

mgr Anna Bogdańska

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

„Ocena hipoglikozylacji transferyny metodą elektroogniskowania jako biomarkera w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji białek”

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Anna Tyłki-Szymańska

Streszczenie

Wrodzone zaburzenia glikozylacji (ang. *Congenital Disorders of Glycosylation*, CDG) stanowią stale powiększającą się grupę wrodzonych zaburzeń metabolicznych spowodowanych zaburzeniem glikozylacji białek i lipidów. Defekty te charakteryzują się różnorodnością obrazu i przebiegu klinicznego, większość dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Dotychczas opisano ponad 150 zespołów klinicznych uwarunkowanych wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji.

Biochemicznym markerem defektów N-glikozylacji białek jest transferyna, która występuje w surowicy pod postacią izoform. Glikozylację transferyny bada się między innymi metodą elektroogniskowania (ang. *isoelectric focusing*, IEF), która stanowi tzw. „złoty standard” w diagnostyce zaburzeń glikozylacji. Metoda IEF polega na rozdziale elektroforetycznym białek ze względu na ich punkt izoelektryczny (pI) w odpowiednim gradiencie pH. Transferyna rozdziela się na kilka izoform w zależności od ilości elektroujemnych reszt kwasu sjałowego charakterystycznych dla poszczególnych frakcji. W prawidłowym wzorze izoform wyróżnia się pięć frakcji od disjałotransferyny do heksasjałotransferyny. Jeśli nieprawidłowości związane są z brakiem N-glikanów na cząsteczce transferyny lub defektami w ich budowie obejmującymi niedobór końcowych cukrów, wówczas w rozdziale elektroforetycznym pojawiają się frakcje: asjałotransferyna i monosjałotransferyna oraz zmienia się procentowy skład pozostałych frakcji. Pojawienie się patologicznej frakcji asjałotransferyny oraz wzrost frakcji disjałotransferyny jest charakterystyczne dla CDG typu I. Natomiast podwyższenie w różnym stopniu wartości procentowych izoform takich jak asjało-, monosjało-, disjało- i trisjałotransferyny jest charakterystyczne dla CDG typu II.

Nieprawidłową glikozylację transferyny określano w piśmiennictwie jako tzw. wtórne zaburzenie glikozylacji u pacjentów z alkoholową chorobą wątroby, w galaktozemii i fruktozemii, w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C, niealkoholowym stłuszczeniu wątroby i cholestatycznymi chorobami wątroby.

Celem mojej rozprawy na stopień doktora nauk medycznych było badanie hipoglikozylacji transferyny metodą elektroogniskowania jako biomarkera w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zaburzeń glikozylacji.

Przeprowadzona została analiza retrospektywna izoform transferyny badanej metodą elektroogniskowania w typie I i II pierwotnych zaburzeń glikozylacji oraz wtórnych zaburzeń glikozylacji u polskich pacjentów diagnozowanych w IP-CZD w latach 1995-2020.

W pracy „ **Clinical, biochemical and molecular phenotype of congenital disorders of glycosylation: long-term follow-up**” przeprowadzono analizę wyników 32 pacjentów z potwierdzonymi molekularnie wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji. Przeanalizowano dokumentację medyczną pod kątem wieku rozpoznania, objawów klinicznych, parametrów biochemicznych oraz danych molekularnych.

Na podstawie szczegółowej analizy wzoru izoform transferyny oraz wyników analizy molekularnej pacjentów podzielono na następujące grupy:

I. grupa PMM2-CDG, licząca 12 pacjentów z deficytem fosfomannomutazy 2 (PMM2-CDG) (CDG typ I),

II. grupa non-PMM2-CDG, licząca 20 pacjentów, którą podzielono na 3 podgrupy:

a. non-PMM2-CDG-I, licząca 15 pacjentów z CDG typu I: 3 z deficytem transferazy UDP-GlcNAc (ALG13-CDG), 3 z deficytem beta-1,4-mannozylotransferazy (ALG1-CDG), 1 z deficytem alfa-1,3-mannozylotransferazy (ALG3-CDG), 3 z deficytem izomerazy mannozylofosforanowej (MPI-CDG), 4 z deficytem reduktazy poliprenolowej (SRD5A3-CDG), 1 z deficytem transferazy GlcNAc-1 (DPAGT1-CDG),

b. non-PMM2-CDG-II, licząca 4 pacjentów z CDG typu II: 3 z deficytem białka towarzyszącego Ac45 kompleksu V-ATP-azy (ATP6AP1-CDG), 1 z deficytem podjednostki A2 kompleksu V-ATP-azy (ATP6V0A2-CDG),

c. non-PMM2-CDG I/II, obejmująca 1 pacjenta z deficytem fosfoglukomutazy 1 (PGM1-CDG).

