCT). Relative expression to beta2-microglobulin was calculated using the ΔCT method. Mean values of $1/2^{-\Delta\text{CT}} \pm \text{SEM}$ were -22.0 ± 3.23 for FATP1 and -10.9 ± 1.50 for FAT in cultured human myotubes incubated with glucose. To determine changes due to culture handling, the ΔCT values for muscle biopsies were subtracted from the ΔCT values of cells cultured with 10 mM glucose. Data are expressed as the mean values of $2^{-\Delta\text{CT}}$ from four samples performed in duplicate. The ΔCT values for cells incubated with glucose were subtracted from those of the palmitate-treatment. Data are expressed as the mean values of $1/2^{-\Delta\text{CT}}$ from four independent experiments performed in duplicate. The negative symbol indicates down-regulation. Significance of differences between tissue and cultured muscle.

Gene	Fold of change $(1/2)^{-\Delta\text{CT}}$	
	Cultured muscle/glucose	Cultured muscle/palmitate
FATP1	-3.12^\dagger	-1.18
FAT	-8.68^*	-1.58

* $p < 0.05$.

† $p < 0.001$.

palmitate (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) was slightly reduced following overexpression of either FATP1 (27.5%, $p < 0.001$) or FAT (7.24%, $p < 0.01$) compared to control cells (5.75 ± 0.2 pmol/min/mg protein). $[U-^{14}\text{C}]$ -glucose total incorporation was enhanced by approximately 35% by overexpression of FATP1 or FAT (Table 2), while glucose uptake was increased: by about 35% and 55% by FATP1 and FAT, respectively. The incorporation of radioactive glucose into glycogen increased with both FATP1 (65%) and FAT (40%).

3.3. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity

To gain a deeper insight into the glucose metabolic step that was sensitive to FATP1 action, we examined $^{14}\text{CO}_2$ production from

Table 2

Effects of FATP1 and FAT on glucose metabolism. Cultured myotubes were transfected with Ad- βgal (controls), Ad-FATP1 or Ad-FAT. Forty-eight hours after transduction, cells in 24-well plates were incubated for 4 h with 10 mM $[U-^{14}\text{C}]$ -glucose (0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) to measure total incorporation or incorporation into glycogen and $^{14}\text{CO}_2$ production. To measure uptake, cells were incubated for 6 min with 0.5 mM 2-deoxy-D- $[1-^3\text{H}]$ -glucose (2.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Data are expressed as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significance of differences versus controls.

	Glucose metabolism		
	Ad- βgal	Ad-FATP1	Ad-FAT
Total incorporation (pmol/min/mg protein)	532 ± 21	$684 \pm 67^*$	$732 \pm 68^*$
Uptake (pmol/min/mg protein)	385 ± 23	$520 \pm 43^*$	$600 \pm 52^\dagger$
Incorporation into glycogen (pmol/min/mg protein)	32.2 ± 0.9	$52.8 \pm 1.3^\ddagger$	$44.6 \pm 1.0^\ddagger$
$^{14}\text{CO}_2$ production (pmol/min/mg protein)	28.6 ± 2.1	$101 \pm 8^\ddagger$	$38.2 \pm 2.0^*$

* $p < 0.05$.

† $p < 0.001$.

‡ $p < 0.0001$.

$[U-^{14}\text{C}]$ -lactate and $[U-^{14}\text{C}]$ -acetate (Fig. 3A) in human myotubes. $^{14}\text{CO}_2$ production from lactate was stimulated by FATP1 to a similar extent (approximately 2.4-fold) to that of glucose, whereas $^{14}\text{CO}_2$ production from acetate was not.

These data indicated that FATP1 enhances the conversion of pyruvate into acetyl-CoA. We therefore measured the levels of the active form of the enzymatic PDH complex, which catalyzes the conversion. As shown in Fig. 3B, FATP1 increased the levels of active PDH as assessed by the production of acetyl-CoA from pyruvate, by more than 3-fold, whereas FAT did not (data not shown). We also examined whether the activity of the PDH-E1 catalytic subunit, which is responsible for the irreversible decarboxylation of pyruvate, was modified. Thus, the activity of the active forms and total activities of PDH and PDH-E1 were assessed by CO_2 production from pyruvate. As shown in Table 3, the activity

