

**BESTUDERING VAN TRANSFERRIENGLIKOSILERING
AS 'N MERKER VIR
GLIKOSILERINGSDEFEKTE**

**Johanna Aletta du Plessis
B.Sc. Honns.**

**Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir
die graad Magister Scientiae in Biochemie aan die Potchefstroomse
Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

**Studieleier: Professor P.J. Pretorius
Medeleier: Professor L.J. Mienie**

**POTCHEFSTROOM
November 1998**

*“Ek weet wat Ek vir julle beplan, sê die Here: voorspoed en nie teenspoed nie;
Ek wil vir julle ‘n toekoms gee, ‘n verwagting!
Dan sal julle My aanroep, tot My kom bid, en Ek sal julle gebede verhoor.
Julle sal vra na My wil en julle sal dan My wil ken as julle met julle hele hart daarna
vra.
Julle sal My ontmoet, sê die Here, en Ek sal julle terugbring uit die ballingskap uit.”*

Jeremia 29:11-14

Vir Jaco en my ouers

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
LYS VAN FIGURE	vi
ABSTRACT	viii
OPSOMMING	x
BEDANKINGS	xii
HOOFSTUK 1: INLEIDING	1
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG	3
2.1 INLEIDING	3
2.2 GLIKOPROTEÏENE	3
2.2.1 Geskiedkundige agtergrond	3
2.2.2 Nuwe ontwikkelings in die glikobiologie	4
2.2.3 Die struktuur van glikoproteïene	6
2.2.3.1 N-gekoppelde glikane	7
2.2.3.2 O-gekoppelde glikane	8
2.2.3.3 Glikosielfosfatidielinositol-gekoppelde glikane	9
2.2.4 Die sintese van glikoproteïene	10
2.2.4.1 Sintese van N-gekoppelde glikane	10
2.2.4.2 Sintese van O-gekoppelde glikane	12
2.2.4.3 Sintese van glikofosielsfatidielinositol-gekoppelde glikane	14
2.2.5 Funksies van glikoproteïene	14

2.3	DIE “Carbohydrate-deficient Glycoprotein” (CDG) SINDROME	15
2.3.1	Inleiding	15
2.3.2	CDG-sindroom tipe 1	17
2.3.2.1	Insidensie en beskrywing	17
2.3.2.2	Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 1A	18
2.3.2.3	Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 1A	20
2.3.2.4	Behandeling van CDG-sindroom tipe 1A	21
2.3.2.5	Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 1B	21
2.3.2.6	Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 1B	22
2.3.2.7	Behandeling van CDG-sindroom tipe 1B	22
2.3.3	CDG-sindroom tipe 2	23
2.3.3.1	Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 2	23
2.3.3.2	Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 2	23
2.3.3.3	Behandeling van CDG-sindroom tipe 2	24
2.3.4	CDG-sindroom tipe 3	24
2.3.4.1	Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 3	24
2.3.4.2	Behandeling van CDG-sindroom tipe 3	24
2.3.5	CDG-sindroom tipe 4	25
2.3.5.1	Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 4	25
2.3.5.2	Behandeling van CDG-sindroom tipe 4	25
2.4	TRANSFERRIEN AS MERKER VIR GLIKOSILERINGSDEFEKTE .	25
2.4.1	Inleiding	25
2.4.2	Die struktuur, sintese en chemie van transferrien	26
2.4.3	Mikroheterogeniteit van transferrien	28
2.4.3.1	Genetiese polimorfisme	29
2.4.3.2	Ysterinhoud	29

2.4.3.3	Koolhidraatgroepe	30
2.4.4	Funksies van transferrien	30
2.4.5	Die rol en belang van transferrien in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme	31
2.5	ISO-ELEKTRIESE FOKUSERING	33
2.5.1	Die beginsel van iso-elektriese fokusering	33
2.5.2	Die gebruik van iso-elektriese fokusering in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme	34
2.6	DOELSTELLING EN BENADERINGSWYSE	35
HOOFSTUK 3: MATERIALE EN METODEDES		36
3.1	INLEIDING	36
3.2	MATERIALE	36
3.2.1	Apparaat	36
3.2.2	Teenliggaampies	36
3.3	TOETSGROEPE	37
3.3.1	Normaalwaardes	37
3.3.2	Positiewe kontroles	37
3.3.3	Alkoholiste	37
3.3.4	CDG-proefpersone	38
3.4	METODES	38
3.4.1	Monsterneming en -berging	38
3.4.2	Aanvanklike IEF-metode	38
3.4.3	Tweede metode	39

3.4.4	Gestandaardiseerde metode	41
3.4.4.1	Gestandaardiseerde metode vir die diagnose van die CDG-sindrome	41
3.4.4.2	Gestandaardiseerde metode vir die bestudering van transferrien by alkoholiste	42
3.5	SAMEVATTING	42
HOOFSTUK 4: RESULTATE		43
4.1	INLEIDING	43
4.2	STANDAARDISERING VAN DIE IEF-TEGNIK	43
4.2.1	Aanvanklike metode	43
4.2.2	Tweede metode	44
4.2.3	Optimale monstervolume	46
4.2.4	Probleme ondervind tydens die standaardisering van die IEF-tegniek	47
4.2.4.1	Vals positiewe resultate	47
4.2.4.2	Hoë agtergrond na ontkleuring	50
4.2.4.3	Eluering van transferrien uit filtreerpapier	51
4.2.4.4	Teenliggaampies	54
4.2.5	Samevatting	54
4.3	BESTUDERING VAN TRANSFERRIENGLIKOSILERING	55
4.3.1	Normaalpersone	55
4.3.2	Alkoholiste	55
4.3.3	Positiewe kontroles	56
4.3.4	Moontlike CDG-pasiënte	58
4.3.5	Samevatting	64

HOOFSTUK 5: BESPREKING	65
5.1 INLEIDING	65
5.2 STANDAARDISERING VAN DIE IEF-METODE	66
5.3 CDG-TRANSFERRIENPATRONE	71
5.4 GEVOLGTREKKING	77
LITERATUURVERWYSINGS	80
LYS VAN AFKORTINGS	86

LYS VAN FIGURE

Figuur 2.1:	N-gekoppelde glikane	8
Figuur 2.2:	O-gekoppelde glikane	9
Figuur 2.3:	Sintese van N-gekoppelde glikane	11
Figuur 2.4:	Sintese van O-gekoppelde glikane	13
Figuur 2.5:	Metaboliese weë van mannose	18
Figuur 2.6:	Struktuur van transferrien	27
Figuur 4.1:	Transferrienpatrone van normaalpersone	44
Figuur 4.2:	Transferrienpatrone van normaalpersone	45
Figuur 4.3:	Bepaling van optimale monstervolume	46
Figuur 4.4:	Abnormale transferrienpatrone van normaalpersone	48
Figuur 4.5:	Transferrienpatrone van normaalpersone na inkubasie met Fe(III)sitraat by 37°C	49
Figuur 4.6:	Transferrienpatrone van normaalpersone	50
Figuur 4.7:	Voorbeeld van 'n jel met hoë agtergrond	51
Figuur 4.8:	Transferrienpatrone van serum uit filtreerpapier geëlueer	52
Figuur 4.9:	Transferrienpatrone van serum van alkoholiste uit filtreerpapier geëlueer	53
Figuur 4.10:	Transferrienpatrone van serum van alkoholiste	54
Figuur 4.11:	Transferrienpatrone van serum van alkoholiste	56
Figuur 4.12:	Transferrienpatrone van positiewe kontroles	57
Figuur 4.13:	Transferrienpatrone van pasiënt ES	59

Figuur 4.14: Transferrienpatrone van moontlike CDG-pasiënte	60
Figuur 4.15: Transferrienpatrone van moontlike CDG-pasiënte	60
Figuur 4.16: Transferrienpatrone van pasiënt ST	61
Figuur 4.17: Transferrienpatrone van pasiënt SN	62
Figuur 4.18: Transferrienpatrone van pasiënt DL	63

ABSTRACT

The CDG-syndromes, usually characterised by psychomotor retardation, is a newly described group of diseases and no case has yet been described in South Africa. The purpose of this study was the development of a standard method for studying of the glycosylation of transferrin as a marker for glycosylation defects and the application of the method to South African patients.

Transferrin shows a degree of microheterogeneity due to differences in carbohydrate composition of the N-glycans bound to the peptide and is therefore very useful in the study of glycosylation defects. Iso-electric focusing (IEF) is often used in the study of transferrin glycosylation. An IEF-technique was developed to study transferrin patterns; transferrin of a number of different control persons was studied and the known transferrin pattern in normal people (high levels of tetrasialotransferrin, with lower levels of tri-, di- and pentasialotransferrin, respectively) was observed in these controls. To validate this standardised IEF-technique for this study, transferrin from a number of different alcoholics was analysed and the characteristic abnormal transferrin pattern with raised levels of disialotransferrin and also asialotransferrin, was observed in these patients. The transferrin of seventeen possible CDG-cases was analysed and in four of these, abnormal patterns were observed. Patient ES showed a pattern corresponding to patterns of positive controls of CDG type 1, while another patient (patient ST) showed transferrin patterns corresponding to known patterns for CDG type 3. A patient (patient SN) whose transferrin pattern corresponds to known patterns for CDG type 2, was also identified and in another case (patient DL), a previously unknown but unmistakably abnormal transferrin pattern was observed. Unfortunately, clinical histories of all of these cases are not at all complete and further studies (including enzyme analyses) will have to be performed to verify these results.

Parts of this study were presented at the following congresses:

- Du Plessis, J.A., Swanepoel, M., Pretorius, P.J., Mienie, L.J., Erasmus, E., Knoll, D.P. The Study of Transferrin-glycosylation as a Marker for Glycosylation Defects. Inborn Errors of Metabolism Workshop, Potchefstroom, September 1998.
- Du Plessis, J.A., Swanepoel, M., Pretorius, P.J., Mienie, L.J., Erasmus, E., Knoll, D.P. The Study of Transferrin-glycosylation as a Marker for Glycosylation Defects. 2nd International Congress of the Federation of African Societies for Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 15th Congress of the South African Society for Biochemistry and Molecular Biology, Potchefstroom, October 1998.

OPSOMMING

Die CDG-sindrome, wat deur veral psigomotoriese vertraging gekenmerk word, is relatief nuut beskryfde siektetoestande en geen geval is nog in Suid Afrika beskryf nie. Die doel van hierdie studie was die ontwikkeling van 'n standaardmetode vir bestudering van transferrienglikosilering as 'n merker vir glikosileringsdefekte en die toepassing daarvan op Suid Afrikaanse pasiënte.

Transferrien vertoon 'n mate van mikroheterogeniteit as gevolg van verskille in die koolhidraatsamestelling van die N-gekoppelde glikane wat aan die peptied gebind is en kan dus met vrug aangewend word in die bestudering van glikosileringsdefekte. Iso-elektriese fokusering (IEF) word algemeen aangewend in die bestudering van transferrienglikosilering. 'n IEF-metode is ontwikkel om transferrienpatrone te bestudeer; transferrienpatrone van 'n aantal normaalpersone is bestudeer om as kontroles te dien en het ooreengestem met die transferrienpatrone wat vir normaalpersone in die literatuur beskryf is (hoë vlakke van tetrasialotransferrien met laer vlakke van onderskeidelik tri-, di- en pentasialotransferrien). Om die toepasbaarheid van die gestandaardiseerde IEF-tegniek vir die aantoon van wanglikosilering van transferrien te toets, is transferrienpatrone van 'n aantal alkoholiste bestudeer. 'n Karakteristieke abnormale patroon waar verhoogde disialotransferrien en ook asialotransferrien voorkom, is by hierdie persone waargeneem. Die transferrien van sewentien moontlike CDG-pasiënte is gevolglik geanaliseer en by vier van hierdie pasiënte is abnormale transferrienpatrone waargeneem. Pasiënt ES het 'n transferrienpatroon getoon wat ooreenstem met positiewe kontroles van CDG tipe 1, terwyl by 'n ander pasiënt (pasiënt ST) transferrienpatrone waargeneem is wat ooreenstem met gepubliseerde patrone vir CDG tipe 3. 'n Pasiënt (pasiënt SN) wie se transferrienpatrone ooreenstem met bekende patrone vir CDG tipe 2, is ook geïdentifiseer en by 'n ander pasiënt (pasiënt DL) is 'n onbekende, maar onmiskenbaar abnormale transferrienpatroon opgemerk. Hierdie

pasiënte is almal klinies baie swak beskryf en verdere analises, waaronder ensiemanalises, moet uitgevoer word om hierdie resultate te bevestig.

Gedeeltes van hierdie studie is by die volgende kongresse voorgedra:

- Du Plessis, J.A., Swanepoel, M., Pretorius, P.J., Mienie, L.J., Erasmus, E., Knoll, D.P. The Study of Transferrin-glycosylation as a Marker for Glycosylation Defects. Inborn Errors of Metabolism Workshop, Potchefstroom, September 1998.
- Du Plessis, J.A., Swanepoel, M., Pretorius, P.J., Mienie, L.J., Erasmus, E., Knoll, D.P. The Study of Transferrin-glycosylation as a Marker for Glycosylation Defects. 2nd International Congress of the Federation of African Societies for Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 15th Congress of the South African Society for Biochemistry and Molecular Biology, Potchefstroom, Oktober 1998.

BEDANKINGS

Die volgende bedankings kom uit my hart:

- Here, my Vader, Jesus, my Verlosser en die Heilige Gees, my Trooster: aan U kom alle eer en dank toe. Laat nie my woorde of my stem nie, maar my hele lewe U lof besing.
- Jaco: dankie vir jou liefde, geduld met my en voortdurende aanmoediging. Jy is my inspirasie.
- Pa en Ma: dankie dat Ma-hulle my aangemoedig het om die beste te doen wat ek kan en alles te word wat ek kan wees.
- Prof. Piet Pretorius, my studieleier: groter of meer woorde kan nie my dankbaarheid vir al Prof. se moeite, geduld en hulp beter uitdruk nie. Ek kan net sê: baie, baie dankie.
- 'n Groot dankie aan Karin Vergeer, ons staatmaker, vir die hulp met die figure, rekenaarwerk en sommeer elke dag se vriendelike geselskap.
- Baie dankie aan prof. Japie Mienie, mnre. Lardus Erasmus en Detlef Knoll, Izelle Fourie en Mari Swanepoel vir hulle onderskeie bydraes en belangstelling in hierdie projek.
- Baie dankie aan Dr. André Esterhuysen vir die gereelde gebruik van Dok se rekenaar en vir die hulp met die literatuurverwysings.
- Dankie aan Suster Leonie Louw en ook die personeel van Witrand vir die verskaffing van bloedmonsters.
- Dankie aan Eldred Ekermans en Print Marketing vir die skandering van die figure en ook die druk- en bindwerk van dele van die verhandeling.
- 'n Laaste woord van dank aan Francois van der Westhuizen, Jaco Pieterse en Jacques van Onselen: julle is wonderlike vriende en dit is 'n plesier en 'n voorreg om saam met julle te werk.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Genetiese siektes word al lank deur medici en wetenskaplikes bestudeer. 'n Wye verskeidenheid van genetiese siektes is al bekend, maar nuwe genetiese siektes word gereeld ontdek en beskryf. Een so 'n groep siektetoestande wat onlangs (1980) eers beskryf is, is die "Carbohydrate-deficient glycoprotein" (CDG) sindrome. Hierdie siektetoestande het veral in die laaste vier tot vyf jaar sterk onder die soeklig gekom en tot en met Junie 1997 was ongeveer 250 pasiënte met hierdie sindroom gediagnoseer.

Die CDG-sindrome is 'n groep siektes wat verskillende kliniese simptome vertoon, maar gekenmerk word deur 'n belangrike gemeenskaplike faktor: die abnormale glikosilering van sommige glikoproteïene, veral transferrien. Transferrien is 'n glikoproteïen wat in die serum van meeste vertebrate voorkom en het twee glikosileringspunte, waarvan beide normaalweg geglikosileer word. By die CDG-sindrome en ook by alkoholisme word transferrien ondergeglykosileer en kan daarom as merker gebruik word in die diagnose van daardie patologiese toestande waar 'n glikosileringsdefek voorkom. Die glikosilering van transferrien word geanaliseer met behulp van IEF en die mikroheterogeniteit van transferrien kan duidelik waargeneem word na analise met hierdie tegniek. Mikroheterogeniteit is die verskynsel waar daar verskillende vorme van 'n spesifieke verbinding of molekule aangetref word. Die mikroheterogeniteit van transferrien kan aan drie oorsake toegeskryf word: genetiese polimorfisme, verskille in ysterinhoud en verskille in koolhidraatsamestelling van transferrien. Hierdie eienskappe van transferrien maak dit 'n ideale kandidaat vir die bestudering van glikosileringsdefekte.

Transferrien word dan ook veral in Europese lande baie algemeen gebruik as merker vir veral twee siektetoestande waar glikosileringsdefekte voorkom, naamlik die CDG-sindrome en alkoholisme. Geen navorsing aangaande die gebruik van transferrien as

merker van die CDG-sindrome is al in Suid Afrika gedoen nie en die doel van hierdie studie was dan die ontwikkeling van 'n standaard-tegniek om transferrienglikosilering te bestudeer, die analise van die transferrien van 'n aantal verskillende normaalpersone en die toepassing van hierdie gestandaardiseerde tegniek op monsters van verskillende alkoholiste en moontlike CDG-pasiënte.

In Hoofstuk 2 word die mees relevante inligting vanuit die literatuur en ook die doelstelling en benaderingswyse van die studie gegee (afdeling 2.6). In die daaropvolgende hoofstukke word onderskeidelik die materiale en metodes (Hoofstuk 3) en die resultate van die studie (Hoofstuk 4) gegee, terwyl die resultate in Hoofstuk 5 krities beskou en bespreek word en 'n gevolgtrekking daaruit gemaak word.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Die glikosilering van proteïene is van die belangrikste post-translasionele gebeure, want die oorgrote meerderheid proteïene wat in selle en biologiese vloeistowwe voorkom, is geglikosileer (Montreuil, 1995:1). Hierdie proteïene word glikoproteïene genoem en word aangetref in diere, plante, mikro-organismes en virusse.

Glikoproteïene is betrokke by verskeie belangrike fisiologiese prosesse, bv. dit is belangrike komponente van reseptore (Voet & Voet, 1995:273); glikoproteïene speel 'n belangrike rol by immuunreaksies omdat dit deel vorm van immunoglobulene (Mathews & Van Holde, 1990:293). Sommige glikoproteïene dien ook as merkers vir verskeie patologiese toestande bv. die CDG-sindrome (Jaeken *et al.* 1991:6) en alkoholisme (Stibler *et al.* 1979:275).

Hierdie molekules is 'n baie diverse groep makromolekules en word verder in hierdie hoofstuk bespreek. Verder word die onderskeie CDG-sindrome, transferrien as merker vir glikosileringsdefekte, asook die gebruik van iso-elektriese fokusering in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme, bespreek.

2.2 GLIKOPROTEÏENE

2.2.1 Geskiedkundige agtergrond

Daar was aan ons slegs beperkte bronne aangaande die geskiedkundige agtergrond en nuwe ontwikkelinge in die glikobiologie beskikbaar en hierdie afdeling word dan hoofsaaklik gebaseer op twee hoofbronne.

Glikoproteïene het eers in die laat sestigerjare werklik onder die soeklig gekom terwyl die chemiese eienskappe van eenvoudige suikers alreeds in die laat negentiende eeu beskryf is deur Emil Fischer (Dwek, 1996:153). In die jare tussen die twee wêreldoorloë is die ringstrukture van hierdie suikers deur Haworth en medewerkers beskryf (Dwek, 1996:153).

Glikoproteïene is in 1908 deur die “Committee on Protein Nomenclature of the American Society of Biochemists” geklassifiseer as: “compounds of the protein molecules with a substance or substances containing a carbohydrate group, other than nucleic acid” (Montreuil, 1995:1).

Die biologiese werking en belang van die glikoproteïene het egter minder aandag geniet as wat dit regverdig, omdat dit beskou is as molekules wat geen rol te speel het in die dra van biologiese inligting nie. Dit was ook moeilik, vanweë die tegniese beperkinge, om inligting aangaande die struktuur van glikoproteïene te bekom en om die suikerkomponente en die volgorde van hul koppeling aan die proteïene te bestudeer. Vandag is meer gevorderde tegnologieë beskikbaar en kan hierdie molekules met groter gemak bestudeer word. Die term “glikobiologie” word vandag gebruik om die bestudering van die rol van glikokonjugate in die funksionering van biologiese sisteme te beskryf (Montreuil, 1995:1).

2.2.2 Nuwe ontwikkelings in die glikobiologie

Daar is gespekuleer dat “Together with nucleic acids and proteins, carbohydrates represent the third dimension of molecular biology” (Montreuil, 1995:1). In Augustus 1990 het ‘n artikel in die Herald Tribune verskyn waarin voorspel word dat: “... in five years, there will be more companies with ‘glyco’ in their name than companies with ‘gene’ in their name today.” Hieruit is dit duidelik dat daar destyds groot verwagtinge gestel was in die toekoms en vooruitgang van die studie van glikokonjugate. Hierdie toedrag van sake kan toegeskryf word aan die ontdekking van verskillende belangrike

funksies van glikokonjugate. Veral twee ontdekkings het die molekulêre eienskappe van glikokonjugate op die voorgrond geskuif: Ashwell en Morell beskryf in 1968 dat glikane dien as uitkenningspunte vir die hepatosietmembraanproteïene, lektien (Montreuil, 1995:7). Hierdeur word dit bekend dat die glikane op bloedserum-proteïene hul lewensydperke bepaal deurdat desialering van bloedserum-proteïene lei tot die uitkenning van hierdie proteïene vir degradasie deur hepatosiete.

Burger en Goldberg en ook Inbar en Sachs beskryf dat die primêre struktuur van glikane in kankerselle dramaties anders is as in normale selle (Montreuil, 1995:7). Dit is moontlik dat hierdie modifikasies verantwoordelik is vir die anargistiese gedrag van kankerselle. Hierdie twee verskynsels het die belang van glikokonjugate onder die soeklig gebring en het gelei tot verdere ontwikkelinge in die veld van glikobiologie.

Die bepaling van die primêre struktuur van glikane het in 1977 'n hupstoot gekry deur die toepassing van hoëveld ^1H -KMR spektroskopie deur Vliegthart en Montreuil se groepe. A.g.v. die ontwikkeling van X-straaldiffraksie en KMR het daar tussen 1974 en die vroeë tagtigerjare heelwat inligting na vore gekom t.o.v. die drie-dimensionele struktuur van die glikoproteïene (Montreuil, 1995:9). Tot in die vroeë 1980's was dit nog moeilik om die primêre struktuur van glikoproteïene te bepaal maar in 1983 het die Monsanto Company en Oxford Universiteit 'n tegnologie ontwikkel (Dwek, 1996:154) wat dit moontlik gemaak het om die oligosakkariedvolgorde van glikokonjugate te bepaal deur die monosakkariede vry te stel, te isoleer en die suikervolgordes in nanomol hoeveelhede te bepaal.

Bogenoemde faktore het daartoe bygedra dat glikobiologie meer aandag geniet en dat daar tans baie belangstelling is in die bestudering van glikokonjugate, hul struktuur en funksies. Daar is inderdaad vandag baie nuwe inligting aangaande die glikoproteïene op die Internet beskikbaar en verskeie bladsye op die Internet wat aan die glikobiologie gewy word.

2.2.3 Die struktuur van glikoproteïene

Tot onlangs was net die strukture van musiene, polisakkariede uit bindweefsels, serumglikoproteïene en glikoproteïene in eierwitte bekend. Met die verbetering van die isolasie- en analitiese tegnieke is daar vandag tot soveel as 15 000 unieke koolhidraatstrukture bekend (Vliegthart & Montreuil, 1995:13).

Verskeie nuwe tegnieke word vandag aangewend in die bestudering van glikokonjugate.

Van hierdie tegnieke sluit in:

- verbeterde isolerings- en suiweringsmetodes
- verbeterde chemiese en ensiematiese tegnieke vir die splyting van glikosidiese bande
- glikaanpermetilering en identifikasie van gemetileerde monosakkariede deur GLC-MS
- direkte analise van glikane deur MS-MS, FAB-MS en MALDI-TOF-MS

Verskeie monosakkariede is al lank bekend, o.a. D-galaktose, D-mannose, L-fukose, N-asetiel-D-glukosamien, N-asetiel-D-galaktosamien en verskeie sialiensure. Oligosakkariede wat voorheen as skaars geklassifiseer is, kan nou makliker geïdentifiseer word in sakkariedkettings weens hierdie verskeidenheid van nuwe tegnieke wat beskikbaar is.