W grupie 12 pacjentów z PMM2-CDG wieloletnia obserwacja obejmowała 11 z nich. U wszystkich obserwowano opóźnienie rozwoju psychoruchowego, u większości hipotonię mięśniową, ataksję mózdkową, a także zaburzenia widzenia, powiększenie wątroby,

niedoczynność tarczycy, odwrócone brodawki sutkowe i nieprawidłowe rozmieszczenie tkanki tłuszczowej. Dwóch pacjentów zmarło, natomiast u większości obserwowano poprawę zdolności motorycznych z wyjątkiem trzech pacjentów z kardiomiopatią. Analiza izoform transferyny metodą IEF wykazała u wszystkich podwyższone frakcje asjalo- i disjalo-transferyny. Obniżony poziom tetrasjalo-transferyny występował u 11 pacjentów. W grupie non-PMM-CDG liczącej 20 pacjentów, 19 miało wieloletnią obserwację. Dominującym objawem było opóźnienie rozwoju psychoruchowego i hipotonia mięśniowa. Czterech pacjentów z tej grupy zmarło (2 z ALG1-CDG, 1 z PGM1-CDG, 1 z DPAGT1-CDG). Pacjenci z ALG1-CDG mieli fenotyp prowadzący do śmierci w pierwszych miesiącach życia. Jeden pacjent z PGM1-CDG prezentował postępującą niewydolność serca i zaburzenia czynności wątroby. U trzech pacjentów z SRD5A3-CDG obserwowano poprawę rozwoju, zwłaszcza zdolności motorycznych i rozwój mowy. U trzech pacjentów płci męskiej z ATP6AP1-CDG (defekt sprzężony z chromosomem X) obserwowano postępujący przebieg choroby: niedosłuch nerwowo-czuciowy do całkowitej głuchoty, a także wypadanie włosów aż do całkowitego wyłysienia, uszkodzenie wątroby, u dwóch rozwinął się białkomocz kłębuszkowy. U pacjentki z ATP6V0A2-CDG występowały *cutis laxa* oraz pachygyria i polimikrogyria. U pacjentów z MPI-CDG w obrazie klinicznym dominowało uszkodzenie wątroby. U trzech pacjentek z ALG13-CDG rozpoznano wczesnodziecięcą encefalopatię padaczkową. Nieprawidłowy obraz izoform transferyny stwierdzono u 18 pacjentów z grupy non-PMM2-CDG. U dwóch pacjentek z ALG13-CDG wykazano jedynie nieznaczną hipoglikozylację transferyny i niewielki procentowy wzrost asjalo- i disjalo lub nawet tylko disjalo-transferyny. Dwaj pacjenci z ALG1-CDG mieli znaczny procentowy wzrost asjalo- i disjalo-transferyny charakterystyczny dla typu I CDG podczas gdy trzeci pacjent z łagodniejszym fenotypem miał wzór izoform w granicach normy. U 4 pacjentów z typem II CDG stwierdzono podwyższoną frakcję disjalo- i trisjalo-transferyny oraz obniżoną tetrasjalo-transferynę. U pacjenta z PGM1-CDG wykazano tzw. mieszany typu I/II CDG charakteryzujący się zwiększonymi procentowymi wartościami asjalo-, monosjalo- i disjalo-transferyny oraz znacznie obniżoną tetrasjalo-transferyną.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na wykazanie następujących wyników:

- wykryto nieprawidłowy wzór izoform transferyny u dwóch dziewczynek z ALG13-CDG dotychczas nie raportowanych w literaturze,

- grupa III- 2 pacjentów z nawracającą ostrą niewydolnością wątroby (ang. *recurrent ALF - RALF*).

