



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 2 / 2016 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Вродени дефекти на гликозилиране (Обзор)

Малина Станчева-Иванова
МДЦ „Медива“ – София

Резюме

Вродените дефекти на гликозилиране представляват група от редки генетични, заболявания, дължащи се на дефекти в комплексния процес гликозилиране. По настоящем са известни повече от 71 типа, а броят им непрекъснато се увеличава, тъй като гените, които участват в процеса на гликозилиране представляват 1-2% от човешкия геном. Те се характеризират със значителна клинична хетерогенност, като при повечето от тях се установяват неврологични симптоми. През последните 20 години са разработени ефективни методи за скрининг, диагноза и лечение на вродените дефекти на гликозилиране.

Ключови думи: вродени дефекти на гликозилиране

Congenital disorders of glycosylation

Malina Stancheva-Ivanova
Mediva Medical Centre, Sofia

Abstract

Congenital disorders of glycosylation (CDG) is a group of rare genetic, metabolic disorders due to defects in the complex chemical process glycosylation. At present the total number of known defects is more than 71 types and continue to increase, because the genes involved in the glycosylation are 1-2% of the human genome. Their main characteristic is clinical heterogeneity with predominant neurological symptoms. In the last 20 years are applied novel effective methods for screening, diagnostics and treatment of congenital disorders of glycosylation.

Keywords: congenital disorders of glycosylation

Кореспонденция:

Д-р Малина Станчева-Иванова
malinastancheva@yahoo.com

Correspondence:

Malina Stancheva-Ivanova, MD
malinastancheva@yahoo.com

Въведение

Вродените дефекти на гликозилиране представляват генетични дефекти в синтеза или свързването на гликаните към гликопротеини и гликолипиди (глюкоконюгати) [1].

N- и O- гликопротеините участват във всички жизнени процеси. Те кодират различни типове протеини: гликозилтрансферази, сулфотрансферази, олигозахарилтрансферази, нуклеотид-захарни транспортери и синтази, гликозидази, лектини, гени, участващи в синтеза или използването на долхол-фосфат маноза или долхол-фосфат глюкоза, гликанови флипази, протеини на консервиран олигомеричен Голджи комплекс, необходими за осъществяване на нормалния трафик в Голджи, субединица A2V-тип на H+ATФ-аза, различни кинази, мутази, изомеризи и други ензими, които действат върху шаперони и други протеини, които осигуряват правилно нагъване на кодираните протеини и много други.

В резултат на хипогликозилирането се нарушава биологичните роли на глико-протеините и гликолипидите като: рецептори, хормони, транспортни молекули и участието им в процесите на възпаление, имунитет,

туморен растеж и др.

Това предопределя сложността и многообразието на клиничната картина, с която се изявяват вродените заболявания на гликозилирането.

Първият познат дефект PMM2-CDG е открит през 1980 г. белгийският педиатър Jaak Jaeken [2]. По настоящем вече са известни повече от 71 вродени дефекти на гликозилиране, а броят им непрекъснато се увеличава, тъй като гените, които участват в процеса на гликозилиране представляват 1-2 % от човешкия геном [3]. В България са открити и описани пациенти с PMM2-CDG, EXT1/EXT2-CDG, GNE-CDG [4-6]. Клинично описание на фамилната туморна калциноза е направено от Соколов Т, 2000 [7].

Класификация на вродените дефекти на гликозилиране

Първата класификация е утвърдена на интернационална работна среща по проблемите на вродените дефекти на гликозилиране през 1999 г. [7].

През 2009г. е приета нова генетична класификация (Таблица 1) [1].

Таблица 1. Класификация на вродените дефекти на гликозилирането, дефектен протеин, номер в международната класификация на заболяванията и генен локус по [1, 3], модел при изоелектрично фокусиране на серумен трансферин (ИЕФ) на серумен трансферин (1-тип 1, 2-тип 2, Н-нормален).

I. Дефекти на N-гликозилирането на протеините

№	ОММ	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус
1	212065	PMM2-CDG (CDG-Ia)	Фосфоманомутаза 2	16p13.3-p13.2
2	602579	MPI -CDG (CDG-Ib)	Фосфоманоза изомераза	15q22-qter
3	603147	ALG6-CDG (CDG-Ic)	Dol-P-Glc: Man ₉ GlcNac ₂ -P-P-Dol гликозилтрансфераза (гликозилтрансфераза 1)	1p22.3
4	601110	ALG3-CDG (CDG-Id)	Dol-P-Man:Man ₅ -GlcNac ₂ -P-P-Dol манозилтрансфераза (манозилтрансфераза 6)	3q27
5	607143	ALG12-CDG (CDG-Ig)	Dol-P-Man:Man ₇ -GlcNac ₂ -P-P-Dol манозилтрансфераза (манозилтрансфераза 8)	22q13.33
6	608104	ALG8-CDG (CDG-Ih)	Dol-P-Glc:Glc ₁ -Man ₉ -GlcNac ₂ -P-P-Dol гликозилтрансфераза (гликозилтрансфераза 2)	11pter-p15.5
7	607906	ALG2-CDG (CDG-Ii)	GDP-Man: Man ₁ -GlcNac ₂ -P-P-Dol манозилтрансфераза (манозилтрансфераза 2)	9q22
8	608093	DPAGT1-CDG (CDG-Ij)	UDP-GlcNac: Dol-P-GlcNac-P-трансфераза	11q23.3
9	608540	ALG1 -CDG (CDG-Ik)	GDP-Man: GlcNac ₂ -P-P -Dol манозилтрансфераза 1 (манозилтрансфераза 1)	16p13.3
10	608776	ALG9-CDG (CDG-Il)	Dol-P-Man:Man ₆ -и Man ₈ -GlcNac ₂ -P-P-Dol манозилтрансфераза (манозилтрансфераза 7-9)	11q23
11	613661	ALG11-CDG	GDP-Man: Man ₃ -GlcNac ₂ -P-P-Dol α1-2 манозилтрансфераза (манозилтрансфераза 4-5)	13q14.2
12	300884	ALG13-CDG	Субединица на UDP-GlcNac-трансфераза	Xq23
13	616227	ALG14-CDG	Субединица на UDP-GlcNac-трансфераза	1p21.3
14	611633	RFT1-CDG (CDG-In)	Флипаза на Man ₉ GlcNac ₂ - P-P-Dol	3p21.1
15	602616	MGAT2-CDG (CDG-Ila)	N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 2	14q21
16	606056	MOGS-CDG (CDG-Ilb)	Гликозидаза 1 (GCS1)	2p13-p12
17	601385	TUSC3-CDG	Олигозахарилтрансферазна субединица	8p22
18	300715	MAGT1-CDG	Магнезиев транспортер 1	Xq13.1-q13.2
19	604346	MAN1B1-CDG	Манозилолигозахарид-α-1,2 манозидаза	9q34.3