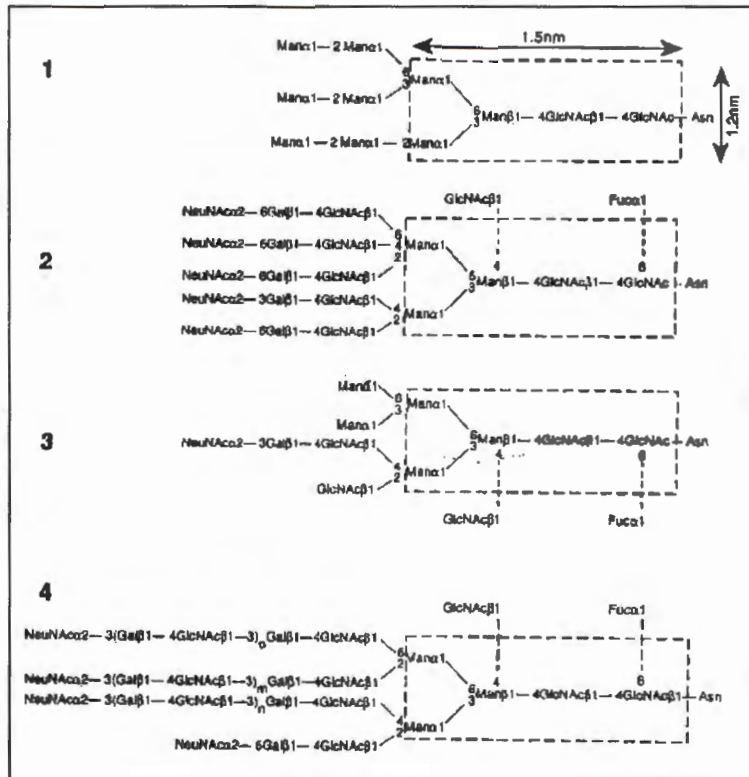
Die meerderheid van sel-oppervlak en gesekreterde proteïene is geglikosileer met die koolhidraatgroep kovalent gebind aan die peptied d.m.v. 'n N-atoom (vanaf die aminosuur asparagien), 'n O-atoom (vanaf die aminosure serien, treonien of hidroksilisien) of met behulp van 'n glikosiefosfatidielinositol-arm (Voet & Voet, 1995:271). Die strukture van hierdie glikoproteïene word in die volgende paragrawe beskryf.

2.2.3.1 N-gekoppelde glikane

Vir die N-gekoppelde glikane is dit bekend dat die asparagienresidu waaraan die oligosakkariedgroep gebind word, moet voorkom in 'n spesifieke tripeptied, nl. Asn-X-Ser (waar X enige aminosuur kan wees behalwe prolien), alhoewel nie alle Asn-X-Ser geglikosileer word nie (Dwek, 1996:163). Tot onlangs was slegs die N-glikosielbinding tussen N-asetielglukosamien en asparagien beskryf, maar vandag is bindings tussen asparagien en verskeie ander suikers, waaronder glukose en N-asetielgalaktosamien, ook al beskryf (Mathews & Van Holde, 1990:291; Vliegthart & Montreuil, 1995:18; Voet & Voet, 1995:271).

Alle N-gekoppelde glikane bevat die kernsakkaried ($\text{mannose}\alpha 1-6$ ($\text{mannose}\alpha 1-3$) $\text{mannose}\beta 1-4$ $\text{GlcNAc}\beta 1-4$ GlcNAc) waaraan verskeie ander glikaangroepe gebind word. N-gekoppelde glikoproteïene kan in vier groepe ingedeel word o.g.v. die ligging en struktuur van glikaanresidue wat tot die tri-mannosielkern gevoeg word (kyk figuur 2.1) (Mathews & Van Holde, 1990:291-293; Voet & Voet, 1995:609,613-614; Dwek, 1996:163).

1. Oligomannose: hierdie glikane bevat slegs α -mannosielresidue
2. Kompleks: hierdie glikaangroepe het antennas met N-asetielglukosamienresidue op die reducerende termini. Tussen twee en vyf antennas kan voorkom.
3. Hibried: hierdie glikane toon eienskappe van beide die komplekstipe en hoë mannose-tipe. Een of twee α -mannosielresidue is gekoppel aan die $\text{mannose}\alpha 1-6$ arm van die kern en daar is een of twee antennas aan die $\text{mannose}\alpha 1-3$ arm.
4. Poli-GalNAc: hierdie groep bevat herhalende eenhede van ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3$) wat aan die kern geheg is. Hierdie antenna is nie eweredig oor die kern versprei nie en die galaktose-ketting kan self ook vertak wees.



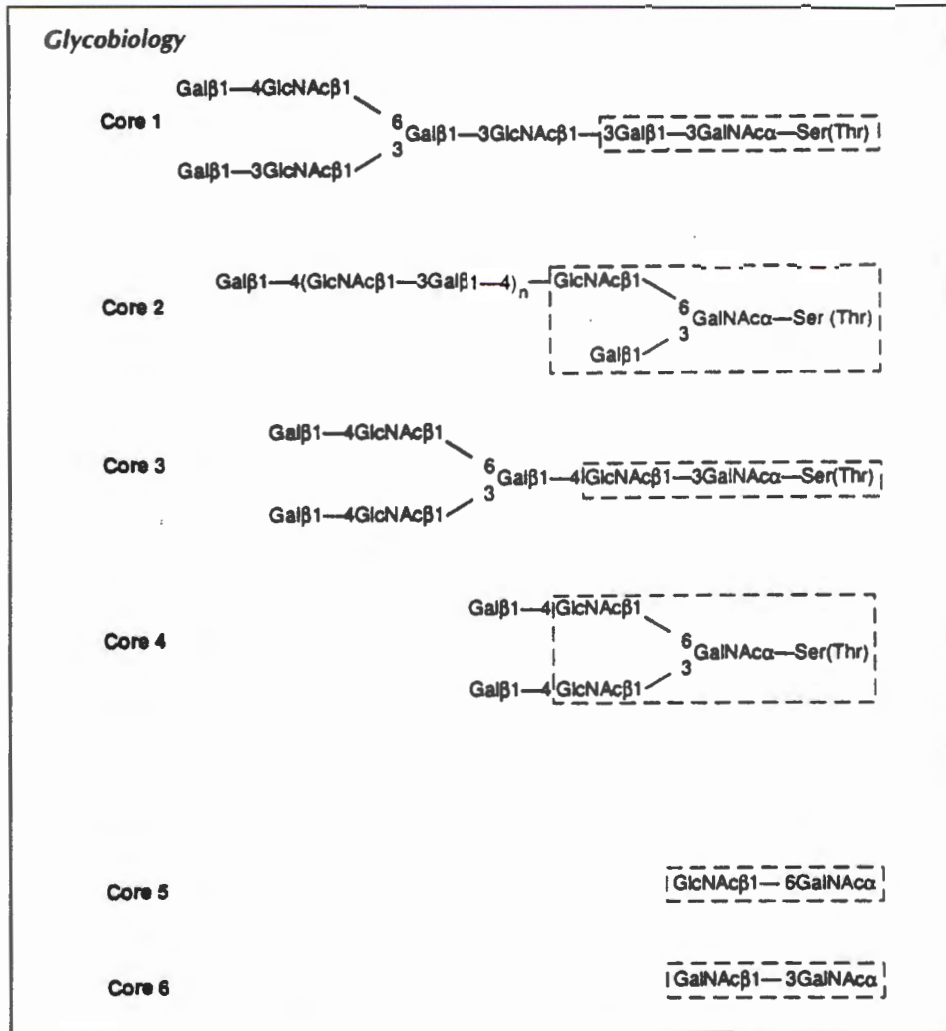
Figuur 2.1: N-gekoppelde glikane
(Dwek, 1996:165-166)

2.2.3.2 O-gekoppelde glikane

O-gekoppelde glikane het nie hierdie enkele gemeenskaplike kern-struktuur nie, maar kan een van ses kerne bevat (Dwek, 1996:168) (kyk figuur 2.2). Hierdie glikaangroepe word meestal aan serien / treonien gebind deur GalNAc (Mathews & Van Holde, 1990:293; Voet & Voet, 1995:272-273,609, 615), maar dit kan ook geskied deur ander residue soos bv. fukose. Enkelglikane kan ook O-gekoppel word aan peptiede.

Die O-binding tussen glikane en peptiede is in die 1960's bevestig deur 'n β -eliminasiereaksie wat die alkali-labiliteit van die suiker- β -hidroksi-aminosuurbindinge tussen glikane en serien of treonien bewys het deur hierdie bindings te splyt. Onlangse inligting (Dwek, 1996:163) dui daarop dat 'n konsensusvolgorde (Gly-Gly-Ser-Thr) O-

fukosilering by epidermale groeifaktore bevoordeel en ook dat 'n proliesresidu op posisie -1 of +3 glikosilering bevoordeel vir O-gekoppelde glikane (Dwek, 1996:163).



Figuur 2.2: O-gekoppelde glikane
 (Dwek, 1996:169)

2.2.3.3 Glikofosfatidielinositol-gekoppelde glikane

'n Derde tipe koppeling tussen glikane en proteïene word aangetref by seloppervlakproteïene: glikane word in 'n lipiedlaag ingevoeg d.m.v. 'n glikofosfatidielinositol (GPI) anker (Voet & Voet, 1995:609). In hierdie geval kan slegs een van ses aminosure as aanhegtingspunt vir die glikaan dien: sisteïen, aspartiensuur, asparagien, glisien, alanien of serien (CDNGAS) (Dwek, 1996:163). Glisien, alanien en

serien kom gewoonlik in hierdie gevalle op posisie +1 voor en moet vir glikosilering ook in posisie +2 wees.

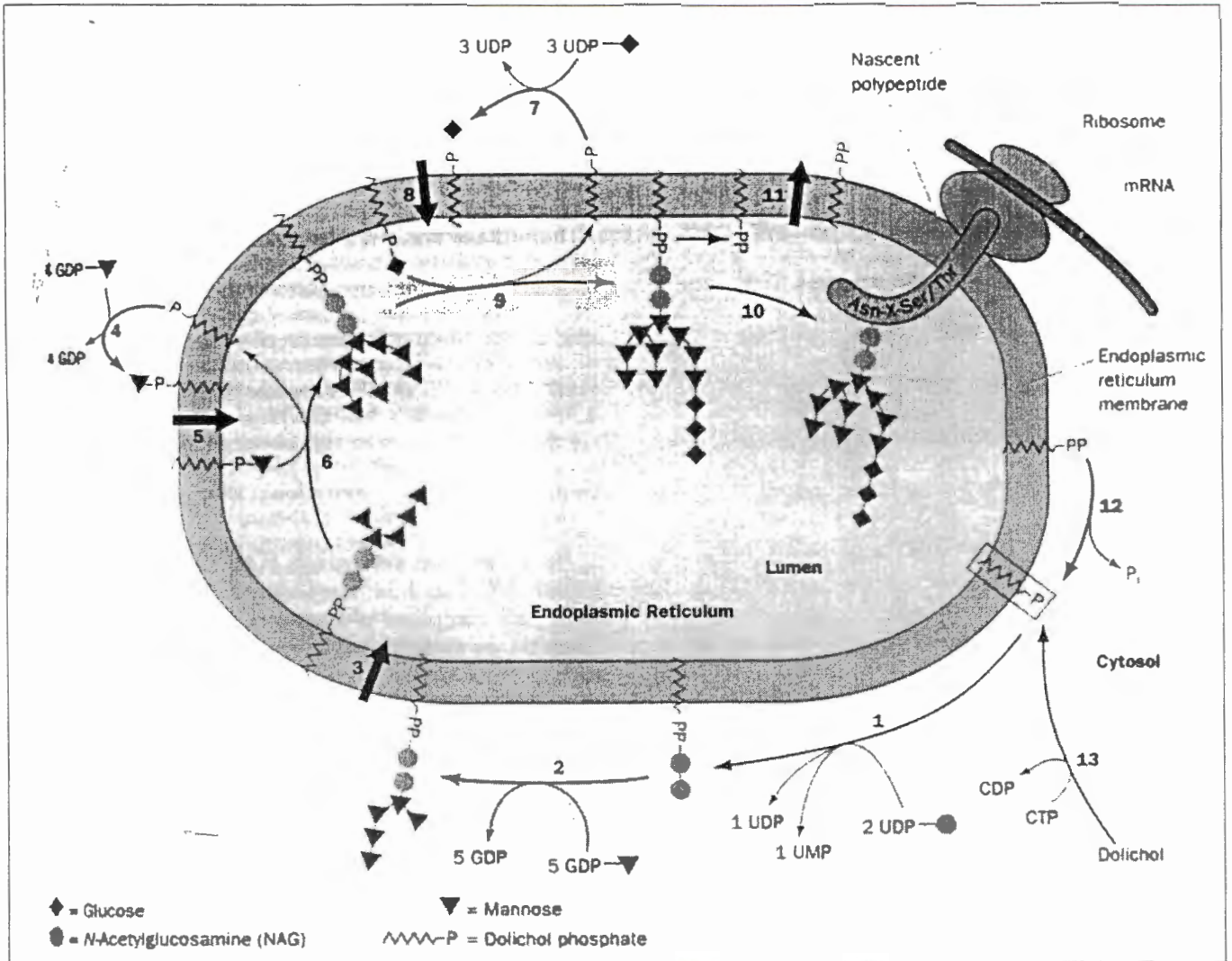
2.2.4 Die sintese van glikoproteïene

Die glikosilering van proteïene, asook die prosessering van oligosakkariede, speel 'n belangrike rol in die sortering en vervoer van proteïene na hul verskillende sellulêre bestemmings. Onder fisiologiese toestande is die vorming van glikosidiese bande 'n proses wat energie vereis en tydens hierdie proses word monosakkariede omgeskakel na nukleotiedsuikers; hierdie suikers se anomeriese koolstof is 'n goeie verlatende groep. Met die hulp van glikosieltransferase word glikosidiese bandvorming dus gefasiliteer (Voet & Voet, 1995:609) met veral UDP, GDP en CMP wat by hierdie proses betrokke is. Glikoproteïensintese geskied in twee hoofstappe: die sintese van die polipeptied op die ribosoom en die byvoeging en modifikasie van die sakkariedkomponent.

Die drie glikoproteïengroepe se sinteseweë word apart beskryf.

2.2.4.1 Sintese van N-gekoppelde glikane

N-gekoppelde glikoproteïene word in vier stadia gesintetiseer (figuur 2.3). Hierdie proses begin in die endoplasmiese retikulum en word voltooi in die Golgi-apparaat. Die eerste stap is die sintese van die oligosakkariedgroep as 'n lipied-gekoppelde voorganger waarby dolichol betrokke is om die polisakkaried aan die ER-membraan te anker. Dolichol is aan die polisakkaried gebind d.m.v. 'n piro-fosfaatbrug. Die gemeenskaplike kern-oligosakkaried word gevorm deur die stapsgewyse byvoeging van monosakkaried-eenhede met die hulp van spesifieke glikosieltransferases. Alhoewel nukleotiedsuikers die mees algemene bron van monosakkariede is, kan mannosiel- en glikosielresidue ook vanaf hul ooreenstemmende dolichol-fosfate oorgedra word in glikosieltransferasereaksies.



Figuur 2.3: Sintese van N-gekoppelde glikane (Voet & Voet, 1995:615)

Sommige van die reaksies in hierdie proses vind aan die sitoplasmiese kant van die ER-membraan plaas, terwyl sommige in die lumen van die ER plaasvind. Dit is dus noodsaaklik dat van die intermediêre translokasie moet ondergaan vanaf die sitoplasmiese gebied tot in die lumen en ook omgekeerd, maar die meganismes van translokasie is onbekend.

Nadat die kern-oligosakkaried gesintetiseer is, word hierdie oligosakkaried-lipied aan die polipeptied gebind terwyl peptidsintese nog plaasvind. Hierdie oordrag vind plaas d.m.v.'n membraangebode oligosakkaried oordragensiem, wat die Asn-X-Ser volgorde uitken. Slegs sowat 'n derde van hierdie volgordes word egter geglikosileer omdat glikosilering by voorkeur plaasvind waar die volgorde voorkom op 'n β -draai, sodat die amiedgroep van die asparagien in 'n waterstofbinding is met die serien se hidroksiel O-atoom.

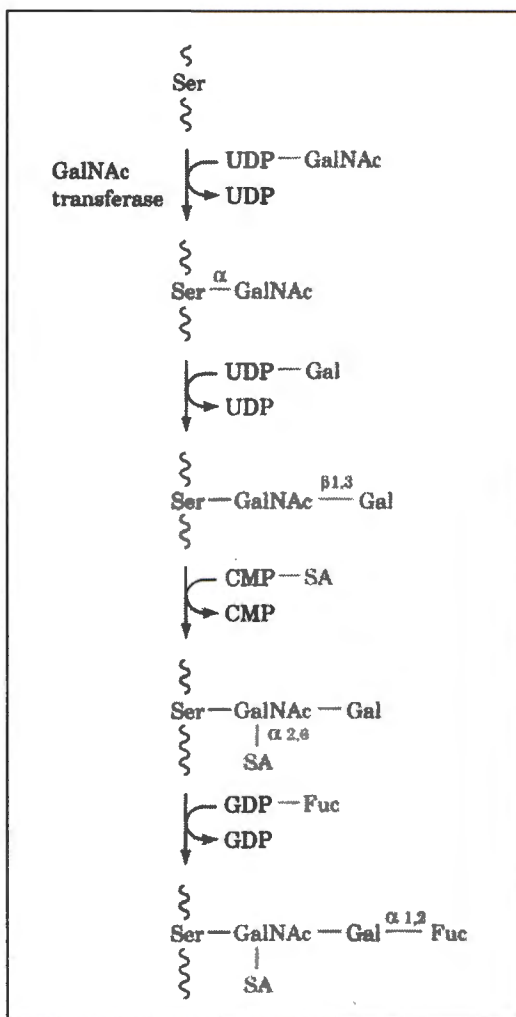
Die primêre glikoproteïen se prosessering begin in die ER met die ensimatiese verwydering van glukoseresidue en ook 'n mannoseresidu, waarna die proteïen in vesikels na die Golgi-apparaat vervoer word, waar dit in die *cis* Golgi-apparaat inbeweeg en deur die sisternae beweeg. Hier vind verskeie ander modifikasies plaas en die volwasse glikoproteïen beweeg dan deur die *trans* Golgi-apparaat waar dit gesorteer word vir versending na die sellulêre bestemming. Na prosessering bevat alle N-gekoppelde glikane die (NAG)₂ (Mannose)₃ kernsakkaried.

(Saamgestel uit: Mathews & Van Holde, 1990:559-562; Hemming, 1995:127-129; Schachter, 1995:123-124; Vliegthart & Montreuil, 1995:17-19; Voet & Voet, 1995:609-615; Dwek, 1996:168-171)

2.2.4.2 Sintese van O-gekoppelde glikane

O-gekoppelde oligosakkariede word post-translasioneel gevorm in die Golgi-apparaat deur die stapsgewyse byvoeging van monosakkariedeenhede aan die volledige polipeptied (figuur 2.4). Die proses begin met die oordrag van 'n N-asetielgalaktosamienresidu vanaf

UDP-GalNAc na 'n serien/treonienresidu in die polipeptied d.m.v. GalNAc-transferase. Die posisie van die glikosileringspunt word bepaal deur die sekondêre en / of tersiêre struktuur van die proteïen. Verdere glikosilering geskied dan deur opeenvolgende byvoeging van galaktose, sialiensuur, NAG en fukose deur die ooreenstemmende glikosieltransferases. (Saamgestel uit: Mathews & Van Holde, 1990:559; Vliegthart & Montreuil, 1995:17-19; Voet & Voet, 1995:615; Dwek, 1996:168-171)



Figuur 2.4: Sintese van O-gekoppelde glikane
(Voet & Voet, 1995:615)

2.2.4.3 Sintese van glikofosfatidielinositol-gekoppelde glikane

Glikosiefosfatidielinositolgroepe (GPI-groepe) tree op as ankers vir 'n verskeidenheid proteïene in die eksterne oppervlak van die eukariotiese plasmamembraan. Die ankering is moontlik a.g.v. die trans-amidering van 'n glikolipied, met oordrag van 'n teikenproteïen na die ER. Die kern-GPI word gesintetiseer aan die lumen-kant van die ER-membraan uit fosfatidiel-inositol, UDP-NAG, dolichol-P-mannose en fosfatidieletanolamien. Die kern varieer afhangende van die organisme en proteïen waaraan dit geheg is.

(Saamgestel uit: Voet & Voet, 1995:316-317,617; Dwek, 1996:179-180)

2.2.5 Funksies van glikoproteïene

Glikoproteïene speel 'n fundamentele rol in verskeie biologies belangrike prosesse. Tot 75% van alle proteïene is geglikosileer en glikoproteïene as 'n groep het uiteenlopende funksies. Van die belangrikste funksies is:

- Glikoproteïene is noodsaaklik vir die vorming en instandhouding van die korrekte proteïenkonformasie tydens proteïensintese. Dit stabiliseer die konformasie deur middel van proteïen-glikaan of glikaan-glikaan interaksies (Montreuil, 1995:2).
- Die oligosakkariedkettings van glikoproteïene speel 'n rol in die bepaling van die lewenstydperk van sirkulerende glikoproteïene deurdat desialering lei tot afbraak van hierdie molekules deur hepatosiete (Mathews & Van Holde, 1990:293; Montreuil, 1995:3).
- Glikoproteïene is ook betrokke by selherkenning, aanhegting en selkontakinhibisie. Glikoproteïene is dikwels transmembraanproteïene: die peptiedgedeelte is in die lipiedlaag van die membraan geleë terwyl die oligosakkaried na die buitekant van die sel wys. Hierdie punt dien dan as uitkenningspunt (Voet & Voet, 1995:617).
- Glikoproteïene is belangrike komponente van immunoglobuliene: elke immunoglobulien dra aan die konstante gebied van die swaar ketting verskeie

koolhidrate (Mathews & Van Holde, 1990:292-293). Hierdie koolhidrate is noodsaaklik om die immunoglobulene uit te ken vir weefselverspreiding en interaksie met fagositiese selle. Die uitkenningsproses berus gedeeltelik op die struktuur van die oligosakkariedkettings.

- Glikoproteïene word dikwels in die selmembraan ingebou as noodsaaklike dele van reseptore (Voet & Voet, 1995:273). Reseptore het kort, stewige O-geglykosileerde gebiede, wat egter nie eweredig geglykosileer is nie, maar die oligosakkariede in groepe bevat. Die steriese en hidrofobe interaksies van hierdie groeperings veroorsaak dat die gebied in 'n uitgestrekte konformasie voorkom. Hierdie O-geglykosileerde gebiede koppel die glikoproteïen se membraanbindingsdomein aan die funksionele domein sodat die funksionele domein bo die seloppervlak-glikokaliks uitsteek sodat interaksie tussen die funksionele domein en makromolekules wat nie die glikokaliks kan binnedring nie, kan plaasvind.
- Glikoproteïene kan egter ook as antigene optree (Mathews & Van Holde, 1990:294). Veral die selwande van bakterieë, in besonder die peptidoglikane, kan immunologiese reaksies uitlok (Voet & Voet, 1995:270). Selfs net die inspuit van hierdie molekules in die menslike liggaam kan die immuunstelsel aktiveer (Berger & Beger, 1987:289). Die peptidoglikaangedeelte van die selwand bestaan uit herhalende eenhede van β 1-4N-asetielglukosamien en N-asetielmuramiensuur wat in lae met kruisbindings aan mekaar gebind is en vir die patogenisiteit van bakteriese selwande verantwoordelik is.

2.3 DIE “Carbohydrate-deficient Glycoprotein” (CDG) SINDROME

2.3.1 Inleiding

Die “Carbohydrate-deficient Glycoprotein” of CDG-sindrome is genetiese afwykings wat outosomaal resessief oorgedra word (Stibler & Cederberg, 1993:55; Henry *et al.* 1997:412). Dit is 'n koolhidraatdefek in gesekreterde glikoproteïene (Stibler *et al.* 1994:552; Barone *et al.* 1998:167) en vertoon multi-sistemiese simptome met ernstige senuweestelsel betrokkeheid (Jaeken *et al.* 1991:6; Henry *et al.* 1997:413). Die sentrale

en perifere senuweestelsel word beïnvloed, maar die graad kan varieer in verskillende individue. 'n Gemeenskaplike kenmerk is 'n gedeeltelike tekort aan sialiensuur, galaktose en N-asetielglukosamiengroepe van transferrien en verskeie ander serum glikoproteïene (Jaeken *et al.* 1991:6).