Spośród 12 pacjentów grupy I, u 10 stwierdzono procentowy wzrost asjalo-, monosjalo- i disjalo transferyny. U 4 pacjentów wykonano analizy kontrolne izoform transferyny. Profil znormalizował się równolegle z normalizacją wskaźników czynności wątroby. Wśród pacjentów grupy II większość stanowili pacjenci z przewlekłą cholestatyczną chorobą wątroby. Zaobserwowano w tej grupie procentowy wzrost asjalo- i monosjalo transferyny, a u dwóch pacjentów także disjalo transferyny. Mechanizm hipoglikozylacji może tu być związany z upośledzeniem funkcji wydzielniczej hepatocytów. U dwóch pacjentów po transplantacji wątroby (ang. *liver transplantation, LTx*) wykonano analizę kontrolną izoform transferyny, stwierdzono normalizację wzoru równolegle z normalizacją testów czynnościowych wątroby. W grupie III obserwowano wzrost monosjalo- oraz znaczny wzrost asjalo transferyny podczas epizodów ALF. Pomiędzy epizodami testy czynnościowe wątroby oraz izoformy transferyny były prawidłowe. Hipoglikozylacja transferyny u pacjentów z chorobami wątroby może mieć związek z zaburzeniem funkcji retikulum endoplazmatycznego wtórnie do uszkodzenia hepatocytów. Jednak dokładny mechanizm hipoglikozylacji transferyny w tych przypadkach nie jest znany, może być związany ze specyficznymi zaburzeniami czynności wątroby. Wykonano testy- t lub test Welscha, aby sprawdzić, czy różnice w procentowym rozkładzie izoform transferyny oraz testów czynnościowych wątroby są istotne statystycznie. Wykazano iż grupa I różni się od grupy II wartością disjalo transferyny, grupa II od grupy III asjalo transferyny, a grupa I od grupy III pentasjalo transferyny. Grupa I znacznie różni się od grupy III w wynikach GGT, które były dużo niższe dla grupy III. Zbadano korelacje między izoformami transferyny oraz wskaźnikami czynnościowymi wątroby w każdej grupie. Wykazano istotne statystycznie korelacje między INR oraz monosjalo transferyną a także między INR i tetrasjalo transferyną w grupie II.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wykazanie następujących wyników:

- charakterystyka wzoru izoform transferyny u dzieci z chorobami wątroby jest pierwszym dotychczas niepublikowanym badaniem,
- u wszystkich analizowanych pacjentów z pierwotną chorobą wątroby stwierdzono podwyższony poziom asjalo- jak również monosjalo transferyny,

- wtórna hipoglikozylacja transferyny występowała w przypadkach znacznego uszkodzenia wątroby,
- jest to pierwsze dotychczas niepublikowane badanie opisujące wtórną hipoglikozylację transferyny w przebiegu nawracającej ostrej niewydolności wątroby (RALF),
- jest to pierwsze dotychczas niepublikowane badanie u pacjentów pediatrycznych dotyczące hipoglikozylacji transferyny w surowicy wtórne do przewlekłej cholestatycznej choroby wątroby i normalizacji po transplantacji wątroby,
- w grupie II stwierdzono korelację między izoformami transferyny a testami czynnościowymi wątroby.
- GGT może być przydatnym wskaźnikiem testów czynnościowych wątroby dla rozróżnienia między grupą III i grupą I,

Od 1995 roku w IP-CZD wykonywane jest badanie izoform transferyny w kierunku wrodzonych zaburzeń glikozylacji. Do 2020 roku przebadano ponad 23 000 próbek. W pracy „**Congenital disorders of glycosylation: Prevalence, incidence and mutational spectrum in the Polish population**” przedstawiono wyniki badań 39 pacjentów (z 35 rodzin) z molekularnie potwierdzonym CDG oraz 11 pacjentów z nieprawidłowym wzorem izoform transferyny, których badania genetyczne są w toku. Większość pacjentów (17) stanowili pacjenci z PMM2-CDG, 4 z ALG13-CDG, 4 z SRD5A3-CDG, 3 z ALG1-CDG, 3 z MPI-CDG, 3 z ATP6AP1-CDG, 1 z ALG3-CDG, 1 z PGM1-CDG, 1 z DPAGT1-CDG, 1 z ATP6V0A2-CDG, 1 z deficytem białka pomocniczego w kompleksie V-ATP-azy (VMA21-CDG). Większość deficytów dziedziczy się autosomalnie recesywnie, trzy (ALG13-CDG, ATP6AP1-CDG, VMA21-CDG) są sprzężone z chromosomem X. U czterech pacjentów wykonano najpierw sekwencjonowanie całego eksomu (ang. *whole-exome sequencing*, WES). Wśród nich zdiagnozowano 3 pacjentów płci żeńskiej z ALG13-CDG i 1 pacjentkę z ALG1-CDG. U pacjentów z PMM2-CDG zidentyfikowano 15 różnych mutacji, z czego najczęstsze były warianty typu *missense*. Najczęstszym z nich był wariant c.422G>A, p.(Arg141His) (25%) i c.691G>A, p.(Val231Met) (21%). Najbardziej powszechnym genotypem był c.691G>A, p.(Val231Met)/c.422G>A, p.(Arg141His) (23%). U pozostałych 17 pacjentów (z 14 rodzin) zidentyfikowano łącznie 18 różnych wariantów, w tym 11 mutacji zmiany sensu, 3 mutacje nonsens i 2 mutacje przesunięcia ramki. Częstość występowania CDG w populacji polskiej oszacowano na około 1 na 1 000 000, podczas gdy PMM2 na około 0,4 na 1 000 000.

