

Congenital Disorder of Glycosylation (CDG)-Ih

Identifizierung eines Defekts in der Dol-P-Man:Man₁₋₂-GlcNAc₂-
PP-Dol Mannosyltransferase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christian Thiel

aus Göttingen

Göttingen 2002

D7

Referent: Prof. Dr. K. von Figura

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2002

Für meine Frau und meine Kinder

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Glykosylierung von Proteinen	1
1.2	Grundlagen der Protein-Glykosylierung	1
1.2.1	O-Glykane	1
1.2.2	N-Glykane	2
1.3	Defekte in der N-Glykosylierung	4
	CDG-Ia	6
	CDG-Ib	7
	CDG-Ic	8
	CDG-Id	9
	CDG-Ie	10
	CDG-If	10
	CDG-Ig	11
	CDG-IIa	11
	CDG-IIb	12
	CDG-IIc	12
	CDG-IId	13
2	Problemstellung	14
3	Materialien und Methoden	15
3.1	Materialien	15
3.1.1	Geräte	15
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3	Chemikalien	17
3.1.4	Detergenzien	20
3.1.5	Enzyme, DNA- und Proteinstandards, Antibiotika	20
3.1.6	Kits zur Bearbeitung von DNA und RNA	20
3.1.7	EDV	21
3.1.8	Antikörper	21
3.1.9	Radioaktive Substanzen	21
3.1.10	Vektoren	21
3.1.11	Bakterienstämme	22
3.1.12	Zelllinien	22
3.1.13	Standardpuffer und -lösungen	23
3.1.14	Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	24
3.1.15	Antibiotikum	25
3.1.16	Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	25

3.2	Methoden	26
3.2.1	Methoden zur Arbeit mit bakteriellen Kulturen	26
3.2.1.1	Flüssigkulturen	26
3.2.1.2	Plattenkulturen	26
3.2.1.3	Stammkonservierung und Reaktivierung	26
3.2.1.4	Reinheitskontrollen	27
3.2.1.5	Zelldichtebestimmungen	27
3.2.1.6	Zellernte	27
3.2.2	Zellbiologische Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Kulturen	27
3.2.2.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	27
3.2.2.2	Trypsinieren und Ernten von Zellen	28
3.2.2.3	Kryokonservierung von Zellen	28
3.2.2.4	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	28
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	29
3.2.3.1	Serumpräparation aus venösem Blut	29
3.2.3.2	Eisensättigung der Serumproben	29
3.2.3.3	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976), modifiziert	29
3.2.3.4	Isoelektrische Fokussierung von Serumtransferrin	30
3.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen	31
3.2.3.6	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	33
3.2.3.7	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen ("Western blotting")	34
3.2.3.8	Detektion von Proteinen auf Nitro-Zellulosemembranen	34
3.2.3.9	Chemilumineszenz-Nachweis	35
3.2.3.10	Herstellung von Fibroblastenextrakten	35
3.2.3.11	Bestimmung der Aktivität der Phosphomannomutase 2 in Patienten- und Kontrollfibroblasten	35
3.2.3.12	Bestimmung der Aktivität der Phosphomannose Isomerase (PMI) in Patienten- und Kontrollfibroblasten	36
3.2.3.13	Metabolische Markierung von Fibroblasten mit [2- ³ H]-Mannose	36
3.2.3.14	Milde Säurebehandlung und HPLC-Analyse langkettiger lipidverknüpfter Oligosaccharide	36
3.2.3.15	Enzymatische Deglykosylierung proteinverknüpfter Oligosaccharide durch PNGase F	37
3.2.3.16	Milde Säurebehandlung und HPLC-Analyse kurzkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide	37
3.2.3.17	Markierung von Oligosacchariden mit PMP	38
3.2.3.18	Massenspektrometrische Untersuchungen von abgespaltenen Zuckerketten	38

3.2.4	Methoden zur molekularbiologischen Arbeit mit DNA und RNA	39
3.2.4.1	Leukozytenpräparation	39
3.2.4.2	Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten und primären, humanen Fibroblasten	39
3.2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA	40
3.2.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.4.4.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	40
3.2.4.4.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	41
3.2.4.5	Phenol-Chloroform-Extraktion	42
3.2.4.6	Alkoholpräzipitation	42
3.2.4.6.1	Alkoholpräzipitation von DNA mit Ethanol	42
3.2.4.6.2	Alkoholpräzipitation von DNA mit Isopropanol	43
3.2.4.7	Lagerung von DNA und RNA	43
3.2.4.8	Restriktionsverdau von DNA	43
3.2.4.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	44
3.2.4.10	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.4.11	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese nach SOUTHERN (1979)	45
3.2.4.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
3.2.4.13	Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA	46
3.2.4.14	Ligation	46
3.2.4.15	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen nach (INOUE et al., 1990) und Transformation von kompetenten Zellen	46
3.2.4.16	DNase I-Verdau	48
3.2.4.17	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	48
3.2.4.18	Polymerase-Chain-Reaction (PCR) nach SAIKI et al. (1985), modifiziert	49
3.2.4.19	<i>In vitro</i> -Mutagenese	50
3.2.4.20	DNA-Sequenzierung	51
3.2.4.21	Northern Blot von Gesamt-RNA der Patientin und Kontrollen	52
3.2.4.22	DNA-Markierung mit α - ³² P-dCTP	53
3.2.4.23	Hybridisierung der Hybond-N-Filter mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	54
3.2.4.24	Transfektion von FNX-Eco-Zellen mit FuGENE6-Transfektionsreagenz	55
3.2.4.25	Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten	56
3.2.4.26	Verwendete Primer für PCR und Sequenzierung	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Patientenanamnese	58

4.2	Proteinbiochemische Untersuchungen	59
4.2.1	Isoelektrische Fokussierung und Western Blot Analyse des Serum-Transferrins	59
4.2.2	Bestimmung der Aktivität der Phosphomannomutase 2	60
4.2.3	Bestimmung der Aktivität der Phosphomannose Isomerase	62
4.2.4	HPLC-Analyse Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S. zum Ausschluß der CDG-Typen Ic, Id, Ie, If und Ig	62
4.2.5	HPLC-Analyse Protein-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S.	64
4.2.6	Dünnschichtchromatographie kurzkettiger Lipid-verknüpfter Oligosaccharide	65
4.2.7	HPLC-Auftrennung kurzkettiger, Lipid-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S. und massenspektrometrische Analyse der Verbindungen	67
4.3	Molekularbiologische Untersuchungen	69
4.3.1	Orthologe zum ALG2-Protein der Hefe	69
4.3.2	Überprüfung des humanen <i>alg2</i> -Locus' durch Sequenzierung	71
4.3.3	Identifizierung einer Mutation auf dem paternalen Allel	75
4.3.4	Überprüfung der Expression der langen und kurzen <i>alg2</i> -Form mittels Northern Blot	78
4.3.5	Expression der WT-cDNA und der Δ 1040G-cDNA für die lange ALG2-Isoform in den Hautfibroblasten der Patientin	80
4.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	81
5	Diskussion	82
5.1	Die Unterglykosylierung von Glykanen der Patientin M.S. basiert auf keinem der bisher bekannten CDG-Typen	82
5.2	Die molekulare Ursache der Erkrankung der Patientin M.S. ist auf einen frühen Defekt in der Biosynthese Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide zurückzuführen	84
5.3	Die Überprüfung des humanen Orthologs zum Hefe <i>alg2</i>-Gen der Patientin M.S. zeigte zwei Mutationen	89
5.4	Die Expression der WT-cDNA für die lange hALG2-Isoform in den Patientenfibroblasten führte zur Normalisierung des Glykosylierungsmusters	92
6	Zusammenfassung	94
7	Ausblick	97
8	Literaturverzeichnis	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession Number
ALG	Asparagine linked glycosylation
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDG	Congenital Disorder(s) of Glycosylation
CDGS	Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie ($2,22 \times 10^6$ counts per minute)
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
Dol	Dolichol
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylgalaktosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
³ H	Tritium
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (lat. und andere)
FKS	fötales Kälberserum
G418	Geneticin [®] 418
Glc	Glucose
h	Stunde(n)
³ H	Tritium
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactopyranosid
kbp	kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Broth
LLO	lipid linked oligosaccharides
m	milli
M	molar
Man	Mannose
mA	milli Ampere

MCS	multiple cloning site
min	Minute(n)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
μ	mikro
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	nano
NANA	Sialinsäure
neo	Neomycin
OD	Optische Dichte
³² P	Phosphor 32
p	pico
P	Phosphat
p.a.	pro analysi (lat. zur Analyse)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMI	Phosphomannose Isomerase
PMM2	Phosphomannomutase 2
PNS	Postnukleärer Überstand
PP	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoacetat
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region (nicht-codierender Bereich)
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder im Ein-Buchstabencode angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung von Proteinen stellt eine der häufigsten Formen der Proteinmodifikation in Tieren, Pflanzen und Bakterien dar. Glykoproteine treten in subzellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi, den Lysosomen, den Peroxisomen aber auch im Cytoplasma auf. Sie sind sowohl in zellulären Membranen als auch in extrazellulären Flüssigkeiten und Matrices vertreten. Glykoproteine greifen in eine Vielzahl lebenswichtiger Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung, Entwicklung von Organen, Signalübertragung, Abwehr, Entzündung und maligne Entartung ein. Im Rahmen der Glykoproteinbiosynthese werden Kohlenhydratketten schrittweise durch eine Reihe von Glykosyltransferasereaktionen erzeugt und anschließend kovalent an Aminosäurereste eines Glykoproteins angeheftet. An der Glykosylierung von Proteinen sind mehr als 300 verschiedene Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Transportproteine beteiligt. Die an ein Glykoprotein angehängten Kohlenhydratketten schützen das Protein vor Proteasen, sind für die Funktionalität, die korrekte Faltung, die Löslichkeit sowie den gerichteten Transport eines Proteins innerhalb einer Zelle als auch zu spezifischen Zielzellen mitverantwortlich (Varki et al., 1993). In interzellulären Prozessen sind die Kohlenhydratseitenketten beispielsweise bei der Fertilisation (Gabiuss et al., 1987), der Embryogenese (Lennarz et al., 1993) oder der Zelladhäsion von großer Bedeutung. Die Aufklärung einer ganzen Reihe von vererbten N-Glykosylierungsdefekten beim Menschen in den letzten Jahren (s.u.) verdeutlicht die wichtige Funktion des Oligosaccharidanteils der Glykoproteine.

1.2 Grundlagen der Protein-Glykosylierung

Die Glykananteile von Glykoproteinen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die O-verknüpften Glykane und die N-verknüpften Glykane. Da die vorliegende Arbeit lediglich auf die N-Glykansynthese eingeht, wird im Folgenden nur eine kurze Zusammenfassung zu den O-Glykanen gegeben.

1.2.1 O-Glykane

O-Glykane lassen sich abhängig von der Verknüpfung zwischen ihren Zucker- und Aminosäurereste in drei Hauptgruppen unterteilen. Bei der häufigsten Form der O-

Glykane in tierischen Zellen, handelt es sich um Glykane des Muzin-Typs, bei denen die N-Acetylgalaktosaminreste auf Serin- oder Threoninreste übertragen werden. Der Muzin-Typ ist beispielsweise für die glatte Beschaffenheit von Epithelien sowie für die Ausbildung einer Barriere zwischen epithelialeem Gewebe und Körperflüssigkeiten verantwortlich. Darüberhinaus gibt es den O-GlcNAc-Typ, bei dem N-Acetylglucosamin mit Serin oder Threonin verknüpft wird sowie den Xylulose-Typ, bei dem dieser Zucker an Serin- oder Threoninreste in Proteoglykanen gebunden ist.

1.2.2 N-Glykane

Die Biosynthese N-glykosidisch verknüpfter Glykoproteine erfolgt kotranslational am endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat. Zunächst wird ein komplexes Oligosaccharid an dem Isoprenederivat Dolicholphosphat (Dol-P), das in die Membran des endoplasmatischen Retikulums inseriert ist, schrittweise zusammengesetzt (siehe Abb. 1).

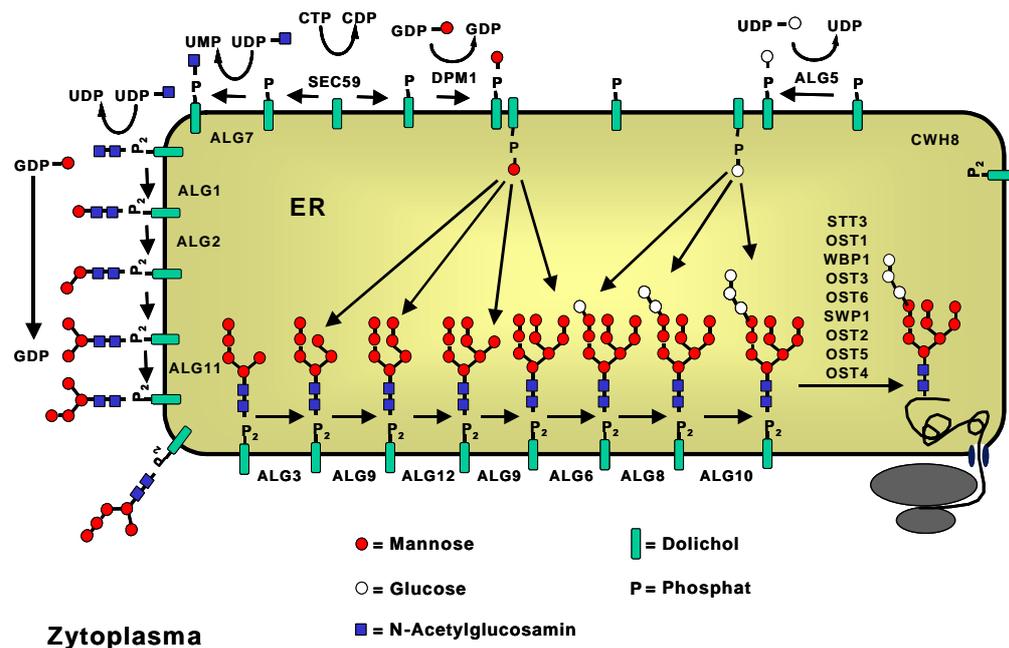


Abb. 1: N-Glykosylierungsschritte im endoplasmatischen Retikulum

Dargestellt ist die Biosynthese lipidverknüpfter Oligosaccharide sowie die Übertragung auf naszierende Proteine im ER. Die Enzymnamen entsprechen der Nomenklatur für *Saccharomyces cerevisiae* (ALG = Asparagine Linked Glykoylation).

Das Dolicholphosphat ist dabei so in die Membran integriert, dass sich der Phosphatrest auf der cytosolischen Seite des ER befindet. Auf den Phosphatrest wird zunächst ein N-Acetyl-glucosamin-1-phosphat-Rest von dem Donor UDP-

GlcNAc übertragen, so dass N-Acetylglucosaminyl-pyrophosphoryl-Dolichol entsteht (Dol-PP-GlcNAc). An das N-Acetylglucosamin wird im nächsten Reaktionsschritt ein weiterer GlcNAc-Rest gebunden (Dol-PP-GlcNAc₂). Nachfolgend werden schrittweise 5 Mannosereste von dem Donor GDP-Mannose auf den Akzeptor Dol-PP-GlcNAc₂ übertragen, wodurch das Intermediat Dol-PP-GlcNAc₂-Man₅ entsteht. Die Mannosereste sind in α -1,3-, α -1,6 und α -1,2-Stellung miteinander verbunden. Durch die Reaktion der Flippase erfolgt eine Translokation des an Dolichol-Pyrophosphat gebundenen Saccharids in das Lumen des ER. Hier werden nacheinander weitere 4 Mannose- sowie 3 Glucosereste durch verschiedene Mannosyltransferasen und Glucosyltransferasen übertragen. Mannosereste werden dazu im Cytoplasma von GDP-Mannose auf Dolichol-Phosphat übertragen, bevor sie an diesem Lipidcarrier in das Lumen des ER transportiert (geflipt) und von Mannosyltransferasen auf das noch unvollständige lipidverknüpfte Oligosaccharid übertragen werden (Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉). Die Glucosereste werden in einer vergleichbaren Reaktion von UDP-Glucose im Cytoplasma auf Dolichol-Phosphat übertragen, ins Lumen des ER geflipt und von spezifischen Glucosyltransferasen endständig auf das zu synthetisierende lipidverknüpfte Oligosaccharid (Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉Glc₃) übertragen (Hirschberg et al., 1998). Das vollständige Oligosaccharid wird anschließend unter Freisetzung von Dolichol-Pyrophosphat durch die Oligosaccharyltransferase (OST) en bloc auf einen Asparaginrest der wachsenden Polypeptidkette übertragen, der sich innerhalb der Aminosäuresequenz aus Asp-X-Ser oder Asp-X-Threonin befindet, wobei X jede Aminosäure mit Ausnahme von Prolin darstellen kann. Nur etwa ein Drittel der möglichen Asp-X-Ser/Thr-Erkennungsstellen eines Proteins werden tatsächlich glykosyliert (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Durch die α -Glucosidasen I und II sowie durch die ER-Mannosidase I werden noch im ER die drei Glucose- und ein Mannosereste wieder abgespalten. Die korrekte Faltung der Glykoproteine wird in einer Wechselwirkung der UDP:Glucose:Glykoprotein-Transferase mit dem Chaperon Calnexin und der α II-Glucosyltransferase sichergestellt (Tatu und Helenius, 1997). Nach dem vesikulären Transport der Glykoproteine zum Golgi erfolgt im cis-Golgi dann das weitere Trimming durch die Abspaltung von 3 Mannoseresten durch die Golgi-Mannosidase I.