20	614507	DDOST-CDG (CDG-Ir)	Олигозахарилтрансфераза	1p36.12
21	300934	SSR4-CDG (CDG-Iy)	Делта субединица на TRAP	Xq28
22	615596	STT3A-CDG (CDG-Iw)	Интегрален мембранен протешн 1	11q24.2
23	615597	STT3B-CDG (CDG-Ix)	Олигозахарилтрансферазна субединица	3p23
24	180490	RPN2-CDG	Рибофорин 2	20q11.23
25	614921	PGM1-CDG (CDG-It)	Фосфоглюкомутаза 1	1p31.3
26	615816	PGM3-CDG (CDG-Iu)	Фосфоглюкомутаза 3	6q14.1
27	610542	GFPT1-CDG	Глутамин: фруктозо-6-фосфат амидотрансфераза 1	2p13.3
28	615495	GMPPA-CDG	Алфа-субединица на ГДФ-манозопирофосфорилаза	2q35
29	615320	GMPPB-CDG	Алфа-субединица на ГДФ-манозопирофосфорилаза	3p21.31

II. Дефекти в O-гликозилирането на протеините

1. Дефекти на O-ксилозилгликановия синтез

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
30	608177/	EXT1/EXT2-CDG	Глюкуронилтрансфераза	8q24.11-q.24.13	H
31	608210		/N -ацетилглюкозаминилтрансфераза	11p12-p11	
32	137060	B4GALT1-CDG	УДФ: β -GlcNAc- β -1,4-галактозилтрансфераза 1	9p21.1	2
33	604327	B4GALT7-CDG	β -1-4-галактозилтрансфераза 7	5q35.2-q35.3	H

2. Дефекти в O-N-ацетилгалактозаминилгликановия синтез

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
34	601756	GALNT3-CDG	Полипептид-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 3	2q24-q31	H

3. Дефекти на O-ксилозил/N-ацетилгалактозаминилгликановия синтез

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
35	610804	SLC35D1-CDG (дизплазия на Schepkeckenbecken)	Solute carrier family 35 (двоен транспортер на УДФ-глюкуронова киселина (УДФ-N-ацетилгалактозамин), member D1	1p32-p31	H

4. Дефекти на O - манозилгликановия синтез

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
36	607423	POMT1/POMT2-CDG	O-манозилтрансфераза 1/2	9q34.1/	H
37	607439			14q24.13	
38	606822	POMGNT1-CDG	O-манозо- β -1, 2-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза	1p34-p33	H
39	607440	FKTN-CDG	Фукутин	9q31	H
40	606596	FKRP-CDG	Фукутин свързан протеин	19q13.3	H
41	603590	LARGE-CDG	N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-подообен протеин	22q12.3-q13.1	H

5. Дефекти на O-фукозилгликановия синтез

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
42	602576	SCDO3-CDG	O-фукоза специфична β -1-3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза	7p22	H
43	610308	B3GALTL-CDG	O-фукоза специфична β -1-3-гликозилтрансфераза	13q12.3	H

III. Дефекти в гликозилирането на гликозилфинголипидите и гликозилфосфатидинозитол

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
44	609056	SIAT9-CDG	Лактозилцерамид- α -2-3 сиалилтрансфераза (GM3-синтаза)	2p11.2	H
45	606494	ST3GAL3-CDG	ST3 бетагалактозил алфа-2-3-сиалилтрансфераза 3	1p34.1	H
46	610273	PIGM-CDG	Фосфатидинозитолгликан клас M	1q23.2	H
47	239300	PIGV-CDG	GPI-манозилтрансфераза 2	1p36.11	H

IV. Множествени дефекти на гликозиране и участие в други метаболитни пътища

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
48	603503	DPM1-CDG (CDG-Ie)	GDP-Map:DoI-P-манозилтрансфераза (DoI-P-Map синтаза 1)	20q13.13	1
49	603564	DPM2-CDG	Регулатор на биосинтезата на долихол-фосфат маноза	9q34.13	1
50	605951	DPM3-CDG (CDG-Io)	Долихол-фосфат манозилтрансфераза 3	1q12-q21	1
51	608799	MPDU1-CDG (CDG-Ij)	Лес35 (Map-P-DoI1)	17p13.1-p12	1
52	607091	B4GALT1-CDG (CDG-Ild)	β -1-4-галактозилтрансфераза 1	9p13	1
53	600737	GNE-CDG	UDP-GlcNac епимераза/киназа	9p13.3	H
54	603503	SLC35A1-CDG (CDG-Ilf)	Транспортер на ЦМФ-сиалова киселина	6q15	2
55	605881	SLC35C1-CDG (CDG-Ilc)	ГДФ-фукозен транспортер	11p11.2	2
56	300896	SLC35A2-CDG (CDG-Ilm)	УДФ-транспортер	Xp11.23	2

V. Други метаболитни пътища

1. Дефекти в долихолният път

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
57	610768	DOLK-CDG (CDG-Im)	Долихолкиназа	9q34.11	1
58	612379	SRD5A3-CDG (CDG-Iq)	Стероид-5- α редуктаза тип 3	4q12	1
59	614727	TMEM165-CDG (CDG-Irk)	Трансмембранен протеин с (TPARL) с неизвестни функции	4q12	2
60	615273	NGLY1-CDG	N-глицаназа	3p24.2	H
61	608172	DHDDS-CDG	Дедол-ФФ-синтаза	1p36.11	H
62	610463	NUS1-CDG	Нуклеарна ундекапентилпирофосфат синтаза 1	6q22.1	H
63	608093	DPAGT1-CDG	GlcNac трансфераза 1	11q23.3	H

2. Дефекти на COG комплекса

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
64	606978	COG7-CDG (CDG-Ile)	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k7	16p12.2	2
65	606978	COG1-CDG (CDG-Ilg)	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k1	17q25.1	2
66	606979	COG8-CDG	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k8	16q22.1	2
67	606971	COG4-CDG	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k4	16q22.1	2
68	606821	COG5-CDG	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k5	7q22-q31	2
69	606977	COG6-CDG (CDG-II I)	Компонент на консервативен олигомеричен Голджи k6	13q13.3	2

3. Дефекти на V-АТФ-аза

№	OMIM	Наименование	Дефектен протеин	Генен локус	Модел ИЕФ
70	611716	ATP6VOA2-CDG	Vo Субединица A2 на везикуларна H(+)-АТФ-аза	12q24.3	2
71	610512	SEC23B-CDG	Компонент на COP II-SEC23B	20q11	H

Клинична характеристика на вродените дефекти на гликозиране

Вроден дефект на гликозиране Тип Ia; CDG 1A; MIM ID 212065

Вродените дефекти на гликозиране се характеризират с клинична хетерогенност не само между индивиди с различни мутации, но и при сиблинги, носители на една и

съща мутация. Най-голям е броят на диагностицираните пациенти с PMM2-CDG. При този дефект се установява дефицит на фосфоманомутаза – цитозолен ензим, който конвертира манозо-6-фосфат в маноза-1-фосфат. В България са идентифицирани два клинични случая с PMM2-CDG [5]. Диференциалната диагноза на PMM2-CDG е описана от Божинова В. [9]. На таблица 2 са показани наблюдаваните клиничните симптоми и синдроми при PMM2-CDG.