Doniesienia literaturowe podają, iż częstość występowania PMM2-CDG może sięgać nawet 1:20 000. Biorąc pod uwagę dużą kliniczną różnorodność CDG i fakt, że metody genetyczne tj. sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS) nie jest rutynowo dostępne, można przypuszczać, że niska częstość CDG w tym badaniu może być niedoszacowana.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na wykazanie następujących wyników:

- jest to pierwsze badanie opisujące częstość występowania, zapadalność i charakterystykę genotypów we wrodzonych zaburzeniach glikozylacji w populacji polskiej,
- najczęściej występującą postacią CDG zidentyfikowaną w polskiej populacji był PMM2-CDG podobnie jak to jest opisywane w literaturze. Najczęstszymi wariantami w genie *PMM2* były c.422G> A, p.(Arg141His) i c.691G> A, p.(Val231Met), podobnie jak opisano w literaturze,
- SRD5A3-CDG i ALG13-CDG były drugimi najczęściej występującymi wrodzonymi zaburzeniami w Polsce. Nie zidentyfikowano żadnego pacjenta z ALG6-CDG, który jest drugim najczęstszym CDG w populacji europejskiej według doniesień literaturowych.

Pierwszą i nadal powszechnie stosowaną metodą w diagnostyce wrodzonych zaburzeń glikozylacji jest metoda elektroogniskowania (IEF) izoform transferyny w surowicy. W artykule „**Transferrin isoform analysis from dried blood spots and serum samples by gel isoelectric focusing for screening congenital disorders of glycosylation**” dokonano oceny przydatności metody IEF na materiale biologicznym zachowanym w postaci suchej kropli krwi na bibule (SKK) (ang. *dried blood spot*, DBS). Jest to powszechnie używany materiał w skryningu noworodkowym wrodzonych wad metabolizmu. Sucha kropla krwi może być szczególnie przydatna w diagnostyce, kiedy inny materiał nie jest dostępny na przykład *postmortem*. Próbkę surowicy i równolegle suchej kropli krwi na bibule pobrano od 12 pacjentów z wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji: 8 od pacjentów z PMM2-CDG, 2 od pacjentów z MPI-CDG, 1 od pacjenta z VMA21-CDG i 1 od pacjenta z ALG3-CDG; dwie próbki od pacjentów z polimorfizmem transferyny i 36 próbek od zdrowych pacjentów stanowiących grupę kontrolną.

W suchej kropli krwi oraz w surowicy u pacjentów z PMM2-CDG, ALG3-CDG i MPI-CDG w profilu izoform transferyny metodą IEF zaobserwowano charakterystyczny wzór dla CDG

typu I z wyraźnie podwyższoną izoformą asjalo- i disjalo transferyny oraz obniżoną tetrasjalo transferyną. W przypadku łagodnego fenotypu PMM2-CDG stwierdzono nieznacznie podwyższone izoformy asjalo- i disjalo transferyny w surowicy. W suchej kropli krwi zaobserwowano tylko nieco podwyższony poziom disjalo transferyny wskazujący na niewielką hipoglikozylację. W metodzie IEF zarówno w surowicy jak i w DBS pacjentów z CDG typu II obserwowano charakterystyczny wzorec ze zwiększoną asjalo-, monosjalo-, disjalo- i trisjalo transferyną oraz zmniejszoną tetrasjalo transferyną.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na wykazanie następujących wyników:

- jest to pierwsze w Polsce i dotychczas niepublikowane oraz drugie na świecie badanie dotyczące wykorzystania suchej kropli krwi w diagnostyce CDG metodą IEF,
- wzorce i stężenia izoform transferyny w surowicy i z suchej kropli krwi są porównywalne co pozwala uznać metodę badania w DBS za alternatywną do badania w surowicy.
- sucha kropla krwi pobierana rutynowo do badań przesiewowych np. noworodków i przechowywana w zamrożeniu może pomóc w diagnozie zaburzeń CDG gdy inny materiał nie jest dostępny,
- analiza profilu izoform transferyny w suchej kropli krwi metodą IEF w przypadku łagodnego PMM2-CDG może być niewystarczająca i wymaga analizy izoform w surowicy.