Meeste CDG-pasiënte toon psigomotoriese vertraging, terwyl groeivertraging, lewersiektes as babas (Yuasa *et al.* 1995:13), perifere neuropatie, koma-agtige episodes, epilepsie en subkutaneuse lipodistrofie (Jaeken *et al.* 1991:8; Stibler & Cederberg, 1993:55) ook opgemerk is. Retinitis pigmentosa (Andreasson *et al.* 1992:525; Barone *et al.* 1998:167), hipogonadisme en ook premature veroudering kan voorkom (Stibler *et al.* 1994:553).

Onlangse studies het egter getoon dat alle pasiënte nie noodwendig verstandelike vertraging of neurologiese versteurings vertoon nie (Nieheus *et al.* 1998:1414,1420). Die diagnose van hierdie sindrome moet dus nie beperk word tot pasiënte met neurologiese versteurings nie.

Die mortaliteitsyfer van hierdie sindrome word beraam op tussen 15 en 20% in die eerste paar lewensjare. Die pasiënte sterf gewoonlik a.g.v. erge infeksies, kardiomiopatie of lewersaking (Stibler *et al.* 1994:555; Matthijs *et al.* 1997:88).

'n Belangrike biochemiese eienskap van hierdie sindrome is verhoogde vlakke van disialotransferrien en die teenwoordigheid van asialotransferrien in sommige gevalle (Stibler *et al.* 1994:555; Yuasa *et al.* 1995:13). Hierdie vorme van transferrien is ondergeglisosileer (Van Schaftingen & Jaeken, 1995:318) en kort een of twee N-gekoppelde bi-antennêre oligosakkariedkettings. Hierdie vorme van transferrien staan bekend as "Carbohydrate-deficient Transferrin" of CDT (Stibler & Cederberg, 1993:55) en dien as merkers vir die CDG-sindrome (Stibler *et al.* 1994:556) en alkoholisme (Löf *et al.* 1993:175).

Die CDG-sindrome word onderverdeel in vier tipes o.g.v. kliniese simptome (Henry *et al.* 1997:413). Hierdie vier tipes sal nou in meer besonderhede beskryf word.

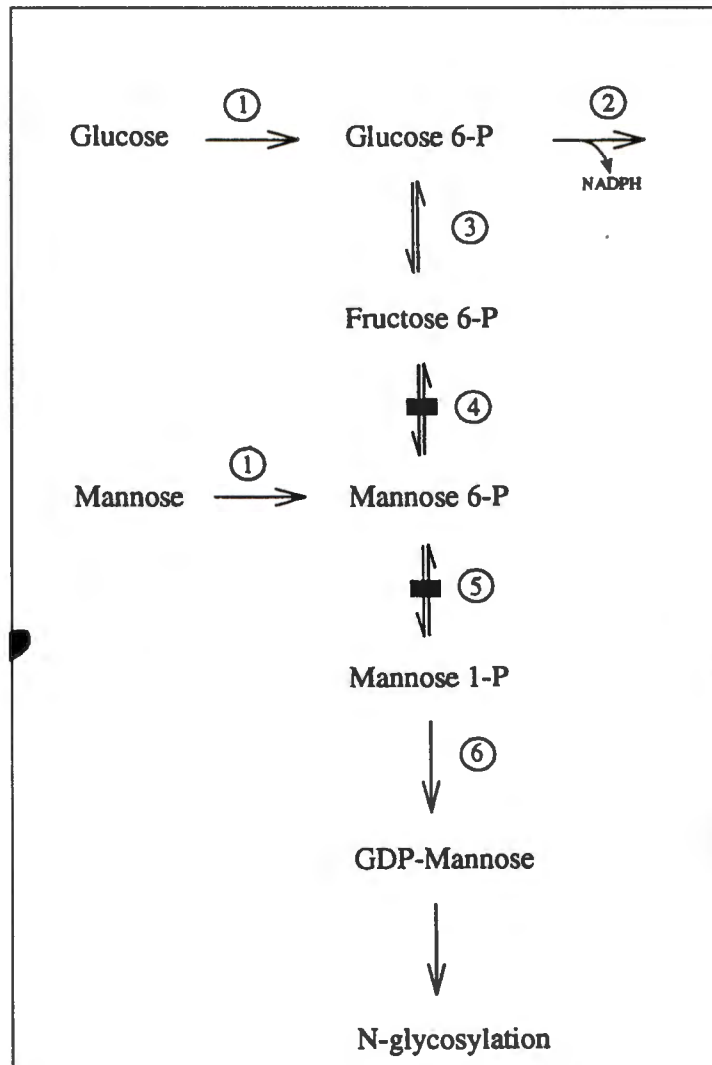
2.3.2 CDG-sindroom tipe 1

2.3.2.1 Insidensie en beskrywing

Hierdie sub tipe van die sindroom is die beste beskryf en verskeie pasiënte is al gediagnoseer met hierdie tipe. In 1980 is die eerste pasiënte met hierdie defek beskryf (Jaeken *et al.* 1991:6). Hierdie pasiënte was 'n tweeling van twee jaar wat 'n aantal abnormaliteite van die sentrale en perifere senuweestelsel gehad het en ook afwykings in verskeie glikoproteïene getoon het (Jaeken *et al.* 1991:6; Stibler *et al.* 1994:552). Tot en met Junie 1997 was daar in totaal ongeveer 250 pasiënte met hierdie siekte bekend, waarvan die meeste gediagnoseer is as CDG-sindroom tipe 1 (Jaeken *et al.* 1997:447; Barone *et al.* 1998:167).

Die CDG-sindroom tipe 1 self word onderverdeel in twee subtypes: tipe 1A en tipe 1B (Nieheus *et al.* 1998:1414). Hierdie twee tipes word van mekaar onderskei o.g.v. die molekulêre basis van die siekte en verskillende kliniese simptome. Tipe 1A word veroorsaak deur 'n defek in die fosfomannomutase-ensiem (PMM) (figuur 2.5), betrokke by die omskakeling van mannose-6-fosfaat na mannose-1-fosfaat (Van Schaftingen & Jaeken, 1995:318-319; Barone *et al.* 1998:167), terwyl pasiënte wat ly aan tipe 1B 'n defek toon van die fosfomannose isomerase ensiem (PMI) (Nieheus *et al.* 1998:1419), 'n ensiem betrokke by die omskakeling van glukose na mannose (figuur 2.5). Mannose word uiteindelik omvorm na GDP-mannose, 'n belangrike voorganger in die sintese van dolichol-gekoppelde oligosakkariede (Voet & Voet, 1995:609-615). Aangesien hierdie siekte tans geklassifiseer word o.g.v. transferrienpatrone wat met iso-elektriese fokusering verkry word (verhoogde disialotransferrien en die teenwoordigheid van asialotransferrien in die serum), en die patrone wat waargeneem word vir die PMM-defek dieselfde vertoon as patrone verkry vanaf persone met die PMI-defek, word hierdie twee subtypes steeds

geklasseer as CDG-sindroom tipe 1 (Jaeken *et al.* 1997:447; Nicheus *et al.* 1998:1419).



Figuur 2.5: Metaboliese weë van mannose
(Nicheus *et al.* 1998:1417)

2.3.2.2 Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 1A

Hierdie sub tipe vertoon verskeie simptome waarvan die mees algemene een psigomotoriese vertraging is (Stibler *et al.* 1994:552; Barone *et al.* 1998:167). Verder kom veral in die eerste jaar van lewe ernstige voedingsprobleme en vomering voor

(Stibler *et al.* 1994:552; Henry *et al.* 1997:413), terwyl daar in die neonatale periode ook hipotonie, ataksia, apatiese episodes, groeivertraging (Henry *et al.* 1997:413), subkutaneuse lipodistrofie, omgekeerde tepels (Jaeken *et al.* 1992:8) en koaguleringsdefekte wat as trombose, oormatige bloeding of beroerte-agtige episodes presenteer (Nieheus *et al.* 1998:1414), kan voorkom. Serebellêre atrofie, retinitis pigmentosa, strabismus en vatbaarheid vir infeksies is ook opgemerk (Henry *et al.* 1997:413).

Verskeie orgaansisteme word aangetas, bv. lewerdisfunksie kan ontwikkel en renale disfunksie (Henry *et al.* 1991:413), hartversaking en selfs perikardiale effusie kan ook voorkom (Jaeken *et al.* 1991:8; Kristiansson *et al.* 1998:121). In die kleuterjare kom motoriese disfunksie meer prominent in die onderste ledemate voor as in die boonste ledemate, retinitis pigmentosa is meer opmerklik en beroerte-agtige episodes is meer algemeen (Stibler *et al.* 1994:552). In die tienerjare is 'n kort postuur kenmerkend by baie van die pasiënte tesame met 'n opmerklike kropbors (Jaeken *et al.* 1991:6; Stibler *et al.* 1994:553). In hierdie jare neem die vatbaarheid vir infeksies, die hepatiese en kardiaale simptome af en pasiënte wat volwassenheid bereik, vertoon 'n permanente stabiele neurologiese sindroom. Vroulike pasiënte vorder nie verby puberteit nie, terwyl manlike pasiënte wel sekondêre seksuele ontwikkeling ondergaan (Jaeken *et al.* 1991:11; Stibler *et al.* 1994:553).

Sommige pasiënte kan wel praat en eenvoudige opdragte uitvoer en alhoewel hulle op hul hande en voete kan voortskuifel, ontwikkel voortbeweging selde verder as hierdie stadium (Jaeken *et al.* 1991:11).

Die biochemiese manifestasie van hierdie sub tipe word gekenmerk deur hypoalbuminemie en hipocholesterolemie wat na die ouderdom van 1 jaar minder prominent word (Jaeken *et al.* 1991:12). Met analise van verskeie glikoproteïene is abnormale vorms van transferrien en ander glikoproteïene opgemerk (Yuasa *et al.* 1995:13; Henry *et al.* 1997:413). Die pasiënte kan effens anemies wees en verhoogde

serum-aminotransferases toon (Jaeken *et al.* 1991:9), terwyl 'n algemene biochemiese kenmerk verhoogde vlakke van CDT is (Stibler *et al.* 1994:552; Jaeken *et al.* 1997:447). Transferrien is by hierdie pasiënte ondergeglkosileer met hele oligosakkariedkettings wat nie op die glikosileringspunt ingekorporeer word nie (Yuasa *et al.* 1995:13; Nieheus *et al.* 1998:1414).

Verskeie ander serumglikoproteïene vertoon ook abnormale glikosilering, waaronder transportproteïene, koaguleringsfaktore en -inhibeerders en ook die immunoglobuliene (Barone *et al.* 1998:168). Verder is verhoogde serum aktiwiteit van lisosomale ensieme en lisosomale insluitingsliggaampies ook al waargeneem (Barone *et al.* 1998:168). Die lisosomale ensiemaktiwiteite van veral β -galaktosidase, β -glukuronidase, arielsulfatase A en β -heksoosaminidase kan tussen twee en tien maal verhoog wees, maar die rede hiervoor is nie bekend nie.

2.3.2.3 Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 1A

Die CDG-sindroom tipe 1A maak tot 80% van alle CDG-sindroom tipe 1-lyers uit (Barone *et al.* 1998:167; Nieheus *et al.* 1998:1414). Hierdie sub tipe word veroorsaak deur 'n defek in die fosfomannomutase-ensiem (PMM), 'n defek wat lei tot 'n afwyking in die inkorporasie van mannose in oligosakkariedkettings tydens die vroeë stadia van die sintese van hierdie oligosakkariede (Jaeken *et al.* 1997:448; Nieheus *et al.* 1998:1414).

PMM is verantwoordelik vir die omskakeling van mannose-6-fosfaat na mannose-1-fosfaat (figuur 2.5), wat noodsaaklik is vir die beginstappe van glikosilering van glikoproteïene (Van Schaftingen & Jaeken, 1995:318; Barone *et al.* 1998:167). Hierdie tipe word as 'n outosomaal resessiewe siekte oorgedra en die lokus van die defek is geleë op chromosoom 16p13.3 tot 16p13.12 (Henry *et al.* 1997:413; Matthijs *et al.* 1998:542). Daar is waargeneem dat die PMM-ensiem self, eerder as 'n regulatoriese geen van PMM, defektief is (Jaeken *et al.* 1995:319). Hierdie geen, *pmm2*, is onlangs gekloneer en is dit bevestig dat hierdie geen wel die oorsaak is van die CDG-sindroom tipe 1A (Matthijs *et*

al. 1998:543). 'n Tweede PMM-geen, *pmm1*, is op chromosoom 22q13 aangetoon (Matthijs *et al.* 1997:88). Onlangse studies toon dat bykans alle CDG tipe 1A pasiënte mutasies in die *pmm2*-geen het (Jaeken *et al.* 1998:1535) en dat, hoewel die mutasies van mekaar mag verskil, dit meestal “missense” mutasies is (Matthijs *et al.* 1998:547). Geen mutasies is tot dusver op *pmm1* aangetoon nie.

2.3.2.4 Behandeling van CDG-sindroom tipe 1A

Tot op hede is baie min bekend ten opsigte van die behandeling van hierdie siekte. Studies t.o.v. behandeling met mannose is al beskryf, maar hierdie studies het nog geen klinklare oplossing gebring nie. Fibroblaste van persone met CDG-sindroom tipe 1A is gekweek en mannose is by die medium gevoeg en is daar waargeneem dat hierdie behandeling van die selkultuur die nadelige effekte van die PMM-defek teëwerk (Marquardt *et al.* 1997:389), maar dit is egter te vroeg om definitiewe behandelingswyses voor te stel.

2.3.2.5 Kliniese simptome van CDG-sindroom tipe 1B

Verskeie pasiënte wat die karakteristieke CDG tipe 1 transferrienpatroon vertoon, maar normale PMM-aktiwiteit het, is al beskryf (Charlwood *et al.* 1997:817; Jaeken *et al.* 1998:1535) en geklassifiseer as 'n variant van CDG tipe 1 (Charlwood *et al.* 1997:825). Hierdie tipe is later CDG tipe 1B genoem (Nieheus *et al.* 1998:1414) en vertoon 'n ander kliniese beeld as tipe 1A. Daar is waargeneem dat pasiënte wat aan hierdie tipe ly, milde of geen psigomotoriese vertraging toon nie (De Koning *et al.* 1998:38; Nieheus *et al.* 1998:1420) en die tipe presenteer eerder as 'n gastro-intestinale siekte (Jaeken *et al.* 1998:1535) met diarree, vomering (Charlwood *et al.* 1997:818; Nieheus *et al.* 1998:1414), trombose en erge bloeding (Nieheus *et al.* 1998:1414). Lisosomale insluitingsliggaampies is ook opgemerk, terwyl erge hipoproteïenemie, anemie en tekort aan antitrombin ook kan voorkom (Charlwood *et al.* 1997:818, Nieheus *et al.* 1998:1416). Chronies verlaagde vlakke van albumien en verhoogde vlakke van

aminotransferases is beskryf (De Koning *et al.* 1998:39). Die transferrienpatroon na iso-elektriese fokusering stem ooreen met die van CDG-sindroom tipe 1A (De Koning *et al.* 1998:39; Jaeken *et al.* 1998:1536; Nieheus *et al.* 1998:1416), maar hierdie tipe word onderskei van tipe 1A o.g.v. kliniese kenmerke en die molekulêre basis van die siekte.

2.3.2.6 Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 1B

Hierdie sub tipe word veroorsaak deur 'n defek van die fosfomannose isomerase ensiem (PMI) (De Koning *et al.* 1998:41; Jaeken *et al.* 1998:1535; Nieheus *et al.* 1998:1417). Die ensiem is noodsaaklik vir die omskakeling van fruktose-6-fosfaat na mannose-6-fosfaat (figuur 2.5), 'n stap in die produksie van GDP-mannose, wat 'n noodsaaklike verbinding in die N-glikosilering van proteïene is. Hierdie defek word veroorsaak deur 'n mutasie in die PMI-geen (verplasing van Arg219 deur Gln219 a.g.v. puntmutasie in geen) (Nieheus *et al.* 1998:1417). Defekte op ander gebiede van die geen is ook al beskryf: puntmutasies op posisies 304 en 413 veroorsaak aminosuursubstitusies wat kan lei tot verlies van aktiwiteit van die ensiem (Jaeken *et al.* 1998:1536).

2.3.2.7 Behandeling van CDG-sindroom tipe 1B

Die PMI-defek lei tot verminderde sintese van mannose-6-fosfaat vanuit glukose in die liggaam (De Koning *et al.* 1998:39; Nieheus *et al.* 1998:1418) (figuur 2.5). Mannose-6-fosfaat is van kritiese belang vir die glikosilering van proteïene en moet dus in die geval van 'n PMI-defek vanuit ander bronne verkry word. Orale mannose-terapie is op 'n pasiënt toegepas (Nieheus *et al.* 1998:1418-1419) en het binne 'n paar weke 'n drastiese vermindering in die kliniese simptome, veral bloeding en diarree, tot gevolg gehad. Met iso-elektriese fokusering is waargeneem dat die transferrienpatrone na mannosebehandeling na normaal terugkeer het, terwyl hierdie verbetering ook by ander serum-glikoproteïene opgemerk is. Die mannose-terapie (100-150mg/kg per dag) het geen nuwe-effekte getoon nie (Nieheus *et al.* 1998:1419), maar verdere studies oor

hierdie terapie moet nog uitgevoer word voordat dit as 'n definitiewe behandeling geklassifiseer kan word.

2.3.3 CDG-sindroom tipe 2

2.3.3.1 Kliniese simptome

Hierdie tipe is minder algemeen as tipe 1 en is ook 'n outosomaal resessiewe defek (Tan *et al.* 1997:389) wat multi-sistemiese gevolge het. Infantiele stuiptrekkings en pigmentasie abnormaliteite kom baie voor, terwyl prominente abnormale gesigseienskappe hoë voorkop, prominente basis van die neus, terugwykende ken en groot, displastiese ore ook aangetref is (Jaeken *et al.* 1996:458; Henry *et al.* 1997:413). Pasiënte toon ernstige vertraging, maar geen perifere neuropatie of serebellêre hipoplasie kom voor nie (Yuasa *et al.* 1995:13; Henry *et al.* 1997:413).

Met biochemiese analises is waargeneem dat normale vlakke in serum elektroliete, albumien, kreatinien, cholesterol en transaminases voorkom. Verlaagde vlakke van sommige serum-glikoproteïene is waargeneem, waaronder koaguleringsfaktore, anti-thrombin III, proteïen C en S en ook heparien kofaktor II (Jaeken *et al.* 1996:459). Hierdie CDG-subtype toon 'n verlaging in UDP-GlcNAc: α -6-D-mannosied- β -1,2-N-asetielglukoosaminieltransferase 2 (GnT2) van tot 98% (Tan *et al.* 1997:389) en verhoogde vlakke van disialotransferrien en monosialotransferrien, maar geen asialotransferrien is in die transferrienpatroon waargeneem nie (Yuasa *et al.* 1995:13).

2.3.3.2 Molekulêre basis van CDG-sindroom tipe 2

Ook vir hierdie subtype is die defek al geïdentifiseer: defektiewe aktiwiteit van die ensiem UDP-GlcNAc: α -6-D-mannosied- β -1,2-N-asetielglukoosaminieltransferase 2 (GnT2, 'n Golgi-apparaat-ensiem betrokke in die laat stadia van N-glikosilering van proteïene (Van Schaftingen & Jaeken, 1995:318; Henry *et al.* 1997:413). Die geen vir hierdie ensiem is

gekloneer en gelokaliseer op chromosoomband 14q21 (Matthijs *et al.* 1998:542) en twee puntmutasies is in twee nie-verwante pasiënte geïdentifiseer in die katalitiese domein van hierdie ensiem: histidien na arginien en serien na fenielalanien onderskeidelik (Tan *et al.* 1997:389). Analises van die gene vir GnT2 in die families van hierdie twee pasiënte het getoon dat verskeie familieledede draers van hierdie mutasies is.

2.3.3.3 Behandeling van CDG-sindroom tipe 2

Geen behandeling vir hierdie tipe is al beskryf nie.

2.3.4 CDG-sindroom tipe 3

2.3.4.1 Kliniese simptome

Hierdie tipe van die CDG-sindroom is nie baie algemeen nie. 'n Paar gevalle is al aangemeld en die meeste van hierdie pasiënte het perinatale papheid en infantiele spasmas getoon (Yuasa *et al.* 1995:14), terwyl optiese atrofie en abnormale velpigmentasie ook voorkom (Charlwood *et al.* 1997:824). Serebellêre hipoplasie en poli-neuropatie is nie opgemerk nie, maar hipotonie en psigomotoriese vertraging kom wel voor. Hepatomegalie en transamienemie is waargeneem (Charlwood *et al.* 1997:824), terwyl tri-, di-, mono- en asialotransferrienvlakke in die pasiënte verhoog was (Yuasa *et al.* 1995:14).

2.3.4.2 Behandeling van CDG-sindroom tipe 3

Geen behandeling vir hierdie tipe is al beskryf nie.

2.3.5 CDG-sindroom tipe 4

2.3.5.1 Kliniese simptome

Hierdie tipe is baie skaars, maar by 'n paar persone wat wel gediagnoseer is, kom mikrocefalie voor (Stibler *et al.* 1996:235; Henry *et al.* 1998:413), tesame met geroteerde, displastiese ore, hipotonie, psigomotoriese vertraging en epilepsie (Stibler *et al.* 1996:235). By hierdie pasiënte is geen lewerdisfunksie opgemerk nie (Henry *et al.* 1997:413), maar verhoogde vlakke van CDT, veral disialotransferrien, kom voor (Stibler *et al.* 1996:236).

2.3.5.2 Behandeling van CDG-sindroom tipe 4

Geen behandeling vir hierdie tipe is al beskryf nie.

2.4 TRANSFERRIEN AS MERKER VIR GLIKOSILERINGSDEFEKTE

2.4.1 Inleiding

Om die rol van transferrien as merker vir glikosileringsdefekte te verstaan, word die struktuur en funksies daarvan nou beskryf.

Transferrien is 'n monomeriese glikoproteïen wat in die biologiese vloeistowwe van vertebrate sowel as invertebrate voorkom (Schaeffer *et al.* 1987:109) en optree as reguleerder van ysterfluktuasies tussen gebiede van ysterabsorpsie, ysterverbruik en ysterstoring (De Jong *et al.* 1990:3). Transferrienagtige molekules is klaarblyklik van kardinale belang vir oorlewing, want selfs by primitiewe vertebrate kom transferrienagtige molekules voor. Selfs in skynbare atransferrienemie kom steeds spoorhoeveelhede transferrien voor; wat daarop dui dat lewe sonder transferrien dalk nie

moontlik sou wees nie (De Jong *et al.* 1990:3). Dit is nie duidelik watter funksie van transferrien verantwoordelik is vir die noodsaaklikheid van transferrien vir lewe nie.

Transferrien is die hoof-ysterdraende molekule in die bloedplasma (Regoeczi & Bolyos, 1993:35) en word gekodeer deur 'n geen van nagenoeg 33,5 kilobase, wat 17 eksons en 16 introns bevat (Schaeffer *et al.* 1987:109).