Таблица 2. Клинични симптоми и синдроми при PMM2-CDG по Grünewald, 2009 [10].

МЕДИЦИНСКИ ОБЛАСТИ	КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ И ЛАБОРАТОРНИ ПОКАЗАТЕЛИ
Неврология	Аксиална хипотония, периферна невропатия, хипорефлексия, изоставане в ННР, гърчове, инсултособни епизоди, микро и макроцефалия, миопатия
Гастроентерология / Хепатология	Изоставане във физическото развитие, повръщане, протеин-губеща ентеропатия, чернодробна дисфункция, хепатомегалия и хронична диария
Неонатология	Хидропс феталис, асцит, плеврални изливи, мултиорганна недостатъчност, изоставане във физическото развитие и хипотония
Хематология	Тромбоцитопения, коагулопатия, тромбоза, анемия, левкоцитоза
Ендокринология	Хиперинсулинемична хипогликемия, хипотиреоидизъм, хипергонадотропен хипогонадизъм, изоставане в растежа
Клинична генетика	Лек лицев дизморфизъм, инвертирани мамили
Ортопедия	Остеопения, ставни контрактури, кифоза/сколиоза, къси крайници, артрогрипоза
Офтальмология	Абнормни очни движения, страбизъм, катаракта, пигментен ретинит, нистагъм, транзиторна кортикална слепота
Радиология	Церебеларна атрофия, оливопонтocereбеларна хипоплазия, изоставане в миелинизацията, Dandy-Walker малформация
Хистология	Чернодробна фиброза, чернодробна цироза, ламеларни вclusions в хепатоцитите, бъбречни микрокисти
Дерматология	Абнормно разпределение на подкожната мастна тъкан, липодистрофия
Нефрология	Нефротичен синдром, тубулопатия, кистични бъбреци, нефромегалия
Кардиология	Кардиомиопатия, перикардни изливи, кардиална исхемия, сърдечна тампонада
Клинично-лабораторни промени	Хипоалбуминемия, увеличени трансаминази, нисък холестерол, триглицериди, намален антитромбин III, намалени фактори VIII, IX, XI, намален протеин C и S, увеличени FSH, LH и пролактин, нисък FT ₄ , увеличен феритин, намален афамин

Вроген дефект на гликозилиране, тип Ib; CDG1B

Клинична картина на заболяването е описана за първи път от Pederson et al. През 1980г. [11] се описва подобно летално заболяване при 4 пациента от „Saguenay-Lac-St-Jean“ в Квебек, Канада, при които ретроспективно е поставена диагноза MPI-CDG.

Клиничната картина на заболяването е вариабилна и протича основно с чернодробна и стомашно-чревна симптоматика, асоциирана с лек хиперинсулинизъм и тромбоза [12-15].

Стомашно-чревните симптоми са повръщане, диария и малнутриция, дължащи се на протеин-губеща ентеропатия, понякога асоциирани с лека вилозна атрофия [16].

Чернодробното заболяване се изяснява с хепатомегалия, понякога асоциирана с отоци или генерализиран едем. Чернодробната биопсия показва фиброза, билиарна дистрофия и портална фиброза и наподобява врогената чернодробна фиброза [17].

Заболяването може да се изяви и с аурикулотромбоза, хиперехогенни бъбреци, чернодробна цитоллиза, намалени коагулационни фактори XI, антитромбин III, протеин C и S, хипохолестеролия, хипотиреоидизъм [12, 15, 18]. Диференциалната диагноза на MPI-CDG е описана от Pageva B., 2005 [19].

На таблица 3 са показани клиничните симптоми при врогените дефекти на гликозилиране.

Таблица 3. Клинични симптоми и синдроми при врогените дефекти на гликозилиране по [3].

Клинични симптоми	Вродени дефекти на гликозилиране
Умствена изостаналост	PMM2-CDG, ALG3-CDG, ALG2-CDG, RFT1-CDG, ALG11-CDG, ST3GAL3-CDG, ALG13-CDG, DPM2-CDG, MPDU1-CDG, GCS1-CDG, SLC35C1-CDG, COG8-CDG.
Епилепсия	GMPPB-CDG, ALG3-CDG, ALG2-CDG, RFT1-CDG, ALG11-CDG, ALG13-CDG, DPM2-CDG, MPDU1-CDG, COG2-CDG, COG6-CDG, DPAGT1-CDG, NGLY1-CDG, DOLK-CDG, ST3GAL3-CDG, PMM2-CDG, ALG6-CDG, ALG12-CDG, ALG1-CDG, ALG9-CDG, MGAT2-CDG, GCS1-CDG.
Микроцефалия	GMPPB2-CDG, ALG3-CDG, ALG12-CDG, DPAGT1-CDG, ALG9-CDG, RFT1-CDG, ALG11-CDG, ALG13-CDG, DPM1-CDG, DPM2-CDG, DOLK-CDG, SLC35C1-CDG, COG1-CDG, COG2-CDG, COG4-CDG, COG5-CDG, COG8-CDG.
Макроцефалия	Man1B1-CDG, B4GALT1-CDG, GMPPB-CDG
Мускулна хипотония	ALG6-CDG, ALG8-CDG, DPAGT1-CDG, ALG1-CDG, ALG9-CDG, RFT1-CDG, ALG11-CDG, PMM2-CDG, DDOST-CDG, DPM2-CDG, DOLK-CDG, COG1-CDG, GCS1-CDG.
Спастичност ригидност	ALG13-CDG (+ екстрапирамидни симптоми), COG5-CDG
Мускулна дистрофия	GMPPB-CDG, POMT1/2-CDG, POMGNT-CDG, FKTN-CDG, FKRP-CDG, LARGE-CDG
Врогена миастения	GFPT1-CDG, ALG14-CDG, DPAGT1-CDG
Атаксия	PMM2-CDG, ALG8-CDG, DPM1-CDG, DPAGT1-CDG.
Периферна невропатия	DPM1-CDG, PMM2-CDG
Миопатия	GNF-CDG; DPM1-CDG, DPM2-CDG, DPM3-CDG, PGM1-CDG, B4GALT1-CDG.
Дилатативна кардиомиопатия	ALG6-CDG, ALG12-CDG, ALG8-CDG, ALG1-CDG, ALG9-CDG, DOLK-CDG, DPM3-CDG, PMM2-CDG, PGM1-CDG, SLC35A1-CDG
Перикарден излив	PMM2-CDG