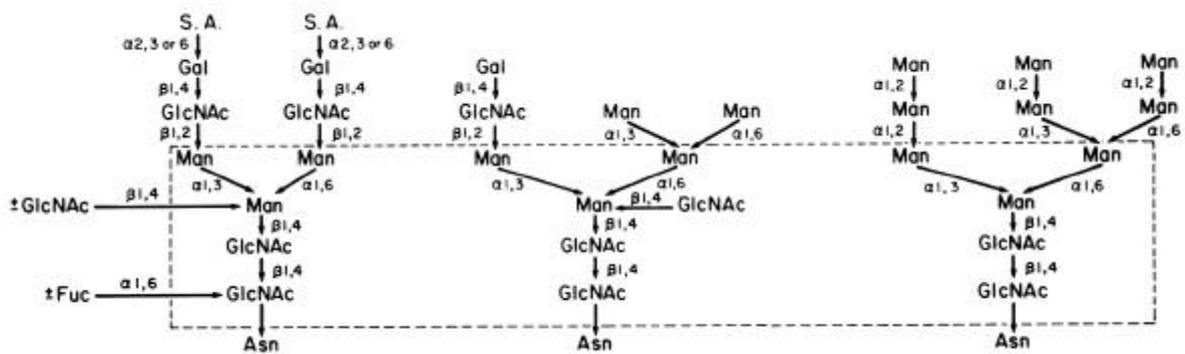


Abb. 2: Die Haupttypen der Asparagin-verknüpften Oligosaccharide

Innerhalb der gestrichelt-markierten Fläche befindet sich die Pentasaccharid Core-Struktur, die allen N-Glykanen gemeinsam ist. S.A.=Sialinsäure

Die Aminosäuresequenz des jeweiligen Glykoproteins entscheidet darüber, ob das daran gebundene N-glykosidische Oligosaccharid in ein komplexes, ein hybrides oder ein Mannose-reiches Oligosaccharid umgewandelt wird. So wird bei der Synthese von komplexen N-glykosidischen Oligosacchariden, den bei Vertebraten am häufigsten auftretenden extrazellulären N-Glykanen, an die Kernregion aus N-Acetylglucosamin und Mannose hauptsächlich im medialen und trans-Golgi-Komplex mit Hilfe spezifischer Glykosyltransferasen die für das jeweilige Glykoprotein spezifischen peripheren Saccharidreste aus drei N-Acetylglucosamin-, drei Galaktose-, einen Fucose- oder auch drei Sialinsäurereste (NANA-Reste) angeheftet. Kann dagegen die Golgi-Mannosidase I nicht mit dem an das Protein gebundenen Oligosaccharid aus GlcNAc₂-Man₈ reagieren, entsteht ein Mannose-reiches Oligosaccharid. Die dabei entstehenden Oligosaccharide der verschiedenen Typen können eine unterschiedliche Anzahl von Antennen tragen (Kornfeld und Kornfeld, 1985), so dass sich in Bezug auf die Oligosaccharidstruktur an Glykoproteinen eine große Diversität ergibt.

1.3 Defekte in der N-Glykosylierung

Die Glykosylierung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Angeborene Defekte, die die Synthese oder die Prozessierung der Glykanstrukturen von Glykoproteinen betreffen, führen beim Menschen zumeist zu multisystemischen Defekten, die mit schweren psychomotorischen und neurologischen Retardierungen einhergehen. Sie wurden bis 1999 als 'Carbohydrate Deficient Glykoprotein Syndrom (CDGS)' bezeichnet. Da

man davon ausgehen kann, dass in Zukunft ebenfalls Defekte in der Synthese anderer Glykokonjugate wie bspw. Glykolipide oder Proteoglykane gefunden werden, erfolgte eine Umbenennung der Krankheit von CDGS in die allgemeinere Bezeichnung 'Congenital Disorders of Glykosylation' ('First International Workshop on CDGS' in Leuven/ Belgien, 1999). Die Congenital Disorders of Glykosylation werden in zwei Typen unterteilt. CDG I kennzeichnet dabei alle Defekte in der N-Glykansynthese, die im Cytosol und im ER auftreten können, einschließlich des Transfers des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids auf das neusynthetisierte Glykoprotein durch die Oligosaccharyltransferase. Unter CDG II werden alle nachfolgenden Defekte des Trimmings und der Elongation im ER oder Golgi zusammengefasst.

Tab.1: Zusammenstellung der bisher bekannten 11 CDG-Defekte

Name	Gen-Defekt	Betroffenes Enzym	OMIM*	Jahr
CDG-Ia	<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase (Man-6-P zu Man-1-P)	212065; 601785	1997
CDG-Ib	<i>PMI</i>	Phosphomannose Isomerase (Fru-6-P- zu Man-6-P)	602579; 154550	1998
CDG-Ic	<i>ALG6</i>	alpha-1-3-Glucosyltransferase	603147; 604566	1998
CDG-Id	<i>ALG3</i>	alpha-1-3-Mannosyltransferase	601110	1999
CDG-Ie	<i>DPM1</i>	Dol-P-Man Synthase 1 (GDP-Man zu Dol-P-Man)	603503	1999
CDG-If	<i>LEC35</i>	nicht bekannt	604041	2001
CDG-Ig	<i>ALG12</i>	alpha-1-6-Mannosyltransferase	---	2002
CDG-IIa	<i>MGAT2</i>	β 1-2-N-Acetylglucosaminyltransferase	212066; 602616	1996
CDG-IIb	<i>GLS1</i>	alpha-1-2 Glucosidase	601336	2000
CDG-IIc	<i>GDP-Fuc-TP</i>	Import of GDP-Fuc in den Golgi und Export von GMP	266265; 605881	2001
CDG-IIId	<i>β-1,4-GalTr</i>	β 1-4-Galaktosyltransferase I	607091	2002

*OMIM=online Mendelian inheritance in man (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Seit der belgische Kinderarzt Jaak Jaeken 1980 die ersten Patienten mit einem Defekt in der N-Glykansynthese beschrieben hat (Jaeken et al., 1980), konnten die molekularen Ursachen von 11 verschiedenen CDG-Typen aufgeklärt werden (siehe Tabelle 1). Hierbei handelt es sich um bisher 7 CDG I-Typen (Typ Ia bis Ig) sowie 4 Erkrankungen, die unter CDG II zusammengefasst werden (Typ IIa bis IIc).

CDG-Verdachtspatienten werden im Allgemeinen auf eine Veränderung der Glykosylierung ihres Serum-Transferrins hin untersucht. Dieses Glykoprotein trägt normalerweise zwei biantennäre sialylierte Oligosaccharide vom komplexen Typ, die aufgrund der terminalen Sialinsäurereste negativ geladen sind (Abb. 3).

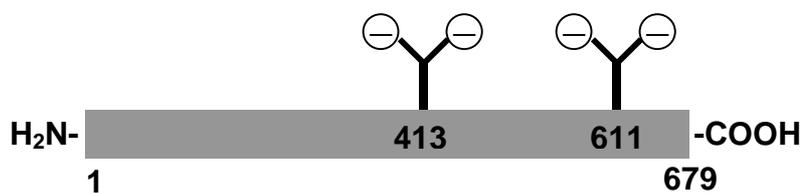


Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen Serum-Transferrins

Das Serum-Transferrin ist an den Asparaginresten 413 und 611 jeweils mit einem biantennären N-Glykan vom komplexen Typ verknüpft und trägt vier terminale negativ geladene Sialinsäurereste (MacGillivray et al., 1983).

Fehlen aufgrund eines Glykosylierungsdefektes des Patienten eine oder beide Ketten, kommt es zu einer Ladungsverschiebung und folglich zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes des Proteins. Diese Verschiebung kann mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) nachgewiesen werden. Die Analyse der Transferrinbanden mit Hilfe der IEF ist zum CDG-Standardsuchtest geworden.

CDG-Ia

CDG-Ia ist der sowohl am längsten bekannte als auch der am häufigsten vorkommende Typ unter den 'Congenital Disorders of Glycosylation'. Etwa 80% aller CDG-Patienten leiden unter diesem Typ (ca. 300 Erkrankte weltweit). CDG-Ia wird durch die verminderte Aktivität der Phosphomannomutase II hervorgerufen (siehe Abb. 4) (van Schaftingen und Jaeken, 1995). Das PMM2-Protein setzt im Cytosol Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat um, welches für die Synthese von GDP-Mannose, GDP-Fukose und Dolichol-P-Mannose benötigt wird (Kepes und Schekman, 1988; Hansen et al., 1997). Durch die verminderte Bereitstellung von GDP-Mannose und Dol-P-Mannose kommt es bei CDG-Ia-Patienten zu einer

Verkürzung der Dolichol-verknüpften Oligosaccharide (Powell et al., 1994; Körner et al., 1998a), die ein schlechtes Substrat für die Oligosaccharyltransferase darstellen, was zum partiellen Verlust kompletter Zuckerketten auf reifen Glykoproteinen führt (Yamashita et al., 1993). Die verminderte Enzymaktivität der PMM2 konnte auf Mutationen im *pmm2*-Gen zurückgeführt werden, das beim Menschen auf Chromosom 16p13 lokalisiert ist (Matthijs et al., 1997). Bis heute wurden 69 verschiedene Mutationen im *pmm2*-Gen gefunden (Matthijs et al., 2000; Westphal et al., 2001). Auffällig ist, dass bei allen bisher identifizierten Mutationen eine Restaktivität von PMM2 beobachtet wurde, was Anlaß zu der Vermutung gibt, dass ein totaler Aktivitätsverlust der Phosphomannomutase unvereinbar mit dem Leben ist (Matthijs et al., 1998). Durch den PMM2-Defekt kommt es bei CDG-Ia-Patienten zum Verlust einer oder beider Oligosaccharidketten des Serum-Transferrins und folglich zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Transferrins aufgrund fehlender Sialinsäurereste (Jaeken et al., 1984). Klinisch präsentieren sich die Ia-Patienten durch geistige und körperliche Behinderung, Muskelschwäche, Ataxie, Gedeih- und Entwicklungsstörungen, invertierte Brustwarzen und Fettansammlungen an Oberarmen und Gesäß. Weiterhin kann es zu Störungen im Leberstoffwechsel, zu Blutgerinnungsproblemen und Herzfunktionsstörungen kommen (zur Übersicht siehe: de Lonlay et al., 2001). Die Sterblichkeitsrate liegt aufgrund dieser Probleme in den ersten 6 Jahren bei ca. 20%. Mit fortschreitendem Alter findet eine Stabilisierung des Gesundheitszustandes statt (Jaeken und Carchon, 1993). Obwohl sich die N-Glykosylierung von Fibroblastenzellen von CDG-Ia-Patienten durch Mannosezugabe ins Zellkulturmedium bzw. Reduktion der Glucosekonzentration im Medium auf ein Zehntel des normalen Wertes normalisierte (Panneerselvam et al., 1996; Körner et al., 1998b), führte eine Therapie von CDG-Ia-Patienten durch die orale Gabe von Mannose zu keiner Verbesserung ihres Gesundheitszustandes (Mayatepek u. Kohlmüller, 1998).

CDG-Ib

Eine der wenigen therapierbaren CDG-Erkrankungen ist der CDG-Typ Ib, der 1998 von Niehues et al. zum ersten Mal beschrieben worden ist. Biochemisch ist hier die Phosphomannose Isomerase (PMI) betroffen, ein cytosolisches Protein, das Fruktose-6-Phosphat zu Mannose-6-Phosphat umsetzt und somit der Reaktion der

bei CDG-Ia betroffenenen Phosphomannomutase direkt vorgeschaltet ist (siehe Abb. 4).

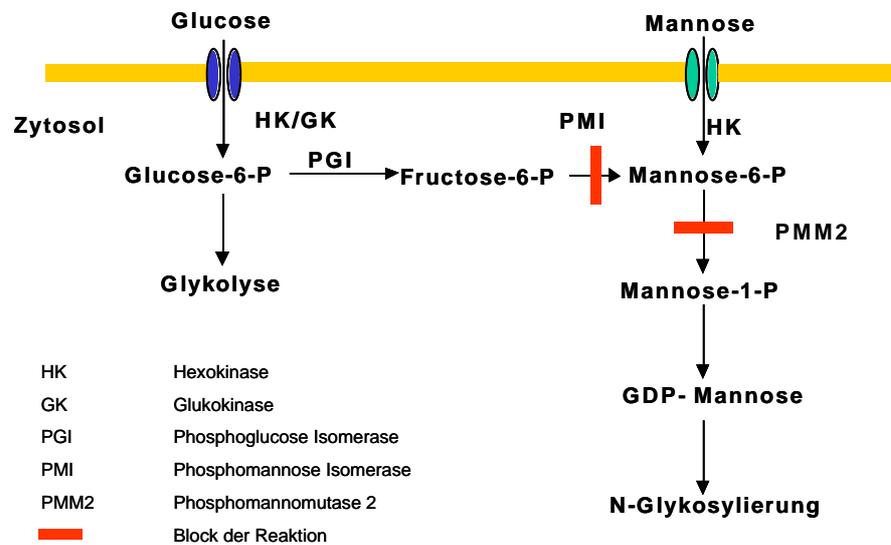


Abb. 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Defekte von CDG-Ia und CDG-Ib

Glucose und Mannose können über Transportproteine ins Zytosol transportiert und durch HK und GK phosphoryliert werden. Glu-6-P kann anschließend durch PGI zu Fru-6-P umgesetzt werden. Die PMI katalysiert die Umwandlung von Fru-6-P zu Man-6-P. Diese Reaktion ist bei CDG-Ib-Patienten stark reduziert (Balken). Bei CDG-Ia ist die Umwandlung von Man-6-P zu Man-1-P aufgrund eines partiellen Defektes der PMM2 stark vermindert (Balken), was zu einem verminderten GDP-Man-Pool führt.

CDG-Ib-Patienten leiden unter chronischer Diarrhoe mit enteropathischem Proteinverlust. Die Darmblutungen können ein lebensbedrohliches Ausmaß annehmen. Im Vergleich zu CDG-Ia zeigen die Patienten keine mentalen oder psychomotorischen Defekte. In der IEF gleicht CDG-Ib dem Muster von CDG-Ia (Niehues et al., 1998). die Therapie von CDG-Ib erfolgt durch die orale Gabe von Mannose, wobei sich die Mannosekonzentration im Blut erhöht. Mannose wird in Folge verstärkt über einen mannosenspezifischen Transporter in die Zellen aufgenommen und unabhängig von PMI von der Hexokinase in Mannose-6-Phosphat umgewandelt (Paneerselvam et al., 1997; Niehues et al., 1998).

CDG-Ic

CDG-Ic ist der nach CDG-Ia bisher am häufigsten diagnostizierte CDG-Typ. CDG-Ic wird durch die verminderte Aktivität der Dol-P-Glc:Man₉-GlcNAc₂-PP-Dolichyl Glucosyltransferase hervorgerufen (Körner et al., 1998c), was auf Mutationen in dem entsprechenden Gen, das nach dem Ortholog in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

als humanes *ALG6* bezeichnet wird, zurückgeführt werden konnte (Imbach et al., 1999; Hanefeld et al., 2000). Das aktive Zentrum dieses Membranproteins befindet sich im Lumen des ER, wo es den ersten Glucoserest vom Donorsubstrat Dol-P-Glc auf das Oligosaccharidintermediat $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dolichyl}$ überträgt (siehe Abb. 5). CDG-Ic Patienten zeigen eine Akkumulation dieses Intermediats (Körner et al., 1998c), das ein schlechtes Substrat für die Oligosaccharyltransferase darstellt (Turco et al., 1977). Auf neusynthetisierte Glykoproteine werden daher nur die wenigen vollständigen Oligosaccharide übertragen, die auf Grund der hALG6-Restaktivität vom Patienten synthetisiert werden, so dass nicht alle N-Glykosylierungsstellen besetzt werden können. Auch das Serum-Transferrinmuster dieses CDG-Typs ähnelt in der IEF dem des CDG-Ia (Körner et al., 1998c). Klinisch zeigen CDG-Ic-Patienten im Vergleich zu CDG-Ia-Patienten weniger stark ausgeprägte neurologische Defekte. Charakteristisch für diesen CDG-Typ sind die auftretenden Krampfanfälle während der Infektionsintervalle.