Podsumowanie

Wzór izoform transferyny nadal stanowi biochemiczny marker defektów N-glikozylacji białek, a metoda elektroogniskowania wciąż jest powszechnie wykorzystywana w diagnostyce wrodzonych zaburzeń glikozylacji. Hipoglikozylację transferyny stwierdzono u pacjentów z wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji typu I, II oraz w typie I/II. Przeprowadzone badania pozwoliły na opisanie nowych obserwacji dotychczas nie raportowanych w literaturze. Stwierdzono nieprawidłowy wzór izoform transferyny u pacjentek z ALG13-CDG i wzór izoform transferyny w granicach wartości referencyjnych w ALG1-CDG.

Nieprawidłowa glikozylacja transferyny obserwowana jest także jako tzw. wtórne zaburzenie glikozylacji u pacjentów z chorobami wątroby. Przeprowadzone badanie charakteryzujące

szczegółowo izoformy transferyny jest dotychczas niepublikowanym badaniem pacjentów pediatrycznych z chorobami wątroby. Wtórna hipoglikozylację transferyny obserwowano u pacjentów z uszkodzeniem komórki wątrobowej, ostrą niewydolnością wątroby oraz u pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby.

Przeprowadzone badanie pozwoliło na oszacowanie częstości występowania, zapadalności i charakterystyki genotypów we wrodzonych zaburzeniach glikozylacji w polskiej populacji. Częstość występowania CDG w populacji polskiej oszacowano na około 1 na 1 000 000. Najbardziej powszechną postacią wrodzonych zaburzeń glikozylacji w polskiej populacji był podobnie jak opisano w literaturze PMM2-CDG, a częstość występowania oszacowano na 0,4 na 1 000 000. Drugimi najczęściej występującymi deficytami były SRD5A3-CDG i ALG13-CDG. ALG6-CDG będący drugim najczęstszym deficytem według doniesień literaturowych, nie został zidentyfikowany w polskiej populacji.

Metoda IEF w suchej kropli krwi podobnie jak w surowicy może być wykorzystana w diagnostyce CDG. Ostateczne rozpoznanie zawsze wymaga analizy molekularnej np. sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

Abstract

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a continually growing group of congenital metabolic disorders caused protein and lipid glycosylation disorders. These defects are characterized by a variety of clinical courses and pictures. Most of them involve autosomal recessive inheritance. To date, more than 150 clinical syndromes due to CDG have been described.

The biochemical marker of proteins N-glycosylation defects is serum transferrin, which occurs in the form of isoforms. Transferrin glycosylation is tested among others by isoelectric focusing (IEF), which is the gold standard in diagnosing glycosylation disorders. The IEF method is based on the electrophoretic separation of proteins due to their isoelectric point (pI) in an appropriate pH gradient. Transferrin divides into several isoforms depending on the number of electronegative sialic acid residues characteristic for each fraction. Five fractions are distinguished from disialotransferrin to hexasialotransferrin in the normal isoform pattern. If the abnormalities are related to the lack of N-glycans on the transferrin molecule or defects in their structure, including the deficiency of terminal sugars, then the following fractions appear in the electrophoretic separation: asialotransferrin and monosialotransferrin and the

change of the percentage composition of the remaining fractions. The appearance of the pathological fraction of asialotransferrin and an increase in the fraction of disialotransferrin are characteristic of CDG type I. However, an increase in the percentage of isoforms such as asialo-, monosialo-, disialo- and trisialotransferrin to various degrees is characteristic of CDG type II.

Abnormal glycosylation of transferrin has been described in the literature as secondary glycosylation disorder in patients with alcoholic liver disease, fructosemia and galactosemia, non-alcoholic steatosis, chronic hepatitis B and C, and cholestatic liver diseases.

This PhD thesis aims to study transferrin hypoglycosylation using isoelectric focusing as a biomarker diagnosing primary and secondary glycosylation disorders.

The retrospective analysis of transferrin isoforms by isoelectric focusing in types I and II of congenital disorders of glycosylation and secondary disorders of glycosylation was performed in Polish patients diagnosed in the Children's Memorial Health Institute (CMHI) in 1995 - 2020.

In the study entitled **“Clinical, biochemical and molecular phenotype of congenital disorders of glycosylation: long-term follow-up”**, the results of 32 patients with molecularly confirmed congenital glycosylation disorders were analyzed. Medical records were examined in terms of the age of diagnosis, clinical symptoms, biochemical parameters, and molecular data.