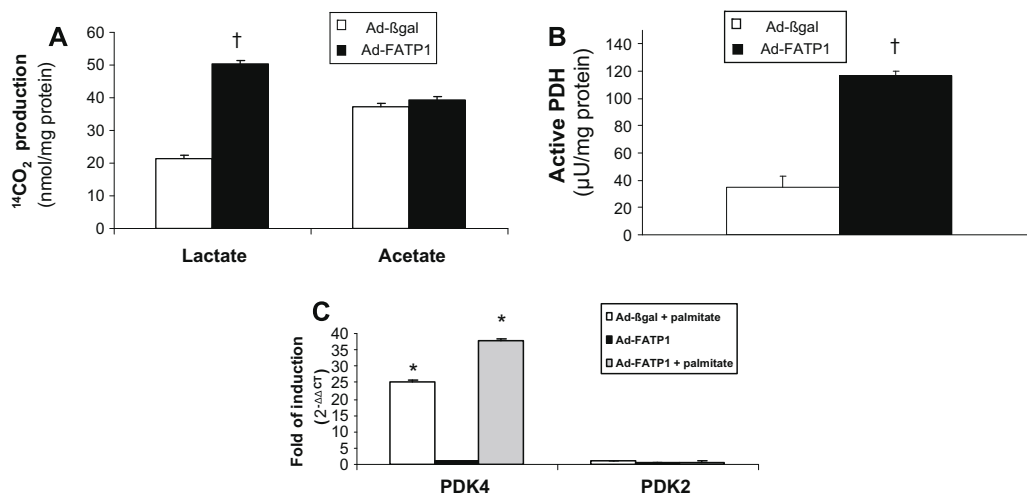


Fig. 3. Effects of FATP1 on (A) lactate and acetate oxidation, (B) active PDH levels and (C) PDK4 and PDK2 gene expression. Cultured human myotubes were transduced with Ad-βgal (controls) or Ad-FATP1. Forty-eight hours after transduction: (A) cells were incubated for 4 h with 2 mM [U-¹⁴C]-lactate (0.6 μCi/μmol) or 10 mM [U-¹⁴C]-acetate (0.6 μCi/μmol) and used to measure ¹⁴CO₂ production; (B) cells were harvested to measure the active form of PDH by the production of radioactively-marked acetyl-carnitine from [2-¹⁴C]-pyruvate; and (C) cells were incubated with 0.5 mM palmitate for 16 h when stated and harvested to isolate RNA. Relative expression of PDK2 and PDK4 to beta2-microglobulin was calculated using the ΔCT method. The ΔCT values for every treatment were subtracted from the ΔCT values of cells treated with the control virus without palmitate. Data are expressed as 2^{-ΔΔCT}. (A–C) Data are the means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significance of differences in FATP1-overexpressers versus Ad-βgal: [†]p < 0.001, ^{*}p < 0.0001.

of the active form of PDH was increased by 6-fold in cells overexpressing FATP1 and total PDH activity rose by a factor of 2.7. Active PDH-E1 levels were 140-fold higher in FATP1-overexpressers than in controls, whereas total PDH-E1 activity increased 48-fold. Thus the ratio of active to total PDH-E1 and PDH activities was higher in FATP1-overexpressers (2.9- and 2.2-fold, respectively) than in controls.

We assessed that FATP1 overexpression in human myotubes did not modify either PDK4 or PDK2 gene expression (Fig. 3C). In contrast, both in cells transduced with Ad-βgal and with Ad-FATP1, palmitate treatment increased PDK4 gene expression by more than 20-fold, whereas PDK2 gene expression was unaffected.

3.4. Regulation of the oxidative-phosphorylation protein complexes and the PDH complex by FATP1

We examined whether mitochondrial proteins belonging to the oxidative-phosphorylation system, namely the 1 alpha subcomplex 9 of NADH dehydrogenase (ubiquinone) (NDUFA9) from complex I, the 70-kDa Fp subunit from complex II, the core 2 subunit from complex III, COI and COII from complex IV, or the alpha subunit of H⁺-F₁-ATP synthase from complex V, were modified by FATP1 in human myotubes. As gauged by immunoblotting, we

found no differences resulting from FATP1 overexpression in the proteins belonging to complexes I, II, III or V (Fig. 4A, B). In contrast, FATP1 slightly reduced COI and COII content by approximately 35% and 26%, respectively, these being the only proteins encoded by the mitochondrial genome among those evaluated. Similarly, overexpression of FATP1 in C2C12 myotubes reduced COI content (data not shown). We evaluated whether FATP1 modified mitochondrial respiration in C2C12 myotubes. Coupled and uncoupled oxygen consumption was similar in controls (coupled 13.9 ± 1.8 nmol O₂/min/10⁶ cells and uncoupled 28.1 ± 2.3 nmol O₂/min/10⁶ cells) and FATP1 overexpressers (coupled 13.9 ± 1.1 nmol O₂/min/10⁶ cells and uncoupled 27.7 ± 2.0 nmol O₂/min/10⁶ cells).