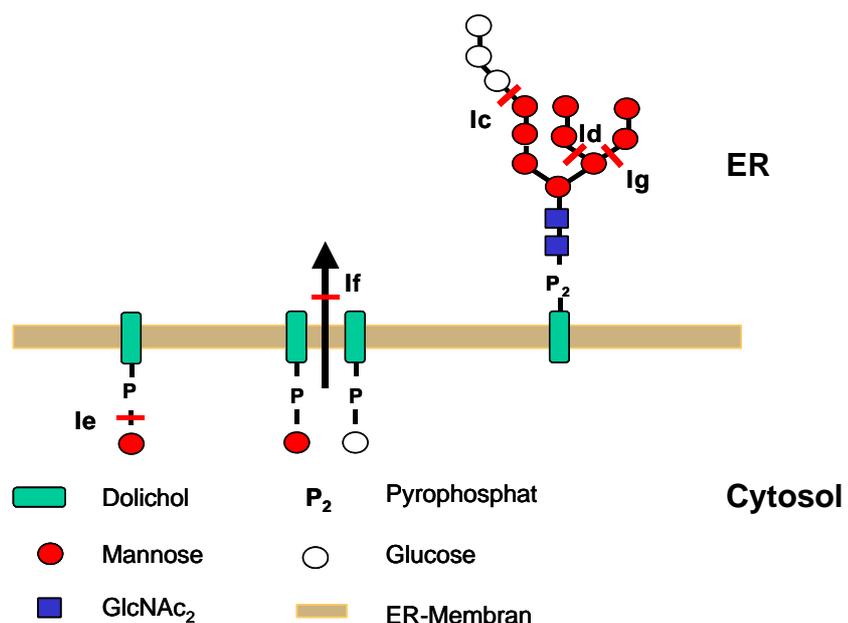


Abb. 5: Schematische Darstellung der CDG-Typen Ic bis Ig im endoplasmatischen Retikulum

Die Abbildung zeigt die molekulare Ursache der CDG-Defekte Ic bis Ig, die durch Balken angedeutet werden. Die verwendeten Symbole sind in der Abbildung definiert.

CDG-Id

Durch die verminderte Aktivität der Dol-P-Man:Man₅-GlcNAc₂-PP-Dolichyl Mannosyltransferase aufgrund einer homozygoten Mutation im korrespondierenden Gen für dieses Protein kommt es im Lumen des ER zu einer Akkumulation des

Intermediates $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ (siehe Abb. 5). Der einzige bisher bekannte Patient zeigt in der IEF des Serum-Transferrins einen teilweisen Verlust kompletter N-Glykanketten. Neusynthetisierte Glykoproteine des Patienten, die aus Fibroblasten isoliert worden waren, wiesen einen Anteil von weniger als 20% an vollständig übertragenen Oligosacchariden auf (Körner et al., 1999). Weiterhin ließen sich sowohl $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-}$ als auch der $\text{G}_1\text{-Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-Oligosaccharide}$ auf neusynthetisierten Glykoproteinen identifizieren, da beide Formen von der Oligosaccharyltransferase übertragen werden können (Körner et al., 1999a; Rearick et al., 1981). Der Patient zeigte schwere Krampfanfälle direkt nach der Geburt. Der inzwischen 9-jährige Junge leidet unter einer sehr eingeschränkten psychomotorischen Entwicklung, Skelettdeformationen, Sehstörungen und Mikrozephalie.

CDG-Ie

CDG-Ie-Patienten zeigen wie die CDG-Id-Patienten eine Akkumulation von $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Die isoelektrische Fokussierung des Serumtransferrins weist eine starke disialo- aber nur eine schwache asialo-Bande auf. Verantwortlich hierfür ist ein Defekt in der cytosolischen Untereinheit der Dolichol-P-Man Synthase (DPM I), so dass zuwenig Dol-P-Mannose synthetisiert wird (siehe Abb. 5), welches für die Anheftung der 4 Dolichol-verknüpften Mannosereste im Lumen des ER notwendig ist. Die Patienten sind schwerstbehindert, zeigen kaum neurologische Entwicklung und leiden unter schweren Epilepsien (Imbach et al., 2000; Kim et al., 2000).

CDG-If

Durch Mutationen im *Lec35*-Gen, dessen korrespondierendes Protein für die Nutzbarmachung von Dolichol-P-Mannose und Dolichol-P-Glucose in den Zellen benötigt wird (Anand et al., 2001), kommt es in den Patientenfibroblasten zu einer Akkumulation unvollständiger Oligosaccharide im ER und zu einer Übertragung kompletter wie auch von verkürzter $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-Oligosaccharide}$ auf Glykoproteine (siehe Abb. 5). Klinisch zeigen die Patienten eine schwere geistige Behinderung. Sie sind nicht in der Lage zu sprechen und es wurde ein Augenleiden beobachtet, das bis zur Erblindung führen kann. Weiterhin sind sie oftmals von einer schuppigen Hauterkrankung (Ichtyosis) betroffen und können unter Zwergwuchs leiden (Schenk et al., 2001; Kranz et al., 2001).

CDG-Ig

Die molekulare Ursache von CDG-Ig konnte als Defekt des Enzyms Dol-P-Man:Man₇GlcNAc₂-PP-Dolichyl-Mannosyltransferase, welches das humane Ortholog zur ALG12-Mannosyltransferase von *Saccharomyces cerevisiae* darstellt (hALG12), identifiziert werden. Dieses Enzym katalysiert die Übertragung von Mannoseresten vom Donorsubstrat Dol-P-Man auf Man₇GlcNAc₂-PP-Dolichyl im Lumen des ER (siehe Abb. 5) (Burda et al., 1999). Durch Mutationen im Gen des hALG12 kommt es bei CDG-Ig-Patienten zu einer verminderten Aktivität des Enzyms und nachfolgend zu einer Akkumulation von Man₇GlcNAc₂-PP-Dol (Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann et al., 2002). Der Verlust kompletter N-Glykanketten führt zu einem typischen CDG-I isoelektrischen Fokussierungsmuster des Serum-Transferrins. Allerdings ist die Unterglykosylierung des Transferrins bei CDG-Ig-Patienten weniger stark ausgeprägt als bei CDG-Ia-Patienten (Thiel et al., 2002). CDG-Ig-Patienten zeigen eine verzögerte mentale und motorische Entwicklung. Sie leiden unter Mikrozephalie, muskulärer Hypotonie, verlängerter partieller Thromboplastinzeit, supraglutealen Fettpolstern und dysmorphen Gesichtsveränderungen wie verformten Ohren und verkürztem Filtrum (Nasenrinne).

CDG-IIa

CDG-IIa wurde 1991 als erster Defekt vom CDG-Typ im Golgi-Apparat lokalisiert (Ramaekers et al., 1991). 1994 konnte der genetische Defekt in dem Gen für die UDP-GlcNAc:á-6-D-Mannosid-β1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase II (GlcNAcTII) identifiziert werden (Jaeken et al., 1994). Dieses Enzym überträgt einen N-Acetylglucosaminrest auf den á 1,6-Arm der N-Glykan-Kernsequenz, so dass nachfolgend die weitere Glykosylierung des mit einem N-Acetylglucosaminrestes besetzten Arms durch Galaktosyl- und Sialyltransferasen erfolgen kann (siehe Abb.6). Die Übertragung des N-Acetylglucosaminrestes ist notwendig für eine biantennäre Struktur der Oligosaccharide neusynthetisierter Glykoproteine. CDG-IIa-Patienten können lediglich monoantennäre Oligosaccharide durch die Aktivität der N-Acetylglucosaminyltransferase I bilden. Ihnen fehlt somit die Hälfte der negativen Ladungen auf ihrem Serum-Transferrin, so dass die IEF eine verstärkte Disialo- und keine Tetrasialotransferrinbande zeigt (Jaeken et al., 1994). Klinisch zeichnet sich dieser Defekt durch schwerste Entwicklungsstörungen, eine generelle Hypotonie und

Gliederschwäche aus. Eine periphere Neuropathie wird im Gegensatz zu CDG-Ia nicht beobachtet. Auch ist das Kleinhirn normal angelegt (Ramaekers et al., 1991).

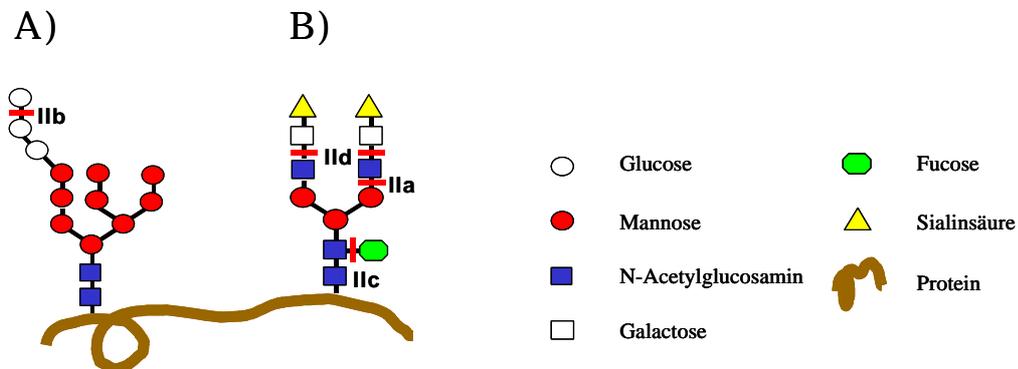


Abb. 6: Übersicht der CDG-Typen IIa, IIb, IIc und IIId im ER und Golgi

A) zeigt ein vollständig glykosyliertes Dolichol-verknüpftes Oligosaccharid im ER. B) zeigt ein reifes Oligosaccharid nach Trimming und Elongation im Golgi. Die CDG-Defekte IIa bis IIId sind durch Balken in den betreffenden Oligosacchariden dargestellt, die die Übertragung der weiteren Monosaccharide blockieren. Die verwendeten Symbole sind in der Abbildung erklärt.

CDG-IIb

CDG-IIb ist durch den Defekt der ER-Glucosidase I gekennzeichnet. Die Glucosidase I katalysiert im ER, direkt nach der Übertragung des vollständigen $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharids vom Dolichol-PP-Carrier auf das naszierende Polypeptid durch die Oligosaccharyltransferase, die Abspaltung des dritten Glucoserestes (siehe Abb. 6). Da aus bislang ungeklärten Gründen die Glykosylierung des Serum-Transferrin durch diesen Defekt nicht verändert wird, zeigt sich in der IEF keine Auffälligkeit. Der einzige bisher bekannte Patient litt unter Krampfanfällen, verminderter Nervenleitgeschwindigkeit, Muskelhypotonie, dysmorphen Veränderungen sowie Leberfunktionsstörungen (de Praeter et al., 2000).

CDG-IIc

Die molekulare Ursache für CDG-IIc konnte biochemisch auf den verminderten Import von GDP-Fucose in den Golgi-Apparat und die damit verbundene Unterfucosylierung von Glykoproteinen zurückgeführt werden (Lübke et al., 1999; siehe Abb. 6). Mit Hilfe einer retroviralen Komplementationsklonierungsstrategie konnte der genetische Defekt im Gen für den Golgi-GDP-Fucosetransporter nachgewiesen werden (Lübke et al., 2001). Im Austausch gegen GMP transportiert dieser Transporter an GDP-gebundene Fucose in den Golgi-Apparat. Patienten,

deren Proteine aufgrund des Defektes unterfucosyliert sind, zeigen eine verzögerte geistige und körperliche Entwicklung, Mikrozephalie, kortikale Atrophie, Hypotonie sowie wiederkehrende, lebensbedrohliche Infektionen bei einer persistierenden Leukozytose. (Etzioni et al., 1992; Frydman et al., 1992; Marquardt et al., 1999).

Neben CDG-Ib stellt CDG-IIc den zweiten, zumindest partiell therapierbaren CDG-Typ dar. Durch die orale Gabe von Fucose war es möglich, den erhöhten Leukozytenspiegel der behandelten Patienten auf ein normales Maß zu senken und die ständigen Infektionen zu unterbinden (Marquardt et al., 1999), allerdings zeigte sich bisher keine Normalisierung der geistigen Retardierung. In der IEF des Serum-Transferrins von CDG-IIc-Patienten läßt sich dieser Defekt nicht nachweisen, da die N-Glykane des Transferrins keine Fucosereste aufweisen.

CDG-IIId

Ein Defekt des im Golgi lokalisierten Enzyms UDP-Gal:N-Acetylglucosamin- β -1,4-Galaktosyltransferase I (β 1,4GalT I) ist die molekulare Ursache für CDG-IIId (Hanßke et al., 2002). Dieses Enzym katalysiert die Übertragung von Galaktose vom Donorsubstrat UDP-Galaktose auf die C₄-Hydroxylgruppe von N-Acetylglucosaminresten im Golgiapparat (siehe Abb. 6). Im einzigen bisher bekannten Patienten kommt es durch einen Baseneinschub im Gen für die β 1,4GalT I zu einem vorzeitigen Translationsstop und damit zu einem verkürzten, inaktiven Protein, das nicht in den Golgi-Apparat transportiert wird, sondern im ER verbleibt.

Das IEF-Muster des Serum-Transferrins des Patienten zeigte hauptsächlich asialo-, monosialo- sowie disialo-Formen aufgrund von fehlenden Sialinsäuren und Galaktoseresten. Der Patient leidet unter mentaler Retardierung, einem Hydrocephalus, Blutgerinnungsproblemen sowie einer Muskelschwäche auf Grund einer Muskeldystrophie (Peters et al., 2002).

Problemstellung

Die 'Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)' umfassen zur Zeit eine Gruppe von elf verschiedenen molekularen Defekten der Glykoproteinbiosynthese beim Menschen, die in Abhängigkeit der zellulären Lokalisation der Defekte in CDG-I und CDG-II untergliedert werden. Im Rahmen der CDG-Routinediagnostik wurden in den letzten Jahren in unserer Arbeitsgruppe neben bereits bekannten Typen eine Reihe von CDG-Verdachtspatientinnen/en entdeckt, bei denen die molekulare Ursache ihrer Erkrankung bisher ungeklärt ist. Eine dieser Patientinnen steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Vorbefunde der Patientin M.S., die mittels isoelektrischer Fokussierung und Western-Blot erzielt wurden, weisen auf eine Erkrankung des CDG-I Typs hin, die mit dem partiellen Verlust kompletter N-Glykanseitenketten am Markerprotein Serum-Transferrin einhergehen. Die bisher bekannten sieben CDG-I Typen können entweder enzymatisch (CDG-Ia und CDG-Ib) oder mittels HPLC-Analyse verkürzter [2-³H]Mannose-markierter Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide (CDG-Ic, -Id, -Ie, -If und -Ig) identifiziert werden. Im Falle unserer Patientin konnten mit den herkömmlichen Methoden alle bekannten CDG-I Typen ausgeschlossen werden.

Auf Grund dieser Vorbefunde kommen als mögliche molekulare Ursachen für die unvollständige N-Glykosylierung des Serum-Transferrins der Patientin zum einen ein Defekt in der Übertragung kompletter Oligosaccharidketten auf das naszierende Protein durch den Enzymkomplex der Oligosaccharyltransferase in Frage. Zum anderen besteht die Möglichkeit eines Defekts in den initialen Schritten der Biosynthese Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide, wie beispielsweise der Übertragung der ersten beiden GlcNAc-Reste auf den Carrier Dolichol-Pyrophosphat oder der ersten Mannosereste auf Dol-PP-GlcNAc₂.