Based on a detailed analysis of transferrin isoforms and the results of molecular analysis, patients were divided into the following groups:

I. PMM2-CDG group, consisting of 12 patients with phosphomannomutase 2 deficiency (CDG type I);

II. non-PMM2-CDG group, consisting of 20 patients, divided into three subgroups:

a. non-PMM2-CDG-I consisting of 15 patients with CDG type I: three with UDP-N-acetylglucosaminyltransferase deficiency (ALG13-CDG), three with beta-1,4-mannosyltransferase deficiency (ALG1-CDG), one with alpha-1,3-mannosyltransferase deficiency (ALG3-CDG), three with mannosephosphate isomerase deficiency (MPI-CDG), four with polyprenol reductase deficiency (SRD5A3-CDG), and one with GlcNAc-1-P transferase deficiency (DPAGT1-CDG);

b. non-PMM2-CDG-II consisting of 4 patients with CDG type II: three with accessory protein Ac45 vacuolar ATP-ase deficiency (ATP6AP1-CDG), and one with subunit A2 vacuolar ATP-ase deficiency (ATP6V0A2-CDG);

c. non-PMM2-CDG I / II consisting of one patient with phosphoglucomutase 1 deficiency (PGM1-CDG).

In the group of 12 patients with PMM2-CDG, 11 were followed-up. All patients had psychomotor retardation; most of them had muscle hypotonia, cerebellar ataxia, visual disturbances, hepatomegaly, hypothyroidism, inverted nipples, and abnormal fat distribution. Two patients died, but the majority showed improvements in motor skills, except for three patients with cardiomyopathy. The IEF analysis of transferrin isoforms revealed elevated fractions of asialo- and disialotransferrin in all patients. Eleven patients had a reduced level of tetrasialotransferrin. Out of the non-PMM-CDG group of 20 patients, 19 were followed-up. The dominant clinical features included psychomotor retardation and muscle hypotonia. Four patients in this group died (two ALG1-CDG, one PGM1-CDG, and one DPAGT1-CDG). Patients with ALG1-CDG showed a severe phenotype leading to death in the first months of life. The patient with PGM1-CDG presented progressive heart failure and impaired liver function. In three patients with SRD5A3-CDG improvements in development, especially motor skills and speech, were observed. In three male patients with ATP6AP1-CDG (X-linked defect), a progressive course of the disease was observed: sensorineural hearing loss up to total deafness, as well as hair loss up to total alopecia, liver damage, and two cases of developed glomerular proteinuria. The patient with ATP6V0A2-CDG showed *cutis laxa*, pachygyria, and polymicrogyria. MPI-CDG patients presented the predominant liver phenotype. Three patients with ALG13-CDG were diagnosed with early childhood epileptic encephalopathy. The abnormal pattern of transferrin isoforms was observed in 18 of 20 non-PMM2-CDG patient. In two female patients with ALG13-CDG, a slight hypoglycosylation of transferrin was observed with a slight increase in asialo- and disialo- or only disialotransferrin. Two patients with ALG1-CDG showed significant percentage increases in asialo- and disialotransferrin characteristic for type I CDG, while the third patient had an isoform pattern within the normal range. In four patients with type II CDG an increased fraction of disialo- and trisialotransferrin and decreased tetrasialotransferrin were found. The PGM1-CDG patient showed a mixed type I/II transferrin isoform profile with significantly increased asialo-, monosialo- and disialotransferrin, and highly decreased tetrasialotransferrin.

The performed analysis yielded the following results:

- an abnormal pattern of transferrin isoforms was detected in two female patients with ALG13-CDG previously not reported in the literature;
- normal pattern of transferrin isoforms was found in a female patient with ALG1-CDG previously not reported in the literature;
- clinical manifestation of the studied cohort of patients was similar to those described in the literature;
- MPI-CDG patients on mannose supplementation achieved clinical improvement and their transferrin isoforms were closer to the reference range;
- a patient with PGM1-CDG receiving galactose supplementation died despite the improvement of transferrin isoforms;
- strong negative Pearson linear correlations between asialo- and tetrasialotransferrin and between disialo- and tetrasialotransferrin were found;
- a strong positive linear correlation between pentasialo- and tetrakisialotransferrin, was detected;
- a chi-squared test found that a group of patients with PMM2-CDG and non-PMM2-CDG differed in the intensity of symptoms such as cerebellar ataxia, failure to thrive, hypothyroidism, pericardial effusion, cardiomyopathy, inverted nipples, prolonged INR.