We analyzed the content of protein subunits of the PDH complex (Fig. 4C, D). E2, E1α, E1β, and E3-binding protein (E3BP) were detected, but not the E3 protein which is hardly detected since it has a low immunogenicity (Sperl et al., 1990). No changes were observed in the content of E2, E3BP and E1alpha following overexpression of FATP1, whereas an increase of 41% in the immunoblotted E1beta protein was detected.

4. Discussion

In this study we provide new insight into FATP1 intracellular localization in cultured myotubes: we show that FATP1 localizes to mitochondria. Immunoblot analysis of FATP1 in human and C2C12 myotubes revealed FATP1 in the mitochondria-enriched fraction. Furthermore, co-localization analysis of the fusion protein FATP1-GFP with MitoTracker and COI showed that most of the mitochondria stained by either mitochondrial probes were FATP1-positive in C2C12 myotubes. Overall, our data indicate that FATP1 localizes to mitochondria, as has been described for FAT (Bezaire et al., 2006), although we have not identified the suborganelle compartment.

We show that FATP1 stimulates CO₂ production from glucose and lactate but not from acetate in cultured human and C2C12 myotubes, whereas FAT has no significant effect. Moreover, both FATP1 and FAT only slightly enhance glucose uptake and incorporation into glycogen in human myotubes. This indicated that FATP1 regulates the conversion of pyruvate into acetyl-CoA, which is cat-

Table 3

Effects of FATP1 on the activity of the active form and total activity of PDH and PDH-E1. Cultured human myotubes were transduced with Ad-βgal (controls) or Ad-FATP1. Forty-eight hours after transduction, cells were harvested to measure the activity of the active form of PDH and the PDH-E1 catalytic subunit and their total activities by ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C]-labelled pyruvate, as described in Section 2. Mean data ± SEM of three independent experiments performed in triplicate are shown. Significance of differences versus controls.

	PDH activity (μU/mg protein)		E1 activity (μU/mg protein)	
	Total PDH	Active PDH	Total E1	Active E1
Ad-βgal	687 ± 10	105 ± 36	28 ± 11	7.6 ± 1.6
Ad-FATP1	1890 ± 84 [†]	644 ± 25 [*]	1366 ± 204 [†]	1075 ± 63 [†]

^{*} p < 0.001.

[†] p < 0.0001.