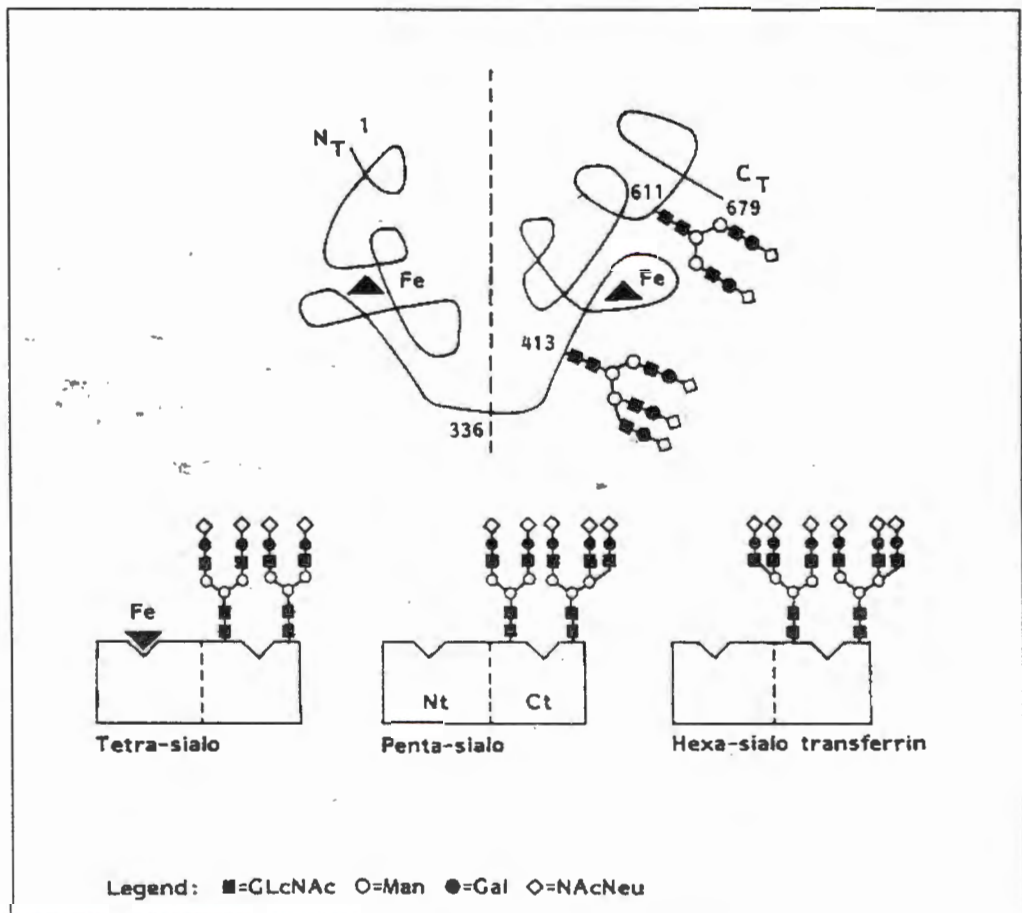
Verskillende soorte transferrien is al geïdentifiseer (De Jong *et al.* 1990:3):

- Transferrien (siderofilien): Hierdie is 'n metaalbindende β -globulien wat in die bloedplasma en ekstrasellulêre vloeistowwe (bv. serebrospinale vog, melk, semen en amnionvog) van voëls en soogdiere voorkom. Dit kom ook intraneuronaal voor.
- Ovotransferrien (konalbumien): Hierdie vorm kom in die oviduksekresies en eierwitte van voëls en reptiele voor.
- Laktoferrien (laktotransferrien): Laktoferrien kom voor in die ekstrasellulêre sekresies van soogdiere.
- P97: Hierdie is 'n membraanproteïen wat in menslike kwaadaardige melanoomselle en ook as regte transferrien in sommige fetale weefsels aangetref word.
- Crustaceae en Urochordata: Ysterbindende proteïene is al in die bloed van hierdie invertebrate waargeneem.

2.4.2 Die struktuur, sintese en chemie van transferrien

Transferrien bestaan uit 'n enkele polipeptiedketting van 679 aminosuurresidue (Landberg *et al.* 1995:267) met twee N-gekoppelde glikane aan die peptiedketting gebind. Die volledige molekule se molêre massa is 79 570 Da (De Jong *et al.* 1990:4; Henry *et al.* 1997:417) en bestaan uit twee homodomeine (figuur 2.6): 'n N-terminale domein (residue 1-336) en 'n C-terminale domein (residue 337-679). Daar word aanvaar dat die glikaangroepe by posisies 413 en 611 aan 'n asparagienresidu gekoppel is (De Jong *et al.* 1990:4; Yuasa *et al.* 1995:18), alhoewel dit al gemeld is dat dit by posisies 432 en 630 is (Henry *et al.* 1997:417). Die N- en C-domeine vorm twee globulêre lobbe wat deur 'n

groef van mekaar geskei word. In elk van hierdie lobbe is 'n metaalbindingspunt geleë. Transferrien bind hoofsaaklik yster, maar kan ook ander metale bind, bv. Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} en Al^{3+} (De Jong *et al.* 1990:5). Dit blyk dat die twee bindingspunte se affiniteit verskil (C>N) ahangende van die pH van die omgewing waarin die molekule voorkom (Regoeczi & Bolyos, 1994:35).



Figuur 2.6: Struktuur van transferrien

(De Jong *et al.* 1990:4)

Transferrien word hoofsaaklik in die hepatosiete gesintetiseer (Löf *et al.* 1993:176), alhoewel dit net na geboorte ook in ander weefsels gesintetiseer word. Daar is egter bewyse dat die sintese van transferrien in weefsels soos die niere, spiere en milt van rotte afneem in die neonatale periode, terwyl die sintese in die breinweefsel toeneem (De Jong *et al.* 1990:6). Die transferrienpolipeptied is aanvanklik 19-20 aminosure langer as die

finale proteïen en voor sekresie word hierdie ekstra residue afgesplyt. Die vermoede bestaan dat die afsplyting van hierdie residue deur proteolitiese ensieme bewerk word en noodsaaklik is vir sekresie, aangesien sekresie van die ongesplyte polipeptied drasties verlaag is (De Jong *et al.* 1990:6).

Die sintese van transferrien word op transkripsionele sowel as translasionele vlak gereguleer en hoewel die meganismes van regulering nog nie bekend is nie, is verskeie metaal-regulatoriese elemente in die promotorgebied waargeneem (De Jong *et al.* 1990:7). Transferrien word gesintetiseer soos in afdeling 2.2.4.1 beskryf en het twee moontlike N-glikosileringspunte waarvan beide normaalweg geglikosileer word met glikane van die komplekstipe (De Jong *et al.* 1990:4; Löf *et al.* 1993:176). Daar is 'n wye, maar beperkte, spektrum van moontlike strukture vir transferrien (Hackler *et al.* 1995:281; Yuasa *et al.* 1995:13), 'n verskynsel wat bekend staan as mikroheterogeniteit. Dit is nie duidelik of die mikroheterogeniteit van transferrien 'n willekeurige proses is en of dit 'n rol te speel het in lewende organismes nie. Die mikroheterogeniteit van transferrien en die verskillende vorme van transferrien word in die volgende paragraaf verder beskryf.

2.4.3 Mikroheterogeniteit van transferrien

Soos reeds genoem, is transferrien nie 'n homogene molekule nie, want met behulp van immunoelektroforese word 'n komplekse patroon vir transferrien waargeneem. Hierdie mikroheterogeniteit is te wyte aan drie faktore (Van Noort & Van Eijk, 1992:1; Hackler *et al.* 1995:281):

1. Variasies in die polipeptiedkettings (genetiese aminosuursubstitusies of delesies)
2. Verskille in die ysterinhoud van transferrien
3. Verskille in die strukture van die N-gekoppelde glikane

Hierdie drie faktore word nou in meer besonderhede beskryf.

2.4.3.1 Genetiese polimorfisme

Die verskynsel van genetiese polimorfisme van transferrien kan deur middel van isoelektriese fokusering (IEF) en poli-akrielamiedjelelektroforese (PAGE) aangetoon word en tot 30 verskillende variante van die transferrien-polipeptied is al waargeneem (De Jong *et al.* 1990:8; Hackler *et al.* 1995:281). Die aminosuursubstitusies vir sommige van hierdie variante is bepaal en daar is waargeneem dat almal enkelsubstitusies is waar die tweede nukleotied van die kodon vir die betrokke aminosuur vervang of oorgeslaan is (De Jong *et al.* 1990:8). Verskillende fenotipes is waargeneem by verskillende individue: die mees algemene een is die TfC-tipe, terwyl daar ook TfB- en TfD-tipes voorkom (De Jong *et al.* 1990:8-10; Hackler *et al.* 1995:281). By hierdie fenotipes kom ook verdere subtypes voor bv. sub tipe TfC₁ en TfD₁ maar die meeste van hierdie variante toon dieselfde ysterbindingskapasiteit as die mees algemene variant, nl. TfC₁ (De Jong *et al.* 1990:8-9).

2.4.3.2 Ysterinhoud

Die ysterinhoud van transferrien kan ook aanleiding gee tot die mikroheterogeniteit van transferrien (Van Noort & Van Eijk, 1992:1; Hackler *et al.* 1995:281). Onder fisiologiese toestande is transferrien tot 30% versadig met yster en tot vier verskillende vorme van transferrien, wat varieer t.o.v. die ysterinhoud, kan in serum voorkom, nl. (Van Noort & Van Eijk, 1992:1; Regoeczi & Bolyos, 1994:35) apotransferrien (bevat geen yster), monoferriese transferrien met die yster gebind aan die punt in die N-terminale domein (Fe_NTf), monoferriese transferrien met die yster gebind aan die punt in die C-terminale domein (TfFe_C) en dan diferriese transferrien (Fe₂Tf) (Regoeczi & Bolyos, 1994:35). Hierdie isovorme van transferrien kan d.m.v. IEF geskei word. Dit is nie bekend of hierdie vorme verskillende fisiologiese rolle speel nie, maar die Fe_NTf vorm domineer en die vorme blyk eenvormig te wees wat ysterdonering aanbetref (De Jong *et al.* 1990:10).

2.4.3.3 Koolhidraatgroepe

Die eienskappe van die koolhidraatgroep van transferrien is 'n verdere faktor wat aanleiding kan gee tot die mikroheterogeniteit van die molekule (Van Noort & Van Eijk, 1992:1; Hackler *et al.* 1995:281). Transferrien dra twee N-gekoppelde glikane wat struktureel varieerbaar is en van mekaar kan verskil t.o.v. die graad van vertakking: dit kan bi-, tri- of tetra-antennêre strukture wees (De Jong *et al.* 1990:12; Hackler *et al.* 1995:281). Tot nege verskillende variante van transferrien is bekend sover dit die koolhidraatgroepe betref: van asialotransferrien (geen sialiensuur) tot oktiasialotransferrien (agt sialiensuuresidue) (Hackler *et al.* 1995:281). Asialotransferrien kom egter normaalweg nie in die liggaam voor nie (Stibler & Cederberg, 1993:55). Sialiensuur is die terminale residu op die koolhidraatgroepe wat op transferrien gedra word en is negatief gelaai (Voet & Voet, 1995:613). Transferrien wat abnormaal geglikosileer is, sal dus van normale transferrien verskil in terme van die hoeveelheid sialiensuur wat op die molekule voorkom; dus sal die verskillende vorme van transferrien verskillende ladings en verskillende pI-punte hê. Die variant van transferrien wat in die hoogste konsentrasies in die liggaam voorkom, is tetrasialotransferrien wat 'n pI-punt van 5.4 het (Stibler *et al.* 1979:277; Hackler *et al.* 1995:281) en twee bi-antennêre komplekstipe oligosakkariede daaraan gekoppel het (Löf *et al.* 1993:176). Asialotransferrien (met 'n pI-punt van 5.9) het geen oligosakkaried aan enige van die glikosileringspunte gebind nie, terwyl disialotransferrien (met 'n pI-punt van 5.7) op slegs een van die twee punte geglikosileer is (Stibler *et al.* 1994:552; Yuasa *et al.* 1995:18). 'n Kenmerkende transferrienpatroon van normale serum kan m.b.v. IEF verkry word (Stibler & Cederberg, 1993:55).

2.4.4 Funksies van transferrien

Die belangrikste funksie wat aan transferrien toegedeel is, is die vervoer van yster en die lewering daarvan aan teikenselle en -weefsels (Löf *et al.* 1993:176; Regoeczi & Bolyos, 1994:35). Daar is aanduidings dat transferrien 'n rol speel in die groei en differensiasie

van 'n verskeidenheid selle (De Jong *et al.* 1990:16); terwyl dit ook sommige endotoksiene kan bind en van belang is in bakteriostase (Berger & Beger, 1987:298). Daar word gespekuleer dat hierdie funksie van transferrien toe te skryf is aan die feit dat transferrien met mikro-organismes kompeteer vir yster. Die organismes word dus van hierdie belangrike mineraal ontnem. Dit kan ook wees dat transferrien direk aan lipopolisakkariede in die selwand van bakterieë bind en so die deurlaatbaarheid en sensitiwiteit van die selwand verander (Berger & Beger, 1987:298). Dit is ook bekend dat transferrien kan optree as 'n groeifaktor (De Jong *et al.* 1990:27) deur aan die plasmamembraanreseptor van die teikensel te bind en dan groei te stimuleer. Hierdie stimulasie van groei word toegeskryf aan die vervoer van yster, wat dan hierdie mineraal beskikbaar stel aan ribonukleotiedreduktase, 'n ensiem betrokke by DNA-transkripsie wat yster benodig as kofaktor (De Jong *et al.* 1990:27; Voet & Voet, 1995:806).

Die opname van yster deur transferrien kan vanuit drie sisteme geskied (De Jong *et al.* 1990:18):

- intestinale absorpsie van yster
- heropname van yster deur hersirkulering van ysterbevattende proteïene uit fisiologiese prosesse bv. die afbraak van proteïene soos hemoglobien
- opname vanuit ysterstore in veral hepatosiete

Liggaamsvlakke van yster word meestal op die vlak van opname gereguleer. Dit is egter nog nie duidelik of transferrien net 'n vervoermolekule vir yster is en of dit ook verantwoordelik is vir die beheer van ystervlakke nie.

2.4.5 Die rol en belang van transferrien in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme

Transferrien word met groot welslae aangewend in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme vanweë die feit dat dit duidelik onderskeibare patrone vorm na iso-elektriese fokusering en selfs SDS-PAGE (Van Noort & Van Eijk, 1992:2; Löf *et al.*

1993:175). Hierdie patrone van transferrien is te wyte aan die mikroheterogeniteit van transferrien en bestaan normaalweg uit hoofsaaklik tetrasialotransferrien met klein hoeveelhede di-, tri- en pentasialotransferrien (Löf *et al.* 1993:176), terwyl persone wat aan een van die CDG-sindrome of aan alkoholisme ly, patrone van transferrien toon wat afwyk van die normale patroon (Stibler & Cederberg, 1993:55). Hierdie abnormale patrone word waargeneem as gevolg van die abnormale glikosilering van transferrien (Henry *et al.* 1997:413).

Die verskille in transferrienpatrone tussen normale persone, persone wat aan die CDG-sindrome ly en ook persone wat gereeld alkohol misbruik, is duidelik aantoonbaar met IEF. Soos reeds genoem, is daar verskillende vorme van transferrien wat kan voorkom met tetrasialotransferrien as die mees algemene vorm wat in die menslike liggaam voorkom, terwyl kleiner hoeveelhede van di-, tri- en pentasialotransferrien kan voorkom (Yuasa *et al.* 1995:15; Landberg *et al.* 1996:267). By persone wat aan die CDG-sindroom tipe 1 ly, is dit baie opmerklik dat daar verhoogde vlakke van disialotransferrien in hul serum is, asook dat daar asialotransferrien voorkom by hierdie pasiënte (Yuasa *et al.* 1995:15; Jaeken *et al.* 1998:1535), terwyl verhoogde tri- en disialotransferrien, met geen asialotransferrien, karakteristiek is by tipe 2 pasiënte. By tipe 3 pasiënte is die tri-, di-, mono- en asialotransferrienvlakke verhoog, terwyl daar steeds van die normale isovorm ook teenwoordig is in die serum (Yuasa *et al.* 1995:18).

Dit is lank reeds bekend dat abnormale transferrien-isovorme by alkoholiste voorkom (Stibler *et al.* 1979:275; Löf *et al.* 1993:176). Daar is gevind dat tetrasialotransferrienvlakke afneem met chroniese misbruik van alkohol, terwyl di-, mono- en asialotransferrien toeneem (Stibler & Borg, 1986:61; Löf *et al.* 1993:184) en hierdie veranderinge kan met IEF waargeneem word (Van Noort & Van Eijk, 1992:2). Etanol inhibeer die sintese en sekresie van plasmaproteïene, maar die meganisme wat hierdie abnormaliteite by transferrien veroorsaak, is nog nie opgeklaar nie (Gravel *et al.* 1996:82).

CDT-vlakke in serum word baie algemeen as 'n merker vir chroniese alkohol-misbruik aangewend (Löf *et al.* 1993:175; Landberg *et al.* 1995:268) en IEF toon die abnormale isovorme baie duidelik aan. IEF van transferrien kan dus as diagnostiese tegniek vir die diagnose van alkoholisme gebruik word (Stibler *et al.* 1979:277; Löf *et al.* 1993:175).

Mikroheterogeniteit te wyte aan veranderde glikosilering kom ook by ander glikoproteïene voor, bv. by die β -ketting van haptoglobien en ook α 1-suurglikoproteïen (Henry *et al.* 1997:412). Hierdie verskynsel is egter nie opgemerk by bloedplaatjie-glikoproteïen IIB en IIIA in tipe IIA hipercholesterolemie nie (Gianazza *et al.* 1994:221). Mikroheterogeniteit is dus nie 'n verskynsel wat noodwendig in 'n siektetoestand waarby glikoproteïene betrokke is, voorkom nie.

2.5 ISO-ELEKTRIESE FOKUSERING

2.5.1 Die beginsel van iso-elektriese fokusering

Iso-elektriese fokusering (IEF) is 'n elektroforetiese tegniek wat hoofsaaklik aangewend word in die skeiding van amfotêre verbindings soos aminosure en peptiede. Hierdie tegniek berus op die skeiding van die verbindings in 'n medium waarvoor 'n spanningsverskil en 'n pH-gradiënt aangelê is (Wilson & Goulding, 1986:260-262). Die anode-gebied is by 'n laer pH as die katode-gebied met 'n stabiele pH-gradiënt tussen die twee elektrodes. Dit is van belang om die pH-gradiënt so te kies dat die verbindings wat geskei moet word, hul iso-elektriese punte in hierdie gradiënt sal hê. Skeiding word bewerkstellig deurdat verbindings wat in 'n pH-gebied onder hul iso-elektriese punte (pI-punte) is, positief gelaai sal wees en na die katode sal migreer. Tydens hierdie migrasie beweeg die verbinding dan deur 'n gebied van hoër pH. Die molekule sal dan sy pI-punt bereik, in die switserioonvorm verkeer (netto lading van 0) en nie verder migreer nie. Dieselfde sal gebeur met molekules wat in 'n pH-gebied bo hul pI-punte is, behalwe dat hierdie molekules negatief gelaai sal wees en na die anode sal beweeg totdat hul hul pI-

punte bereik en nie verder sal migreer nie. Die verbindings word dus geskei in nou, stasionêre bande.

Hierdie metode is baie bruikbaar vir die skeiding van transferrien omdat dit sensitief is en 'n hoë resolusie verkry word (Hackler *et al.* 1995:281). Die jelle wat gebruik word, kan self gegiet word of daar kan gebruik gemaak word van kommersieël beskikbare voorafvervaardigde poli-akriëlamiedjelle met 'n gespesifiseerde pH-gradiënt. Die gekose gradiënt hang af van die iso-elektriese punt van die verbindings wat geskei moet word.

2.5.2 Die gebruik van iso-elektriese fokusering in die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme

Vir die diagnose van die CDG-sindrome en alkoholisme met behulp van IEF word gebruik gemaak horisontale IEF met die Phastsystem-apparaat (Jaeken *et al.* 1997:447; Nieheus *et al.* 1998:1414). Die diagnose berus op die verskil in lading en iso-elektriese punte van serum-glikoproteïene bv. transferrien o.g.v. hul sialiensuurinhoud (Stibler & Cederberg, 1993:55; Hackler *et al.* 1995:281). IEF kan ook gebruik word om die verskil in ysterinhoud van transferrien aan te toon (Regoeczi & Bolyos, 1994:34), maar vir die diagnose van CDG-sindrome en alkoholisme word daar nie van hierdie funksie gebruik gemaak nie. Dit is egter noodsaaklik om in ag te neem dat die transferrien wat gebruik gaan word vir die diagnoses, ten volle versadig moet wees met yster sodat enige verskille in die bandpatrone wat mag voorkom, slegs toegeskryf kan word aan 'n verskil in sialiensuurinhoud en nie aan verskille in ysterinhoud ook nie (Yuasa *et al.* 1993:15; Hackler *et al.* 1995:281). Die kondisies wat aangewend word om die yster- en sialiensuurinhoud van transferrien te bestudeer, is welbekend (Van Eijk & Van Noort, 1992:354) en spesiale kondisies wat die verlies van yster vanaf transferrien tydens IEF voorkom, is ook al beskryf (Hackler *et al.* 1995:287-288).

Na IEF is vyf duidelik-onderskeibare sialeringsbande vir die transferrien van normale persone sigbaar waarvan die mees algemene een die tetrasialotransferrienband is (Stibler & Cederberg, 1993:55). Soos reeds genoem, skei hierdie verskillende vorme van transferrien van mekaar omdat die molekules verskil in sialiensuurinhoud. Sialiensuur is 'n negatiefgelaaiete molekule; die verskillende vorme van transferrien het dus verskillende ladings, en gevolglik verskillende pI-punte. By persone wat aan die CDG-sindrome en alkoholisme ly, kom verhoogde vlakke van CDT voor en die diagnose kan hieruit bevestig word.

2.6 DOELSTELLING EN BENADERINGSWYSE

Alhoewel IEF algemeen in Europese lande vir die bestudering van glikosileringsdefekte aangewend word, is hierdie tegniek nie vir hierdie doel in Suid Afrika gebruik nie. Die doel van hierdie studie was om IEF aan te wend in die bestudering van transferrienglikosilering as merker vir glikosileringsdefekte en daar is gekonsentreer op twee siektetoestande waar glikosileringsdefekte voorkom, nl. die CDG-sindrome en alkoholisme.

Om hierdie doel te kan bereik, is die volgende benaderingswyse gevolg:

- Standaardisering van die IEF-tegniek om die mikroheterogeniteit van transferrien aan te toon
- Analise van transferrien van 'n aantal normaalpersone om as kontroles te dien
- Analise van transferrien van alkoholiste
- Analise van transferrien van moontlike CDG-pasiënte

Die uiteindelijke doelwit van hierdie studie was om 'n toets daar te stel wat komplementêr is aan kliniese analises vir die diagnose van CDG-gevalle in Suid Afrika.

HOOFSTUK 3

MATERIALE EN METODEDES

3.1 INLEIDING

In hierdie hoofstuk word die materiale en metodes wat in hierdie studie gebruik is, beskryf en daar sal verder in die verhandeling net daarna verwys word.

3.2 MATERIALE

3.2.1 Apparaat

In hierdie studie is iso-elektriese fokusering gebruik as diagnostiese tegniek vir die CDG-sindrome en hiervoor is die Phastsystem-apparaat (Pharmacia LKB, Uppsala, Swede) gebruik vir horisontale IEF met voorafvervaardigde Phastgel 4 - 6.5 poli-akriëlamiedjelle. Hierdie jelle is aangekoop en het 'n lineêre pH-gradiënt van tussen pH 4 en pH 6.5.

3.2.2 Teenliggaampies

Vir die spesifieke deteksie van transferrien-isovorme is gebruik gemaak van anti-transferrien teenliggaampies. Daar is aanvanklik gebruik gemaak van konyn-anti-menstransferrien teenliggaampies maar vanweë die hoë koste van hierdie teenliggaampies, is bok-anti-menstransferrien (ICN) eerder gebruik, want hierdie teenliggaampies het dieselfde mate van werking getoon (kyk afdeling 4.2.4.4).

Die poliklonale konyn-anti-menstransferrien teenliggaampies is in vloeistofvorm verskaf en in klein hoeveelhede verdeel en gevries (-20°C) tot gebruik. Die poliklonale bok-anti-menstransferrien teenliggaampies is in poeivorm verskaf en is tot die korrekte volume

opgemaak met water, waarna dit ook in klein hoeveelhede verdeel is en gevries is (-20°C) tot gebruik.

3.3 TOETSGROEPE

3.3.1 Normaalwaardes

Vir die standaardisering van die metode is van verskeie normaalpersone gebruik gemaak om sodoende 'n normaalpatroon van die transferrien-isovorme te karakteriseer. Geeneen van hierdie persone het enige van die kliniese simptome van die CDG-sindrome getoon of chronies alkohol misbruik nie.

3.3.2 Positiewe kontroles

Verskeie positiewe kontroles (persone wat voorheen gediagnoseer is met een van die CDG-sindrome), is vanaf mede-werkers in Leuven, België¹ verkry. Die kontroles bestaan uit serum van pasiënte wat op Guthrie-kaartjies gedrup en gedroog is, waarna dit per lugpos na ons gestuur is.

3.3.3 Alkoholiste

Serummonsters van alkoholiste is ook geanaliseer, omdat dit welbekend is dat die oormatige gebruik van alkohol ook lei tot abnormale glikosilering van glikoproteïene (Stibler *et al.* 1979:279). Materiaal (in die vorm van serum) van hierdie toetspersone is vanaf die metabolisme laboratorium van die Departement Biochemie en Mikrobiologie verkry. Hierdie analises is uitgevoer om die doeltreffendheid van die metode na te gaan, asook om die verskillende isovorme van transferrien by alkoholiste te bestudeer.

¹ Dr. J. Jaeken, Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Herestraat 49, 3 000, Leuven, België.