Ендокринни нарушения	PMM2-CDG, ALG6-CDG, ALG12-CDG (TCX, хипогонаготропен хипогонадизъм), ALG8-CDG (псевдогинекомастия), MAN1B1-CDG, TMEM165-CDG (замлъстване), TMEM165-CDG (Хиполазия на хипофизата и дефект на растежен хормон), GMPGA-CDG (адренална инсуфициенция), MPDU1-CDG, NGLY1-CDG (нарушения в метаболизма на холестерола), PMM2-CDG (липодистрофия), COG2-CDG (ниски мед и церулоплазмин)
Ихтиоза	MPDU1-CDG (CDG-If), DOLK-CDG (CDG-Im), SRD5A3-CDG (CDG-Iq) и PIGL-CDG (синдром на CHIME, невроектодермален синдром на Zurich)
Нарушен клетъчен имунитет (неутропения)	PMM2-CDG, ALG12-CDG, ALG1-CDG, ALG13-CDG, DDOST-CDG, GCS1-CDG, SLC35A1-CDG, PGM3-CDG, COG4-CDG, COG8-CDG, COG6-CDG
Нарушен хуморален имунитет	PMM2-CDG, ALG12-CDG, ALG1-CDG, GCS1-CDG и COG6-CDG. При PGM3-CDG се установява хиперимуноглобулинемия IgE.
Коагулопатия	PMM2-CDG, MPI-CDG, ALG8-CDG, ALG2-CDG, ALG13-CDG, DDOST-CDG, SRD5A3-CDG, TMEM165-CDG, COG8-CDG.
Тромбоцитопения	MGAT2-CDG, SLC35A1-CDG
Клинико-лабораторни промени	Хипоалбуминемия, увеличени трансаминизи, нисък холестерол, триглицериди, намален антитромбин III, намалени фактори VIII, IX, XI, намален протеин C и S, увеличени FSH, LH и про-лактин, нисък FT4, увеличен феритин, намален афамин

Методи за скрининг на вродените дефекти на гликозилиране

Най-широко използваните методи за скрининг на вродените дефекти на гликозилиране са изоелектричното фокусиране на серумен трансферин с имунофиксация или имуноблотинг, капиларно зонава електрофореза и HPLC (High performance liquid chromatography).

Изоелектричното фокусиране на серумен трансферин е приложено е за първи път от Jaeken et van Eijk през 1984 г. [20]. Представлява електрофоретичен метод, с който протеините се разделят според техните изоелектрични точки (pI) [21].

С намаляването на броя остатъци сиалова киселина намалява отрицателният заряд на трансферините изоформи. Тяхната изоелектричната точка се премества към катода с ~ 0.1 рН единица, за всеки липсващ остатък сиалова киселина. Хексасиалотрансферинът, който има шест остатъка от сиалова киселина е с изоелектрична точка $pI=5.2$. Пента-, тетра-, три-, ди- и моно- и асиалотрансферините имат съответно изоелектрични точки $pI=5.3; 5.4; 5.6; 5.7; 5.8$ и 5.9 .

Изоелектричната точка на трансферина намалява с ~ 0.2 рН единици за всеки свързан железен йон [22]. Биологичните материали, в които могат да бъдат търсени нарушения на гликозилирането са серум от периферна венозна кръв, серум, получен чрез кордоцентеза на пълни съдове [23], цереброспинална течност, сухи капки пълна кръв/серум върху филтърна хартия тип Гутри [24], плазма, урина, делипидирани хомогенати от чернодробна биопсия. У нас е разработен и приложен в практиката модифициран метод от Станчева М. и сътр.[5]

Интерпретация на резултата

При наличието на дефекти на N-гликановата биосинтеза в ранните ѝ етапи, които се извършват в цитоплазмата или в ендоплазматичния ретикулум се изгражда само единия, или липсват и двата N-гликана

на трансферина. Това води до увеличаване на дисиало- и асиалотрансферина, и основно се наблюдава при Модел тип 1.

Ако дефектът настъпва след трансфера на олигозахарида върху протеина или засяга биосинтезата и транспорта на нуклеотидни захари, активността и локализацията на гликозидази и гликозилтрансферази и транспорта на гликопротеините от ендоплазматичния ретикулум към цис-, транс- и медианен Голджи се наблюдава Модел тип 2. Непълното гликозилиране на гликаните води до появата на асиало Модел тип 2 (увеличени са изоформите асиало-, моно-, дисиало- и трисиалотрансферин) и дисиало Модел тип 2, при които са увеличени ди- и трисиалотрансферин. При интерпретация на резултата е необходимо да бъдат взети под внимание познатите 38 генетични протеинови варианти, от които най-чест е C1.

Анализът показва, че изоелектричното фокусиране на серумен трансферин при пациенти с PMM2-CDG може да даде както фалшиво-негативен резултат при фетуси и в ранния неонатален период [25]. Други автори показват, че е възможно заболяването да бъде открито пренатално [23].

Според проучванията с напредване на възрастта профилът получен при ИЕФ показва тенденция за подобрене [26, 27, 28]. Fletcher et al., 2000 наблюдава нормален профил на трансферин при двамата пациенти с PMM2-CDG на 10 месечна и 4 годишна възраст [29].

Наличието на сигурни клинични данни (при нормален биохимичен резултат) са достатъчно основание пациентът да се насочи за изследване с друг диагностичен метод или към ензимни и молекулярно-генетични изследвания.

Нормален резултат може да бъде получен след преливане на плазма и кръв, затова се препоръчва изследването да се проведе поне един месец след трансфузии на биологични продукти.

Приложение на метода изоелектрично фокусиране на серумен трансферин в клиничната практика за откриване на първични и вторични нарушения на гликозилиране

Методът изоелектрично фокусиране на серумен трансферин се прилага и за проследяване за проследяване на ефекта от лечението при галактоземия и фруктоземия, както и за доказване на придобити дефекти на гликозилиране като алкохолизъм и хемолитико-уремичен синдром, предизвикан от невраминидаза продуциращи микроорганизми.

Индикации за насочване към селективен скрининг за вродени дефекти на гликозилиране са разнообразни [30-36]. Grünewald, 2009 препоръчва скрининг за вродените дефекти на гликозилиране при мултисистемно заболяване със засягане на ЦНС [10]. Българските автори установяват значителна хетерогенност и възрастова зависимост в клиничната картина на PMM2-CDG и препоръчват за изследване да се насочват деца с умствено изоставане, церебеларен синдром, церебеларна атрофия [5].

Преобладаващото мнение е, че поради значителната клинична хетерогенност на заболяването във и между отделните типове, разликите в тежестта и зависимостта на клиничната картина от възрастта и стабилизация с напредването ѝ е необходимо да се провежда разширен метаболитен скрининг за тази група заболявания [37].

Други методи за потвърждаване на вродените дефекти на гликозилиране

Методи за анализ на гликановите структури

Диференцирането на CDG и особено идентификацията на субтипозите с модел тип 2 изискват детайлен анализ на гликановите структури. Най-съвременните методи ESI-MS и MALDI-TOF не могат да идентифицират локализацията на дефекта в олигозахаридната верига. При тези обстоятелства е необходим анализ на освободените гликани. С оглед получаването на структурни данни N-свързаните гликани трябва да бъдат откъснати ензимно (peptide N-glycosidase F, PNGase F) или химически от гел сепарирани или серумни протеини. Използват се различни профилиращи и характеризиращи процедури като SDS-PAGE [38], CE [39], LC [40], обикновено комбинирани с MS техники, за предпочитане TOF и тандем MS/MS [41]. Стандартният метод за количествено измерване на олигозахаридите е HPLC, след флуоресцентно маркиране с редуцируемо аминиране (2-амино бензамид). Освободените гликани могат да бъдат пречистени през

порите на графит въглерод като сепарационна среда за олигозахаридните алдитоли и анализирани с ESI-MS [38]. Алтернативно олигозахаридите могат да бъдат директно идентифицирани с MALDI-MS. Много изследвания са базирани на метаболитно белязване на олигозахаридите със захарни прекурсори. С използването на тази техника могат да бъдат мониторираны ефикасността на гликозилиране, нивата на различни междинни метаболити (Man-1-P или ГДФ-Man) и структурни промени на свързаните с долохол фосфат олигозахариди /LLO-lipid linked oligosaccharides/ и N-свързаните гликани /NLG - N-linked glycans/.