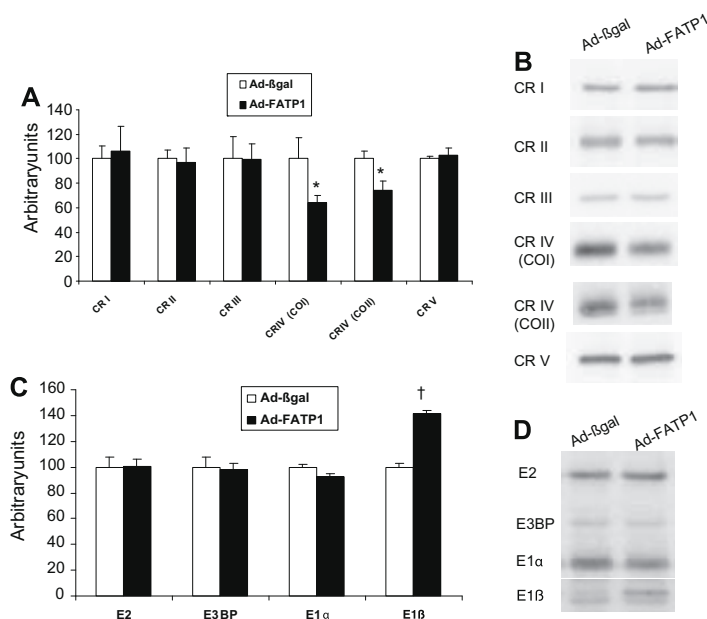


Fig. 4. Regulation of subunits of the oxidative-phosphorylation system and the PDH complex by FATP1. Cultured human myotubes were transduced with Ad-βgal (controls) or Ad-FATP1. Forty-eight hours after transduction, western blots were performed on mitochondrially-enriched cell extracts (1500g pellet). Membranes were hybridized with antibodies against: (A and B) (CRI) complex I (anti-NDUFA9), (CRII) complex II (anti-Fp 70 KDa subunit), (CRIII) complex III (anti-core 2), (CRIV) complex IV COI and COII, and (CRV) complex V (anti-subunit alpha from H⁺-F₁-ATP synthase) or (C and D) PDH complex. (A and C) Bands were quantified with an LAS-3000 (FujiFilm) and values expressed as a percentage of controls. Mean data ± SEM of three independent experiments performed in triplicate are shown. The significance of the difference in FATP1-overexpressers versus controls was **p* < 0.005 and †*p* < 0.001. (B and D) A representative image is shown.

alyzed by the mitochondrial complex enzyme PDH. The latter is the rate-limiting, irreversible step in glucose oxidation (Patel and Korotchkina, 2006; Randle et al., 1994; Sugden and Holness, 2003). Accordingly, we show that FATP1 increases the levels of active PDH, as assessed by the rate of conversion of pyruvate to acetyl-CoA and by the rate of decarboxylation of pyruvate. The PDH complex is formed by three catalytic components – pyruvate decarboxylase (E1α and E1β), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2), and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) – together with the E3-binding protein (E3BP) (Patel and Korotchkina, 2006; Sugden and Holness, 2003). We demonstrate that FATP1 greatly increases active PDH-E1 levels, what may explain the higher activity of the active form of the PDH complex, since PDH-E1 is the rate-limiting step in the PDH complex (Patel and Korotchkina, 2006). FATP1 increases the total activity of the PDH-E1 catalytic subunit and PDH, but to levels much lower than those of their respective active forms, thus causes activation of PDH-E1 and PDH.

PDH-E1 and PDH activation state is regulated by phosphorylation–dephosphorylation reactions catalyzed by PDH kinases (PDK1–4) and PDH phosphatases (PDP1–2), respectively. Three specific serine residues from the alpha subunit of the PDH-E1 component are phosphorylated by PDKs with different affinities, and phosphorylation of sites 1 and 2 inactivates the PDH complex *in vitro* (Korotchkina and Patel, 2001; Patel and Korotchkina, 2006). It has also been suggested that phosphorylation controls PDH activity *in vivo*: at site 1 in rat hearts during starvation or exercise (Sale and Randle, 1982) and at sites 1 and 2 in human skeletal muscle during exercise (Pilegaard et al., 2006). However, intralipid infusion increased sites 1 and 2 phosphorylation without changing PDH activation at rest in human skeletal muscle (Pilegaard et al., 2006), which has led to the suggestion that PDH may be subjected to other covalent undefined modifications that overcome PDH-E1 alpha phosphorylation. PDKs are regulated allosterically and transcriptionally (Patel and Korotchkina, 2006; Sugden and Holness, 2003). Elevation of mitochondrial acetyl-CoA and NADH increases PDK activity, whereas pyruvate de-

creases it (Sugden and Holness, 2003). PDK4 gene transcription is believed to be regulated by lipids since under conditions in which the circulating FA concentration rises, such as starvation (Tsintzas et al., 2006; Wu et al., 2000) and high-fat feeding (Holness et al., 2000; Peters et al., 2001), PDK4 expression in heart, skeletal muscle and liver increases. PDK4 mRNA was also shown to be upregulated in response to fatty acid supplementation in cultured human muscle cells (Abbot et al., 2005). We show that FATP1 does not regulate PDK4 or PDK2 expression in human myotubes, indicating that changes in PDH-E1 alpha phosphorylation due to regulation of PDKs gene transcription would not be involved in its mechanism of action. The existence of mechanisms of regulation of PDH activity other than phosphorylation has previously been proposed but not defined (Pilegaard et al., 2006); much more work will be necessary to elucidate FATP1's mechanism of action.