The liver is the main organ of glycoprotein synthesis, including transferrin. There are no reports in the literature regarding the study of transferrin isoforms in children with liver disease. The study entitled “**Pediatric liver disease patients and secondary glycosylation abnormalities**” presents the results of the analysis of transferrin isoforms in the serum of children with primary liver diseases. Out of approximately 2,000 analyses performed, 19 patients with glycosylation disorders secondary to liver disease were included in the study. Patients with galactosemia and fructosemia were not enrolled in this study. Medical records were analyzed in terms of clinical symptoms and biochemical parameters, including: serum IEF transferrin profile, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), international normalized ratio (INR), total and direct bilirubin, and gamma-glutamyltransferase (GGT). Based on the phenotype of liver disease, the following three groups were distinguished:

- group I - 12 patients with acute liver injury (ALI) or acute liver failure (ALF),

- group II - five patients with chronic liver disease (CLD),

- group III - two patients with recurrent acute liver failure (recurrent ALF - RALF).

Of the 12 patients in group I, ten showed an increased percentage of asialo-, monosial- and disialotransferrin. Control analyses of transferrin isoforms were performed in four patients. The transferrin isoform profile normalized in parallel to the normalization of liver function parameters. The majority of patients in group II had chronic cholestatic liver disease. In this group, an increased percentage of asialo- and monosialotransferrin was observed, and two patients also had increased disialotransferrin. The mechanism of hypoglycosylation may be related to the impairment of the secretory function of hepatocytes. In two patients after liver transplantation (LTx), a control analysis of transferrin isoforms was performed, and normalization of the pattern was found in parallel with the normalization of liver function tests. In group III there was an increase in monosialo- and a significant increase in asialotransferrin during episodes of ALF. Liver function tests and transferrin isoforms were normal between episodes. Transferrin hypoglycosylation in patients with liver disease may be associated with endoplasmic reticulum dysfunction secondary to hepatocyte damage. However, the exact mechanism of transferrin hypoglycosylation in this case, is unknown and may be associated with severe liver dysfunction. T-tests or Welch tests were performed to see if the differences in the percent distribution of transferrin isoforms and liver function were statistically significant. Group I was different from group II in disialotransferrin, group II differed from group III in asialotransferrin, and group I was different from group III in pentasialotransferrin. Group I differed significantly from group III in GGT results, which were much lower in group III. The correlations between transferrin isoforms and liver function indicators in each group were investigated. There were statistically significant correlations between INR and monosialotransferrin, as well as between INR and tetrasialotransferrin in group II.

The performed analysis yielded the following results:

- the characteristics of the pattern of transferrin isoforms in children with liver disease are the first unpublished study;
- in all pediatric patients with primary liver disease, elevated levels of asialo- and monosialotransferrin were found;
- secondary transferrin hypoglycosylation has occurred in cases of severe liver injury,

- this is the first unpublished study describing secondary transferrin hypoglycosylation in the course of recurrent acute liver failure (RALF);
- this is the first unpublished study in pediatric patients of serum transferrin hypoglycosylation secondary to chronic cholestatic liver disease and normalization after LTx;
- in group II, a correlation was found between transferrin isoforms and liver function tests;
- GGT may be a useful indicator of liver function tests to distinguish between group III and group I.

Transferrin isoforms analysis for congenital glycosylation disorders has been performed at CMHI since 1995. By 2020, more than 23 000 samples have been tested. The study entitled **“Congenital disorders of glycosylation: Prevalence, incidence and mutational spectrum in the Polish population”** presents the results of 39 patients (from 35 families) with molecularly confirmed CDG and 11 patients with an abnormal pattern of transferrin isoforms, whose molecular analysis is pending. Most of the patients (17) had PMM2-CDG, four ALG13-CDG, four SRD5A3-CDG, three ALG1-CDG, three MPI-CDG, three ATP6AP1-CDG, one ALG3-CDG, one PGM1-CDG, one DPAGT1-CDG, one ATP6V0A2-CDG, and one VMA21-CDG. Most of cases involved autosomal recessive inheritance, with three of them (ALG13-CDG, ATP6AP1-CDG, VMA21) X-linked cases. In four patients, whole-exome sequencing (WES) was performed first. Among them, three female patients with ALG13-CDG and one patient with ALG1-CDG were diagnosed. As a result, 15 different mutations were identified in PMM2-CDG patients, and the most common were missense variants. The most common were c.422G> A, p. (Arg141His) (25%), and c.691G> A, p. (Val231Met) (21%). The most common genotype was c.691G> A, p. (Val231Met) /c.422G> A, p. (Arg141His) (23%). In the remaining 17 patients (from 14 families), a total of 18 different variants were identified, including 11 missense mutations, three nonsense mutations and two frameshift mutations. The prevalence of CDG in the Polish population has been estimated at approximately 1 per 1 000 000, while PMM2 at approximately 0.4 per 1 000 000. Literature reports indicate that the incidence of PMM2-CDG may be as high as 1 per 20 000. Considering the large clinical value, the diversity of CDG, and the fact that genetic methods, such as next-generation sequencing (NGS), are not routinely available, it can be assumed that the low frequency of CDG in this study may be underestimated.