При LLO-анализа, култивирани фибробласти (контроли и пациенти) се белязват с радиоактивни захарни прекурсори като [2-³H] маноза или [14-³C] глюкозамин за DPAGT1-CDG и ALG1-CDG. След което те се подлагат на трипсин, разделят се, правят се разтворими. Освобождават се от липидния носител посредством кисела хидролиза на пирофосфорната връзка (NLG се откъсват посредством ензими) и се характеризират с HPLC [41-42]. Анионообменна хроматография (AEC) с пулсираща амперометрична детекция (PAD) се използват често за селективен анализ на захаридите. Напоследък е описан лесен, точен и чувствителен нерадиоактивен метод за характеризиране на LLO и NLG, който се базира на FACE [34]. Алтернативно освободените гликани могат да бъдат белязани флуоресцентно и изследвани посредством LC/MS [41]. Анализът на гликопептидите в комбинация с MALDI-MS или LC/MSLC/MS/MS се използва за характеризиране на специфичното за определено място или субклас специфичните гликанови профили в CDG тип 2 диагностиката.

Методи за изследване на ензими, транспортери и субединиците на консервативния олигомеричен комплекс на Голджи (COG)

Намалената ензимна активност се оценява обикновено в левкоцити от периферна кръв или култивирани фибробласти. Фосфоманозоизомерата (PMI) катализира превръщането на фруктозо-6-фосфат до манозо-6-фосфат, който изомеризира от фосфоманомутазата (PMM2) до манозо-1-фосфат за синтезата на липидсвързани олигозахариди. Активността на PMM и PMI е значително намалена в левкоцити, фибробласти и хепатоцити при CDG пациенти с PMM2-CDG и MPI-CDG респективно. Алтернативно амниоцитите и хорионни вѐси могат да бъдат използвани за пренатална диагноза. Изследването се базира на куплирана НАДФ+/НАДФН ензимна система. Реакционният продукт се измерва фотометрично (340nm) или флуориметрично (ексцитация, емисия, 340/460 nm) [15, 44-45]. Някои изследователи изследват активността посредством използването на [3-³H] манозо-6-фосфат

като субстрат. Интермедиерният продукт се мониторира посредством електрофореза. По-чувствителни процедури, базирани на директна детекция на нарушената конверсия на субстрат/продукт (манозо-1-фосфат до манозо-6-фосфат при PMM2-CDG) с AEC-PAD. Посредством този метод се установява значително намалена активност в облигатни хетерозиготи [43].

Комплексна процедура наречена афинитетно захващане и елуция (ACE) комбинирано с ESI-MS се използва за определяне на засегнатите ензими в мултиплексния анализ на PMM2-CDG и MPI-CDG. Ензимните продукти, които са изомерични с техните субстрати (в култивирани клетъчни хомогенати) претърпяват други ензимни реакции и резултиращите продукти се определят количествено с MS.

Въпреки, че ензимният дефект е познат при CDG типове, не за всички е рутинно навлязло в практиката изследване на ензимната активност (например типове ALG8-CDG и ALG9-CDG).

Дефектите на ГДФ-фукозният транспортер водят до нарушен импорт на цитозолният ГДФ-фукоза в Голджи при SLC35C1-CDG. Радиомаркираната фукоза, свързана с нуклеотидни захари или гликопротеини се изследва във фибробласти от пациента, и използва фукоза специфични, лектин-оцветяващи процедури [46].

SLC35A1-CDG води до структурни промени на транспортера на цитидин монофосфат (ЦМФ)-сиалова киселина, който се пренася между цитозола и комплекса на Голджи. Пътищата на интрацелуларния мембранен трафик също са били изучени. Различни процедури са били описани за COG анализ и диагноза на COG1-CDG [47, 48, 49], COG7-CDG [49], COG8-CDG [50], COG4-CDG [51], COG5-CDG. Тези процедури включват Western blot и MS анализ на NLG, имунофлуоресцентно белязване на междинните продукти в клетъчни култури, експерименти с трансфекция и мутационен анализ.

Важно е да бъде подчертано, че резултатите получени от гликановия анализ и изследването на специфични ензими (или функционални протеини) трябва да бъде потвърдено от генетичен анализ.

Лечение на PMM2-CDG

В *in vitro* условия манозата влиза в клетката с помощта на манозо-специфичен транспортер и добавянето ѝ към фибробластите коригира дефектната манозна инкорпорация [42, 52]. При пациенти и нормални контроли приемането на маноза в доза 0.1 g/kg на 3 ч. води до 2-3кратно увеличение на серумната ѝ концентрация [53], определена по способа, описан от Etchison et Freeze, 1997 [54]. Интерес представлява факта, че краткосрочното

приложение на маноза подобрява нарушеното гликозилиране [55]. Според други автори, обаче, интравенозното приложение на маноза 2 mM, последвана от орална маноза за 6 месеца не е било ефективно [56].

В процес на развитие са опити за синтез на мембранно-пропускливи деривати на манозо-1-фосфата, тъй като той не може да проникне в клетката, поради своята полярност [57]. В последно време се обсъжда прилагането на АМО. Те блокират достъпа до сплайсозомата, което води до коректен сплайсинг на мРНК [10]. Направление за изследване е ензим заместващата терапия, която може да се окаже успешна в практиката [58].

До сега за лечението на този дефект се провежда симптоматична терапия.

При изоставане във физическото развитие се прилага антирефлуксни медикаменти, хранене със сонда и гастростомия. При изоставането в моторното развитие и в речта се прилагат физио- и логопедична терапия. Инсултосободните епизоди могат да бъдат профилактирани с аспирин в антиагрегатна доза. За лечение на остеопенията се прилагат бифосфонати. При хипотиреоидизъм и нисък тироксин-свързващ глобулин се провежда лечение с тироксин. Жените с хипергонадотропен хипогонадизъм провеждат хормонална заместително лечение. В тази връзка трябва да посочим, че естрадиолната терапия е индуцирала телархе и пубархе при 2 пациентки [55]. При избор на хормонозаместителна терапия трябва да се има предвид повишеният риск за тромбоемболични усложнения, дължащи се на дефицит на АТ III, протеин С и/или S.