Furthermore, we show that immunoblotted protein levels of the PDH complex subunits E1α, E2 and E3BP were unchanged, whereas the content of the E1β protein was increased by FATP1 overexpression, which may partly explain the increase in total PDH-E1 activity. Finally, we show that among the oxidative-phosphorylation system complexes that we analyzed (I–V), FATP1 only reduced the content of COI and COII in complex IV, the only proteins encoded by the mitochondrial genome, in human and C2C12 myotubes. However, oxygen consumption in C2C12 myotubes was not reduced by FATP1 overexpression. This observation is compatible with the notion that cell respiration is well preserved and defects occur at residual cytochrome c oxidase activity of approximately 60–70% (D'Aurelio et al., 2001). More work will be required to elucidate potential mechanisms by which FATP1 could affect mitochondrially-encoded protein content.

In summary, our data reveal the localization of FATP1 to the mitochondria in human and C2C12 myotubes, and point to a regulatory function on a mitochondrial metabolic protein complex, i.e., the activation of the PDH complex and the PDH-E1 catalytic subunit.

Acknowledgements

We thank Anna Orozco and Sonia Moliner for technical assistance. This work was supported by Grants SAF-2003-04223 and SAF2006-07228 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT) and from Instituto de Salud Carlos III, Spain, CIBERDEM REDIMET RD06/0015/0018. CGM was the recipient of a Ramon y Cajal fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. Ester Quintana is supported by Grant from the FIS (AI079007), Ministerio de Sanidad, Spain, as part of the PhD program of the Department de Bioquímica i Biologia Molecular of UAB. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII.