The performed analysis yielded the following results:

- this is the first study to describe the frequency, incidence, and characteristics of genotypes in congenital glycosylation disorders in the Polish population;
- PMM2-CDG was the most common form of CDG detected in the Polish population, similarly to the literature. The most common variants in the PMM2 gene were c.422G> A, p. (Arg141His), and c.691G> A, p. (Val231Met), as described in the literature;
- SRD5A3-CDG and ALG13-CDG were the second most common congenital disorders of glycosylation in Poland. No patient has been diagnosed with ALG6-CDG, which is the second most common CDG in the literature.

The first and still widely used method diagnosing congenital disorders of glycosylation is the isoelectric focusing (IEF) method of serum transferrin. In the study entitled “**Transferrin isoform analysis from dried blood spots and serum samples by gel isoelectric focusing for screening congenital disorders of glycosylation**”, the suitability of the IEF method was assessed on other biological material, such as a dried blood spot (DBS). It is a widely used material in newborn screening for inborn errors of metabolism. Dried blood spots can be especially useful in postmortem diagnostics when no other material is available. Serum samples and dried blood spots were collected simultaneously from 12 patients with congenital disorders of glycosylation: eight from patients with phosphomannomutase 2 (PMM2-CDG) deficiency, two from patients with mannosephosphate isomerase deficiency (MPI-CDG), one from a patient with vacuolar ATP-ase assembly factor (VMA21-CDG), one from a patient with alpha-1,3-mannosyltransferase deficiency (ALG3-CDG); two samples from patients with transferrin polymorphism and 36 samples from a healthy control group.

In the dried blood spots and the serum of patients with PMM2-CDG, ALG3-CDG, and MPI-CDG in the profile of transferrin isoforms tested using the IEF method, a characteristic pattern was observed for CDG type I with clearly elevated asialo- and disialotransferrin isoforms and reduced tetrassialotransferrin. In the case of a mild PMM2-CDG phenotype, slightly elevated asialo- and disialotransferrin isoforms were found. In DBS, only a slightly elevated level of disialotransferrin was observed, indicating a slight hypoglycosylation. In the IEF method in serum in patients with CDG type II, a characteristic pattern with increased asialo-, monosialo-, disialo- and trisialotransferrin and decreased tetrassialotransferrin was observed.

The performed analysis yielded the following results:

- it is the first and so far unpublished study in Poland and the second in the world, which describes the use of dried blood spots in CDG diagnostics using IEF;
- transferrin isoform patterns in serum and DBS are comparable;
- dried blood spots used for neonatal screening and stored frozen may aid in the postmortem diagnosis of CDG disorders when no other material is available;
- DBS isoform profile tested by IEF in the case of mild PMM2-CDG may be insufficient and requires analysis of the serum isoforms.

Conclusions

Transferrin isoforms are a biochemical marker of protein N-glycosylation defects, and isoelectric focusing (IEF) is widely used to diagnose of congenital disorders of glycosylation. Transferrin hypoglycosylation was found in patients with congenital disorders of glycosylation type I, II, and type I/II. The research included in this work allowed reporting new observations not yet found in the literature. There was an abnormal pattern of transferrin isoforms in patients with ALG13-CDG and a pattern of transferrin isoforms within the reference values of ALG1-CDG.

Abnormal transferrin glycosylation is also observed in secondary disorders of glycosylation in liver disease patients. This study characterizing the transferrin isoforms in detail is an unpublished study of pediatric patients with liver disease. Secondary transferrin hypoglycosylation was observed in patients with acute hepatic cell injury, acute liver failure, and chronic liver disease patients.

This study allowed estimating the prevalence, incidence, and characteristics of genotypes in congenital glycosylation disorders in the Polish population. The prevalence of CDG in the Polish population was estimated at 1 per 1 000 000. The most common form of congenital disorders of glycosylation in the Polish population was, PMM2-CDG, with an estimated incidence of 0.4 per 1 000 000. The second most common CDG were SRD5A3-CDG and ALG13-CDG. ALG6-CDG deficiency, the second most common CDG in literature reports, was not identified in the Polish population.

The IEF method in dried blood spots, similar to the serum, can be used to diagnose CDG. Final diagnosis always requires molecular analysis, for example, next-generation sequencing (NGS).