MPI-CDG е единственият дефект, при който се провежда ефективно перорално лечение с маноза. Преди въвеждането на терапията от Niehues et Hasilik, 2000 [15] всички пациенти са екзистирали в ранна детска възраст от чернодробна недостатъчност. След втората седмица от началото на манозната терапия при всички пациенти, с изключение на един [60], се установява подобрене в общото състояние, хипогликемията и симптомите от страна на стомашно-чревния тракт. Единствено хепатомегалията перзистира при някои от случаите [15].

Препоръчаната доза на манозата е 0.2 g/kg/24ч., разделена най-често в 4 дневни приема [15]. При висока доза може да се появи осмотична диария. За осъществяване на ефективно лечение е необходимо плазмената концентрация на манозата да бъде >20 $\mu\text{mol/l}$ на гладно и >100 $\mu\text{mol/l}$ след прием [53]. На фона на провежданата терапия с маноза при чернодробна биопсия се наблюдава портална фиброза, пролиферация на дистрофични и дилатирани жлъчни каналчета, без

възпаление, стеатоза и холестаза [59].

При провеждане на изоелектрично фокусиране на трансферин след започване на лечението при пациентите с лека форма на заболяването се наблюдава нормален модел, а при тези с тежко чернодробно заболяване се отбелязва леко подобрение, но без пълна нормализация на сiałотрансферина [15].

Високите метаболитни нужди в кърмаческата и детската възраст затрудняват клетъчния капацитет за гликозилиране. С увеличаване на възрастта пациентите вероятно се стабилизират, подобно на други метаболитни заболявания. В тази връзка при клиничното проследяване на пациент от раждането до 35 годишна възраст се наблюдава намаляване на тежестта на клиничните симптоми с напредване на възрастта [55].

Liet et al., 2008 [60] потвърждава добрия ефект от приложението на нефракциониран хепарин при възрастен пациент с протеингубещата ентеропатия.

Молекулярно-генетичен анализ при вродените дефекти на гликозилиране

Повече от 70 гена, допринасят за синтеза, насочването и трансфера на липидсвързаните олигозахариди към протеините и рециклирането на биопродукти. За сравнение повече от 500 гена, участват в синтеза и функцията на олигозахаридите [60, 61].

Установена е молекулярната база на различните типове CDG. Мутацията R141H на PMM2 гена, която никога не се среща в хомозиготно състояние е най-честата мутация в Кавказката раса. Открити са повече от 90 мутации, повече мисенс в този ген [63].

Използването на РНК също допълва генетичното изследване. РНК може да бъде екстрахирана от различни източници, пълна кръв с ЕДТА, култивирани фибробласти или амниотични клетки или хорионни въси. Мутациите могат да бъдат идентифицирани, посредством комбинация на CE система за едновременен конформационен анализ на полиморфизмите, (real-time) PCR, ДНК секвениране [64].

Детайлно са описани скрининг стратегии за генен мутационен анализ, включващи генатуриращи HPLC методи или ин витро експресно тестване в дрожди или мутантни клетки от бозайници след трансфекция [46, 61, 65]. Хомозиготни или двойни хетерозиготни мутации, в кодиращата секвенция, но също така в промоторната част, интрони, сплайс-мутации се потвърждават на геномно ниво в пациентите и техните близки [61, 66, 67]. Поради тежестта на заболяването пренаталната диагностика (при идентифицирани два алела) се базира на комбинирани мутации и linkage анализ с полиморфни маркери [68, 69].

Пренатална диагностика при вродените дефекти на гликозилиране

Пренаталната диагностика се извършва чрез ензимен или ДНК анализ на фетални клетки, получени с амниоцентеза от 15-18 г. с. или с трансцервикална или трансабдоминална биопсия на хорионни въси от 10-12 г.с.

За извършване на пренатална диагностика е необходимо предварителна идентификация на молекулярния дефект при пробанда в клинична и/или изследователска лаборатория.

Възможна е прегимплантационна генетична диагностика за PMM2-CDG, ALG3-CDG и EXT1/EXT2-CDG.

Генетично консултиране при вродените дефекти на гликозилиране

По-голямата част от вродените дефекти на гликозилиране се предават по автосомно-рецесивен път, с изключение на EXT1/EXT2-CDG (наследствените множествени остеохондромии), които е с автосомно-доминантно унаследяване [74] и MAGT1-CDG, ALG13-CDG, MAGT1-CDG, SSR4-CDG, SLC35A2-CDG, които се унаследяват по X-рецесивен модел. Schollen et al., 2004 [71], докладват за по-висок генетичен риск при семейства с PMM2-CDG (1:3), вместо очаквания (1:4), което трябва да се вземе предвид при генетичното им консултиране въпреки необходимостта този факт да бъде потвърден и от други автори.

Библиография

1. Jaeken J., T. Henne, G. Matthijs, H. Freeze. CDG-nomenclature: Time for a change ! *Biochim Biophys Acta*, 1792, 2009, №9, 825-826.
2. Jaeken J., M. Vanderschueren-Lodeweyckx, P. Caeser, L. Snoeck, L. Corbeel, E. Eggermont. Familial psychomotor retardation markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr Res.*, 14, 1980, 179.
3. Pérez-Cerdá C., Girós M.C., Serrano M., Pérez Dueñas B., Ecaj M.J., Medrano C., Gort L., Pérez González L. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los defectos congénitos de glicosilación. *Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM) / © 2015 Ediciones Mayo, S.A-испански език.*
4. Соколов Т. Костните тумори у децата. София, Изд. Къща ДЛ&М ООД, 2006, 59.
5. Станчева М. Скрининг за вродени дефекти на гликозилиране при деца с изоставане в умственото развитие, дисертационен труд, 2013 г.
6. Чамова Т., Е. Титянова, И. Търнев, Р. Димова. Мионосографна оценка на триглавия мускул на подбедрицата при автосомно-рецесивна наследствена миопатия с телца на включване. *Неврофизиология и мозъчна хемодинамика*, 7, 2011, 2, 93-100.
7. Соколов Т., А. Михова. Туморна калциноза. *Ортопедия и травматология*, 36, 2000, № 4, 575-580.
8. Aebi M., A. Helenius, B. Schenk, R. Barone, A. Fiumara, E. Berger. Carbohydrate-deficient syndromes become congenital disorders of glycosylation: and updated nomenclature for CDG. *First Int. Workshop on CDGS /letter/. Glycoconj J.*, 16, 1999, 669-671.
9. Божинова В. Диагноза и диференциална диагностика при деца с двигателен дефицит. *Педиатрия, Supplementum за общопрактикуващия*, 47, 2007, № 1.
10. Grunewald S. The clinical spectrum of phosphomannomutase deficiency (CDG-