References

- Abbot, E., McCormack, J.G., Reynet, C., Hassall, D.G., Buchan, K.W., Yeaman, S.J., 2005. Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *FEBS J.* 272, 3004–3014.
- Askanas, V., Gallez-Hawkins, G., 1985. Synergistic influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle. *Arch. Neurol.* 42, 749–752.
- Baqué, S., Guinovart, J.J., Gómez-Foix, A.M., 1996. Overexpression of muscle glycogen phosphorylase in cultured human muscle fibers causes increased glucose consumption and nonoxidative disposal. *J. Biol. Chem.* 271, 2594–2598.
- Baqué, S., Montell, E., Camps, M., Guinovart, J.J., Zorzano, A., Gómez-Foix, A.M., 1998. Overexpression of glycogen phosphorylase increases GLUT4 expression and glucose transport in cultured skeletal human muscle. *Diabetes* 47, 1185–1192.
- Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gómez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., Newgard, C.B., 1994. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol.* 43, 161–189.
- Bezire, V., Bruce, C.R., Heigenhauser, G.J., Tandon, N.N., Glatz, J.F., Luiken, J.J., Bonen, A., Spriet, L.L., 2006. Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E509–E515.
- Bonen, A., Luiken, J.J., Arumugam, Y., Glatz, J.F., Tandon, N.N., 2000. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 275, 14501–14508.
- Bonen, A., Luiken, J.J., Glatz, J.F., 2002. Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol. Cell Biochem.* 239, 181–192.
- Capaldi, R.A., Marusich, M.F., Taanman, J.W., 1995. Mammalian cytochrome *c* oxidase: characterization of enzyme and immunological detection of subunits in tissue extracts and whole cells. *Methods Enzymol.* 260, 117–132.
- Chiu, H.C., Kovacs, A., Blanton, R.M., Han, X., Courtois, M., Weinheimer, C.J., Yamada, K.A., Brunet, S., Xu, H., Nerbonne, J.M., Welch, M.J., Fettig, N.M., Sharp, T.L., Sambandam, N., Olson, K.M., Ory, D.S., Schaffer, J., 2005. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 96, 225–233.
- D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C.D., Kwong, J.Q., Bruno, C., Beal, M.F., Manfredi, G., 2001. In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome *c* oxidase subunit I. *J. Biol. Chem.* 276, 46925–46932.
- Eytan, G.D., Carroll, R.C., Schatz, G., Racker, E., 1975. Arrangement of the subunits in solubilized and membrane-bound cytochrome *c* oxidase from bovine heart. *J. Biol. Chem.* 250, 8598–8603.
- García-Martínez, C., Marotta, M., Moore-Carrasco, R., Guitart, M., Camps, M., Busquets, S., Montell, E., Gomez-Foix, A.M., 2005. Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C1264–C1272.
- Gimeno, R.E., 2007. Fatty acid transport proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 271–276.
- Hatch, G.M., Smith, A.J., Xu, F.Y., Hall, A.M., Bernlohr, D.A., 2002. FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells. *J. Lipid Res.* 43, 1380–1389.
- Holness, M.J., Kraus, A., Harris, R.A., Sugden, M.C., 2000. Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes* 49, 775–781.
- Kim, J.K., Gimeno, R.E., Higashimori, T., Kim, H.J., Choi, H., Punreddy, S., Mozell, R.L., Tan, G., Stricker-Krongrad, A., Hirsch, D.J., Fillmore, J.J., Liu, Z.X., Dong, J., Cline, G., Stahl, A., Lodish, H.F., Shulman, G.I., 2004. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 113, 756–763.
- Korotchkina, L.G., Patel, M.S., 2001. Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 276, 37223–37229.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F., 1996. Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 337–343.
- Lewis, S.E., Listenberger, L.L., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2001. Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *J. Biol. Chem.* 276, 37042–37050.
- Livak, K., Schmittgen, T., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Luiken, J.J., Dyck, D.J., Han, X.X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F., Bonen, A., 2002. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E491–E495.
- Luiken, J.J., Coort, S.L., Willems, J., Coumans, W.A., Bonen, A., van der Vusse, G.J., Glatz, J.F., 2003. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signalling. *Diabetes* 52, 1627–1634.
- Patel, M.S., Korotchkina, L.G., 2006. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 217–222.
- Peters, S., Harris, R.A., Wu, P., Pehleman, T.L., Heigenhauser, G.J., Spriet, L.L., 2001. Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1151–E1158.
- Pilegaard, H., Birk, J.B., Sacchetti, M., Mourtzakis, M., Hardie, D.G., Stewart, G., Neuffer, P.D., Saltin, B., van Hall, G., Wojtaszewski, J.F., 2006. PDH-E1alpha dephosphorylation and activation in human skeletal muscle during exercise: effect of intralipid infusion. *Diabetes* 55, 3020–3027.
- Randle, P., Priestman, D.A., Mistry, S., Halsall, A., 1994. Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37, S155–S161.
- Sale, G.J., Randle, P.J., 1982. Occupancy of phosphorylation sites in pyruvate dehydrogenase phosphate complex in rat heart in vivo. Relation to proportion of inactive complex and rate of re-activation by phosphatase. *Biochem. J.* 206, 221–229.
- Schaffer, J.E., Lodish, H.F., 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427–436.
- Sperl, W., Ruitenbeek, W., Kerkhof, C.M., Sengers, R.C., Trijbels, J.M., Guggenbichler, J.P., Janssen, A.J., Bakkeren, J.A., 1990. Deficiency of the alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase in a patient with lactic acidosis and unexpected sudden death. *Eur. J. Pediatr.* 149, 487–492.
- Sperl, W., Trijbels, J.M., Ruitenbeek, W., Laack, H.L., van Janssen, A.J., Kerkhof, C.M., Sengers, R.C., 1993. Measurement of totally activated pyruvate dehydrogenase complex activity in human muscle: evaluation of a useful assay. *Enzyme Protein* 47, 37–46.
- Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., Lodish, H.F., 2002. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell.* 2, 477–488.
- Sterk, J.P., Stanley, W.C., Hoppel, C.L., Kerner, J., 2003. A radiochemical pyruvate dehydrogenase assay: activity in heart. *Anal. Biochem.* 313, 179–182.
- Sugden, M.C., Holness, M.J., 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E855–E862.
- Tsintzas, K., Jewell, K., Kamran, M., Laithwaite, D., Boonsong, T., Littlewood, J., Macdonald, I., Bennett, A., 2006. Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. *J. Physiol.* 575, 291–303.
- van Laack, H.L., Ruitenbeek, W., Trijbels, J.M., Sengers, R.C., Gabreëls, F.J., Janssen, A.J., Kerkhof, C.M., 1988. Estimation of pyruvate dehydrogenase (E1) activity in human skeletal muscle; three cases with E1 deficiency. *Clin. Chim. Acta* 171, 109–118.
- Wu, P., Blair, P.V., Sato, J., Jaskiewicz, J., Popov, K.M., Harris, R.A., 2000. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 1–7.
- Wu, Q., Ortegon, A.M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K.R., Stahl, A., 2006. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell Biol.* 26, 3455–3467.