3.3.4 CDG-proefpersone

Verskeie analises is uitgevoer op persone wat tipiese kliniese simptome van die CDG-sindrome vertoon. Persone vanuit 'n plaaslike hospitaal vir verstandelik-gestremdes is getoets, asook pasiënte van die metabolisme laboratorium van hierdie departement wat van die simptome getoon het.

3.4 METODEDES

3.4.1 Monsterneming en -berging

Bloedmonsters wat van pasiënte verkry is, is toegelaat om te stol en die serum is verwyder deur die monster vir tien tot vyftien minute te sentrifugeer en die serum dan met 'n mikropipet af te trek. Die serum is in klein hoeveelhede gevries (-70°C), omdat klein volumes vir die analises gebruik is. Dit is raadsaam om die serum so te verdeel, omdat die transferrien dalk mag denatureer met herhaalde vries- en ontdooi-siklusse.

3.4.2 Aanvanklike IEF-metode

Met die aanvang van hierdie studie is daar gebruik gemaak van die metode wat Van Noort (Van Noort & Van Eijk, 1992:2) vir die diagnose van die CDG-sindrome gebruik het. Hierdie metode is in hierdie studie ook aangewend vir die bestudering van transferrien-isovorme by alkoholiste.

Nadat die bloed vanaf toetspersone toegelaat is om te stol, is dit vir 10 minute by 12 000 opm gesentrifugeer en die serum is afgetrek waarna $20\mu\text{l}$ serum met $2\mu\text{l}$ 10mM Fe(III) sitraat, $2\mu\text{l}$ 0.5M NaHCO_3 en $60\mu\text{l}$ 10mM NaHCO_3 gemeng is en vir ten minste 2 ure by kamertemperatuur geïnkubeer is. Na hierdie inkubasietyd is die preparaat weer gesentrifugeer (10 minute by 13 000 opm) en van hierdie supernatant is $50\mu\text{l}$ afgetrek en by $50\mu\text{l}$ 10mM NaHCO_3 gevoeg. Hierdie mengsel is dan vir elektroforese gebruik deur

1µl daarvan op die toediener te laai en in die toedienerarm van die elektroforese-apparaat te plaas. Die monster is dan met die toedienerarm op die jel, wat vooraf in die apparaat geplaas is, gelaai.

Die program wat in hierdie IEF-metode gebruik is, was soos volg:

Toedienerarm af by stap 1.2					0Vh
Toedienerarm op by stap 1.3					0Vh
Ekstra alarm klink by stap 1.1					350Vh
Stap 1.1	2000V	2.0mA	3.5W	15°C	485Vh
Stap 1.2	200V	2.0mA	3.5W	15°C	15Vh
Stap 1.3	1000V	2.0mA	3.5W	15°C	200Vh

Na IEF is die jel na 'n plastiese petribakkie oorgedra en egalig bedek met 80µl teenliggaampie-suspensie (40µl teenliggaampies wat verdun is met 40µl 0.15M NaCl). Die jel is dan vir twee ure by 4°C gelaat waarna die reaksie gestop is deur die jel te bedek met 0.9% NaCl (w/v) en die jel oornag op 'n skudapparaat matig te laat skud. Tydens hierdie stap is alle ongebonde proteïene uit die jel gewas. Hierna is die jel vir 30 minute in water gewas, waarna die transferrienteenliggaamkompleks vir 30 minute met ongeveer 30ml 12% TCA (w/v) in die jel gefikseer is. Die jel is weer vir 30 minute in water gewas, waarna dit vir 5-10 minute met 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v) gekleur is. Die jel is vervolgens vir 30-45 minute ontkleur in die ontkleuringsoplossing (350ml etanol, 100ml asynsuur, opgemaak tot 1l met water) en dan vir 2 ure in water gespoel. Hierna is die jel toegelaat om lugdroog te word en is dan in 'n plastieksakkie verseël. Die droeë jelle is geskandeer met 'n Agfa Duoscan en die resultate is op 'n disket gestoor.

3.4.3 Tweede metode

Vervolgens word die metode van Hackler beskryf wat ook vir die IEF-analise van serumtransferrien gebruik is (Hackler *et al.* 1995:282,287).

Nadat bloedmonsters verkry is, is dit vir 30 minute by kamertemperatuur gelaat om te stol, waarna dit vir 10 minute by 2 000 opm gesentrifugeer is. Serum is in klein volumes verdeel en by -70°C bewaar tot gebruik. Serummonsters is voor gebruik met 0.15M NaCl verdun en een deel (10µl) van hierdie oplossing is met 4 dele (40µl) water en 1 deel (10µl) 200 µM Fe(III)sitraat gemeng. Die mengsel is dan vir 15 minute by kamertemperatuur geïnkubeer en hiervan is 1µl in die toediener gelaai. Die toediener is in die toedienerarm van die elektroforese-apparaat geplaas en die monster is met die toediener op die jel gelaai.

Die program wat vir IEF gebruik is, was soos volg:

Toedienerarm af by stap 2.2					0Vh
Toedienerarm op by stap 2.3					0Vh
Ekstra alarm klink by stap 2.1					73Vh
Stap 2.1	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	75Vh
Stap 2.2	200V	2.5mA	3.5W	15°C	15Vh
Stap 2.3	2000V	2.5mA	3.5W	15°C	185Vh

Na IEF is die jel na 'n plastiese petribakkie oorgedra en met die teenliggaampiesuspensie (40µl teenliggaampies verdun met 40µl 0.15M NaCl) bedek. Na 'n inkubasietydperk van 40 minute by kamertemperatuur is ongebonde proteïene verwyder deur die jel vir 15-20 ure in 0.15M NaCl te was terwyl dit matig geskud word. Die transferrien-teenliggaamkompleks is vir 30 minute in die jel met ongeveer 30ml 20% TCA (w/v) gefikseer, waarna die jel vir 30 minute in water gewas is. Die kleuring en daaropvolgende ontkleuring is uitgevoer soos reeds in afdeling 3.4.1 beskryf, behalwe dat die ontkleuring vir slegs 10-15 minute uitgevoer is.

3.4.4 Gestandaardiseerde metode

Na die uitvoering van beide bogenoemde metodes, is 'n eie metode ontwikkel wat onder ons laboratoriumkondisies geskik gevind is vir die optimale skeiding van die transferrien isovorme. Die metode wat gebruik is vir diagnose van die CDG-sindrome verskil effens van die wat gebruik is vir die bestudering van transferrien by alkoholiste (kyk afdeling 4.3.2). Die twee metodes sal afsonderlik beskryf word.

3.4.4.1 Gestandaardiseerde metode vir die diagnose van die CDG-sindrome

Nadat bloedmonsters van toetspersone en pasiënte verkry is en dit gestol het, is dit vir 10 minute teen 14 000 opm gesentrifugeer, waarna die serum met 'n mikropipet afgetrek is. Die serum is by -70°C bewaar totdat dit gebruik is. Van die vars serum is op filtreerpapier gedrup sodat die papier deurnat was met die serum, waarna die papier gedroog is en in 'n koevert in die yskas gestoor is. Die filtreerpapier is gebruik omdat dit in die literatuur beskryf is dat serum baie lank op hierdie manier bewaar kan word (Stibler & Cederberg, 1993:58). Wanneer die analises uitgevoer moes word, is klein stukkies papier met 'n gaatjiepons uit die papier gedruk en twee van die geponsde papiertjies (elk 5 millimeter in deursnee) is gebruik vir elke analise. Die papiertjies is vir 24-36 uur by 4°C in $100\mu\text{l}$ water geëlueer, waarna $50\mu\text{l}$ van die eluaat gebruik is en met $10\mu\text{l}$ Fe(III)sitraat vir 20 minute by 37°C geïnkubeer is. Geen water is by die eluaat gevoeg nie omdat die serum dan te verdun is om duidelike proteïenbande in die jel te kan waarneem. Na hierdie inkubasietydperk is $1.5\mu\text{l}$ van die serum in die toediener geplaas en die monster is op die jel gelaai.

Die program wat vir hierdie analises gebruik is, asook die hibridisering van transferrien met die teenliggaampies, die wasstappe, kleuring en ontkleuring is soos beskryf in afdeling 3.4.2.

3.4.4.2 Gestandaardiseerde metode vir die bestudering van transferrien by alkoholiste

Monsters van alkoholiste is vanaf die metabolisme afdeling van hierdie departement verkry. Die monsters is in Medispo-buise by -70°C geberg tot gebruik. Van hierdie monsters is $10\mu\text{l}$ geneem en met $40\mu\text{l}$ water en $10\mu\text{l}$ Fe(III)sitraat by 37°C vir twintig minute geïnkubeer. Die serum is nie met NaCl verdun nie, omdat die bandjies na verdunning te dof vertoon het. Van hierdie preparaat is $1.5\mu\text{l}$ op die toediener gelaai, die toediener is in die toedienerarm van die elektroforese-apparaat geplaas en die monster is op die jel gelaai.

Die program wat vir hierdie analises gebruik is, asook die hibridisering van transferrien met die teenliggaampies, die wasstappe, kleuring en ontkleuring is uitgevoer soos beskryf in afdeling 3.4.2.

3.5 Samevatting

In hierdie hoofstuk is die verskillende metodes wat vir hierdie studie gebruik is, beskryf. 'n Eie gestandaardiseerde metode wat geskik gevind is vir gebruik onder ons laboratoriumkondisies, is ontwikkel. In die volgende hoofstuk, sal die resultate van hierdie studie gegee en beskryf word.

HOOFSTUK 4

RESULTATE

4.1 INLEIDING

Die resultate van hierdie studie word in hierdie hoofstuk onder twee hoofpunte beskryf: eerstens die standaardisering van die iso-elektriese fokuseringstegniek en daarna die toepassing van die tegniek op 'n aantal verskillende kontrole en patologiese monsters.

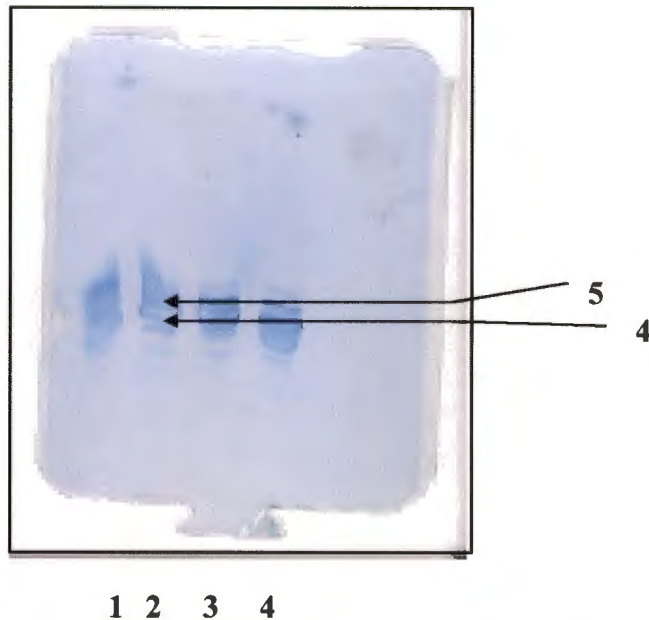
4.2 STANDAARDISERING VAN DIE IEF-TEGNIK

Soos reeds in Afdeling 3.4 genoem, is twee metodes vanuit die literatuur gebruik om 'n standaard-IEF-metode te ontwikkel vir gebruik in hierdie studie om die mikroheterogeniteit van transferrien aan te toon. Hierdie onderskeie metodes het verskillende resultate gelewer en, soos verderaan duidelik sal word, is slegs een van die metodes in die studie gebruik.

4.2.1 Aanvanklike metode

Die eerste metode wat in hierdie studie ondersoek is, is 'n metode wat deur Van Noort en Van Eijk gepubliseer is (Van Noort en Van Eijk, 1992:2). Na verskeie analises van die transferrien van normaalpersone (dit is persone wat geen van die kliniese simptome van die CDG-sindrome toon nie) is daar waargeneem dat hierdie metode nie duidelike resolusie van die transferrien-isovorme lewer nie (figuur 4.1) en is daar tot die gevolgtrekking gekom dat dit glad nie geskik vir die doeleindes van hierdie studie nie. Die geskiktheid

van 'n ander metode wat in die literatuur beskryf is (Hackler *et al.* 1995:282, 287), is gevolglik ondersoek.



Figuur 4.1: Transferrienpatrone van normaalpersone

Bane 1-4: Normaalpersone: 1.5 μ l

Hierdie monsters is geanaliseer volgens die aanvanklike metode soos beskryf in Afdeling 3.4.2.

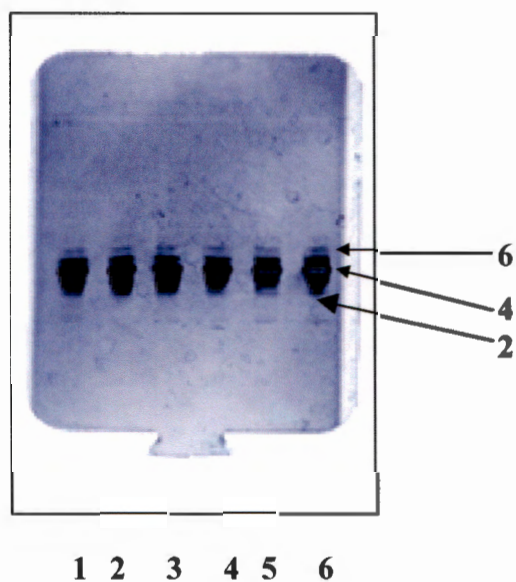
In hierdie en ander elektroforetogramme dui die byskrifte telkens die volgende aan:

- 0: Asialotransferrien
- 1: Monosialotransferrien
- 2: Disialotransferrien
- 3: Trisialotransferrien
- 4: Tetrisialotransferrien
- 5: Pentasialotransferrien
- 6: Heksasialotransferrien

4.2.2 Tweede metode

Die metode van Hackler en medewerkers (Hackler *et al.* 1995:282,287) beskryf verskillende faktore wat in ag geneem moet word tydens die analise van transferrien deur

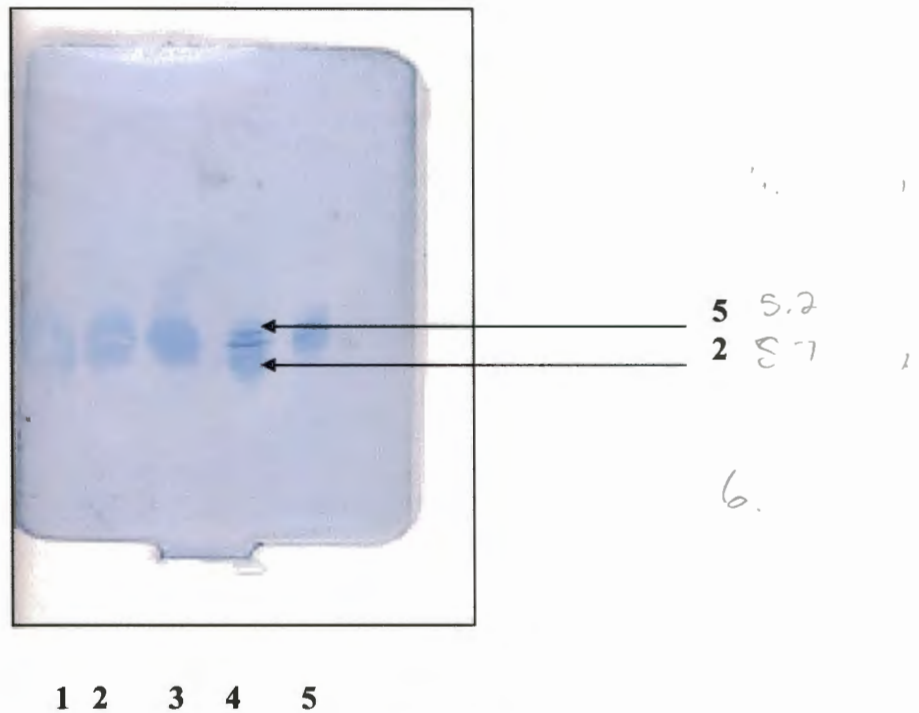
middel van IEF en een van die faktore is die elektroforeseprogram self wat reeds in Afdeling 3.4.2 en 3.4.3 gegee is. Met die gebruik van die program wat deur hierdie navorsers voorgestel is, is baie beter resolusie van die transferrien-isovorme verkry (figuur 4.2) as in die geval van die eerste metode (kyk Afdeling 4.2.1). Met hierdie metode is duidelik onderskeibare transferrienbande waarneembaar en hierdie bande stem ooreen met wat in die literatuur beskryf is: die donkerste band verteenwoordig tetrasialotransferrien, terwyl ligter bandjies sigbaar is en onderskeidelik tri-, di- en pentasialotransferrien verteenwoordig. Met die aanvanklike metode was bykans geen bande sigbaar nie (figuur 4.1). Die metode van monstervoorbereiding wat deur Hackler en medewerkers gebruik is, is ook anders as wat deur Van Noort en Van Eijk voorgestel is (kyk Afdeling 3.4.2 en 3.4.3) en wat die verdere voorbereiding en elektroforese van monsters in hierdie studie betref, is die metode van Hackler en medewerkers as basis vir die daarstelling van 'n eie, gestandaardiseerde metode gebruik. Tensy anders aangedui, is hieropvolgende monsters volgens die tweede metode (kyk Afdeling 3.4.3) geanaliseer.



Figuur 4.2 Transferrienpatrone van normaalpersone
Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5 μ l

4.2.3 Optimale monstervolume

Ten einde die optimum volume vas te stel vir die beste resolusie van die transferrienisovorme, is afnemende volumes van 'n monster op 'n jel aangebring. Die volumes was: 4 μ l, 3 μ l, 2 μ l, 1.5 μ l en 0.5 μ l onderskeidelik. Volgens die resultate in figuur 4.3 is dit duidelik dat die optimum volume in hierdie geval 1.5 μ l is, want dit is die enigste volume waar die verwagte bande onderskeibaar is. Dit is dan ook die volume wat verder in hierdie studie gebruik is.



Figuur 4.3 Bepaling van optimale monstervolume

Baan 1: Normaalpersoon: 4 μ l

Baan 2: Normaalpersoon: 3 μ l

Baan 3: Normaalpersoon: 2 μ l

Baan 4: Normaalpersoon: 1.5 μ l

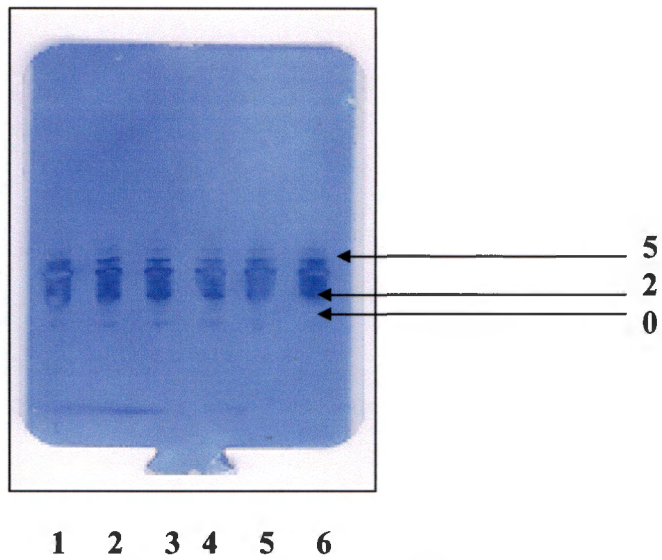
Baan 5: Normaalpersoon: 0.5 μ l

4.2.4 Probleme ondervind tydens die standaardisering van die IEF-tegniek

'n Aantal onverwagte probleme is ondervind met die standaardisering van die IEF-metode wat vir die analise van transferrienglikosilering gebruik wou word. Soos reeds in Afdeling 4.2.1 en 4.2.2 genoem, is twee elektroforese programme vir toepassing in hierdie studie getoets en die program (Afdeling 4.2.2) wat die beste resolusie van transferrien-isovorme gelewer het, is verder in die studie aangewend.

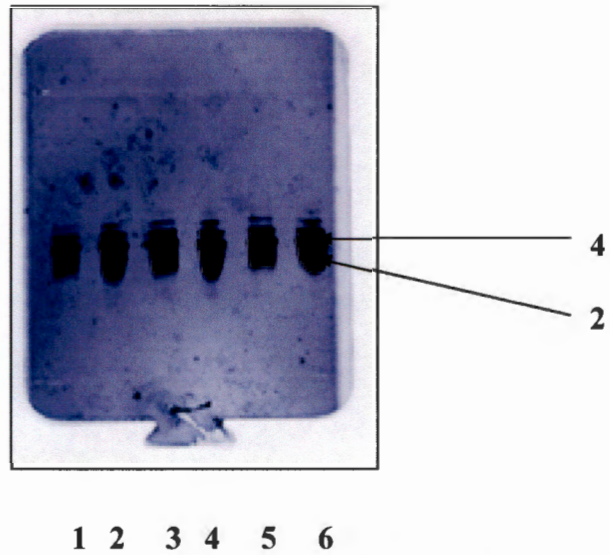
4.2.4.1 Vals positiewe resultate

Nadat die mees geskikte elektroforese program vasgestel is, is daar begin met die analise van bloedmonsters van verskillende persone wat geen van die simptome van die CDG-sindrome toon nie en ook van mense wat nie gereeld alkohol misbruik nie (normaalpersone) om as kontroles te dien. Buiten die normale bande wat verwag is (tetra-, penta-, tri- en disialotransferrien), is daar egter na IEF 'n abnormale transferrienpatroon waargeneem met 'n bandjie in die omgewing waar asialotransferrien verwag word (figuur 4.4). Aangesien 'n abnormale transferrienpatroon ('n transferrienpatroon wat nie ooreenstem met verwagte, bekende patrone nie) 'n aanduiding is van wanglikosilering van transferrien en dus ook van moontlike patologiese toestande, moet daar seker gemaak word dat alle bande wat na IEF teenwoordig is, verklaar kan word. Verskeie pogings is aangewend om die oorsaak van hierdie verskynsel vas te stel. Al die reagense wat gebruik is, is vars berei, nuwe ystersitraat is aangekoop en berei, die inkubasietyd van die monster met ystersitraat is verleng en die pH van alle reagense is getoets. Geen van hierdie ingrepe kon egter die teenwoordigheid van hierdie band verklaar nie (resultate nie gegee nie).



Figuur 4.4 Abnormale transferrienpatrone van normaalpersone
 Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5 μ l

Die inkubasietemperatuur van die monster met ystersitraat is ook verander aangesien daar vermoed is dat die abnormale bandjie die gevolg kan wees van onvolledige versadiging van die transferrien met yster. Die monsters is by kamertemperatuur (kyk figuur 4.2) en ook by 37°C (figuur 4.5) met die ystersitraat geïnkubeer en daar is wel effense verskille in die transferrien-patrone opgemerk. Die bande van die monsters wat by 37°C geïnkubeer is, kom skerper en duideliker voor as die van die monsters wat by kamertemperatuur geïnkubeer is (figuur 4.5).

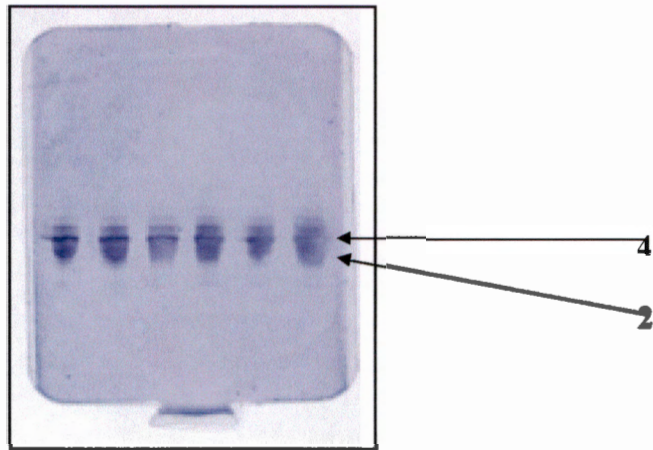


Figuur 4.5: Transferrienpatrone van normaalpersone na inkubasie met Fe(II)sitraat by 37°C

Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5µl

Hierdie pogings het egter steeds nie die teenwoordigheid van die abnormale bandjie verklaar nie. Dit is later opgemerk dat die abnormale bandjie in dieselfde omgewing op die jel voorkom as waar die monster met die toediener op die jel geplaas word en die voorlopige gevolgtrekking was dat die bandjie die gevolg was van beskadiging van die jel tydens die plasing van die toediener op die jel, aangesien die jelle baie dun is en dus maklik beskadig kan raak. Om hierdie probleem te oorkom, is daar met groter sorg gewerk wanneer die toediener wat die monster bevat, op die jel geplaas is.