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekulare Ursache des Glykosylierungsdefekts unserer Patientin M.S. zu beschreiben. Dabei soll der Defekt zunächst biochemisch mit Hilfe der HPLC, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie näher charakterisiert und auf einen bestimmten Bereich der N-Glykosylierung eingegrenzt werden, um anschließend die genetische Ursache identifizieren zu können. Sollte im Rahmen dieser Arbeit ein defektes Gen gefunden werden, soll nachfolgend durch Komplementationsstudien mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems die Funktionalität der entsprechenden Mutation in den Patientenfibroblasten überprüft werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Analysenwaagen Typ 1602 MP und M5P	Sartorius AG, Göttingen
Typ Technoclav 50	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Osterode, Köttermann, Häningsen
Dounce- Homogenisator	Wheaton, USA
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt d. Instituts
DNA-Sequenzer Typ 310	ABI, PE Biosystems
Analysegerät für Dünnschicht- chromatogramme	Berthold, Tracemaster 20
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt d. Instituts
Flüssigkeitsszintillationszähler 1900TR	Packard, Frankfurt
Filmentwicklungsmaschine Gevomatic60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gefrierschrank -80°C	Colora Messtechnik, Lorch
Heizblock 5320	Eppendorf, Hamburg
HPLC	Waters, Eschborn
Inkubator, wasserummantelt, geregelt CO ₂ -Atmosphäre	Forma Scientific, Marietta, USA
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Scientific Edison, USA
Durchlicht Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer IKA-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
Multipett, Combipets	Eppendorf, Hamburg
Multiphor II-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech AB
MultiTemp	Amersham Pharmacia Biotech AB
Peristaltikpumpe, P1	Pharmacia, Uppsala, Schweden
pH-Meter	Beckman, München

Photometer UV 160A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Refraktometer	Schmidt, Haensch
Schüttelwasserbad	Köttermann, Häningsen, Göttingen
Semi-Dry-Blot-System	cti GmbH, Idstein/ Taunus
Spannungsgeräte	Hölzel, München
Spektralphotometer Modell Uvikon 810	Kontron, Eching
Sterilbank, Typ A/B3	Baker Company, Inc., USA
Thermoprinter, Typ P91E	INTAS Mitsubishi, Tokio, Japan
Transilluminator Modell IL400M	Bachofer, Reutlingen
Typ Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
Vortex Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen Typ 1264MP und 1265	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
Wipptisch	Eigenbau, Werkstatt d. Instituts
<u>Zentrifugen:</u>	
Biofuge Fresco	Heraeus Sepatech, Osterode
Eppendorfzentrifuge 5402 und 5415	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J-21C und J2-MC	Beckman, München
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont Instruments, Bad Homburg
Labofuge GL	Heraeus Sepatech, Osterode
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode
<u>Rotoren für die Kühlzentrifuge:</u>	
JA-10 Rotor	Beckman, München
JA-20 Rotor	Beckman, München
Ultrazentrifuge L80	Beckman, München
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalkanülen	Neobject, Gelnhausen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen

4-, 6-, 24-well Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen 35, 60, 100, 150 mm	Greiner, Nürtingen
Glaskolben 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
IEF Electrode Strip	Amersham Pharmacia Biotech AB
IEF/SDS applicator strip	Amersham Pharmacia Biotech AB
Immersionsöl 518C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen (steril), 26G, 20G	Braun, Melsungen
Linsenpapier MN 10B	Machery-Nagel, Düren
Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Objektträger und Deckgläschen	Menzel Gläser
Parafilm	American National, Neenah, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Plastikröhrchen, 10 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Plastikpipetten steril (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Nürtingen
Plastik-Petrischalen (10 cm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2,0ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
1ml Spritze, steril	Sherwood, Ballymoney, Irland
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,2µm und 0,45µm	Sartorius AG, Göttingen
Whatman 3 MM-Papier	Whatman Vertrieb, Göttingen
<u>Zentrifugenbecher:</u>	
JA-10 u. JA-20, Polypropylen	Beckman bzw. Nalgene, München

3.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA), Baker (Deventer, Niederlande), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Calbiochem (Frankfurt), Fluka (Buchs, Schweiz), GIBCO/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) mit dem Reinheitsgrad "p.a." oder "reinst" verwendet.

Aceton	Merck
Adenosintriphosphat	Merck

Agar	Sigma
Agarose	Sigma
Albumin aus Rinderserum	Serva
Ammoniummolybdat	Merck
Ascorbinsäure	Sigma
ATP	Sigma
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bromphenolblau	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat- p-toluidin (BCIP)	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Dextransulfat	Pharmacia
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMSO	Merck
EDTA- $\text{Na}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethanolamin	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Flüssigszintillator Rotiszint eco plus	Roth
Folin-Ciocalteus Reagenz	Merck
Formaldehyd-Lösung	Merck
Formamid	Fluka
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
H_2O (HPLC rein)	Merck
HEPES	Serva
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kupfersulfat	Merck
Levamisol	Sigma
Manganchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Roth
MOPS	Serva
Mowiol	Calbiochem
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck
Nitroblau-tetrazolium (NBT)	Sigma
Ovalbumin	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol	Merck
Phospho-Wolfram-Säure	Sigma
Polybrene	Sigma
Salzsäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
Sucrose	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Trypanblau	Boehringer

3.1.4 Detergenzien

Triton-X-100 Sigma, Deisenhofen

3.1.5 Enzyme, DNA- und Proteinstandards, Antibiotika

1 kb-DNA Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Calbiochem, Frankfurt
DNase I	Boehringer, Mannheim
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
HotStar <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Oligonukleotide (PCR)	IBA-NAPS, Göttingen
Penicillin/ Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Phosphatase, alkalische, CIP	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Rainbow Marker	Amersham Life Science,
Braunschweig	
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	New England Biolabs, USA
	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Reverse Transcriptase (Omniscript)	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Roth
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Trypsin aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
Ultrapur dNTP Set	MBI Fermentas, St. Leon Roth

3.1.6 Kits zur Bearbeitung von DNA und RNA

FuGENE6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
RediPrime II DNA Labelling Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
QIAquick DNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
QiaPlasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaPlasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QiaPCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Quick-Change <i>in-vitro</i> -Mutagenese Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAquick Nucleotide Removal Kits	Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
HotStarTaq-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
TA-Vektor-Cloning Kit	Promega, Madison, USA
ABI PRISM Dye Terminator	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA

3.1.7 EDV

Hardware

Apple Macintosh LCII	Apple Computer
Apple LaserWriter 16/600 PS	Apple Computer
CanoScan D660U Scanner	Canon
Lexmark Optra SC 1275	Lexmark
Gericom Notebook P4	Gericom Computer

Software

Adobe Photoshop 5.5	Adobe Systems Inc.
DNA Star	DNASTAR Inc.
Windows	Microsoft
Windows Office 98	Microsoft
Image Reader	Fuji
Image Gauge 3.0	Fuji
Kaleidagraph Grafikprogramm	Synergy Software

3.1.8 Antikörper

Rabbit-Anti-Human-Transferrin (Primärantikörper)

Goat-Anti-Rabbit, HRP-gekoppelt (Sekundärantikörper)

3.1.9 Radioaktive Substanzen

α -[³² P]-dCTP, Redivue (3000 Ci/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
[2- ³ H(N)]-D-Mannose (15-30Ci/ mmol)	NEN Life Science Prod. Incorp., Zaventem, Belgien

3.1.10 Vektoren

pBluescript SK II (-)	Stratagene, Heidelberg
pGEM-T-Easy	Promega, Madison, USA
pLNCXII	Clontech, Heidelberg

3.1.11 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden routinemäßig zur Transformation von Plasmid-DNA eingesetzt.

E. coli XL1-Blue (Genotyp: F⁻::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^PΔ (lacZ)M15/recAI endAI
gyrA96(Nal) thi hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44 relAI lac)

E. coli DH5-Alpha (Genotyp: F⁻ deoR recAI endAI hsdR1(r_K⁻m_K⁺) supE44 1-thi
gyrA96 relAI)

Genotypbezeichnung: siehe Bachmann (1987)

3.1.12 Zelllinien

primäre Fibroblasten

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Patientin M.S.	Primäre Fibroblasten aus einer Oberarm-Hautbiopsie der Patientin M.S.	diese Arbeit
Vater K.S.	Primäre Fibroblasten aus einer Oberarm-Hautbiopsie des Vater K.S.	diese Arbeit
6 Kontroll-Fibroblastenzelllinien	Primäre Fibroblasten aus Oberarm-Hautbiopsien der verschiedenen Kontrollpersonen.	Körner et al., 1999-2001

Retrovirale Verpackungszelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
FNX-Eco (ATTC, durch Prof. G. Nolan, Stanford, USA, lizenziert)	Retrovirale, ecotrope Verpackungszelllinie (293T, primäre, humane Nierenepithelzellen). Stabil transfiziert mit a) Moloney GagPol-IRES-Lyt2 (Hygro-Selektion) und b) ecotrope Moloney Hüllprotein (Diphtheria-Selektion)	Nolan et al., Stanford University
RetroPack PT67 (Clontech)	Dualtrope, retrovirale Verpackungszelllinie (NIH 3T3-Derivate); Expression des dualtropischen Hüllproteins 10A1 (DHFR-Selektion); Moloney GagPol (TK-Selektion)	Miller und Miller, 1994

Stabil transfizierte humane, primäre Fibroblasten

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Patientin M.S.	Primäre Fibroblasten der Patientin M.S. stabil transfiziert mit mock (LNCXII-Vektor), mutierter- <i>alg2</i> -cDNA und WT- <i>alg2</i> -cDNA	diese Arbeit
Kontrollfibr- blastenzelllinie	Primäre Fibroblasten einer Kontrolle stabil transfiziert mit mock (LNCXII-Vektor)	Körner et al., 1999-2001

3.1.13 Standardpuffer und -lösungen

10xPBS	80g NaCl 1,6g Na ₂ HPO ₄ ad 800ml H ₂ O _{bidest} , pH 7,4 ad 1000ml H ₂ O _{bidest}
TBS	10mM Tris/ HCl, pH 7,4 150mM NaCl
Hanks	8g NaCl 0,4g KCl 0,06g KH ₂ PO ₄ 0,35g NaHCO ₃ 1g Glucose ad 1000ml H ₂ O _{bidest} pH 7,4
50xTAE	2M Tris-Base 100mM EDTA pH 8,0 mit Eisessig
10% SDS	10g Natriumdodecylsulfat/ 100ml H ₂ O _{bidest}

20x SSC	175,3g NaCl 88,2g Na-Citrat ad 1000ml H ₂ O _{bidest} pH 7,0
10x TE	100mM Tris/ HCl 10mM EDTA pH 7,6
50xDenhardts	1% Ficoll 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H ₂ O _{bidest} Rühren über Nacht bei RT und autoklavieren

3.1.14 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Die im Anschluß aufgeführten Komplexnährmedien wurden für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für feste Medien wurde 1,5 % (w/ v) Agar zugesetzt.

Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth	8g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000ml

Luria-Bertani-Medium (LB) nach SAMBROOK et al. (1989)

Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000ml
pH 7,5 (NaOH)	

X-gal-Medium

X-gal-Medium bestand aus LB-Medium mit den folgenden Zusätzen:

X-gal (2% [w/v] in N,N'-Dimethylformamid)	2 ml/1000ml
Ampicillin	hier: 75 mg/1000ml
IPTG (0,2M Lösung)	1 ml/1000ml

3.1.15 Antibiotikum

Die Ampicillin-Stammlösung wurde nach SAMBROOK et al. (1989) angesetzt, sterilfiltriert und aliquotiert in autoklavierten Eppendorf-Cups bei -20°C gelagert. Der Zusatz der Ampicillin-Stammlösung zu den autoklavierten Nährlösungen erfolgte erst nach deren Abkühlung auf unter 50°C, wobei eine Endkonzentration von 50µg/ml eingestellt wurde.

Ampicillin-Stammlösung (Na-Salz) 100mg /ml in H₂O_{bidest} gelöst

3.1.16 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen**Gekaufte Medien und Lösungen**

Modified Eagle Medium (MEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin (200mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
	0,05% (w/v) Trypsin
	0,02% (w/v) EDTA in
	modifizierter Puck's Salzlösung
Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ ml)	Gibco BRL, Eggenstein

Selbst angesetzte Medien und Lösungen

PBS für die Zellkultur	150mM NaCl
	120mM KCl
	10mM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH7,4
	0,002% (w/v) Phenolrot

Medien für die Kultivierung von FNX-Eco und AmphoPack PT67-Zellen

DMEM (Gibco BRL, Eggenstein)
 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS
 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)
 100 U/ ml Penicillin/ Streptomycin

Die Hitzeinaktivierung des FKS (Inaktivierung des Komplementsystems) erfolgte bei 56°C für 45 min.

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden zur Arbeit mit bakteriellen Kulturen

3.2.1.1 Flüssigkulturen

Die Zellanzucht von Bakterienstämmen im Komplexmedium erfolgte in Erlenmeyerkolben, deren Volumen dem 4- bis 10-fachen Kulturvolumen entsprachen, indem von einer bewachsenen Agarplatte eine Einzelkolonie mit der ausgeglühten Impföse abgenommen und in der jeweiligen Kulturflüssigkeit geschwenkt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C oder 37°C in einem Schüttelinkubator oder Schüttelwasserbad.

3.2.1.2 Plattenkulturen

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme wurden zur kurzfristigen Aufbewahrung auf geeigneten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Bei 4°C konnten die mit Parafilm umwickelten Plattenkulturen bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden.

3.2.1.3 Stammkonservierung und Reaktivierung

Längerfristige Konservierungen von Stämmen erfolgten durch Anlegen von Glycerin-Stammkulturen. Von einer ausgewachsenen LB-Flüssigkultur mit Antibiotika wurden 830µl abgenommen und in sterile Schraubröhrchen, die mit 170µl 87% (v/v) autoklaviertem Glycerin gefüllt waren, überführt. Nach der vollständigen Durchmischung erfolgte die Lagerung bei -80°C. Eine Reaktivierung von konservierten Stämmen wurde durch Ausstreichen auf Komplexagarplatten vorgenommen. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte zur Reinheitskontrolle ein erneuter Ausstrich auf eine weitere Komplexagarplatte. Routinemäßig fand nach dem Anlegen einer Stammkultur einmal eine Reaktivierung statt, um sicherzustellen, daß sich die Kultur revitalisieren ließ.

3.2.1.4 Reinheitskontrollen

Nach der Revitalisierung von Glycerin-Stammkulturen und vor dem Anlegen von Flüssigkulturen wurden Reinheitskontrollen durchgeführt. Hierbei erfolgte ein Ausstrich auf Agarplatten, wobei sich nach der Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank die Einheitlichkeit der Koloniebildung erkennen ließ. Flüssigkulturen wurden auf ihre Einheitlichkeit hin unter dem Mikroskop untersucht.

3.2.1.5 Zelldichtebestimmungen

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.2.1.6 Zellernte

Die Zellernte von Bakterienkulturen erfolgte in Abhängigkeit der Größe der Kulturvolumina. Kulturvolumina von 1,5 bis 2ml wurden in Eppendorf-Cups in einer Tischzentrifuge für 3min bei 13000U/min pelletiert. Zellkulturen mit einem Volumen von 10 bis 50ml konnten in sterilen Plastikröhrchen oder in JA-20-Zentrifugenbechern durch Zentrifugation für 20min bei 4000U/min pelletiert werden. Noch größere Kulturvolumina wurden für 10min bei 12000U/min in JA-10-Zentrifugenbechern pelletiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Kulturen

3.2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben. Im allgemeinen erfolgte die Kultivierung der Zellen mit folgendem Medium:

DMEM +10% FKS + 1x Penicillin/ Streptomycin + 1x L-Glutamin.

Die viralen Verpackungszellen (FNX-Exo und AmphoPack PT67) wurden in DMEM + 10% hitzeinaktiviertem FKS + 1x Pen/ Strep + 1x L-Glutamin gehalten.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Serumpräparation aus venösem Blut

Zur Gewinnung von humanem Serum erfolgte die Blutentnahme aus einer Ellenbeugenvene. Das erhaltene Blut wurde 2h bei RT zur Gerinnung inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000g und RT für 10min ließ sich das Serum als Überstand abpipettieren.

3.2.3.2 Eisensättigung der Serumproben

Zu 12,5µl Serum (3.2.3.1) wurden 12,5µl des Phosphat-Citrat-Puffers sowie 5µl des Eisenchloridpuffers hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 1,5h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die eisengesättigten Proben wurden 1:50 mit H₂O verdünnt.

Phosphat-Citrat-Puffer:

0,05 M NaH₂PO₄ x 2H₂O

0,02 M Natriumcitrat

pH 7,4

Eisenchlorid-Puffer:

2,4 mM FeCl₃ x 6H₂O

3.2.3.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976), modifiziert

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Protein, wodurch ein Komplex entsteht und sich das Absorptionsmaximum proportional zum gebildeten Komplex von 465nm zu 595nm hin verschiebt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit 0-20 µg Rinderserumalbumin aufgenommen. Die 20-40µl Proben wurden mit 1ml Bradford-Reagenz versetzt und 15 min bei RT inkubiert bevor die Extinktionsmessung bei 595nm im Zeiss Photometer PM 4 (Firma Zeiss, Oberkochen) erfolgte.

Bradford-Reagenz: 100mg Brilliant Blue G-250
ad 50ml 96 % (v/ v) Ethanol
100ml 85 % (v/ v) H₃PO₄

Direkt vor dem Versuch werden 15% (v/v) der Stammlösung werden, mit 85 % (v/v) $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ versetzt.

3.2.3.4 Isoelektrische Fokussierung von Serum-Transferrin

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) für humanes Serumtransferrin wurde nach Westermeier (1996, modifiziert) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Das humane Serumtransferrin verfügt über zwei N-Glykane des komplexen, biantennären Typs, mit 4 terminalen negativ geladenen Sialinsäuren. Diese Tetrasialo-Form stellt die Hauptform des Transferrins bei gesunden Menschen dar. Liegt aufgrund eines N-Glykosylierungsdefekts ein Unterschied im Glykosylierungsmuster des Transferrins vor, wodurch die terminalen Sialinsäuren betroffen sind, so ist ein von der Norm abweichendes Laufverhalten in der IEF zu erkennen.