- la). *Biochim Biophys Acta*, 1792, 2009, № 9, 827-834.
11. Pelletier V., N. Galeano, P. Brochu, C. Morin, A. Weber, C. Roy. Secretory diarrhea with protein losing enteropathy, enterocolitis cystica superficialis, intestinal lymphangiectasia and congenital hepatic fibrosis a new syndrome. *J Pediatr.*, 108, 1986, №1, 61-65.
 12. Babovic-Vuksanovic D., M. Patterson, W. Schwenk, J.F. O'Brien, J. Vockley, H. Freeze, D. Mehta, V. Michels. Severe hypoglycemia as a presenting symptom of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Pediatr.*, 135, 1999, № 6, 775-781.
 13. De Koning T., P. Nikkels, L. Dorland, J. Bekhof, J. de Schrijver, J. van Hattum, O. van Diggelen, M. Duran, R. Berger and B. Poll-The. Congenital hepatic fibrosis in 3 siblings with phosphomannose isomerase deficiency. *Virchows Arch.*, 437, 2000, № 1, 101-105.
 14. De Lonlay P., N. Seta. The clinical spectrum of phosphomannoseisomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment of CDG-Ib. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792, 2009, № 9, 841-843.
 15. Niehues R., M. Hasilik. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib: phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *MMW Fortschr Med.*, 142, 2000, Suppl. 3, 171-2.
 16. Harms H., K. Zimmer, K. Kurnik, R. Bertele-Harms, S. Weidinger, K. Reiter. Oral mannose therapy persistently corrects the severe clinical symptoms and biochemical abnormalities of phosphomannose isomerase deficiency. *Acta Paediatr.*, 91, 2002, №10, 1065-72.
 17. De Lonlay P., M. Cuer, S. Vuillaumier-Barrot, G. Beaune, P. Castelnau, M. Kretz, G. Durand, J-M. Saudubray, N. Seta. Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign in phosphomannose isomerase deficiency: a new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. *J Pediatr.*, 135, 1999, № 3, 379-383.
 18. Penel-Capelle D., D. Dobbelaere, J. Jaeken, A. Klein, M. Cartigny, J. Weill. Congenital disorder of glycosylation 1b(CDG-Ib) without gastrointestinal symptoms. *J Inherit Metab Dis.*, 26, 2003, 83-5.
 19. Pageва Б. Диагноза на острата метаболична чернодробна недостатъчност. *GP News*, 2005, №1, 26-27.
 20. Jaeken J., H. van Eick, C. van der Heul, L. Corbeel, R. Eeckels, E. Eggermont. Sialic acid deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized syndrome. *Clin Chim Acta*, 144, 1984, № 2-3, 245-247.
 21. Westermeier R. Isoelectrofocusing. In: *Electrophoresis in practice (A guide to methods and applications of DNA and protein separations. Fourth revised and enlarged Edition.* Weinheim, Wiley-VCH-Verlag GmbH & CoKGaA, 2008, ISBN 3-527-31181-5, 51-64.
 22. van Geet C., J. Jaeken, K. Freson, T. Lenaerts, J. Arnout, J. Vermeylen, M. Hoylaerts. Congenital disorders of glycosylation Ia and IIa are associated with different prime hemostatic complications. *J Inherit Dis.*, 24, 2001, №4, 477-492.
 23. Edwards M., F. Mc Kenzie, S. O'Callagan, D. Somerset, P. Woodford, J. Spilsbury, M. Fietz, J. Fletcher. Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia by cordocentesis and transferrin isoelectrofocusing of serum of a 27 week fetus with non immune hydrops. *Prenat Diagn.*, 26, 2006, № 10, 985-988.
 24. Carchon H., C. Ndosimao, S. van Aerschot, J. Jaeken. Use of serum on Guthrie cards in screening for CDG. *Clin Chem.*, 52, 2006, № 4, 774-775.
 25. Clayton P., B. Winchester, E. Di Tamazo, G. Keir G, Rodeck K. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: normal glycosylation in fetus. *Lancet*, 341, 1993, № 8850, 956.
 26. Dupre T., M. Cuer, S. Barrot, A. Barnier, V. Cormier-Daire, A. Munnich, G. Durand, N. Seta. Congenital Disorder of Glycosylation Ia with Deficient Phosphomannomutase Activity but Normal Plasma Glycoprotein Pattern. *Clinical chemistry*, 47, 2001, № 1, 132-134.
 27. Hahn S., S. Minnich, J. O'Brien. Stabilization of hypoglycosylation in a patient with CDG type Ia. *J Inherit Metab Dis.*, 29, 2006, № 1, 235-237.
 28. Stibler H., F. Skovby. Failure to diagnose carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome prenatally. *Pediatr Neurol.*, 11, 1994, №1, 71.
 29. Fletcher J., G. Matthijs, J. Jaeken, E. Van Schaftingen, P. Nelson. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: beyond the screen. *J Inherit Metab Dis.*, 23, 2000, №4, 396-98.
 30. Aebi M., T. Hennet. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol.*, 11, 2001, № 3, 136-41.
 31. Briones P., M. Vilaseca, M. Garcia-Silva, M. Pineda, J. Colomer, I. Ferrer, J. Artigas, J. Jaeken, A. Chabas. Congenital disorders of glycosylation (CDG) may be underdiagnosed when mimicking mitochondrial disease. *Eur J Paediatr Neurol.*, 5, 2001, № 3, 127-131.
 32. Brum J., I. Rizzo, D. Mello, E. Carlos. Congenital disorders of glycosylation type Ia: a non progressive encephalopathy associated with multisystemic involvement. *Arq Neuro-Psiquiatr.*, 66, 2008, № 3, 545-548.
 33. Drouin-Garraud V., M. Belgrand, S. Grunewald, N. Seta, J. Dacher, A. Henocq, G. Matthijs, V. Cormier-Daire, T. Frebourg, P. Saugier-Verber. Neurological presentation of a congenital disorder of glycosylation CDG-Ia: implications for diagnosis and genetic counseling. *Am J Med Genet*, 101, 2001, № 1, 46-9.
 34. Marklova E., Z. Albahri. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta.*, 385, 2007, № 1-2, 6-20.
 35. Rimela-Le-Huu A., H. Henry, I. Kern, S. Hanquinet, S. Roulet-Perez, E. Neuman, A. Supertifurga, C. Bonate, D. Baahausen. Congenital disorder of glycosylation (CDG-Ia) and molecular characterization of a new patient. *J Inherit Metab Dis.*, 2008, DOI-10.1007/s10545-008-0959-x.
 36. Schoffer K., J. O'Sullivan, J. McGill. Congenital disorder of glycosylation type Ia presenting as early-onset cerebellar ataxia in an adult. *Movement Disorders*, 21, 2006, № 6 869-72.
 37. Marquardt T., C. Denecke. Congenital disorders of glycosylation review of their molecular bases clinical presentations and specific therapy. *Eur J Pediatr.*, 162, 2003, № 6, 359-79.
 38. Mills P., K. Mills, N. Mian, B. Winchester, P. Clayton. Mass spectrometric analysis of glycans in elucidating the pathogenesis of CDG type IIx. *J Inherit Metab Dis.*, 26, 2003, № 2-3, 119-34.
 39. Sanz-Nebot V., P. Gonzalez, I. Toro, A. Ribes, J. Barbosa. Characterization of human transferrin glycoforms by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B.*, 798, 2003, № 1, 1-7.
 40. Grubenmann C., C. Frank, S. Kjaergaard, E. Berger, M. Aebi, T. Hennet. ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Hum Mol Genet.*, 11, 2002, № 19, 2331-2339.
 41. Butler M., D. Quelhas, A. Critchley, H. Carchon, H. Hebestreit, R. Hibbert, L. Vilarinho, E. Teles, G. Matthijs, E. Schollen, P. Argibay, D. Harvey, R. Dwek, J. Jaeken and P. Rudd. Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology*, 13, 2003, № 9, 601-622.
 42. Körner C., L. Lehle, K. von Figura. Abnormal synthesis of mannose-1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1 fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. *Glycobiology*, 8, 1998, №2, 165-171.
 43. Marklova E., Z. Albahri. Transferrin D protein variants in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG). *J Clinical Lab Anal.*, 23, 2009, № 2, 77-81.
 44. Charlwood J., P. Clayton, G. Keir, N. Mian, E. Young, B. Winchester. Prenatal diagnosis of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A (CDG1A) by a combination of enzymology and genetic linkage analysis after amniocentesis or chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.*, 18, 1998, № 7, 693-9.
 45. van Schaftingen E., J. Jaeken. Phosphomannomutase deficiency is a cause of Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.*, 377, 1995, № 3, 318-320.
 46. Lubke T., T. Marquardt, A. Etzioni, E. Hartmann, K. von Figura, C. Korner. Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of CDG –as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet.*, 28, 2001, №1, 73-6.
 47. Foulquier F., E. Vasile, E. Schollen, N. Callewaert, T. Raemaekers, D. Quelhas, J. Jaeken, P. Mills, P. B. Winchester, M. Krieger, W. Annaert, G. Matthijs. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 103, 2006, №10, 3764-3769.
 48. Zeevaert R., F. Foulquier, B. Dimitrov, E. Reynders, R. Van Damme-Lombaerts, E. Simeonov, W. Annaert, G. Matthijs, J. Jaeken. Cerebrocostomandibular-like syndrome and a mutation in the conserved oligomeric Golgi complex, subunit 1. *Hum Molec Genet.*, 18, 2009, № 3, 517-524.
 49. Wu X., R. Steet, O. Bohorov, J. Bakker, J. Newell, M. Krieger, L. Spaapen, S.