In figuur 4.6 kan gesien word dat hierdie probleem wel opgelos is deur die toediener baie versigtig op die jel te plaas. Die abnormale bandjie wat in die omgewing waar asialotransferrien verwag is, voorgekom het, is nie meer sigbaar nie en die transferrienpatrone is soos verwag.



1 2 3 4 5 6

Figuur 4.6 Transferrienepatrone van normaalpersone

Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5 μ l

4.2.4.2 Hoë agtergrond na ontkleuring

Die kleurstof wat in hierdie studie gebruik is, is Coomassie Brilliant Blue, waarvan daar 'n 0.1% oplossing (w/v) met 550ml water, 350ml etanol en 100ml asynsuur berei is (Hackler *et al.* 1995:282). Na herhaalde gebruik van dieselfde kleurstofbereiding is waargeneem dat die agtergrond van die jelle algaande donkerder geword het, selfs na langdurige ontkleuring. Die mees waarskynlike oorsaak van hierdie hoë agtergrond mag wees dat die kleurstof na herhaalde gebruik meer en meer gekonsentreerd geraak het as gevolg van die verdamping van die vloeistof en/of dat fyn kristalle of partikels gevorm het wat nie uitwas nie (figuur 4.7). Filtrering het nie die saak verbeter nie, maar wel die gebruik van vars bereide kleurstof (kyk figuur 4.8).



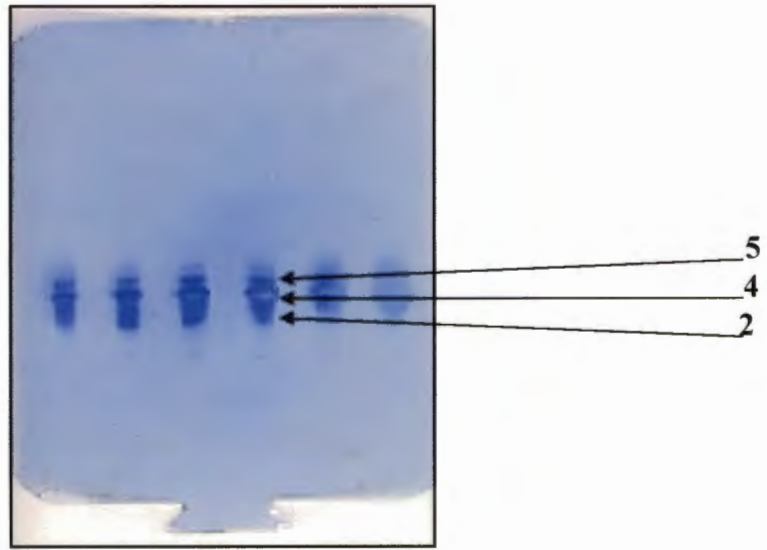
1 2 3 4 5 6

Figuur 4.7 Voorbeeld van 'n jel met hoë agtergrond

Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5 μ l

4.2.4.3 Eluering van transferrien uit filtreerpapier

In die literatuur is beskryf dat serum wat op filtreerpapier gedrup is, baie lank bewaar kan word en dat transferrien hieruit geëlueer kan word vir analise (Stibler & Cederberg, 1993:58). Daar is besluit om hierdie metode te toets om te bepaal of dit wel ook in hierdie studie bruikbaar sal wees. Aanvanklik is daar slegs analyses uitgevoer op die serum van normaalpersone (figuur 4.8); vars serum is op die papier gedrup en die proteïen is geëlueer en geanaliseer. Goeie resolusie van die transferrien-isovorme is verkry (vergelyk met figuur 4.6). Daar is besluit om deurgaans van die filtreerpapier gebruik te maak om die serum te vervoer en te stoor, aangesien die serum op hierdie manier lank bewaar kan word. Nadat monsters verkry is, is die serum op die filtreerpapiertjies gedrup, toegelaat om lugdroog te word en is in 'n plastieksakkie by 4°C gestoor. Vir die analises is die transferrien uit die filtreerpapier geëlueer soos beskryf in Afdeling 3.4.4.1. Alle monsters van moontlike pasiënte is ook op hierdie manier verkry, gestoor en voor gebruik uit die papier geëlueer.

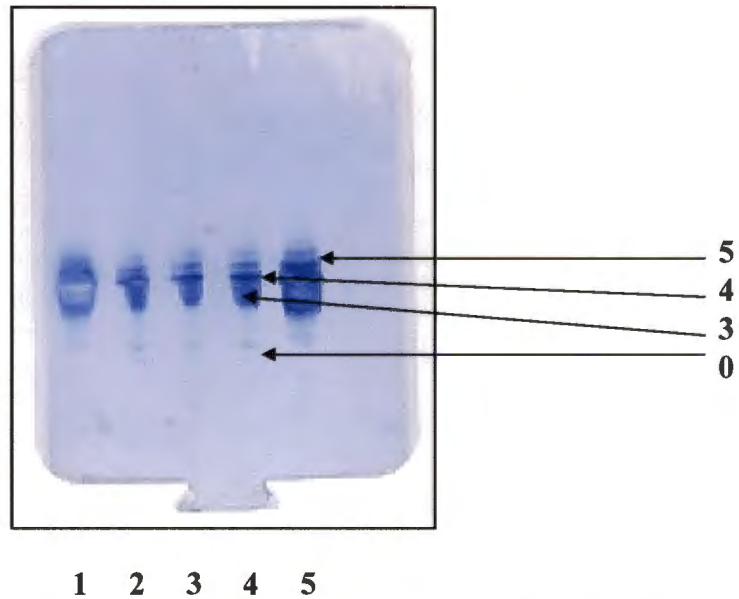


1 2 3 4 5 6

Figuur 4.8 **Transferrienpatrone van serum uit filtreerpapier geëlueer**
 Bane 1-6: Normaalpersone: 1.5 μ l

In hierdie figuur kan egter gesien word dat sommige monsters dowwer as van die ander monsters voorkom (vergelyk bane 5 en 6 met bane 1-4). Die rede daarvoor mag wees dat hierdie monsters nie gelokaliseerd op die jel geplaas is nie, maar oor die jel gespoel het, omdat die jel op daardie posisie dalk nie heeltemal plat was nie, maar 'n effense ronding het wat veroorsaak dat die monsters gespoel het (die toediener maak nie ewe goed kontak op alle plekke op die jel nie).

Na die analise van die serum van alkoholiste wat uit filtreerpapier geëlueer is, is daar egter waargeneem dat die verskille in transferrienpatrone van normaalpersone en alkoholiste nie duidelik sigbaar was met hierdie metode nie (figuur 4.9). Indien hierdie figuur met figuur 4.8 vergelyk word kan gesien word dat daar bykans geen toename in disialotransferrien by die alkoholiste sigbaar is nie en dat daar ook bykans geen asialotransferrien gesien kan word nie.

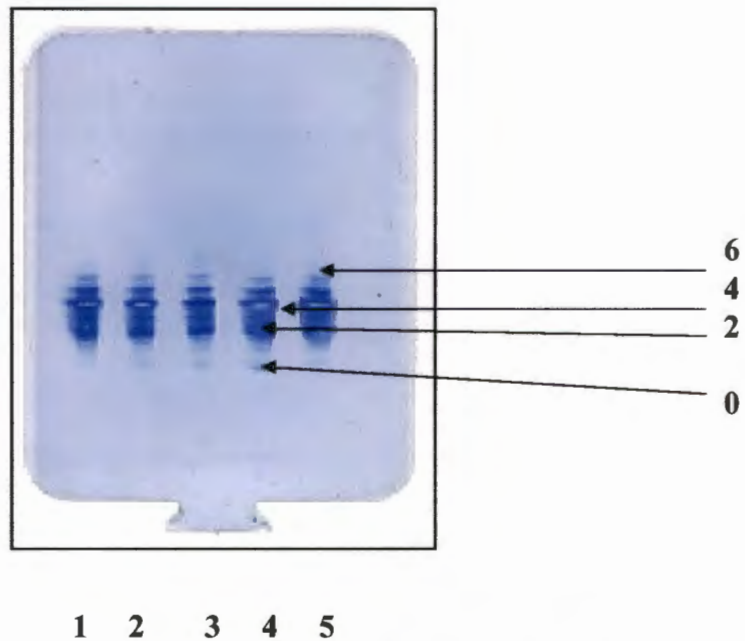


Figuur 4.9 Transferrienpatrone van serum van alkoholiste uit filtreerpapier geëlueer

Bane 1 en 5: Normaalpersone: 1.5 μ l

Bane 2-4: Alkoholiste: 1.5 μ l

Om vas te stel of hierdie resultaat te wyte is aan die filtreerpapier, is vars serum geanaliseer en die resultaat word in figuur 4.10 gegee. Hiervolgens kan 'n duidelike toename in disialotransferrien waargeneem word by die serum van alkoholiste (bane 2-4) en in hierdie bane is bandjies verteenwoordigend van asialotransferrien ook sigbaar, soos verwag, terwyl daar by die kontroles (bane 1 en 5) geen bandjie sigbaar is op die posisie waar asialotransferrien verwag word nie.



Figuur 4.10 Transferrienpatrone van serum van alkoholiste

Bane 1 en 5: Normalpersone: 1.5 μ l

Bane 2-4: Alkoholiste: 1.5 μ l

4.2.4.4 Teenliggaampies

In hierdie studie is gebruik gemaak van immunodeteksie met teenliggaampies teen menslike transferrien. Aanvanklik is konyn-anti-menstransferrien gebruik vir die deteksie van die transferrienpatrone op die jelle, maar vanweë die hoë koste van hierdie teenliggaampies is later gebruik gemaak van bok-anti-menstransferrien en geen verskil in die effektiwiteit van hierdie teenliggaampies en die vorige teenliggaampies is waargeneem nie (resultate nie gegee nie).

4.2.5 Samevatting

Tydens die standaardisering van die IEF-tegniek is verskeie probleme ondervind, o.a. vals positiewe resultate (abnormale transferrienpatrone) wat in sommige gevalle van normaalpersone verkry is en ook die hoë agtergrond van die jelle na ontkleuring. Hierdie

probleme is almal uitgeskakel en 'n standaard-IEF-metode is suksesvol ontwikkel waarmee die analise van monsters van 'n aantal normaalpersone en patologiese monsters gedoen kon word.

4.3 BESTUDERING VAN TRANSFERRIENGLIKOSILERING

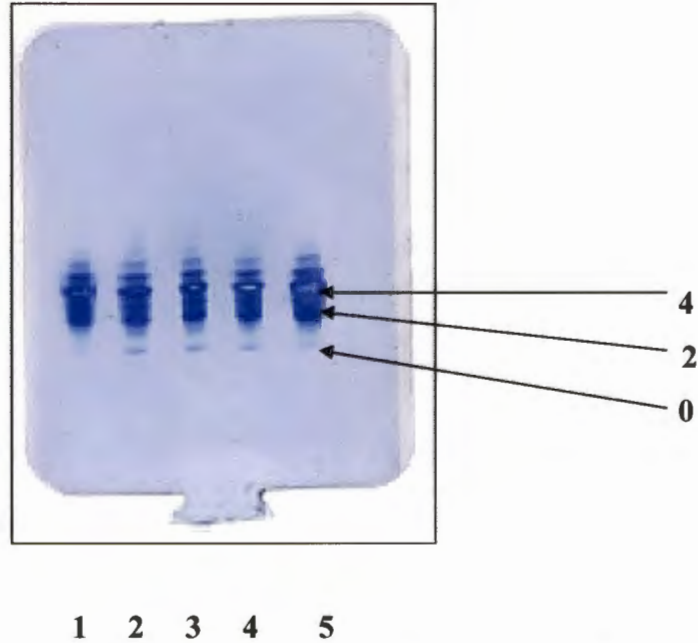
4.3.1 Normaalpersone

Nadat die standaardisering van die tegniek afgehandel is, is daar voortgegaan met die analise van die transferrienpatrone van 'n groter aantal normaalpersone om 'n normale patroon van transferrien te karakteriseer wat in daaropvolgende analyses as kontroles kan dien. In figuur 4.8 (Afdeling 4.2.4.3) kan 'n jel met monsters van 'n aantal van die normaalpersone gesien word en die transferrienpatroon van hierdie persone is duidelik waarneembaar. Die patroon stem ooreen met wat in die literatuur beskryf is van die normale transferrienpatroon in kontroles: tetrasialotransferrien domineer met kleiner hoeveelhede penta-, tri- en disialotransferrien (Stibler & Cederberg, 1993:55). Hier moet genoem word dat daar in hierdie studie glad nie gepoog is om die onderskeie transferrienisovorme te kwantifiseer nie, maar dat daar slegs getoets is vir die teenwoordigheid van die verskillende isovorme.

4.3.2 Alkoholiste

Monsters (vars serum) van verskillende alkoholiste is geanaliseer om die abnormaliteite in die glikosilering van transferrien in hierdie pasiënte na te gaan (kyk Afdeling 3.4.4.2). Duidelike verskille in die transferrienpatrone van hierdie pasiënte in vergelyking met die van die kontroles, is waargeneem (figuur 4.11). By die pasiënte kom verlaagde vlakke van tetrasialotransferrien voor, terwyl 'n verhoging in disialotransferrien waargeneem kan

word en ook asialotransferrien teenwoordig is. Die kontroles (bane 1 en 5) toon die normale transferrienpatroon soos dit ook in die literatuur beskryf is (Löf *et al.* 1993:176).



Figuur 4.11 Transferrienpatrone van serum van alkoholiste

Bane 1 en 5: Normaalpersone: 1.5 μ l

Bane 2-4: Alkoholiste:1.5 μ l

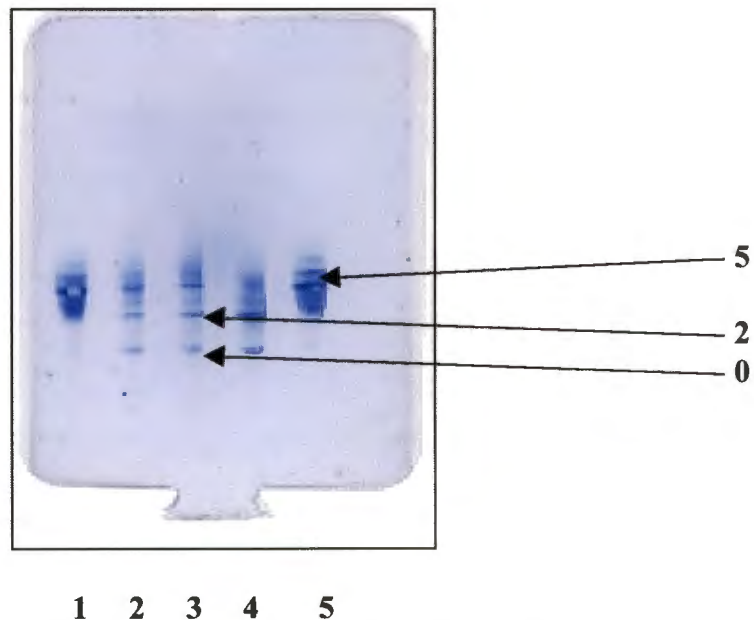
Tensy anders aangedui, is hieropvolgende monsters volgens die gestandaardiseerde metode soos beskryf in Afdeling 3.4.4.2, geanaliseer.

4.3.3 Positiewe kontroles

'n Aantal positiewe kontroles (monsters van persone wat reeds klinies en biochemies gediagnoseer is met een van die CDG-sindrome) is verkry vanaf medewerkers in België¹.

¹ Dr. J. Jaeken, Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Herestraat 49, 3 000, Leuven, België

Hierdie kontroles is in die vorm van druppels serum op filtreerpapier per lugpos gestuur en is volgens die metode soos in Afdeling 3.4.4.1 geëluëer en geanaliseer. Die resultate word in figuur 4.12 gegee. Opvallende verskille in die transferrienpatrone van normaalpersone en die positiewe kontroles is sigbaar. In bane 1 en 5 is serum van normaalpersone en in bane 2 en 3 serum van die positiewe kontroles (CDG tipe 1) terwyl baan 4 serum van 'n CDG tipe 2 pasiënt bevat. Die resultaat van die twee CDG tipe 1 pasiënte toon duidelik die afname in tetrasialotransferrien, met verhoogde disialotransferrien en asialotransferrien wat voorkom, 'n resultaat wat ooreenstem met patrone wat in die literatuur vir hierdie siektetoestand beskryf is (Stibler *et al*, 1994:555).



Figuur 4.12 Transferrienpatrone van positiewe kontroles

Bane 1 en 5: Normaalpersone: 1.5 μ l

Bane 2 en 3: Positiewe kontroles: CDG tipe 1: 1.5 μ l

Baan 4: Positiewe kontrole: CDG tipe 2: 1.5 μ l

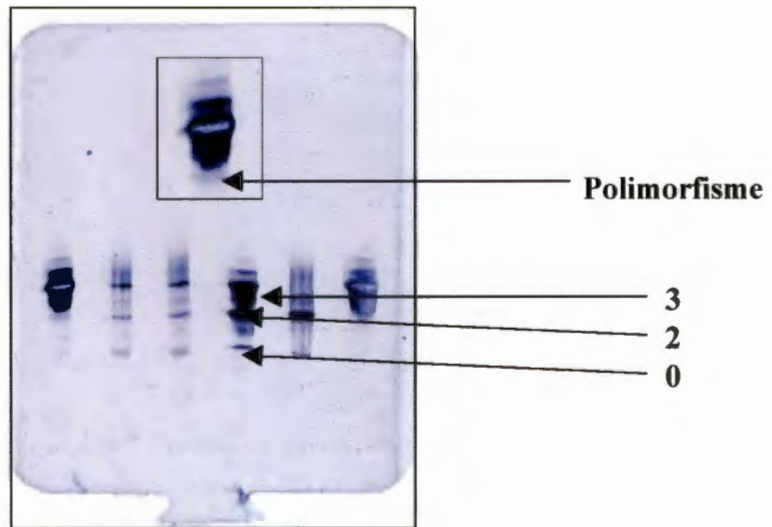
Die patroon vir die CDG tipe 2 pasiënt (figuur 4.12, baan 4) toon bykans geen tetrasialotransferrien nie, met 'n duidelike toename in disialotransferrien en ook die teenwoordigheid van asialotransferrien. Hierdie resultaat stem nie ooreen met patrone wat in die literatuur beskryf is nie, want normaalweg toon CDG tipe 2 pasiënte geen asialotransferrien nie (Yuasa *et al*. 1995:13). Uit hierdie resultaat kan dit egter baie

duidelik gesien word dat daar wel onmiskenbare verskille tussen die transferrienpatrone van normaalpersone en die van CDG-pasiënte is.

4.3.4 Moontlike CDG-pasiënte

Vir verdere analise van die glikosilering van transferrien is monsters van 'n aantal moontlike CDG-pasiënte m.b.v. die IEF-tegniek geanaliseer. Hierdie monsters is verkry vanaf die metabolisme-afdeling van hierdie departement asook vanaf 'n plaaslike hospitaal vir verstandelik gestremde persone en bestaan uit 'n groep pasiënte waarvan sommige van die kliniese simptome ooreenstem met die CDG-sindrome. Die pasiënte vanaf die metabolisme afdeling is deur hul pediater verwys, terwyl die pasiënte vanaf die hospitaal deur 'n sielkundige van die hospitaal uitgewys is as moontlike CDG-pasiënte. Die pasiënte se serum is geanaliseer volgens die metode wat in Afdeling 3.4.4.1 beskryf is en die resultate word in figure 4.13 tot 4.18 gegee.

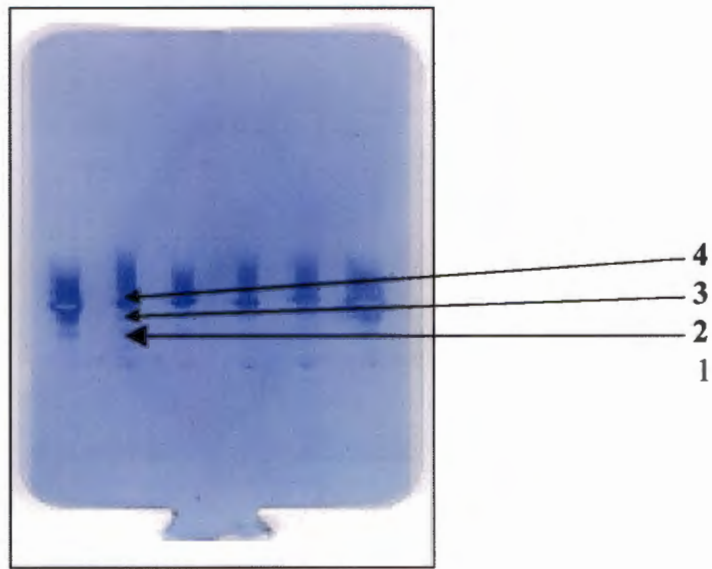
In figuur 4.13 word die resultate van 'n moontlike CDG-pasiënt (pasiënt ES) tesame met voorbeelde van positiewe kontroles vir CDG tipe 1 gegee en hieruit kan gesien word dat daar 'n definitiewe CDG tipe 1 patroon van transferrien by hierdie pasiënt voorkom, want hierdie pasiënt toon opmerklike verhoogde disialotransferrien, terwyl asialotransferrien ook voorkom. Hierdie patroon stem ooreen met patrone wat in die literatuur besryf is (kyk Afdeling 2.4.5) en ook met die van die positiewe kontroles (kyk figuur 4.12).



Figuur 4.13 Transferrienpatrone van pasiënt ES

- Bane 1 en 6: Normaalpersone: 1.5 μ l
 Bane 2 en 3: Positiewe kontroles: CDG-tipe 1:
 1.5 μ l
 Baan 4: Moontlike CDG-pasiënt (pasiënt
 ES): 1.5 μ l
 Baan 5: Positiewe kontrole: CDG tipe 2:
 1.5 μ l

In figuur 4.14 word die resultaat van die analise van monsters van pasiënte uit 'n plaaslike hospitaal vir verstandelik gestremdes gegee. Hieruit kan duidelik gesien word dat een van die pasiënte (pasiënt ST, baan 2) 'n abnormale transferrienpatroon vertoon: by hierdie pasiënt kom verhoogde vlakke van tri-, di- en monosialotransferrien voor, terwyl daar ook asialotransferrien teenwoordig is. Hierdie patroon stem ooreen met patrone wat in die literatuur beskryf word wat kenmerkend vir CDG tipe 3 is (Yuasa *et al.* 1995:14).



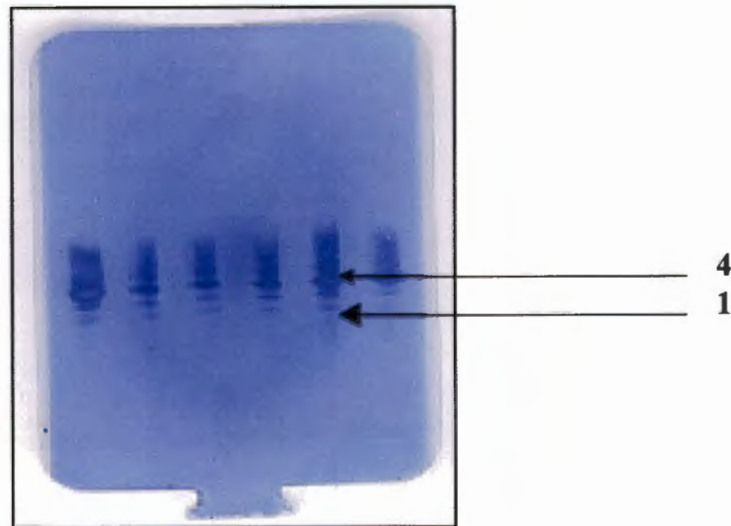
1 2 3 4 5 6

Figuur 4.14 Transferriënpatrone van moontlike CDG-pasiënte

Bane 1 en 6: Normaalpersone: 1.5µl

Bane 2-5: Moontlike CDG-pasiënte: 1.5µl

In figuur 4.15 word 'n geval waar verhoogde tri-, di- en monosialotransferrië waarneembaar is, maar geen asialotransferrië waargeneem kan word nie, gegee. Hierdie pasiënt (pasiënt SN, baan 5) kom ook uit Witrand-hospitaal vir verstandelik gestremdes.