Vorbereiten des Gels

Ein GelBond Film mit einer Größe von 124mm x 258mm wurde mit der hydrophoben Seite nach unten auf eine angefeuchtete Glasplatte mit entsprechender Größe gedrückt und die Gelkammer anschließend mit einer zweiten Glasplatte komplett zusammengebaut und bei 60°C inkubiert. In einem Erlenmeyerkolben wurden 2g Sorbitol mit 19ml H_2O und 0,16g Agarose vermischt und der Ansatz samt Kolben ausgewogen. In der Mikrowelle wurde der Ansatz solange aufgeköcht, bis sich die Agarose und das Sorbitol vollständig gelöst hatten. Das verdampfte H_2O wurde aufgefüllt, der Ansatz mit einer Wasserstrahlpumpe entgast und auf 70°C abgekühlt. Unter Rühren wurden 1,3ml Ampholine (pH 5-7) in den Erlenmeyerkolben hinzupipettiert. Der Ansatz wurde zwischen die Glasplatten pipettiert, anschließend erfolgte das Auspolymerisieren für 2h bei RT. Vor Durchführung der IEF wurde das Gel in vier gleichgroße Teile zurechtgeschnitten (jeweils in der Größe von 6,4mm x 12,4mm). Als Laufkammer wurde die Multiphor II verwendet, die durch die MultiTemp konstant auf 10°C gehalten wurde. Nach Applikation von ein paar Tropfen H_2O wurde das Gel symmetrisch auf die Multiphor II-Kammer platziert. Ein 6,4mm langer, in 0,25M NaOH Lösung getränkter Kathodenstreifen (IEF Electrode Strip) sowie ein 6,4mm langer, in 0,25M Essigsäure getränkter Anodenstreifen (IEF Electrode Strip) wurden nach Abtropfen an die Enden des Gels aufgelegt. Anschließend wurde die Glasplatte mit den Elektroden genau auf den jeweiligen Elektrodenstreifen gelegt.

Bei 350V und 30mA erfolgte die Vorfokussierung des IEF-Geles für 45min, wodurch sich die Ampholine entsprechend ihres pH-Wertes in dem Gel verteilten. Nach der Vorfokussierung wurde der IEF/SDS applicator strip medial an den Kathodenstreifen angelegt, und in jede zweite Tasche wurden die Proben in einem Volumen von 20µl (entspricht ca. 11µg Protein) aufgetragen. Die Einfokussierung der Proben in das Gel erfolgte bei 100V und 30mA für 30min bevor die Fokussierung bei 380V und 30mA über 2,5h ablief. Im Anschluß an die IEF wurden 180µl einer 1:2 verdünnten Lösung des Antikörpers `Kaninchen-Anti-Human-Transferrin´ (Dako) auf das Gel aufgetragen und mit einer gebogenen Pasteurpipette gleichmäßig auf dem Gel verteilt. Nach 15min wurde das Gel in 0,9%ige NaCl-Lösung überführt und 3-12h inkubiert bevor es einmal mit H₂O gespült und weitere 30min in H₂O auf einer Wippe gewaschen wurde. Zum Trocknen des Gels wurden zwei dünne sowie zwei dicke Filterpapiere in Gelgröße zurechtgeschnitten und nach leichtem Anfeuchten mit H₂O auf das Gel gelegt. Direkt auf das Gel wurden die dünnen Filterpapiere gelegt, darüber die zwei Lagen Filterpapier und ein Gewicht von etwa 1kg, das dazu diente, einen gleichmäßigen Druck auszuüben. Nach 30min wurde das Filterpapier entfernt und das Gel mit einem Fön getrocknet. Zur Färbung wurde das Gel für 10min in Coomassie-Lösung überführt und zum Entfärben in Entfärbelösung gelegt. Anschließend wurde das Gel durch Fönen getrocknet.

Coomassie-Lösung:

300 ml Entfärbelösung
1,5 g Coomassie R 250

Entfärbelösung:

350 ml Ethanol
100 ml Essigsäure
650 ml H₂O

3.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

Bei der SDS-PAGE werden denaturierte und durch SDS negativ geladene Proteine im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte voneinander getrennt. Es wurde nach der Methode von Laemmli et al. (1970) vorgegangen.

Trenngel**Ansatz für 1 großes Gel**

	7,5% Trenngel	10% Trenngel
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	7,35ml	9,8ml
4x Puffer 1,5M Tris/HCl; pH 8,8; 0,4% SDS	7,5ml	7,5ml
10% APS	250µl	250µl
TEMED	25µl	25µl
H ₂ O	15ml	12,6ml

5% Sammelgel**Ansatz für 1 großes Gel**

Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	1,3ml
4x Puffer 0,5M Tris/HCl; pH 6,8; 0,4% SDS	2,5ml
10% APS	100µl
TEMED	10µl
H ₂ O	6,1ml

6-fach Probenpuffer

2 M Tris-HCl; pH 6,8	24ml
SDS	12g
Glycerol 100%	45ml
Bromphenolblau	60mg
H ₂ O	ad 88ml
β-Mercaptoethanol	12ml

Anodenpuffer

50 mM Tris
380 mM Glycine
ad 5l H₂O

Kathodenpuffer

250ml Anodenpuffer
10% SDS
0,1% Bromphenolblau-Lösung

Zur Herstellung des Trenngels wurde die entsprechende Lösung frisch angesetzt, sofort zwischen die Glasplatten der Elektrophoreseeinheit gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 1h) wurde das

Sammelgel auf das mit H₂O gespülte Trenngel gegossen und ein Kamm für 10 Taschen von oben zwischen die Glasplatten eingebracht. Das Sammelgel benötigte ca. 30min bis zum vollständigen Auspolymerisieren. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit H₂O gespült. Die zu untersuchenden Proben (50µg Protein) wurden mit H₂O und Probenpuffer auf ein Volumen von 70µl für die großen Gele beziehungsweise 18µl für die Mini-Gele gebracht. Die Ansätze wurden 5min bei 95°C im Heizblock denaturiert und vor dem Aufbringen in die Geltaschen kurz anzentrifugiert. Die Elektrophorese des Mini-Gelsystems erfolgte durchgehend mit einer konstanten Spannung von 200V bei Raumtemperatur. Die Elektrophorese der großen Gele erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 50mA bei einer Temperatur von 4°C.

3.2.3.6 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die Coomassie-Färbung dient der schnellen, unspezifischen Färbung von Proteinbanden im SDS-Polyacrylamid-Gel.

Färbelösung

Coomassie Blue R	2,5 g
Methanol	250 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml

Entfärbelösung

Methanol	200 ml
Essigsäure	50 ml
H ₂ O	250 ml

Zum Färben wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 1h bei RT in die Färbelösung überführt. Anschließend wurde der nichtgebundene Farbstoff durch die Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen, so dass nur der proteingebundene Farbstoff sichtbar wurde. Anschließend wurde das Gel gewässert und getrocknet.

3.2.3.7 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen ("Western blotting")

Für den immunologischen Nachweis wurde gelelektrophoretisch aufgetrenntes Protein durch Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Hierzu wurde das Trenngel nach erfolgter SDS-PAGE (3.2.3.5) 10-15min in Kathodenpuffer äquilibriert. Drei Lagen 3MM-Whatman-Papier (GB 003) sowie die Nitrozellulosemembranen wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Kathodenpuffer eingelegt. Drei weitere Lagen Whatman-Papiere wurden in Anodenpuffer eingelegt. Für den Transfer wurden Trenngel und Nitrozellulosemembran luftblasenfrei zwischen die drei jeweils in Anoden- oder Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papiere gelegt. Da der Transfer der Proteine von der Kathode in Richtung Anode erfolgte, mußte die Membran beim Aufbau des Semi-Dry-Blots der Anode zugewandt sein. Der Transfer erfolgte für 65min bei $1\text{mA}/\text{cm}^2$. Anschließend wurde durch Anfärben des Gels mit Coomassie-Blau überprüft, ob die Proteine vollständig auf die Membran übertragen worden waren.

Kathodenpuffer: 40mM ϵ -Aminocapronsäure, pH 9,0
 25mM Tris/ HCl, pH 9,0
 20% (v/v) Methanol (p.A.)

Anodenpuffer 75 mM Tris/ HCl, pH 7,4
 20% (v/v) Methanol (p.A.)

3.2.3.8 Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Auf Nitrozellulosefilter immobilisierte Proteine (3.2.3.7) können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Nitrozellulose-Membran wurde zur Immunodetektion von Transferrin wie folgt unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Wippe inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5min in PBST gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in 5% Blotto bei 37°C inkubiert, zweimal 5min mit PBST gewaschen und für 1h bei RT mit dem ersten Antikörper `Kaninchen-anti-HTF´ (1:500 in 0,1% PBST) versetzt. Die Membran wurde dreimal für jeweils 20min mit PBST gewaschen. Mit dem Sekundärantikörper `Ziege-anti-Kaninchen´ (HRP-gekoppelt; 1:10.000 in PBST) wurde die Membran 1h bei RT

inkubiert und anschließend dreimal mit PBST und einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen, bevor der Chemilumineszenz-Nachweis (3.2.3.9) geführt wurde.

PBST	PBS/ 0,1% Tween-20
5% Blotto	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS

3.2.3.9 Chemilumineszenz-Nachweis

Die Immunodetektion erfolgte mit Hilfe des Pierce Supersignal Detection Systems, indem die beiden Lösungen des Systems 1:1 gemischt und die Membran damit 5min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschlagen und ein Kodak-XAR-Röntgenfilm für wenige Minuten aufgelegt.

3.2.3.10 Herstellung von Fibroblastenextrakten

48h vor Herstellung des Fibroblastenextraktes wurden $1,2 \times 10^6$ Fibroblastenzellen auf 6cm-Gewebekulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 1ml PBS abgeschabt. Der Zellaufschluß erfolgte durch 10maliges Passieren durch eine 22g-Kanüle. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 3.2.3.3) bestimmt.

3.2.3.11 Bestimmung der Aktivität der Phosphomannomutase 2 in Patienten- und Kontrollfibroblasten

Für die PMM2-Aktivitätsbestimmung wurden jeweils $9\mu\text{g}$ des Gesamtproteins von Kontrollen und der Patientin eingesetzt. Die Aktivität des Enzyms wurde anhand des Umsatzes von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1,6-bisphosphat in Anwesenheit von Glucose-1,6-bisphosphat bestimmt. Der Reaktionsansatz ($25\mu\text{l}$) enthielt neben den $9\mu\text{g}$ Gesamtprotein 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 2mM MgCl_2 , 50000 dpm $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose-6-Phosphat}$ und 1mM Glucose-1,6-Bisphosphat. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30min wurden die Ansätze abzentrifugiert. Aus den Überständen wurde das $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose-6-Phosphat}$ vom $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose-1,6-Bisphosphat}$ durch Hochspannungselektrophorese bei 65 V/cm für 50min auf Whatman 3MM Papier in 80mM Pyridinpuffer (pH 5,5 mit Eisessig eingestellt) getrennt. Nach Trocknung des Papiers erfolgte die Auswertung im Flachbettscanner Tracemaster 20 (Fa. Berthold).

3.2.3.12 Bestimmung der Aktivität der Phosphomannose Isomerase (PMI) in Patienten- und Kontrollfibroblasten

Die PMI-Aktivität in Patienten- und Kontrollfibroblasten wurde im gekoppelten optischen Test mit 9µg Gesamtprotein im Reaktionspuffer aus 40mM Tris-HCl (pH 7,4), 6mM MgCl₂, 5mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 1mM NADP, 100mU Phosphoglucose Isomerase und 500mU Glucose-6-Phosphat gemessen. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe von Mannose-6-Phosphat (1mM Endkonzentration). Die Proben wurden bei RT für 2h inkubiert und die Reaktion bei einer OD von 340nm verfolgt.

3.2.3.13 Metabolische Markierung von Fibroblasten mit [2-³H]-Mannose

Um die lipidverknüpften und die proteinverknüpften Oligosaccharide der Patientin M.S. zu analysieren, wurden Fibroblastenzellen der Patientin sowie von Kontrollen metabolisch markiert. Hierzu wurden 48h vor der Markierung 1,2 Mio Fibroblastenzellen auf 6cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 30min in MEM-Medium, das 0,5mM Glucose und 125µCi [2-³H]Mannose enthielt. Anschließend wurden die Fibroblasten 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und in eiskaltem Methanol abgeschabt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (3x10sec). Nach Lyse wurden 4ml Chloroform hinzupipettiert und das Material anschließend erneut mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation für 10min bei 5000U/min und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zwei weitere Male mit Chloroform-Methanol (3:2) extrahiert. Die verbleibenden Pellets enthielten die langkettigen LLOs und die Proteinfraction. Die vereinigten Überstände, die Dol-P-Man und kurzkettige LLOs enthielten, wurden unter Stickstoff getrocknet. Anschließend wurden das eingedampfte Dol-P-Man und die kurzkettigen LLOs in 3ml Chloroform-Methanol (3:2) resuspendiert, gewaschen und anschließend mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Silica Gel 60-Platten in Chloroform/ Methanol/ H₂O (65:25:4) analysiert. Die Auswertung erfolgte im Flachbettscanner Tracemaster 20 (Körner et al., 1998b)

3.2.3.14 Milde Säurebehandlung und HPLC-Analyse langkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide

Die unter 3.2.3.13 nach der Chloroform-Methanol-Extraktion erhaltenen Pellets enthielten die langkettigen LLOs. Die Pellets wurden gewaschen und mit Chloroform/ Methanol/ H₂O (10:10:3) extrahiert. Die Pellets wurden in jeweils 35µl 1-Propanol

resuspendiert und die Oligosaccharide durch milde Säurebehandlung mit 500µl 0,02N HCl für 30min bei 100°C vom Lipidcarrier abgespalten. Nach Trocknung des Reaktionsansatzes unter Stickstoff wurde das Pellet mit 200µl H₂O versetzt und zum Resuspendieren mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation des Ansatzes für 5min bei 14000U/min wurde der Überstand für die HPLC-Analyse verwendet. Die HPLC Analyse von aufgereinigten N-Glykanen wurde mit Hilfe einer Supelcosil LC-NH₂-Säule (25cm x 4,6cm x 5µm; Fa. Supelco) durchgeführt, die als funktionelle Gruppe NH₂-Reste trägt und Zuckerketten nach ihrer Größe auftrennen kann. Für die HPLC wurde ein linearer Gradient von 70% auf 50% Acetonitril in Wasser bei einer Flußgeschwindigkeit von 1ml/min gefahren. Die gesammelten Fraktionen wurden mit 2ml Szintillationsflüssigkeit (Rothiszint) versetzt und anschließend durch Messung im Flüssigkeitszintillationszähler (Packard) analysiert (Körner et al., 1998b).

3.2.3.15 Enzymatische Deglykosylierung proteinverknüpfter Oligosaccharide durch PNGase F

Die Isolierung N-glykosidisch-verknüpfter Kohlenhydratketten von neusynthetisierten Glykoproteinen erfolgte durch enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F. 75-100µg Protein wurden mit 0,1M β-Mercaptoethanol/ 0,5% SDS-Lösung auf ein Volumen von 90µl gebracht und 5min bei 95°C im Heizblock inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden dem Ansatz 75µl 0,5M Tris/ HCl (pH 8,0), 30µl 0,1M 1,10-Phenanthrolin, 30µl 10% Triton-X-100 und 2,5µl (2,5U) PNGase F hinzugefügt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C unter leichtem Schütteln (300U/min) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 5min bei 95°C beendet. Die freigesetzten Oligosaccharide wurden mit Hilfe von C18-Sep-Pak Säulen (Waters) von Proteinen abgetrennt, unter Vakuum getrocknet, in 100µl H₂O_{HPLC} aufgenommen und mittels HPLC (siehe 3.2.3.14) analysiert (Körner et al., 1998b).

3.2.3.16 Milde Säurebehandlung und HPLC-Analyse kurzkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide

Die unter 3.2.3.13 erhaltenen Überstände enthielten Dol-P-Man sowie die kurzkettigen LLOs. Diese wurden unter Stickstoffatmosphäre getrocknet, nach 3.2.3.14 einer milden Säurebehandlung unterzogen und anschließend mittels HPLC analysiert.

3.2.3.17 Markierung von Oligosacchariden mit PMP

Gesammelte HPLC-Fractionen (siehe 3.2.3.16) wurden mittels Speedvac eingengt und anschließend in 50µl 0,3M NaOH-Lösung resuspendiert. Hinzu kamen 50µl einer Lösung aus 0,5M 1-Phenyl-3-Methyl-Pyrazolinon (PMP) in Methanol, 0,3M NaOH- und 0,1M HCl-Lösung. Nach Inkubation bei 70°C für 30min wurde der Ansatz auf RT gekühlt und 150µl einer 0,1M HCl-Lösung hinzugegeben. Es folgte eine erneute Einengung mittels Speedvac. Nach Resuspendierung in 50µl H₂O folgte ein zweimaliges Waschen mit 200µl Chloroform. Die Proben wurden anschließend zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt.