- Kornfeld, H. Freeze. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nature Med.*, 10, 2004, №5, 518-523.
50. Foulquier F., D. Ungar, E. Reynnders, R. Zeevaert, R. P. Mills, M. Garcia-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 Molec Genet.*, 16, 2007, № 7, 717-730.
51. Reynrds E., F. Fouquier, E. Teles, D. Quelhas, W. Morelle, C. Rabouille, W. Annaert, G. Matthijs. Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum Mol Genet*, 18, 2009, №17, 3244-3256.
52. Panneerselvam K., H. Freeze. Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest.*, 97, 1996, №6, 1478-87.
53. Alton G., S. Kjaergaard, J. Etchinson, F. Skovby, H. Freeze. Oral ingestion of mannose elevated blood mannose levels: A first step toward a potential therapy for Carbohydrate – deficient glycoprotein syndrome type I. *Biochemical and molecular Medicine*, 60, 1997, № 2, 127-133.
54. Etchison J., H. Freeze. Enzymatic assay of D-mannose in serum. - *Clin Chem.*, 43, 1997, №3, 533-538.
55. Kjaergaard S. Congenital disorders of glycosylation type Ia and Ib/genetic, biochemical and clinical studies. *Danish Medical Bulletin*, 51, 2004, №4, 350-363.
56. Mayatepek E., D. Kohlmüller. Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr.*, 157, 1998, № 7, 605-6.
57. Hardre R., A. Khaled, A. Willemetz, T. Dupre, S. Moore, C. Gravier-Pelletier, Y. Le Merrer. Mono, di and tri-mannopyranosyl phosphates as mannose-1-prodrugs for potential CDG-Ia therapy. *Bioorg Med Chem Lett.*, 17, 2007, №1, 152-155.
58. Eklund E., H. Freeze. The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. *NeuroRx*, 3, 2006, № 2, 254-263.
59. Mention K., F. Lacaille, V. Valayanopoulos, S. Romano, A. Kuster, M. Cretz, H. Zaidan, L. Galmiche, F. Jaubert, Y. Keyser, N. Seta, P. de Lonlay. Development of liver disease despite mannose treatment in 2 patients with congenital disorders of glycosylation type Ib. *Mol Genet Metab.*, 93, 2008, №1, 40-43.
60. Liem Y., L. Bode, H. Freeze, F. Leebeek, A. Zandbergen, J. Paul-Wilson. Using heparine therapy to reserve protein-losing enteropathy in a patient with CDG-Ib. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*, 5, 2008, № 4, 220-224.
61. Marquardt T., H. Freeze. Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defect in man and biological models for their study. *Biol Chem.*, 382, 2001, №2, 161-77.
62. Freeze H. Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.*, 7, 2006, №7, 537-51.
63. Jaeken J., G. Matthijs, H. Carchon, E. Van Schaftingen. Defects of N-glycan synthesis. -In: *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8 ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Childs, K. Kinzler, B. Vogelstein. (Ed.), New York, McGraw-Hill, 2001, 1601-21.
64. Callewaert N., E. Schollen, A. Vanhecke, J. Jaeken, G. Matthijs, R. Contreras. Increased fucosylation and reduced branching of serum glycoprotein N-glycans in all known subtypes of congenital disorder of glycosylation I. *Glycobiology*, 13, 2003, № 5, 367-75.
65. Schollen E. S. Kjaergaard, T. Martinsson, S. Vuillaumier-Barrot, M. Dunoe, 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.*, 41, 2004b, № 11, 877-880.
66. Schollen E., K. Martens, E. Geuzens, G. Matthijs. DHPLC analysis as a platform for molecular diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG). *Eur J Hum Genet.*, 10, 2002, № 10, 643-8.
67. Matthijs G., E. Schollen, C. Bjursell, A. Erlandson, H. Freeze, F. Imtiajz, S. Kjaergaard, T. Martinsson, M. Schwartz, N. Seta, S. Vuillaumier-Barrot, V. Westphal, B. Winchester. Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat.*, 16, 2000, №5, 386-94.
68. Charlwood J., P. Clayton, G. Keir, N. Mian, E. Young, B. Winchester. Prenatal diagnosis of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A (CDG1A) by a combination of enzymology and genetic linkage analysis after amniocentesis or chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.*, 18, 1998, № 7, 693-9.
69. Nogueira C., D. Quelhas, L. Vilarinho. Prenatal diagnosis for CDG Ia based on post-mortem molecular study of Guthrie card. *Mol Genet Metab.*, 87, 2006, №4, 379.
70. Schmale G., E. Conrad, W. Rashkind. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am.*, 76, 1994, № 7, 9866-92.
71. Schollen E., S. Kjaergard, E. Legius, M. Schwartz, G. Matthijs. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet.*, 8, 2000, № 5, 367-71.