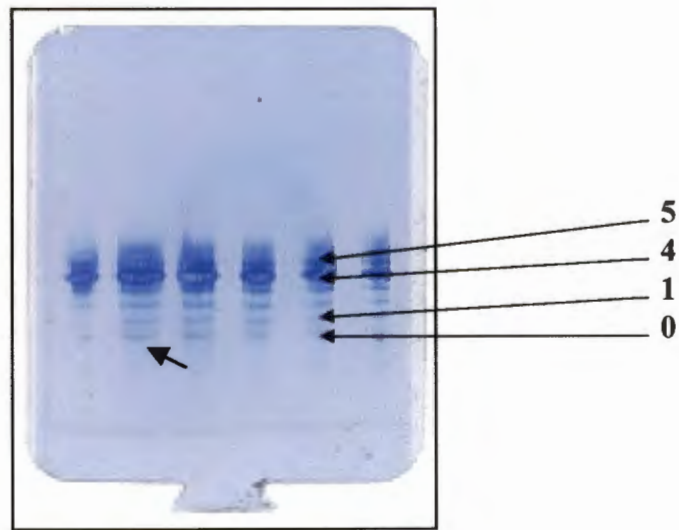
1 2 3 4 5 6

Figuur 4.15 Transferriënpatrone van moontlike CDG-pasiënte

Baan 1: Normaalpersoon: 1.5µl

Bane 2-6: Moontlike CDG-pasiënte: 1.5µl

In figuur 4.16 is afnemende volumes van die monster van pasiënt ST op 'n jel gelaai om vas te stel of die abnormale patroon ooreenstemmend met die monstervolume sal toeneem en of dit 'n artefak van die tegniek blyk te wees. Uit die figuur kan duidelik waargeneem word dat die abnormale patroon wel deurgaans sigbaar is en kan dus aanvaar word dat die patroon nie 'n artefak van die tegniek is nie, maar wel 'n aanduiding van abnormale glikosilering van transferrien by hierdie pasiënt.

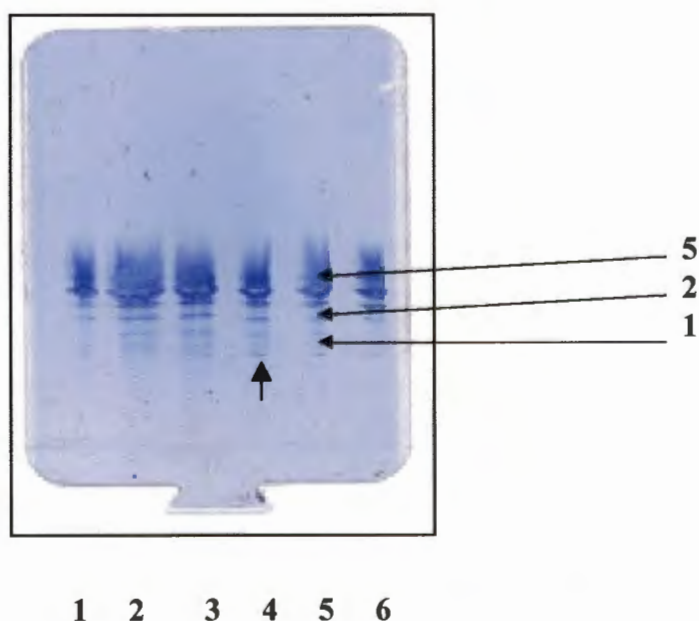


1 2 3 4 5 6
Figuur 4.16 Transferrienpatrone van pasiënt ST
 Baan 1: Normaalpersoon: 1.5 μ l
 Baan 2: Pasiënt ST: 4 μ l
 Baan 3: Pasiënt ST: 3 μ l
 Baan 4: Pasiënt ST: 2 μ l
 Baan 5: Pasiënt ST: 1.5 μ l
 Baan 6: Pasiënt ST: 1 μ l

→ Dui in hierdie geval die posisie van die bandjie waar die jel beskadig is deur die toediener.

Afnemende volumes van die monster van pasiënt SN is om dieselfde rede as wat bo bespreek is, op 'n jel gelaai (figuur 4.17) en die bande by mono-, di- en trisialotransferrien kan steeds duidelik waargeneem word. Hieruit kan ons aflei dat hierdie patrone te wyte is aan abnormale glikosilering van transferrien, alhoewel daar wel 'n effense bandjie teenwoordig is wat toegeskryf kan word aan die beskadiging van die jel met die toediener.

Hierdie band kom egter nie op presies dieselfde plek voor as waar asialotransferrien voorkom nie. By figuur 4.16 en 4.17 is tot 4 μ l van die monsters op die jel gelaai, hoewel daar reeds getoon is dat die optimale monstervolume 1.5 μ l is (kyk Afdeling 4.2.3) en dat daar genoem is dat groter volumes tot gevolg het dat die monster oor die jel spoel. Hierdie verskynsel is wel in ag geneem tydens hierdie analyses en die moontlikheid het bestaan dat hierdie monsters oor die jel mag vloei, maar uit die twee figure is dit duidelik dat dit nie in hierdie gevalle gebeur het nie en dat die transferrienpatrone steeds sigbaar was, selfs by die hoë volumes.



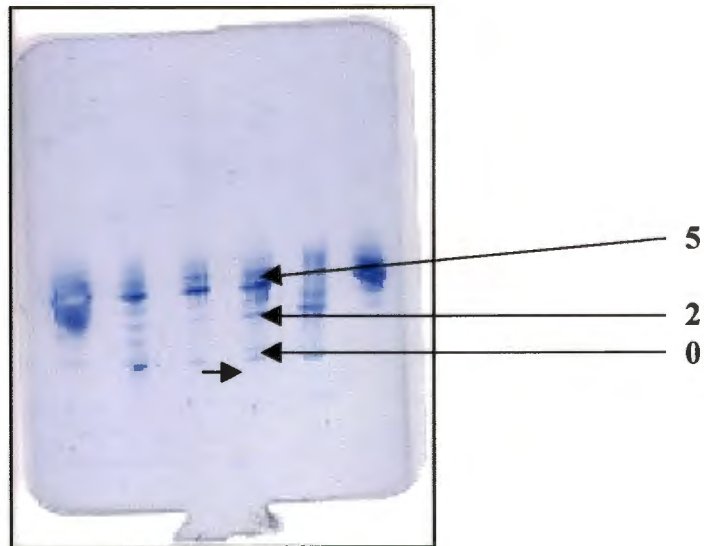
Figuur 4.17 Transferrienpatrone van pasiënt SN

Bane 1 en 6: Normaalpersone: 1.5 μ l
 Baan 2: Pasiënt SN: 4 μ l
 Baan 3: Pasiënt SN: 3 μ l
 Baan 4: Pasiënt SN: 2 μ l
 Baan 5: Pasiënt SN: 1.5 μ l

← Dui in hierdie geval die posisie van die bandjie waar die jel beskadig is deur die toediener.

Een verdere abnormale transferrienpatroon is by 'n pasiënt waargeneem; hierdie pasiënt (pasiënt DL) is deur 'n pediater na die metabolisme afdeling verwys en is na die analise m.b.v. verdere kliniese inligting met Mohr se sindroom gediagnoseer, maar die transferrienpatroon van die pasiënt toon definitiewe abnormaliteite (figuur 4.18). In

hierdie geval is tri-, di- en monosialotransferriën verhoog, terwyl daar asialotransferrin teenwoordig is (baan 2). In baan 3 word 'n tweede monster van hierdie pasiënt gegee wat een week na die in baan 2 geneem is. Die tweede monster toon 'n meer geringe abnormale patroon, maar asialotransferriën is egter steeds waarneembaar.



1 2 3 4 5 6

Figuur 4.18 Transferriënpatrone van pasiënt DL

Bane 1 en 6: Normaalpersone: 1.5µl

Bane 2 en 3: Moontlike CDG-pasiënt (pasiënt DL): 1.5µl

Baan 4: Positiewe kontrole: CDG tipe 1: 1.5µl

Baan 5: Positiewe kontrole: CDG tipe 2: 1.5µl

→ Dui in hierdie geval die posisie van die bandjie waar die jel beskadig is deur die toediener.

4.3.5 Samevatting

In hierdie studie is serum van altesaam sewentien moontlike CDG-pasiënte geanaliseer (buiten die verskillende normaalpersone en alkoholiste) en by vier van hierdie moontlike pasiënte is abnormale transferrienpatrone waargeneem. Volgens die resultate wat van die moontlike pasiënte sowel as die positiewe kontroles verkry is, is dit duidelik dat die gestandaardiseerde IEF-tegniek suksesvol aangewend is vir die analise van transferrienglikosilering as merker vir glikosileringsdefekte.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

5.1 INLEIDING

Die CDG-sindrome is genetiese siektes wat reeds in die vroeë tagtigerjare beskryf is (Jaeken *et al.* 1991:6), maar wat veral in die laaste vier tot vyf jaar sterk onder die soeklig gekom het. Die CDG-sindrome vertoon 'n verskeidenheid kliniese simptome (kyk afdeling 2.3.1), maar 'n uitstaande eienskap is die onderglikosilering van verskillende glikoproteïene (Stibler *et al.* 1994:552). Hierdie abnormale glikosilering is veral opmerklik by transferrien, 'n glikoproteïen wat in die serum voorkom (Henry *et al.* 1997:413).

Transferrien het twee moontlike glikosileringspunte en normaalweg word beide geglikosileer (De Jong *et al.* 1990:4; Yuasa *et al.* 1995:18). Hierdie glikosilering is egter nie volledig by die CDG-sindrome nie, terwyl dit reeds geruime tyd bekend is dat abnormale glikosilering van sommige glikoproteïene ook by alkoholiste voorkom (Stibler *et al.* 1979:275). Die verskille in glikosilering van die transferrien-isovorme (kyk figuur 2.6) is waarneembaar omdat die isovorme van mekaar verskil wat lading en pI-punte betref (Gravel *et al.* 1996:78). IEF word algemeen in die diagnose van glikosileringsdefekte soos die CDG-sindrome en ook alkoholisme gebruik, met transferrien as merker-glikoproteïen (Löf *et al.* 1993:175; Nieheus *et al.* 1998:1414). Hierdie tegniek berus op die skeiding van verbindinge in 'n jel waarvoor 'n elektriese spanning en 'n pH-gradiënt aangelê is (Wilson & Goulding, 1986:260-262) en dui die onderskeie isovorme van transferrien baie duidelik aan.

Aangesien geen inligting aangaande die voorkoms van die CDG-sindrome in Suid Afrika bekend is nie, is daar besluit om hierdie studie te loods om 'n aanduiding van die voorkoms van hierdie siektes in Suid Afrika te kry. Om hiertoe 'n wesenlike bydrae te lewer, is die volgende oorhoofse doelwit vir die studie geformuleer: die karakterisering van a) die normale patroon van die transferrien-isovorme, en b) die abnormale glikosileringspatrone van transferrien in moontlike CDG-pasiënte. Daar is egter deurgaans slegs gekonsentreer op die teenwoordigheid, al dan nie, van die abnormale transferrien-isovorme en geen kwantifisering van die isovorme is uitgevoer nie.

Die oorhoofse doelwit is as volg benader:

- Die standaardisering van 'n IEF-tegniek vir gebruik onder plaaslike laboratoriumkondisies om die mikroheterogeniteit van transferrien aan te toon
- Die analise van transferrien van normaalpersone om as kontroles te dien
- Die analise van transferrien van alkoholiste om die toepassing van die IEF-tegniek te bevestig
- Die analise van transferrien van moontlike CDG-pasiënte

In hierdie hoofstuk word die resultate (kyk Hoofstuk 4) van die studie krities beskou en bespreek.

5.2 STANDAARDISERING VAN DIE IEF-METODE

Die aanvanklike IEF-metode (afdeling 3.4.2) wat in hierdie studie ondersoek is, was nie geskik vir die bestudering van transferrien-isovorme nie omdat duidelike resolusie van die transferrienpatrone nie met hierdie metode verkry is nie (figuur 4.1), maar smere op die jelle voorgekom het. Daar is besluit om hierdie metode te laat vaar en 'n ander metode vir die doeleindes van hierdie studie aan te wend.

Die metode van Hackler en medewerkers (Hackler *et al.* 1995:282,287) het vanuit die staanspoor beter resolusie van die transferrien-isovorme gelewer. Alhoewel hierdie metode later verder verfyn is vir gebruik onder ons laboratoriumkondisies, kon die verwagte bande reeds met die eerste probeerslag waargeneem word (figuur 4.2). Soos verwag, verteenwoordig die donkerste band tetrasialotransferrien, terwyl ligter bande waargeneem is vir penta-, tri- en disialotransferrien (kyk afdeling 2.4.5). Hierdie patrone stem ooreen met die transferrienpatrone wat in die literatuur vir normale persone beskryf is (Yuasa *et al.* 1995:15; Landberg *et al.* 1996:267), maar daar was steeds onverklaarbare smere by hierdie monsters teenwoordig en geen verduideliking kon daarvoor gevind word nie. Die smere was nie te wyte aan enige van die reagense wat in die monstervoorbereiding gebruik is nie, aangesien van die reagense alleen op die jelle gelaai, geëlektroforeer, gekleur en ontkleur is net soos die monsters en daar geen smere of bande op die jelle sigbaar was nie (resultate nie gegee nie). Die vermoede bestaan dat hierdie smere 'n inherente eienskap van hierdie metode is en daar is voortgegaan met die studie omdat die transferrienpatrone steeds duidelik waarneembaar is ten spyte van die smere. Hierdie metode is dan verder in die studie aangewend om die mikroheterogeniteit van transferrien te bestudeer.

Elkeen van die ses tandjies van die toediener het 'n dun kapillêre buisie in die middel wat 'n monstervolume van 4 μ l kan bevat. Die buisie word met die verlangde volume vloeistof gevul m.b.v. 'n mikropipet en kapillêre suigkrag. As deel van die standaardisering van die IEF-tegniek, is die optimum monstervolume vir die bestudering van transferrienpatrone bepaal deur verskillende monstervolumes op 'n jel aan te bring (kyk afdeling 4.2.3). Die beste resolusie van die verwagte transferrienpatrone is verkry met 'n monstervolume van 1.5 μ l (kyk figuur 4.3). By groter volumes is waargeneem dat geen of baie onduidelike bande gevorm is en soms het die monster oor die jel gespoel, terwyl daar by 'n kleiner volume geen duidelike bande waargeneem is nie (figuur 4.3). Daar is besluit om in die res van die studie deurgaans 1.5 μ l as monstervolume te gebruik.

Buiten die verskillende elektroforeseprogramme wat in die standaardisering van die IEF-tegniek getoets is (kyk afdelings 4.2.1 en 4.2.2), is 'n aantal ander onverwagte probleme ondervind, onder andere die verkryging van vals positiewe resultate en hoë agtergrondkleuring van die jelle. Die oplos van hierdie probleemsituasies was baie tydrowend, maar bevredigende oplossings is in alle gevalle gekry en word in die volgende paragrawe bespreek.

Na die vasstelling van die mees geskikte elektroforese program, is begin met die verdere standaardisering van die IEF-tegniek deur analise van transferrien van 'n aantal normaalpersone. Daar is egter waargeneem dat serummonsters van hierdie persone klaarblyklike abnormale transferrienpatrone vertoon. By hierdie monsters was tetrasialotransferrien die duidelikste, terwyl kleiner hoeveelhede van penta-, tri- en disialotransferrien sigbaar was. Daar is egter 'n bandjie waargeneem waar asialotransferrien verwag word (figuur 4.4), 'n verskynsel wat tot nog toe nie in die literatuur beskryf is nie.

Verskillende pogings is aangewend om hierdie verskynsel te verklaar. Alle reagentie wat in hierdie studie gebruik is, is vars voorberei en die analises is herhaal, maar geen verandering is waargeneem nie (resultate nie gegee nie). Die vermoede het ontstaan dat dit mag wees a.g.v. die ystersitraat wat dalk nie voldoende opgelos het om effektief te kan wees in die versadiging van die transferrien nie. Nuwe ystersitraat is aangekoop, voorberei en die analises is herhaal, maar weereens is geen verandering waargeneem nie (resultate nie gegee nie). Gedurende hierdie tyd het die vermoede ook ontstaan dat die abnormale bandjies die gevolg mag wees van onvolledige versadiging van transferrien met yster a.g.v. 'n te lae inkubasietemperatuur (dit het begin winter word), aangesien die versadiging aanvanklik by kamertemperatuur uitgevoer is. Die inkubasietemperatuur van die monster met ystersitraat is verhoog na 37°C en 'n betekenisvolle verbetering in die resultaat is waargeneem. Die transferrienbande was beter sigbaar en die smere nie meer so donker nie, maar die abnormale patroon was steeds teenwoordig (kyk figuur 4.5).

Na verskeie herhalings en geringe aanpasings van hierdie deel van die analise, is die oorsaak van die probleem opgespoor. Daar is vasgestel dat die abnormale band die gevolg is van beskadiging van die jel tydens die plasing van die toediener op die jel. Die jelle is baie dun en kan dus maklik deur die toediener beskadig word, omdat dit sulke skerp randjies het. Daar word vermoed dat die toediener die jel sny tydens die toediening van die monster en dat die kleuringsreagens in hierdie snytjies vasgevang word en dus nie uitwas tydens die ontkleuringstap nie. Hierdie bandjie val egter nie presies saam met dié van asialotransferriene nie en die twee kan van mekaar onderskei word indien albei teenwoordig is (kyk figuur 4.16). Die bandjie wat gevorm is deur die beskadiging van die jel is ook 'n duidelike bandjie, en kan onderskei word van asialotransferriene omdat die nodige kontroles in elke analise ingesluit word.

Met die hantering van die jelle is dit ook van belang dat daarop gelet word dat die jel slegs aan die tongetjie hanteer word, aangesien die jel ook maklik beskadig word deur enige mate van ruwe hantering met 'n knyptangetjie (kyk figuur 4.5: beskadiging aan tongetjie van jel). Deur die jel aan die tongetjie te hanteer, word die skeidingsoppervlak van die jel nie beskadig nie en word die IEF-patroon dus nie beïnvloed nie.

Dit is egter opmerklik dat die verskynsel van skynbare abnormale bandjies nie by al die jelle voorkom nie en dat dit ook nie by al die bane van 'n spesifieke jel sigbaar is nie. Dit hang af van hoe hard die toediener op die jel neergeplaas word en waar die toediener vasgehou word tydens toediening (aan die linkerkant, aan die regterkant of in die middel van die toediener). Dit is belangrik dat die toediener baie versigtig op die jel neergeplaas word, sodat die jel nie beskadig word nie (kyk figuur 4.6), maar aan die ander kant moet daar wel seker gemaak word dat die monsters in die putjies van die toediener wel aan die jel raak. Die laai van die monsters op die jelle moet dus baie versigtig uitgevoer word, sodat geen vals positiewe resultate kan voorkom en 'n foutiewe diagnose gemaak word nie.

'n Verdere probleem wat opgeduik het, was die verkryging van hoë agtergrondkleuring by sommige jelle (figuur 4.7). Daar is waargeneem dat hierdie agtergrond selfs met verlengde ontkleuringstappe nie verwyder kon word nie. Die kleurstof word in etanol, asynsuur en water opgelos (kyk afdeling 3.4.2) en die vermoede het ontstaan dat die vlugtige stowwe moontlik kon verdamp het met die gebruik van die kleuringsreagens. Die kleuringsreagens is vars opgemaak wat die probleem van die hoë agtergrond van die jelle opgelos het. Daarna is die kleuringsreagens gereeld (weekliks) vars voorberei om herhaling van hierdie verskynsel te vermy.

Tydens die standaardisering van die IEF-tegniek het dit ook uit die literatuur aan die lig gekom dat transferrien vanuit bloeddruppels op filtreerpapier geëlueer en geanaliseer kan word (Stibler *et al.* 1993:58). Daar is besluit om hierdie moontlikheid ook te ondersoek en die serum van 'n aantal normaalpersone is op filtreerpapier gedrup, lugdroog laat word en gebruik vir analyses. Klein stukkies papier is met 'n gaatjiepons uitgedruk en transferrien is hieruit geëlueer (kyk afdeling 3.4.4.1). Twee van hierdie geponsede papiertjies (elk 5 millimeter in deursnee) is vir elke analise gebruik, aangesien daar waargeneem is dat daar uit slegs een papiertjie nie genoeg transferrien geëlueer kon word om 'n duidelike patroon te gee nie. Analise van die proteïene wat uit filtreerpapiertjies geëlueer is, het baie bevredigende resultate gelewer (figuur 4.8). Die verwagte normale transferrienpatroon is verkry en daar is besluit om deurgaans die monsters op hierdie manier te stoor, te elueer en te analiseer omdat die filtreerpapiertjies baie lank in 'n koevert in 'n yskas (4°C) gestoor kan word en steeds goeie resultate kan lewer (Stibler & Cederberg, 1993:58). Hierdie besluit is geneem want dit vergemaklik die neem van monsters (slegs 'n vingerprik is nodig), die vervoer en stoor van die monsters. Die vriesontdooi proses wat met serum uitgevoer word, word uitgeskakel en 'n relatief groot aantal analyses kan na een monsterneming uitgevoer word. Hierdie metode is hierna toegepas vir die analise van transferrien van alkoholiste, maar dieselfde goeie resultate is nie in hierdie geval verkry nie (figuur 4.9).

Met analise van die transferrien van alkoholiste uit serum wat op filtreerpapier gedrup is, is nie bevredigende resultate verkry nie. Die resolusie van die transferrien-isovorme was goed, maar die toename in disialotransferrien en afname in tetrasialotransferrien, soos in die literatuur beskryf is (Stibler & Borg, 1986:61; Löff *et al.* 1993:184), kon nie duidelik waargeneem word nie, alhoewel die asialotransferrien wel sigbaar was (figuur 4.9). Daar is besluit om die analise van die transferrienpatrone van alkoholiste eerder direk met die serum te doen, aangesien die verwagte patroon van transferrien van alkoholiste duidelik sigbaar was indien die analise direk uit die serum uitgevoer is (figuur 4.10). Die serum is by -70°C gestoor tot net voor gebruik. Daar word vermoed dat die toename in disialotransferrien en afname in tetrasialotransferrien by alkoholiste nie groot genoeg is om waar te neem indien die transferrien uit filtreerpapiertjies geëlueer word nie, want dit was wel sigbaar toe dieselfde analise met serum uitgevoer is (figuur 4.10). Omdat daar by normaalpersone (kontroles) geen asialotransferrien voorkom nie, kan asialotransferrien in die serum van die alkoholiste egter dadelik opgemerk word, al word die analyses uitgevoer op transferrien wat uit filtreerpapiertjies geëlueer is.

Nadat hierdie onverwagte probleme uitgestryk is, is hierdie tegniek op die analise van transferrien van alkoholiste toegepas omdat dit bekend is dat abnormale isovorme van transferrien by alkoholiste voorkom (kyk afdeling 2.4.5). Hierdie analises sou 'n goeie toets wees vir die waarneming van abnormale transferrienpatrone as 'n bevestiging van die toepasbaarheid van hierdie tegniek op patologiese monsters.

5.3 CDG-TRANSFERRIENPATRONE

Noudat die IEF-tegniek gestandaardiseer is, kon daar met die tweede gedeelte van die studie begin word, nl. die bestudering van transferrienpatrone in normaalpersone, alkoholiste en moontlike CDG-pasiënte.

Serummonsters van verskeie normaalpersone (manlik en vroulik, ouderdomme tussen 20 en 50) is verkry, op filtreerpapiertjies gedrup, gedroog en geanaliseer. Die transferrienpatrone wat waargeneem is, stem ooreen met wat uit die literatuur bekend is: 'n donker band, verteenwoordigend van tetrasialotransferrien, en ligter bande, verteenwoordigend van onderskeidelik penta-, tri- en disialotransferrien (kyk figuur 4.8). In sommige gevalle was selfs baie dowwe bandjies, verteenwoordigend van heksasialotransferrien, sigbaar. By geen van die normaalpersone is mono- of asialotransferrien opgemerk nie en die transferrienpatroon van die normaalpersone was deurgaans bykans identies, ongeag die geslag en/of ouderdomme van die normaalpersone. Hierdie patrone is dus as kontroles aanvaar en is in die res van die studie gebruik om die transferrienpatrone van alkoholiste en moontlike CDG-pasiënte mee te vergelyk.

Ten einde die standaard-tegniek se toepasbaarheid op patologiese monsters te bevestig, is daar besluit om monsters van 'n aantal alkoholiste te bestudeer, aangesien daar by hierdie pasiënte ook abnormale glikosilering van glikoproteïene mag voorkom (Stibler & Borg, 1986:61; Landberg *et al.* 1995:268). Dit word egter weereens beklemtoon dat die doel van hierdie gedeelte van die studie was om die bruikbaarheid van die standaard-tegniek te bevestig en dat daar deurgaans in hierdie studie slegs gefokus is op die teenwoordigheid van abnormale transferrienpatrone. Geen kwantifisering van enige van die transferrienisovorme is uitgevoer nie.