3.2.3.18 Massenspektrometrische Untersuchungen von abgespaltenen Zuckerketten

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden auf einem MALDI-TOF Gerät des Types Bruker REFLEX III der Firma Bruker durchgeführt. Das Prinzip eines linearen Flugzeitmassenspektrometers besteht darin, daß die durch einen Laserimpuls erzeugten Ionen mit gleicher Ladung aber unterschiedlichen m/z-Werten (Masse/Ladungsverhältnis) nach Durchlaufen der gleichen Potentialdifferenz unterschiedliche Geschwindigkeiten besitzen. Schwere Ionen mit hohem m/z-Wert erreichen den Detektor später als leichte Ionen. Ionen gleicher Masse starten mit einer gewissen Verteilungsbreite der Energie. Dies trägt zur Peakbreite der Ionensignale bei. Die Flugstrecke des Gerätes betrug 145cm. Die zu untersuchenden Proben (3.2.3.17) wurden mit einem Stickstofflaser der Wellenlänge 337,1nm ionisiert. Geladene Oligosaccharide wurden im linearen, negativen Modus analysiert, ungeladene Oligosaccharide wurden im linearen, positiven Modus untersucht. Als Matrix wurde Dihydrobenzoesäure (DHB) verwendet. Zwei verschiedene Lösungen von DHB wurden jeweils frisch angesetzt. Für Lösung 1 wurden 10mg DHB in 500µl Aceton gelöst, für Lösung 2 wurden 10mg DHB in 333µl Acetonitril, 167µl H₂O, 10µl 5%iger perfluorinierter Nafionlösung und 0,5µl TFA gelöst. Beide Lösungen wurden vor ihrer Verwendung 20min bei 13000U/min zentrifugiert. Lösung 1 wurde als dünne Schicht auf das Probenfeld aufgetragen, so dass sich eine leicht milchige Oberfläche bildete. Auf die jeweiligen Probenfelder wurden anschließend 0,5-1,0µl der in Wasser gelösten und mit PMP markierten Probe aufgetragen und im Dunklen durch einen leichten Luftstrom getrocknet. 0,5 µl Lösung 2 wurden auf die Proben aufgetragen und ebenfalls im Dunklen durch einen leichten Luftstrom getrocknet.

3.2.4 Methoden zur molekularbiologischen Arbeit mit DNA und RNA

3.2.4.1 Leukozytenpräparation

Die Leukozyten der Patientin und deren Eltern wurden aus EDTA-Blut präpariert. Hierzu wurden 10 ml EDTA-Blut mit 1,5ml der Lösung 1, 5ml der Lösung 2 sowie 3,5ml der Lösung 3 vorsichtig vermischt und für 1h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 15min bei 1250U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2,4ml H₂O und 0,8ml der Lösung 5 versetzt, anschließend vorsichtig resuspendiert und für 1,5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,8ml der Lösung 4 erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1250U/min für 15 min. Dieser Hämolyse-schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor die im Pellet vorliegenden Leukozyten zur Präparation von total-RNA oder genomischer DNA verwendet oder für eine spätere Verwendung bei -80°C eingefroren wurden.

<u>Lösung 1:</u>	D-Glucose	2,69 g
	Na-Citrat	2,2 g
	Zitronensäure	0,73 g
	NaCl	0,9 g
	H ₂ O	ad 100 ml

Lösung 2: 6% Dextran in 0,9% NaCl

Lösung 3: 5% D-Glucose in 0,9% NaCl

Lösung 4: 3,6% NaCl

Lösung 5: 0,9% NaCl

3.2.4.2 Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten und primären, humanen Fibroblasten (nach Hogan et al., 1986)

Leukozyten aus 10ml Blut bzw. Fibroblastenzellen einer 100mm Gewebekulturschale wurden mit 500µl Lysispuffer und 50µl frisch angesetzter Proteinase K-Lösung versetzt und durch Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 56°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach einer Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung konnte die genomische DNA auf eine abgeflamte Pasteurpipette aufgerollt werden. Nach Waschen der DNA mit 70% (v/v) Ethanol und Trocknung bei RT wurde die DNA in 300µl H₂O_{bidest} resuspendiert. Die Aufbewahrung genomischer DNA erfolgte bei 4°C.

Verwendete Lösungen:

Lysis-Puffer:	50mM	Tris/ HCl; pH 8,0
	100mM	EDTA
	100mM	NaCl
	1% (w/v)	SDS

Proteinase K: 10mg in 1ml Lysis-Puffer
Phenol (wassergesättigt)

3.2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus primären, humanen Fibroblasten sowie aus Leukozyten mit Hilfe des RNeasy-Kits der Firma Qiagen isoliert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Stand: Jahr 2000) vorgegangen. Die RNA aus Leukozyten wurde in 30µl, die RNA aus Fibroblasten in 50µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde mit Hilfe der Qiagen-Kits für Mini- bzw. Midi-Präparationen nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.4.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Anzucht des jeweiligen *E. coli*-Stammes fand in 5 ml LB-Flüssigkultur mit Ampicillin im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht statt. Zwei ml der Übernachtskultur wurden in der Eppendorftischzentrifuge für 1min bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem Puffer P1 versetzt und zum Lösen gevortext. 250µl Puffer P2 wurden hinzupipettiert und die Zelllösung für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350µl Puffer N3 erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min in der Eppendorftischzentrifuge zur Abtrennung der chromosomalen DNA und der Proteine. Der klare Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in QiaPrep-Minisäulen pipettiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde der Durchfluß verworfen und die Säulenmembran mit 750µl Puffer PE gespült. Der Durchfluß konnte erneut verworfen werden. Zum Trocknen der Membran erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 U/min für 1min. Zur

Elution der Plasmid-DNA wurden 50-100µl Puffer EB auf die Säule pipettiert, 1min bei RT inkubiert und anschließend für 1min bei 13.000 U/min zentrifugiert.

3.2.4.4.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

200ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden im JA-10 Rotor bei 8500g für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4ml Puffer P1 aufgenommen. Nach Zugabe von 4ml Puffer P2 erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei RT, die durch Zugabe von 4ml eiskaltem Puffer P3 beendet wurde. Einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation im JA-20 Rotor für 45min bei 4°C und 18.000 U/min. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und erneut zum Abtrennen der letzten Protein- und chromosomalen DNA-Reste für 15min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde auf eine mit 4ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-100-Säule pipetiert und nachfolgend zweimal mit Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA konnte dann mit 5ml Puffer QF eluiert werden. Mit 0,7 Vol Isopropanol erfolgte eine Fällung der DNA im 50ml Plastikröhrchen in der Labofuge für 1h bei 5000 U/min und 10°C. Das Pellet wurde dann zweimal mit 70°C Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in Puffer EB.

Pufferzusammensetzung

P1:	50mM	Tris/ HCl; pH 8,0
	10mM	EDTA
	100µg/ ml	RNase A
P2:	0,2M	NaOH
	1% (w/v)	SDS
P3:	3M	Kaliumacetat; pH 5,5
QBT:	750mM	NaCl
	50mM	MOPS; pH 7,0
	15% (v/v)	Ethanol
	0,15% (v/v)	Triton-X-100
QC-Puffer:	1,0M	NaCl
	50mM	MOPS; pH 7,0
	15% (v/v)	Ethanol
QF-Puffer:	1,25M	NaCl
	50mM	Tris/ HCl; pH 8,5
	15% (v/v)	Ethanol

3.2.4.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Dem hier verwendeten äquilibrierten basischen Phenol wurde nach dem Auftauen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Zur Trennung der Phasen wurde die Lösung für 3-4h bei RT inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C im Dunklen.

Um Proteine aus DNA-haltigen Lösungen zu extrahieren, wurden diese Lösungen einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Dabei wurden der zu behandelnden DNA-Lösung 2 Volumen Phenol-Chloroform zugesetzt, die entstehenden Phasen durch mehrmaliges Schwenken gut durchmischt und anschließend für 4 min bei 10.000 U/min und Raumtemperatur zur Trennung der Phasen abzentrifugiert. Die wässrige obere Phase mit der DNA wurde so abgenommen und in ein neues E-Cup überführt, daß von dem Protein, welches sich in der Interphase angesammelt hatte, nichts mit in das neue E-Cup überführt wurde. Es folgte die Zugabe von einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zur Entfernung von verbliebenen Phenolresten in der Probe. Nach einer erneuten Zentrifugation für 4 min bei 10.000 U/min konnte die obere Phase abgenommen, in sterile E-Cups überführt und einer Alkoholpräzipitation (3.2.4.6) unterzogen werden.

3.2.4.6 Alkoholpräzipitation

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren, wurden Fällungen mit Ethanol (3.2.4.6.1) oder Isopropanol (3.2.4.6.2) durchgeführt. Beachtet werden mußte hierbei, daß für eine gute Ausfällung die Kalium- bzw. Natriumionenendkonzentration der DNA-Lösung 250-500mM betragen mußte. Um dies zu gewährleisten, wurde 5M NaCl-Lösung bzw. 3M Na-Acetat- oder 3M K-Acetat-Lösung zugesetzt. Eine Alkoholpräzipitation konnte auf zwei Wegen erfolgen. Routinemäßig wurde die Präzipitation mit Ethanol durchgeführt. Um dagegen besonders reine Plasmid-DNA zu erhalten, beispielsweise für Sequenzierungsansätze, wurde die DNA mit Isopropanol gefällt.

3.2.4.6.1 Alkoholpräzipitation von DNA mit Ethanol

Zu der wässrigen DNA-Lösung, die nach der Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung (3.2.4.5) erhalten wurde, wurden 2,5 Volumen Ethanol (99% [v/v]) zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von ca. 70% eingestellt wurde. Zu beachten war hierbei, daß der Alkohol Raumtemperatur hatte, um ein Ausfällen von störenden Salzen bei der sich anschließenden Zentrifugation zu verhindern (13000U/min, Raumtemperatur,

30-60min). Eine längere Zentrifugationsdauer als 30min erhöhte die DNA-Ausbeute. Der Überstand wurde dekantiert und das umgedrehte E-Cup nach kurzer Wartezeit noch einmal kräftig ausgeschlagen, um letzte Ethanolreste zu entfernen. Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 1ml 70% Ethanol (v/v) gewaschen und erneut kurz abzentrifugiert (13000U/min, 5min). Der Alkohol wurde anschließend vorsichtig entfernt, das Pellet getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

<u>TE-Puffer:</u>	Tris/ HCl	10 mM
	Na ₂ -EDTA	1 mM
	pH 8,0	

3.2.4.6.2 Alkoholpräzipitation von DNA mit Isopropanol

Der zu fällenden DNA-Lösung, die nach der Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (3.2.4.5) erhalten worden war, wurde 0,7 Volumen Isopropanol (RT) zugesetzt und der Ansatz durch mehrmaliges Schwenken durchmischt. Durch Zentrifugation für 30-60min bei 13000U/min und RT erfolgte die Fällung der DNA. Nach Waschen des erhaltenen Pellets mit 70% (v/v) Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

3.2.4.7 Lagerung von DNA und RNA

Die Aufbewahrung von isolierter Plasmid-DNA erfolgte in der Regel bei -20°C. Längerfristige Lagerungen fanden bei -80°C statt. Genomische DNA wurde bei 4°C aufbewahrt. Isolierte RNA wurde routinemäßig bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.8 Restriktionsverdau von DNA

Für Restriktionsverdau von DNA wurden pro µg DNA 2-10 U Enzym eingesetzt, wobei 1U der Enzymmenge entspricht, durch die 1µg λ-DNA/h unter Standardbedingungen gespalten wird. Weiterhin kamen 0,1 Volumen des zum Restriktionsenzym mitgelieferten spezifischen 10-fach konzentrierten Puffers hinzu. Beachtet werden mußte, daß die Glycerinendkonzentration im Verdauansatz nicht über 5 % (v/v) lag, da dies zu einem negativen Effekt auf die spezifische Aktivität des Enzyms hätte führen können. Bei einem gleichzeitigen Verdau von DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (Doppelveidau), die unterschiedliche Salzkonzentrationen benötigten, wurde entweder ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme noch eine zufriedenstellende Teilaktivität aufwiesen, oder aber es wurden

zwei aufeinanderfolgende Verdauungen mit dem jeweils optimalen Puffersystem für das jeweilige Enzym durchgeführt, wobei nach dem ersten Verdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanolpräzipitation stattfanden. Die Restriktionsverdauansätze wurden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für wenigstens 2 h inkubiert. Beendet wurden die Reaktionen durch Inaktivierung der Enzyme mit Proben-Puffer, Inkubation für 10-20 min bei 65°C (nach Angaben des Herstellers) oder durch Einfrieren bei -20°C. Kontrolliert wurde der korrekte Ablauf der Restriktionsverdauung durch eine Agarosegelelektrophorese.

3.2.4.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Re-Ligation der gespaltenen Vektor-DNA zu verhindern, wurde nach erfolgter Spaltung des Vektors mit Restriktionsendonukleasen eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIP) durchgeführt. Hierdurch wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen entfernt. Auf 1 µg Vektor-DNA wurde 1U CIP in 1x CIP-Puffer eingesetzt und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte für 20min bei 75°C. Anschließend wurde die DNA mit Phenol und Phenol/ Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

3.2.4.10 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Agarose wurde mit TBE-Laufpuffer angesetzt und 5min autoklaviert bzw. in einer Mikrowelle mehrmals aufgeköcht. Die Agarose konnte dann für maximal 2 Wochen bei 60°C aufbewahrt werden. Dabei wurde je nach DNA-Größe 0,8-1,5%ige (w/v) Agarose mit EtBr (End-Konz. 0,5 µg/ml) in horizontale Flachbettapparaturen gegossen. Nach dem Einfüllen der Agarose in die Apparatur wurde der Kamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose (ca. 15min) wurde das Gel mit TBE-Laufpuffer überschichtet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 10% (v/v) Proben-Puffer vermischt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 4V/cm. Die durch das EtBr fluoreszierende DNA konnte bei einer Wellenlänge von 254nm auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und das Gel analysiert werden.

verwendete Lösungen:

<u>TBE-Laufpuffer:</u>	50 mM Tris/ HCl 50 mM Borsäure 2,5 mM Na ₂ -EDTA pH 8,5
<u>Proben-Puffer</u>	50% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Bromphenolblau 7 M Harnstoff 1 mM Na ₂ -EDTA pH 7,0
<u>Ethidiumbromid-Lösung:</u>	0,5 µg/ ml

3.2.4.11 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese nach SOUTHERN (1979)

Um die Größe von DNA-Fragmenten bspw. nach Restriktionsverdau (3.2.4.8) oder PCR (3.2.4.18) zu bestimmen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde neben die zu überprüfende linearisierte Proben-DNA ein Standard aufgetragen, von dem die einzelnen Größen der DNA-Banden, die sich hinterher unter UV-Licht zeigten, bekannt waren.

3.2.4.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um nach einem Restriktionsverdau (3.2.4.8) oder einer PCR (3.2.4.18) spezifische DNA-Fragmente von anderen Fragmenten zu trennen, wurde der jeweilige Ansatz mit 10% (v/v) Volumen Proben-Puffer versehen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das entsprechende DNA-Fragment unter dem UV-Licht einer UV-Handlampe ausgeschnitten und gewogen. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegelblock erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen, wobei nach der Hersteller-Vorschrift vorgegangen wurde. Das Verfahren beruht auf dem Auflösen der Agarose durch den mitgelieferten QX1-Puffer und einer nachfolgenden Abtrennung durch den ebenfalls zum Kit gehörenden Puffer PE über eine Säule, in der die DNA haften bleibt und anschließend mit Puffer EB (10mM Tris/ HCl, pH 8,5) eluiert werden kann. Die Aufnahme der DNA erfolgte routinemäßig in 30µl Puffer EB.

3.2.4.13 Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA fand eine Bestimmung der Absorption bei 260nm statt. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Absorption von 1,0 bei 1cm Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette einer Konzentration von etwa 50µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA oder RNA (SAMBROOK et al., 1989).

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades von isolierter DNA wurde routinemäßig zusätzlich die Absorption bei 280nm bestimmt. Dabei sollte das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} für reine DNA bei 1,8 liegen (SAMBROOK et al., 1989). Proteinverunreinigungen senken diesen Wert.

3.2.4.14 Ligation

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren, wurden der pGEM-T-Easy-Kit der Firma Promega bzw. der T4-DNA-Ligations-Kit der Firma MBI-Fermentas verwendet. Ausgehend von der DUGAICZYK-Formel (DUGAICZYK et al., 1975; s.u.) wurde das zu klonierende DNA-Fragment mit einem 2-bis 4-fachen molaren Überschuß zur Vektor-DNA zugegeben. Hinzu kamen 0,1 Volumen 10-fach konzentrierter Ligase-Puffer des Herstellers und 0,1 Volumen T4-DNA-Ligase. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1h bei 4°C im Falle des pGEM-T-Easy-Kits bzw. bei RT, wenn der T4-DNA-Ligations-Kit verwendet wurde. Die Beendigung der Reaktion erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation bei 65°C. Um die Transformationsrate zu steigern, wurde der Ligationsansatz 1:5 mit H_2O_{bidest} verdünnt (JESSE, 1984).

3.2.4.15 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (nach INOUE et al., 1990) und Transformation von kompetenten Zellen

Herstellung kompetenter Zellen

Für die durchgeführten Transformationen wurden kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet, die nach der Methode von INOUE et al. (1990) hergestellt worden waren. Von einer LB-Übernachtskultur (ohne Antibiotikum) von *E. coli* XL1-Blue wurden 8ml abgenommen und damit 250ml SOB-Medium beimpft. Das Wachstum dieser Kultur erfolgte bei 18°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6. Anschließend kamen die Zellen für 10min auf Eis, bevor sie für 10min bei 5000U/min und 4°C pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 80ml eiskaltem TB resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5000 U/min, 4°C, 10min). Das erhaltene Zellpellet wurde

vorsichtig in 20ml eiskaltem TB aufgenommen und mit DMSO versetzt (7% [v/v] Endkonzentration). Nach 10min auf Eis wurden die Zellen aliquotiert (0,1-0,2ml Aliquots) und sofort in bereitstehendem flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

Nach Herstellung von neuen kompetenten Zellen wurden sie einer "Kontroll-Transformation" mit reiner Vektor-DNA unter Selektionsbedingungen unterzogen. Nach Ausplattieren auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde die Transformationsrate der kompetenten Zellen überprüft.

SOB: 2 % (w/v) Bacto Tryptone
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 pH 6,7 - 7,0

TB: 10 mM Pipes
 15 mM CaCl₂
 250 mM KCl
 55 mM MnCl₂
 pH 6,7
 (pH vor Zugabe von MnCl₂ mit 5 N KOH einstellen)

Transformation von kompetenten Zellen

50µl der langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden mit dem Ligationsansatz versetzt und nach vorsichtiger Durchmischung für 20min zur Adsorption der DNA auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C, der der Aufnahme der DNA in die Zellen diente. Nach Inkubation der Zellen für 2min auf Eis wurden 500µl LB-Medium ohne Antibiotika zupipettiert. Nach einer Inkubation der Transformationsansätze für 30min bei 37°C zur Ausprägung der plasmidkodierten Eigenschaften (z.B. Antibiotikaresistenz) wurden 50-200µl des Transformationsansatzes auf Komplexmediumagarplatten mit Antibiotikum (und z.T. mit IPTG und X-Gal) mit einem Drigalsky-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 30 oder 37 °C inkubiert.

3.2.4.16 DNase I-Verdau

Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen aufgrund von verunreinigender DNA in RNA-haltigen Lösungen während der reversen Transkription erfolgte ein DNase I-Verdau.

Ansatz: 1µg total RNA
 1µl Omniscrypt RT-Puffer
 0,5µl DNase I (10U/ µl)
 ad 10µl RNase-freies H₂O

Der Ansatz wurde für 15min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 1µl 25mM EDTA versetzt und für 10min bei 65°C inkubiert, um die DNase I zu inaktivieren.

3.2.4.17 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Während der reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Für diese Reaktion wurde die Qiagen Omniscrypt Reverse Transcriptase eingesetzt, wobei nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen worden ist. Pro RT-Reaktion wurden jeweils 500ng total-RNA aus humanen Fibroblasten bzw. Leukozyten als Template verwendet, die zuvor DNase I (3.2.4.16) behandelt worden war. Ein Standard-RT-Ansatz sah folgendermaßen aus:

Standard-RT-Reaktion

2µl 10xRT-Puffer
2µl 5mM dNTP
1µl Omniscrypt Reverse Transcriptase
2µl spezifischer Primer (10pmol/ µl)
500ng total-RNA aus (DNase I-Verdau)
ad 20µl H₂O_{RNase-frei}
Inkubation für 1h bei 37°C.

Im Anschluß an die reverse Transkription erfolgten zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit der HotStarTaq-DNA-Polymerase, um die synthetisierten cDNA-Einzelstränge zu amplifizieren (siehe 3.2.4.18).

3.2.4.18 Polymerase-Chain-Reaction (PCR) nach SAIKI et al. (1985), modifiziert

Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen (Primern) eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Die Amplifikationen wurden in einem Perkin Elmer Cycler durchgeführt. Als Template wurde cDNA aus den RT-Ansätzen, genomische DNA, PCR-Produkte oder Plasmide eingesetzt.

Eine Standard-Reaktion mit dem HotStar-Taq-DNA-Polymerase Kit der Firma Qiagen wurde in einem Volumen von 50µl durchgeführt und enthielt die folgenden Komponenten.

Standard-PCR-Ansatz

template-DNA	30-125ng
Primer A und B	1,25 µl (10pmol/ µl)
10xReaktionspuffer	5µl
Q-solution	10µl
dNTP-Mix (10mM)	1µl
HotStarTaq-DNA-Polymerase.	0,5µl (2,5 U)
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

PCR-Reaktionen mit anderen DNA-Polymerasen (bspw. von MBI-Fermentas) wurden entsprechend ohne Q-Solution angesetzt. Weiterhin entfiel die Aktivierung der DNA-Polymerase (s.u.). Alle für die PCR verwendeten Primer sind am Ende des Materialien und Methodenteils aufgeführt.

Berechnung der Annealing-Temperatur der Primer

Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur beim PCR-Lauf mußte die Schmelztemperatur der Primer (T_M) berechnet werden. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der folgenden Gleichung:

$$T_M = ((\text{Anzahl der Basen A} + \text{T}) \times 2^\circ\text{C}) + ((\text{Anzahl der Basen G} + \text{C}) \times 4^\circ\text{C})$$

Von der berechneten durchschnittlichen Schmelztemperatur der Primer wurden 8-10°C abgezogen, um auf eine geeignete Annealingtemperatur zu kommen.

PCR-Amplifizierungsprogramm

Ein routinemäßig durchgeführtes PCR-Programm mit dem verwendeten Perkin Elmer Cycler läßt sich aus der hier aufgeführten Tabelle 2 entnehmen.

Tab. 2: Routinemäßig durchgeführtes PCR-Programm

Programmschritt	Temperatur	Dauer [min]
1. Denaturierung der DNA	95°C	1-15*
2. Denaturierung der DNA	94°C	0,5
3. Annealing der Primer	55°C	0,5
4. Verlängerung der DNA	72 °C	3
5. Verlängerung der DNA	72 °C	6
6. Pause	4 °C	
Die Schritte 2-5 wurden 30 mal wiederholt		

*in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Polymerase: 15min bei der HotStar*Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen); 1min bei der *Taq*-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas) sowie bei der *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene).

Zur Entfernung von Reaktionsrückständen wurden die PCR-Ansätze nach abgelaufenem Programm entweder einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation unterzogen oder mit dem PCR-Purification-Kit nach der Herstellervorschrift aufgereinigt.

3.2.4.19 *in vitro*-Mutagenese

Mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese lassen sich Mutationen in Vektoren oder Plasmide einbringen, um bspw. neue Restriktionsschnittstellen oder Aminosäureaustausche in einer klonierten cDNA zu erzeugen. Synthetische Oligonukleotide von etwa 30bp-Länge, die die gewünschte Mutation in ihrer Mitte tragen und jeweils komplementär zum jeweiligen Strang der DNA-Matrize sind, wurden für die Mutagenese eingesetzt. Durch Verwendung der *Pfu*-Turbo-Polymerase (Firma Stratagene) mit 'proofreading' Aktivität wurden DNA-Stränge synthetisiert, die die gewünschte Mutation trugen und zudem über keine DNA-Methylierung verfügten. Nach Ablauf der Reaktion wurde der 50µl-Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (10 U) versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. *DpnI* erkennt die parentale, methylierte DNA und baut diese ab. Durch Transformation in *E.coli*-XL1-Blue-Zellen wurden Vektoren bzw. Plasmide erhalten, die über die eingebrachte Mutation verfügten.

Verwendet wurde das Protokoll für die QuickChange *in vitro*-Mutagenese der Firma Stratagene, wobei nach Angaben des Herstellers vorgegangen wurde (siehe auch Tab. 3).

Mutagenese-Ansatz:

10xPCR-Puffer	5 µl
dNTP (10mM)	1µl
Primer 1 und 2	jeweils 125 ng
Template	30ng
<i>Pfu</i> -Turbo-PM	1µl (2,5U/ µl)
H ₂ O _{bidest}	ad 50µl

Tabelle 3: verwendetes PCR-Mutagenese-Programm

Programmschritt	Temperatur	Dauer [min]
1. Denaturierung der DNA	94°C	0,5
2. Denaturierung der DNA	94°C	0,5
3. Annealing der Primer	55°C	1
4. Verlängerung der DNA	68°C	1/ kbp
5. Pause	4°C	
Die Schritte 2-4 wurden 16 mal wiederholt		

3.2.4.20 DNA-Sequenzierung

Die durchgeführten Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmiden nach der Methode der Dye-Labeled Terminator Sequencing DNA-Sequenzierungsmethode (ROSENBLUM et al., 1997) mit dem DNA-Sequenzierer Typ 310. Bei dieser DNA-Sequenzierungsmethode wird eine Markierung kovalent an die dNTPs angehängt, und zwar jeweils eine anders gefärbte Markierung für den jeweiligen Kettenabbruch. Aus der Sequenz der Farben ergibt sich direkt die Basensequenz.

Ein Sequenzierungsansatz sah folgendermaßen aus:

dsDNA	10ng (PCR-Produkt); 250 ng (Plasmid-DNA)
Primer	5 pmol
Premix	2 µl
ad H ₂ O _{bidest}	10 µl

In dem Premix befanden sich neben dem Puffer für die PCR noch die Polymerase (*Ampli Taq-Gold-DNA-Polymerase*) und die markierten dNTPs. Der Sequenzierungsansatz wurde in einem Perkin Elmer Cycler unter Verwendung des hier aufgeführten Programms inkubiert. Die verwendeten Primer sind am Ende des Materialien und Methodenteils aufgeführt.

RNA-Gele wurden in einer speziell nur für diesen Zweck benutzten Gelkammer gefahren, die zuvor 2h in 5N NaOH-Lösung inkubiert worden war. Die Agarose (1%) wurde in 1xLaufpuffer gelöst, auf 55°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5mg/ ml) und Formaldehyd (Endkonzentration 0,65%) versetzt und in eine RNase-freie Form gegossen. Die RNA-Proben (5µg total-RNA) wurden gefällt und das Pellet in 25µl Probenpuffer gelöst. Vor dem Auftrag wurden die RNA-Proben 5min auf 65°C erhitzt. Nach dem Lauf wurde das Gel 10min in 20x SSC äquilibriert. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20x SSC als Transferpuffer. Der Filter wurde bei RT getrocknet und für 11sec auf dem UV-Transilluminator mit UV-Licht (254nm) bestrahlt, um die RNA kovalent an den Filter zu binden.

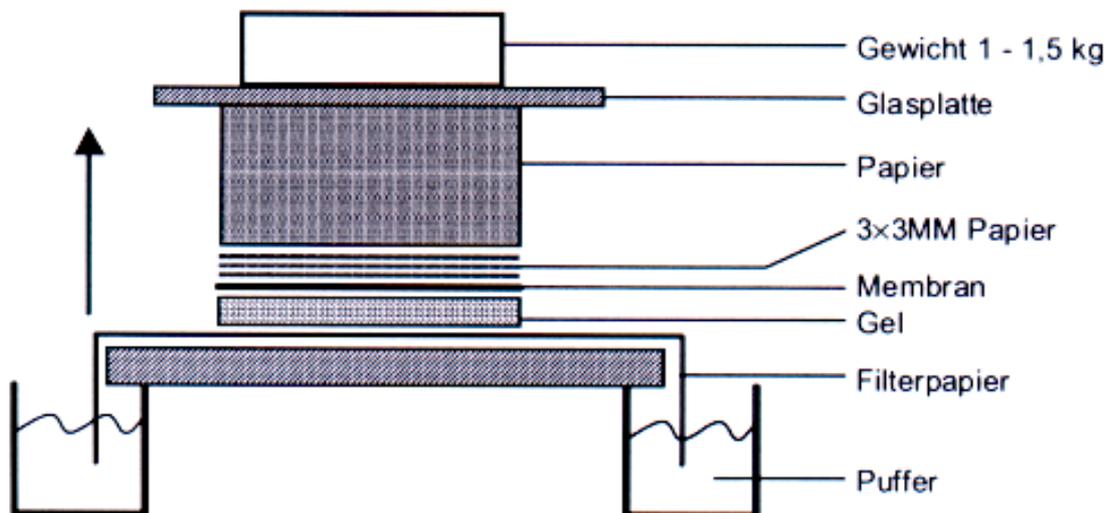


Abb. 7: Northern Blot

Die Abbildung zeigt die Technik des Transfers der Nukleinsäure aus dem Agarosegel auf Hybond-Nylon-Filter. Der Pfeil zeigt die Richtung des Flüssigkeitsstroms an, durch den die RNA aus dem Agarosegel auf einen darüberliegenden Filter übertragen wird.

3.2.4.22 DNA-Markierung mit α -³²P-dCTP

Spezifische DNA-Sonden wurden zur Detektion von spezifischer humaner mRNA in einem Northern Blot eingesetzt. Hierzu verwendet wurden für die interessierende mRNA spezifische PCR-Fragmente mit einer Länge zwischen 500bp und 800bp. Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde (denaturierte DNA) erfolgte nach dem Random Priming-Verfahren. Hierzu wurde das RediPrime II DNA Labelling Kit der Firma Amersham Pharmacia verwendet. 30ng des PCR-Fragments wurden in 45µl

H₂O_{bidest} aufgenommen, 5min bei 95°C denaturiert und nach Anzentrifugieren sofort auf Eis gestellt. Die 45µl mit der denaturierten DNA wurden zusammen mit 5µl α-³²P-dCTP (50µCi) auf den pelletierten Markierungs-Mix gegeben und gemischt. Der Ansatz wurde 15min bei 37°C inkubiert und die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden anschließend von den nicht inkorporierten Nukleotiden mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits der Firma Qiagen getrennt. Hierbei wurde nach der Hersteller-Vorschrift für die Aufreinigung radioaktiver DNA-Fragmente verfahren. Eluiert wurde die DNA in 200µl Puffer EB. Die eingebaute Radioaktivität im Cerenkov-Verfahren (Berger, 1984) bestimmt. Die spezifische Aktivität der ³²P-markierten DNA-Fragmente lag in der Regel bei ca. 10⁶ cpm/ µg DNA.

3.2.4.23 Hybridisierung der Hybond-N-Filter mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Hybridisierung wurde die getrocknete Nylonmembran mit dem Hybridisierungsmix (1ml/cm²) in einem 50ml Plastikröhrchen 10-15min bei 42°C vorinkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde (Endkonz.: 2x10⁶ cpm/ml Mix) und ca. 20µl Lachsspermien-DNA (Endkonz.: 100µg/ ml Hybridisierungsmix) wurden 5min bei 95°C denaturiert und dem Hybridisierungsmix mit dem Filter zugesetzt. Dieser Hybridisierungsansatz wurde über Nacht bei 42°C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde der radioaktive Hybridisierungsmix dekantiert und der Filter zweimal für 10min in Waschlösung 1 bei RT, danach solange mit Waschlösung 2 bei 68°C stringent gewaschen bis eine meßbare Radioaktivität (Handmonitor) auf dem Filter von etwa 30cpm detektiert wurde. Der Filter wurde in Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm (Kodak XAR-5) zwischen Verstärkerfolien (Cronix Dupont) bei -80°C über Nacht inkubiert.

Lachsspermien-DNA

Die Lachsspermien-DNA wurde mit einer sterilen Schere zerkleinert und in H₂O_{bidest} gelöst (Endkonz.: 10mg/ml). Nach 10min Ultraschall und Aufkochen in der Mikrowelle wurde erneut beschallt. Die so homogenisierte DNA wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

<u>Hybridisierungsmix</u>	72ml Formamid
	36ml 20x SSC
	1,5ml 1M Tris/ HCl, pH 7,5
	1,5g SDS
	3ml 50x Denhardts-Lösung
	15g Dextransulfat

Das Dextransulfat wurde in 30ml H₂O_{bidest} aufgenommen und bei 80°C gelöst. Anschließend wurden die restlichen Substanzen zugesetzt und das Volumen auf 150ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt.