Serummonsters van alkoholiste is goedgegunstiglik verkry vanaf die metabolisme afdeling van hierdie departement en transferrienpatrone van hierdie pasiënte is direk vanuit die serum geanaliseer (kyk afdelings 3.4.4.2, 5.2 en ook figuur 4.11). Die kenmerkende abnormale patroon van transferrien by alkoholiste is baie duidelik waargeneem, nl. die tetrasialotransferrien neem effens af (bandjie word ligter), disialotransferrien neem toe (bandjie vertoon donkerder as by kontroles), terwyl asialotransferrien ook voorkom (figuur 4.11). Hierdie resultate stem ooreen met wat uit die literatuur bekend is (kyk afdeling 2.4.5) en daar is dus aanvaar dat die gestandaardiseerde IEF-tegniek wel met

groot sukses aangewend kan word in die bestudering van glikosileringsdefekte met transferrien as merker.

Drie serummonsters van verskillende CDG-pasiënte wat vanaf medewerkers in België verkry is, is geanaliseer om te dien as positiewe kontroles in hierdie studie. Hierdie monsters is in die vorm van gedroogde serum op filtreerpapier tjijs verkry en is geëlueer en geanaliseer volgens die standaardmetode soos beskryf in afdelings 3.4.4.1 en 4.3.3. Die transferrienpatrone van hierdie kontroles het baie duidelik verskil van dié van normaalpersone (figuur 4.12). Die twee kontroles wat gediagnoseer is met CDG tipe 1 het verlaagde vlakke van tetrasialotransferrien en verhoogde vlakke van disialotransferrien getoon, terwyl asialotransferrien ook in die patrone voorkom. Hierdie resultate stem ooreen met resultate wat voorheen gepubliseer is (afdeling 2.3.2.1). Die derde kontrole is 'n pasiënt wat met CDG tipe 2 gediagnoseer is, maar analise van hierdie monster het 'n resultaat gegee wat nie ooreenstem met wat in die literatuur vir tipe 2 beskryf is nie. Die CDG tipe 2 kontrole het geen tetrasialotransferrien getoon nie, maar wel sterk verhoogde disialotransferrien en ook asialotransferrien, terwyl daar in die literatuur gerapporteer is dat CDG tipe 2 pasiënte verhoogde tri-, di- en monosialotransferrien vertoon, maar geen asialotransferrien nie (kyk afdeling 2.3.3.1). Daar word vermoed dat hierdie monster dalk gedegradeer het of dat 'n foutiewe diagnose in die geval van hierdie pasiënt gemaak is.

Serummonsters van verskeie moontlike CDG-pasiënte is vanaf die metabolisme afdeling van hierdie departement verkry nadat die pasiënte deur hul onderskeie pediater en/of huisdokters verwys is. Monsters is ook verkry vanaf 'n plaaslike hospitaal vir verstandelik gestremde persone en verskeie van hierdie pasiënte is deur 'n sielkundige van die hospitaal geïdentifiseer as moontlike CDG-pasiënte. Die bloed van hierdie pasiënte is op filtreerpapier gedrup, gedroog, geëlueer en geanaliseer soos reeds beskryf in afdeling 3.4.4.1. Vanuit hierdie monsters is vier verskillende abnormale transferrienpatrone verkry.

Die eerste moontlike positiewe resultaat word in figuur 4.13, baan 4 gegee (pasiënt ES, vroulik, blank) en daar kan 'n duidelike abnormale patroon waargeneem word: disialotransferrien is verhoog in vergelyking met die kontroles (bane 1 en 6) en 'n baie duidelike band verteenwoordigend van asialotransferrien kan waargeneem word. In hierdie geval is hierdie band nie a.g.v. beskadiging van die jel nie, maar wel a.g.v. die voorkoms van asialotransferrien in hierdie monster. In bane 2 en 3 is monsters van positiewe kontroles (CDG tipe 1) gelaai en dit is duidelik dat die transferrienpatroon van die pasiënt ES met hierdie monsters ooreenstem. Baie min kliniese inligting is egter aangaande hierdie pasiënt beskikbaar, maar dit is wel bekend dat hierdie pasiënt psigomotoriese vertraging toon. Daar word dus sterk vermoed dat pasiënt ES wel ly aan die CDG-sindroom tipe 1. Dit is egter nie moontlik om vanuit hierdie inligting te bepaal of die pasiënt aan tipe 1A of 1B ly nie, aangesien die transferrienpatrone van hierdie twee subtipes ooreenstem (kyk afdeling 2.3.2.1). Om die sub tipe vas te stel, moet die aktiwiteite van PMM en PMI van hierdie pasiënt bepaal en 'n deeglike kliniese beskrywing moet uitgevoer word.

'n Volgende moontlike positiewe resultaat is verkry vanuit die plaaslike hospitaal vir verstandelik gestremde persone, naamlik pasiënt ST. Hierdie pasiënt is vroulik, swart, 26 jaar oud en verstandelik gestremd, maar geen verdere kliniese inligting aangaande hierdie pasiënt is bekend nie. In figuur 4.14, word die resultaat van die analise van 'n paar van die pasiënte uit die hospitaal gegee en kan gesien word dat die monsters in bane 3, 4 en 5, tesame met die twee kontroles in bane 1 en 6, normale transferrienpatrone gelewer het. In baan 2 is die abnormale patroon van pasiënt ST sigbaar: by hierdie pasiënt is tri- en disialotransferrien verhoog in vergelyking met die kontroles en asialo- sowel as monosialotransferrien kom voor. Figuur 4.16 gee 'n resultaat waar afnemende volumes van hierdie persoon se serum op die jel gelaai is om aan te toon dat die abnormale patroon deurgaans sigbaar is en dat die patroon nie 'n artefak van die tegniek is of dat die band, verteenwoordigend van asialotransferrien, nie is as gevolg van beskadiging van die jel

nie. Onder die band wat asialotransferrien verteenwoordig, kan die addisionele bandjie waargeneem word. Hierdie bandjie is die gevolg van die beskadiging van die jel deur die toediener en kan onderskei word van die band verteenwoordigend van asialotransferrien. Dit is dus moontlik om die twee bande van mekaar te onderskei indien asialotransferrien wel voorkom, maar indien geen asialotransferrien voorkom nie, moet groot sorg gedra word dat daar geen twyfel bestaan oor die oorsprong van enige band wat in die omgewing waar asialotransferrien verwag word, voorkom nie (kyk volgende paragraaf). Die resultaat in figuur 4.16 stem ooreen met inligting vanuit die literatuur wat aangaande CDG tipe 3 gepubliseer is (kyk afdeling 2.4.5). Daar word dus vermoed dat hierdie pasiënt ly aan CDG tipe 3 en tot op hede is daar geen verdere analises beskikbaar wat hierdie vermoede kan bevestig nie.

Die volgende geval van 'n moontlike positiewe resultaat, is 'n 20-jarige swart man (pasiënt SN) wat verstandelik gestremd is en ook in hierdie geval is geen verdere kliniese inligting aangaande die pasiënt beskikbaar nie. In figuur 4.15 word die transferrienpatroon gegee wat daarop dui dat in die geval van hierdie pasiënt abnormale glikosilering van transferrien voorkom (baan 5). Monosialotransferrien en verhoogde vlakke van tri- en disialotransferrien kom voor, tesame met 'n bandjie in die omgewing waar asialotransferrien verwag word. Hierdie patroon stem ook ooreem met die gepubliseerde transferrienpatroon van persone wat ly aan CDG tipe 3 (kyk afdeling 2.4.5), maar in figuur 4.17 kan gesien word dat die band wat eers as asialotransferrien aangesien is, inderdaad 'n band is wat veroorsaak is deur beskadiging van die jel. Hierdie figuur gee die resultaat van afnemende monstervolumes van pasiënt SN wat op 'n jel gelaai is en in bane 2 tot 5 kan gesien word dat die band wat voorkom waar asialotransferrien verwag word, nie presies op die posisie voorkom waar asialotransferrien sou wees nie (vergelyk met figuur 4.16). Hierdie resultaat bevestig dat die toediening van die monsters op die jel met die toediener met groot sorg uitgevoer moet word, sodat die jel nie beskadig word nie. Met die resultate van figure 4.15 en 4.17 beskikbaar, is besef dat, in die geval van hierdie pasiënt, transferrienpatrone voorkom wat moontlik ooreenstem met gepubliseerde

inligting vir CDG tipe 2 (kyk afdeling 2.4.5), behalwe dat hierdie pasiënt ook verhoogde monosialotransferrien vertoon.

Die laaste abnormale transferrienpatroon wat verkry is, is van 'n pasiënt (pasiënt DL, manlik, blank en 6 maande oud) wat ongelukkig kort na die analise van hierdie monster, gesterf het. Hierdie pasiënt is voor sy afsterwe gediagnoseer met Mohr se sindroom, maar daar is wel abnormale transferrienpatrone waargeneem by hierdie pasiënt (figuur 4.18). In bane 2 en 3 van hierdie jel is monsters van hierdie pasiënt gelaai en veral in baan 2 kan 'n duidelike abnormale patroon waargeneem word: verhoogde tri-, di- en monosialotransferrien, met asialotransferrien wat ook voorkom. Daar moet weereens gelet word dat hierdie band, verteenwoordigend van asialotransferrien, wel asialotransferrien is en nie as gevolg van die beskadiging van die jel nie. Die patroon wat by hierdie pasiënt waargeneem is, stem ooreen met inligting wat bekend is aangaande persone wat ly aan CDG tipe 3, maar ongelukkig is geen verdere materiaal van hierdie pasiënt beskikbaar nie. Die patroon in baan 3 van figuur 4.18 dui ook die abnormale patroon aan, maar is nie so duidelik soos die patroon in baan 2 nie. Hierdie monster is sewe dae na dié in baan 2 geneem, maar die twee monsters is tegelykertyd geanaliseer. Alhoewel die verskynsel nog nie in die literatuur beskryf is nie, moet die moontlikheid dat hierdie abnormale bande die gevolg van sekere medikasie kon gewees het, ook in gedagte gehou word.

Alhoewel die mikroheterogeniteit van transferrien as gevolg van verskille in die koolhidraatgroepe in hierdie studie bestudeer is, (kyk afdeling 2.4.3.3), is 'n interessante waarneming gemaak aangaande die mikroheterogeniteit van transferrien as gevolg van 'n genetiese polimorfisme (kyk afdeling 2.4.3.1). In die transferrienpatroon wat in figuur 4.13, baan 1 gegee word, kan hierdie polimorfisme duidelik waargeneem word: 'n dubbele transferrienbandjie is sigbaar in die omgewing waar disialotransferrien voorkom (kyk ook vergrote gedeelte van baan 1).

5.4 GEVOLGTREKKING

Hoewel IEF baie algemeen in Europese lande aangewend word as diagnostiese tegniek in die opsporing van glikosileringsdefekte soos die CDG-sindrome, is geen studie van die voorkoms van hierdie siektes in Suid Afrika al aangepak nie. Die doel van hierdie studie was die standaardisering van 'n IEF-tegniek vir die analise van transferrienglikosilering, met daaropvolgende toepassing van hierdie tegniek op monsters van 'n aantal verskillende normaalpersone, alkoholiste en ook moontlike CDG-pasiënte. Serummonsters van sewentien moontlike pasiënte is geanaliseer, tesame met monsters van 'n aantal normaalpersone en alkoholiste. In die geval van die normaalpersone is die verwagte transferrienpatrone, soos in die literatuur beskryf (kyk afdeling 2.4.5), verkry en ook in die geval van alkoholiste stem die verkrygte transferrienpatrone ooreen met patrone wat in die literatuur beskryf is (kyk afdeling 2.4.5). In die geval van vier moontlike pasiënte is abnormale transferrienpatrone waargeneem. Die CDG-sindrome is skaars siektetoestande (kyk afdeling 2.3.2) en dit wil dus voorkom dat hierdie 'n hoë aantal gevalle met abnormale transferrienpatrone is. Daar moet egter in gedagte gehou word dat hierdie pasiënte sommige van die kenmerkende simptome van die CDG-sindrome getoon het en dus 'n verrykte, maar klinies baie swak beskrewe groep was. Die aantal abnormale transferrienpatrone wat waargeneem is, is egter steeds groot in verhouding met die toetsgroep en regverdig verdere studies in hierdie veld. Die moontlikheid dat die siektetoestande 'n baie hoë voorkoms in Suid Afrika mag hê, bestaan wel en die resultate van hierdie studie dui daarop dat die moontlikheid verder bestudeer moet word.

Buiten IEF word vele ander tegnieke ook toegepas in die bestudering van glikosilering van glikoproteïene, waaronder twee-dimensionele jelelektroforese (Henry *et al.* 1997:412; Gravel *et al.* 1996:78), vloeistof-chromatografie (Regoeczi & Bolyos, 1994:35) en ook anioonuitruilingschromatografie (Landberg *et al.* 1995:267). IEF is egter 'n baie handige

tegniek in die bestudering van transferrienglikosilering, aangesien dit 'n relatief eenvoudige tegniek is en goeie resolusie van transferrien-isovorme met die tegniek verkry word. Dit moet egter altyd in gedagte gehou word dat hierdie tegniek nou moet saamhang met deeglike kliniese beskrywings van moontlike pasiënte.

Die verskillende subtypes van die CDG-sindrome vertoon verskillende abnormale transferrienpatrone (kyk afdeling 2.4.5). In geval van twee van die subtypes is die defek bekend en kan daar gespekuleer word aangaande die ontstaan van die abnormale transferrienpatrone. In die geval van CDG tipe 1A en 1B lê die defek in die metabolisme van mannose, wat 'n belangrike komponent van N-gekoppelde glikane uitmaak, terwyl die defek van CDG tipe 2 lê in die GnT2-ensiem. Die molekulêre oorsake van tipes 3 en 4 is egter nog nie bekend nie.

Die resultate wat in die studie verkry is, is bestudeer en bespreek en daar kan met vrymoedigheid aanvaar word dat die IEF-tegniek suksesvol gestandaardiseer is en met groot welslae aangewend is in die analise van monsters van 'n aantal normaalpersone om 'n normale patroon van transferrien te karakteriseer en ook monsters van alkoholiste en moontlike CDG-pasiënte. Hierdie tegniek is reeds so verfyn dat selfs onderlinge verskille in 'n enkele transferrien-isovorm as gevolg van 'n genetiese polimorfisme waargeneem kan word.

Sover ons kennis strek, is dit die eerste maal dat 'n studie aangaande die CDG-sindrome in Suid Afrika aangepak is en is ons positiewe resultate ook die eerste van hulle aard in

die land. Dit is ook die eerste maal dat skynbare abnormale transferrienpatrone by swart pasiënte gerapporteer is en ons kan dus met vertroue aanvaar dat hierdie tegniek met groot sukses in verdere studies aangaande glikosileringsdefekte gebruik kan word.

LITERATUURVERWYSINGS

Andrèasson, S., Stibler, H. & Ehinger, B. 1992. Serum transferrin in patients with retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmologica*, 70 : 525-527.

Barone, R., Carchon, H., Jansen, E., Pavone, L., Fiumara, A., Bosshard, N.U., Gitzelmann, R. & Jaeken, J. 1998. Lysosomal enzyme activities in serum and leukocytes from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A (phosphomannomutase deficiency). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21 : 167-172.

Berger, D. & Beger, H.G. 1987. Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 163 : 289-299.

Charlwood, J., Clayton, P., Johnson, A., Keir, G., Mian, N. & Winchester, B. 1997. A case of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 (CDGS type 1) with normal phosphomannomutase activity. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 20 : 817-827.

De Jong, G., Van Dijk, J.P. & Van Eijk, H.G. 1990. The biology of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 190 : 1-46.

De Koning, T.J., Dorland, L., Van Diggelen, O.P., Boonman, A.M.C., De Jong, G.J., Van Noort, W.L., De Schryver, J., Duran, M., Van Den Berg, I.E.T., Gerwig, G.J., Berger, R. & Poll-The, B.T. 1998. A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 245 : 38-42.

Dwek, R.A. 1996. Glycobiology, a quantum leap in carbohydrate chemistry. *Quantum Leaps in Biochemistry*, 2 : 153-202.

Gianazza, E., Baldassarre, D., Michelagnoli, S., Coari, P. & Sirtori, C.R. 1994. Glycosylation pattern of platelet glycoprotein IIb and IIIa in type IIa hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 107 : 221-227.

Gravel, P., Walzer, C., Aubry, C., Balant, L.C., Yersin, B., Hochstrasser, D.F. & Guimon, J. 1996. New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220 : 78-85.

Hackler, R., Arndt, T., Kleine, T.O. & Gressner, A.M. 1995. Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. *Analytical Biochemistry*, 230 : 281-289.

Henry, H., Tissot, J-D., Messerli, B., Markert, M., Muntau, A., Skladal, D., Sperl, W., Jaeken, J., Weidinger, S., Heyne, K. & Bachmann, C. 1997. Microheterogeneity of serum glycoproteins and their liver precursors in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: Apparent deficiencies in clusterin and serum amyloid P. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 129 : 412-421.

Jaeken, J., Hagberg, B. & Strømme, P. 1991. Clinical presentation and natural course of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paediatrica Scandinavica*

Supplement, 375 : 6-13.

Jaeken, J., Artigras, J., Barone, R., Fiumara, A., De Koning, T.J., Poll-The, B.T., De Rijk-Van Andel, J.F., Hoffmann, G.F., Assmann, B., Mayatepek, E., Pineda, M., Vilaseca, M.A., Saudubray, J-M., Schlüter, B., Wevers, R. & Van Schaftingen, E. 1997. Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type 1 isoelectrofocusing pattern of serum sialotransferrins. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 20 : 447-449.

Jaeken, J., Matthijs, G., Saudubray, J-M., Dionisi-Vici, C., Bertini, E., De Lonlay, P., Henri, H., Carchon, H., Schollen, E. & Van Schaftingen, E. 1998. Phosphomannose isomerase deficiency: A carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with hepatic-intestinal presentation. *American Journal of Human Genetics*, 62 : 1535-1539.

Kristiansson, B., Stibler, H., Conradi, N., Eriksson, B.O. & Ryd, W. 1998. The heart and pericardial effusions in CDGS-1 (carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21 : 112-124.

Landberg, E., Pålsson, P., Lundblad, A., Arnetorp, A. & Jeppsson, J-O. 1995. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210 : 267-274.

Löf, K., Koivula, T., Seppä, K., Fukunaga, T. & Sillanaukee, P. 1993. Semi-automatic method for determination of different isoforms of carbohydrate-deficient transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 217 : 175-186.

Marquardt, T., Hasilik, M., Nieheus, R., Herting, M., Muntau, A., Holzbach, U., Hanefeld, F., Freeze, H. & Harms, E. 1997. Mannose therapy in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 - first results of the German multicenter study. *Amino Acids*, 12 : 387-392.

Mathews, C.K. & Van Holde, K.E. 1990. Biochemistry. Redwood City, Calif. : Benjamin/Cummings. 1129p.

Matthijs, G., Schollen, E., Pardon, E., Veiga-Da-Cunha, M., Jaeken, J., Cassiman, J-J. & Van Schaftingen, E. 1997. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type 1 syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genetics*, 16 : 88-92.

Matthijs, G., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Cassiman, J-J. & Jaeken, J. 1998. Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *American Journal of Human Genetics*, 62 : 542-550.

Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. & Schachter, H. 1995. Glycoproteins. (*In: Neuberger, A & Van Deenen, L.L.M., eds. New Comprehensive Biochemistry. Vol. 29a. Amsterdam : Elsevier. p.1-28.*).

Nieheus, R., Hasilik, M., Alton, G., Körner, C., Schiebe-Sukumar, M., Koch, H.G., Zimmer, K-P., Wu, R., Harms, E., Reiter, K., Von Figura, K., Freeze, H.H., Harms, H.K. & Marquardt, T. 1998. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1B: Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 101 : 1414-1420.

Regoeczi, E. & Bolyos, M. 1994. Isolation of the four forms of transferrin with respect to iron by high-performance liquid chromatography: Comparison of three mammalian species. *Journal of Chromatography*, 653 : 35-40.

Schaeffer, E., Lucero, M.A., Jeltsch, J-M., Py, M-C., Levin, M.J., Chambon, P., Cohen, G.N. & Zakin, M.M. 1987. Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. *Gene*, 56 : 109-116.

Stibler, H., Borg, S. & Allgulander, C. 1979. Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Medica Scandinavica*, 206 : 275-281.

Stibler, H. & Borg, S. 1986. Carbohydrate composition of serum transferrin in alcoholic patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 10 : 61-64.

Stibler, H. & Cederberg, B. 1993. Diagnosis of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by analysis of transferrin in filter paper blood spots. *Acta Paediatrica*, 82 : 55-59.

Stibler, H., Blennow, G., Kristiansson, B., Lindehammer, H. & Hagberg, B. 1994. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: Clinical expression in adults with a new metabolic disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 57 : 552-556.

Stibler, H., Stephani, U. & Kutsch, U. 1995. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome – a fourth subtype. *Neuropediatrics*, 26 : 235-237.

Tan, J., Dunn, J., Jaeken, J. & Schachter, H. 1997. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 2. An autosomal recessive disease due to point mutations in the N-acetylglucosaminyltransferase 2 gene. *Amino Acids*, 12 : 387-392.

Van Eijk, H.G. & Van Noort, W.L. 1992. The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: Quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis*, 13 : 354-358.

Van Noort, W.L. & Van Eijk, H.G. 1992. Separation of human serum and cerebrospinal fluid transferrins in subfractions by isoelectric focusing with PhastSystem and quantitations with the Ultrascan XL densitometer. *Science Tools*, 36 : 1-6.

Van Schaftingen, E. & Jaeken, J. 1995. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *FEBS Letters*, 377 : 318-320.

Voet, D. & Voet, J.G. 1995. Biochemistry. 2nd ed. New York : John Wiley. 1361p.

Wilson, K. & Goulding, K.H. 1986. A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 3rd ed. London : Edward Arnold. 396p.

Yuasa, I., Ohno, K., Hashimoto, K., Iijima, K., Yamashita, K. & Takeshita, K. 1995. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: electrophoretic study of multiple serum glycoproteins. *Brain and Development*, 17 : 13-19.

LYS VAN AFKORTINGS

Asn	Asparagien
CDG	Koolhidraat-tekort glikoproteïen (Carbohydrate-deficient glycoprotein)
CDT	Koolhidraat-tekort transferrien (Carbohydrate-deficient transferrin)
CMP	Sitidien-monofosfaat
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonukleiensuur
ER	Endoplasmiese retikulum
Fe _n Tf	Monoferriese transferrien (yster-atoom gebind aan N-terminale kant van polipeptied)
Fe ₂ Tf	Diferriese transferrien
Fe(III)sitraat	Yster ³⁺ sitraat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-asetielgalaktoosamien
GDP	Guanosien-difosfaat
Glc-NAc	N-asetielglukoosamien
Gly	Glisien
GnT ₂	UDP-GlcNAc:α-6-D-mannosied-β-1,2-N-asetielglukoosaminieltransferase 2 (N-asetielglukoosaminieltransferase 2)
GPI	Glikosiefosfatidielinositol
IEF	Iso-elektriese fokusering
KMR	Kern-magnetiese resonansspektrometrie

M	Molêr (mol per liter)
mA	Milli-Ampere
Man	Mannose
NAcNeu	N-asetielneuramiensuur
NaCl	Natriumchloried
NAG	N-asetielglukoosamien
NaHCO ₃	Natriumwaterstofkarbonaat (Natriumbikarbonaat)
Opm	Omwentelings per minuut
PAGE	Poli-akrielamiedjelektroforese
pI-punt	Iso-elektriese punt
PMI	Fosfomannose-isomerase
PMM	Fosfomannomutase
SDS-PAGE	Natrium-dodesiel poli-akrielamiedjelektroforese
Ser	Serien
TCA	Tri-chloorasynsuur
TfB	Transferrien B-fenotipe
TfC	Transferrien C-fenotipe
TfD	Transferrien D-fenotipe
TfFe _c	Monoferriese transferrien (yster-atoom gebind aan C-terminaal van polipeptied)
Thr	Treonien
UDP	Urasil-difosfaat
UDP-GalNAc	Urasil-difosfaat N-asetielgalaktoosamier
UDP-GlcNAc	Urasil-difosfaat N-asetielglukoosamien
UDP-NAG	Urasil-difosfaat N-asetielglukoosamien
V	Volt
Vh	Volt-uur
W	Watt
(w/v)	Gewig per volume

LYS VAN AFKORTINGS

Hierdie afkortings word in Engels verklaar ter wille van duidelikheid

FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectrometry
GLC-MS	Gas liquid chromatography mass spectrometry
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MS-MS	Tandem mass spectrometry