Waschlösung 1:	2x SSC
	5% (w/v) SDS in H ₂ O _{bidest}

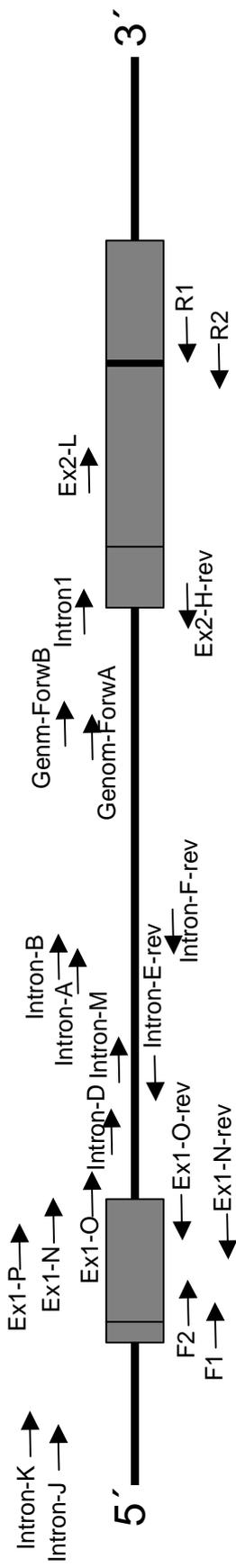
Waschlösung 2:	0,2x SSC
	0,1% (w/v) SDS in H ₂ O _{bidest}

3.2.4.24 Transfektion von FNX-Eco-Zellen mit FuGENE6-Transfektionsreagenz

Zur stabilen Expression der komplementierenden Patienten- bzw. WT-cDNA wurden die primären, humanen Fibroblasten nach der Klonierung der jeweiligen cDNA in den retroviralen, selektierbaren pLNCXII-Vektor transduziert. Unter der Kontrolle des CMV-Promotors integriert dieser Vektor neben der cDNA auch das Neomycin-Resistenzgen in das Genom der Fibroblasten, so daß durch G418-Selektion stabile Zelllinien erzeugt werden können. Am Tag vor der Transfektion wurden 5×10^5 der adhärennten FNX-Eco-Zellen mit 4ml Medium in 60mm Zellkulturschalen ausplattiert. Die Transfektion mit dem FuGENE6-Transfektionsreagenz erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Hierzu wurden drei Teile Transfektionsreagenz mit 94 Teilen serumfreien DMEM in einem sterilen Eppendorfgefäß vorsichtig gemischt und bei RT für 5min inkubiert. 3µg Plasmid (pLNCXII mit der mutierten bzw. WT-cDNA für die lange *alg2*-Isoform) bzw. nur pLNCXII-Vektor-DNA (mock), jeweils gelöst in 3µl sterilem H₂O_{bidest}, wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß pipettiert und mit dem DMEM-Transfektionsreagenzgemisch vermischt. Nach einer Inkubation von 20min bei RT wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

3.2.4.25 Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten

Die transiente Transfektion von FNX-Eco-Zellen wurde wie unter 3.2.4.24 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend für 24h bei 37°C inkubiert. Zur Stabilitätserhaltung retroviraler Partikel erfolgte dann ein Temperaturshift der Zellen auf 33°C und eine weitere Inkubation für 24h. Der die ecotropen Viruspartikel enthaltende Überstand der FNX-Eco-Zellen wurde durch einen sterilen Zellulose-Acetat 0,45µm-Filter zur Reinigung von den Verpackungszellen gegeben und mit 6µg Polybrene pro ml Zellüberstand zur Herabsetzung der ladungsbedingten Abstoßung zwischen dem Viruspartikel und der Zellmembran versetzt. Der so behandelte Überstand wurde dann zur Infektion von 5×10^5 PT67-Verpackungszellen eingesetzt, die am Tag vor der Infektion auf 60mm Gewebekulturschalen ausplattiert worden waren. Nach einer Inkubation von 8h bei 37°C erfolgte der Temperaturshift der Zellen auf 33°C für 16h. Die Ernte der amphiotrophen Überstände erfolgte auf gleiche Weise wie bei den ecotropen Überständen. Die amphiotrophen Verpackungszellen erhielten 4ml frisches Medium und wurden für weitere 24h bei 33°C zur Produktion eines zweiten amphiotrophen Virusüberstandes inkubiert. Mit dem geernteten ersten amphiotrophen Überstand wurden die 48h zuvor ausplattierten primären, humanen Fibroblasten (2×10^5 Zellen/60mm Gewebekulturschale) ein erstes Mal infiziert und die Zellen für 16h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgezogen, durch neues Medium ersetzt und die Zellen für weitere 8h kultiviert. 24h nach Abnahme des ersten amphiotrophen Überstandes wurde ein zweiter Überstand von den PT67-Zellen geerntet, um die humanen Fibroblasten ein zweites Mal zu infizieren. Dieser Vorgang wiederholte sich noch ein weiteres Mal. Die Fibroblastenzellen, die am Ende 3x mit amphiotrophen Überständen behandelt worden waren, wurden für weitere 48h in selektionsfreiem Medium kultiviert. Dann erfolgte der Wechsel auf Medium mit G418 (0,4mg/ml Geneticin) und eine Selektion über 10 Tagen, um stabile Zelllinien zu erhalten.



3.2.4.26: Schematische Darstellung des humanen *alq2*-Genlocus' mit den verwendeten Primern

Nicht-kodierende Bereiche des *alq2*-Genlocus sind hier durch einen schwarzen Balken dargestellt. Die Exons sind durch graue Kästen hervorgehoben. Dünne senkrechte Linien in den Exons kennzeichnen die beiden Start-Codons. Das für beide *alq2*-Isoformen geltende Stop-Codon ist durch eine dicke senkrechte Linie gekennzeichnet. Primer, die für PCR- sowie Sequenzierungsreaktionen eingesetzt wurden, sind in dieser Darstellung unter Angabe ihres Namens und Bindungsortes im Genlocus sowie der Laufrichtung ihrer Reaktion eingetragen.

Intron J: 5'-GGAGATGAGGGTGGCAAGGC-3'	Genom-ForwA: 5'-GAGATGTGCTAAAGTTAAAATACAA-3'
Intron K 5'-GGATAGAAAAGTTACGGAGCCC-3':	Genom-ForwB: 5'-GTAATGTGAAATATATGTATATATAAAG-3'
F1: 5'-GGAGCTTGCAGAGAACCC-3'	Intron 1: 5'-GGCATAATGGTACTGGGTGAGAG-3'
F2: 5'-GTGCAGTTGGGCTCCAG-3'	Ex2-L: 5'-GGAGAAATGTGGAACATTATCAGG-3'
Ex1-P: 5'-GCCACTGTTTCGCCGAGAGC-3'	R1: 5'-GTGGCTCACATTCAAGACTCAA-3'
Ex1-N: 5'-GTCTGCCCTACGTGGCA-3'	R2: 5'-CAAAACTGGTCTACATACCATA-3'
Ex1-O: 5'-TCCTGGCGCTACGTGTT-3'	Ex2-H-rev: 5'-CTTGGTGAGAAAGCAGATCTCC-3'
Intron-A: 5'-GGACATTCTTATGTATCAATATTAG-3'	Intron E-rev: 5'-CAGGCAGATCCAGGTGGAC-3'
Intron B: 5'-GTGGCCAGAAAATCCACTTTTG-3'	Intron F-rev: 5'-GGTTAATATCCAAGCGGACAA-3'
Intron D: 5'-GAGCCAGCCACACCGTC-3'	Ex1-O-rev: 5'-AACAGCACGTAGAGCCCGAGG-3'
Intron M: 5'-GGTACATAATTGGTATTATGACAT-3'	Ex1-N-rev: 5'-TGCCACGTAGCCGACAGC-3'

4 Ergebnisse

4.1 Patientenanamnese



Die Patientin M.S. wurde am 05.08.1999 als erstes Kind gesunder Eltern geboren. In der Familie mütterlicherseits wurden bei der Großmutter sowie bei einem Onkel eine Anfallsbereitschaft diagnostiziert. Darüber hinaus traten mehrere ungeklärte Todesfälle im frühen Säuglingsalter, Verhaltensauffälligkeiten und motorische Gangstörungen auf.

In der Familie des Vaters sind keine Auffälligkeiten bekannt. Die Schwangerschaft verlief unauffällig. In der 36. Schwangerschaftswoche mußte die Geburt wegen eines vorzeitigen Blasensprungs eingeleitet werden. Das Geburtsgewicht des Kindes betrug 3230g, der APGAR-Test (Klassifizierungstest für Adaptationsstörungen) zeigte normale Werte von 9/10/10. Es traten keine postnatalen Komplikationen auf, und das Kind zeigte bis zum 3. Lebensmonat eine unauffällige frühkindliche Entwicklung. Danach wurde auf beiden Augen eine Irismissbildung sowie ein Katarakt auf dem linken Auge festgestellt, welches operativ behandelt wurde. Darüber hinaus wurde eine Haltungsasymmetrie nach rechts sowie eine allgemein verzögerte Entwicklung und eine geringere Reaktion auf Umweltreize jeder Art festgestellt. Im Alter von 4 Monaten wurde die Diagnose eines BNS-Leidens (Blitz-Nick-Salaam-Krämpfe: kurze Propulsivbewegungen mit tonischer Versteifung) gesichert und eine antikonvulsive Behandlung eingeleitet. Bei der Vorsorgeuntersuchung U5 im Alter von 6 Monaten fiel bei dem Kind das fehlende Abstützen mit geöffneten Händen in Bauchlage auf. Die Werte für Körperlänge (69,5 cm) und Kopfumfang (43 cm) lagen im Normbereich. Das Körpergewicht von 8150g lag im oberen Normbereich. Die Bewegungen des Kopfes und der Hände waren ungerichtet. Ein nahezu vollständiger Stillstand der Myelinisierung, ein stark vermindertes Erlernen der Blickfixation, eine einmalig festgestellte Hepatomegalie und eine längere Phase von Erbrechen waren Anlaß für eine Stoffwechselfdiagnostik. Dabei wurden bei der Patientin verlängerte Blutgerinnungszeiten (PTT) und eine starke Erniedrigung des Blutgerinnungsfaktors XI festgestellt, wie sie unter anderem in Fällen von CDG beobachtet wurden. Daher wurde im Alter von 9 Monaten eine

CDG-Diagnostik mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung und des Western-Blots des Serumtransferrins eingeleitet.

4.2 Proteinbiochemische Untersuchungen

4.2.1 Isoelektrische Fokussierung und Western Blot Analyse des Serum-Transferrins

Im Rahmen der CDG-Diagnostik wurde zunächst eine isoelektrische Fokussierung des Serum-Transferrins unserer Patientin M.S., eines CDG-Ia-Patienten sowie einer Kontrolle durchgeführt (siehe Abb. 8 oben).

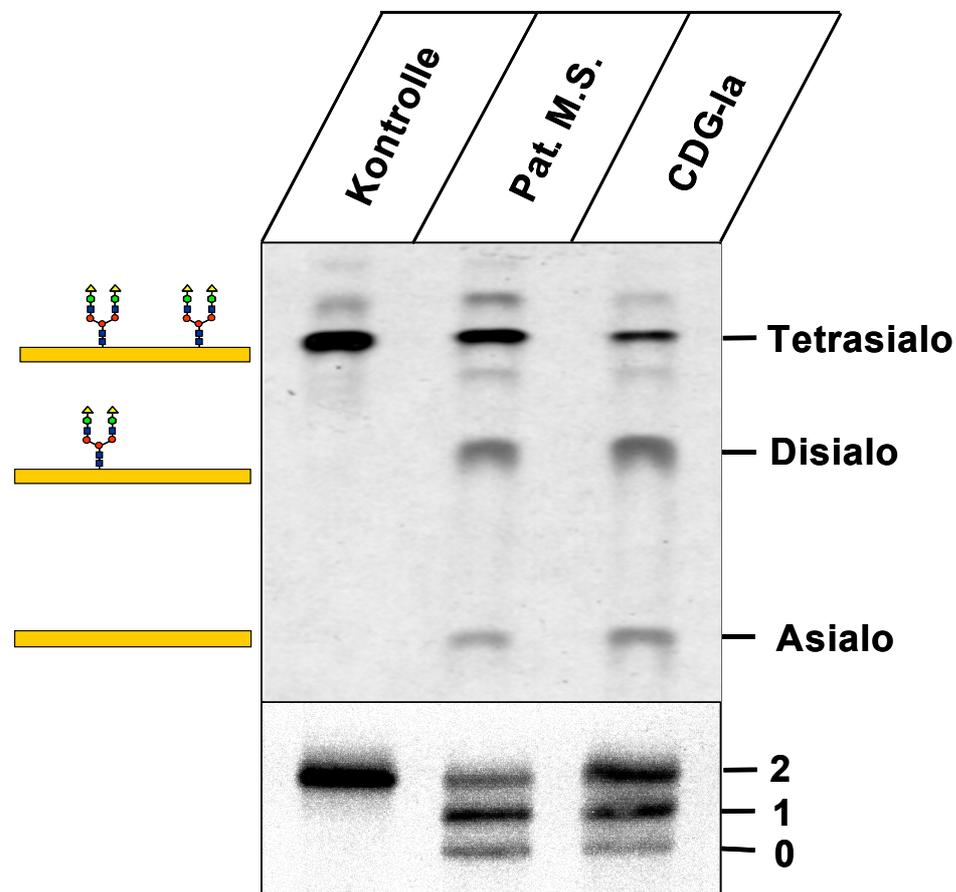


Abb. 8: Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE des Serum-Transferrins.

Die obere Abbildung zeigt die isoelektrische Fokussierung von Kontroll- und Patienten-Serumtransferrin. Die gelben Balken stellen das Transferrinmolekül dar. Das N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharid setzt sich aus den Zuckern N-Acetylglucosamin (■), Mannose (●), Galaktose (●) und Sialinsäure (▲) zusammen. Die untere Abbildung zeigt die Analyse des Serumtransferrins mittels SDS-PAGE. Die Zahlen geben die Anzahl der Transferrin-gebundenen N-Glykane wieder.

Dabei wies das Serum-Transferrin der Kontrollperson eine homogene Bande auf, die der typischen Tetrasialoform von vollständig glykosyliertem und sialyliertem Transferrin entspricht (siehe Einleitung). Bei der Patientin M.S. sowie bei der CDG-Ia-Positivkontrolle erscheinen neben dieser Tetrasialoform des Transferrins zudem gleichstarke Banden für die Disialo- sowie Asialoform des Proteins, was den partiellen Verlust von zwei bzw. vier Sialinsäureresten anzeigt. Dieses IEF-Muster kann u.a. durch den Verlust vollständiger Oligosaccharidketten auf dem Transferrin-Molekül erklärt werden, wie es beispielsweise auch bei CDG-Ia-Patienten gefunden wurde (Jaeken et al., 1984). Mit dem Fehlen kompletter N-Glykane geht auch der Verlust der terminalen Sialinsäurereste einher, wodurch sich die Ladung des Proteins und damit auch das Laufverhalten des Transferrins in der IEF ändert. Um nachzuweisen, daß bei der Patientin tatsächlich komplette Zuckerketten auf dem Transferrin fehlen, wurde eine Western-Blot Analyse des Serum-Transferrins durchgeführt (siehe Abb. 8 unten). Die Glykosylierungsstellen des Serum-Transferrins der Negativkontrolle sind vollständig mit Zuckerketten besetzt, was im Western Blot durch eine homogene Bande, der vollständig glykosylierten Transferrinform, zu erkennen ist. Bei der Patientin zeigen sich, wie bei der CDG-Ia-Kontrolle, neben dem vollglykosylierten Transferrin zwei zusätzliche Banden, was auf den Verlust einer bzw. beider N-Glykan Moleküle auf dem Serum-Transferrin hinweist.

Durch die Ergebnisse der IEF sowie des Western Blots konnte gezeigt werden, daß auf dem Serum-Transferrin der Patientin M.S. nicht alle Zuckerketten vorhanden sind und damit auch die terminalen Sialinsäurereste fehlen. Das Fehlen ganzer Zuckerketten auf dem Serum-Transferrin deutet auf einen frühen Defekt in der N-Glykosylierung und damit auf einen Typ I der CDG hin.

4.2.2 Bestimmung der Aktivität der Phosphomannomutase 2 (PMM2)

Etwa 80% aller CDG-Erkrankten leiden unter CDG-Ia, einem Defekt des Enzyms PMM2, daß im Cytosol die Umsetzung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat katalysiert (Kepes und Schekman, 1988; Hansen et al., 1997). Bei einem Aktivitätsverlust dieses Enzyms kommt es zum partiellen Verlust kompletter N-Glykanketten auf dem Serumprotein Transferrin. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Erkrankung der Patientin M.S. ebenfalls um CDG-Ia handelt, wurde eine Aktivitätsbestimmung der PMM2 sowohl für die Patientin M.S. als auch für Kontrollen

durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Fibroblastenextrakte mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose-6-Phosphat}$ inkubiert und die Entstehung von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose-1,6-Bisphosphat}$ mit Hilfe der Hochspannungspapiererelektrophorese bestimmt.

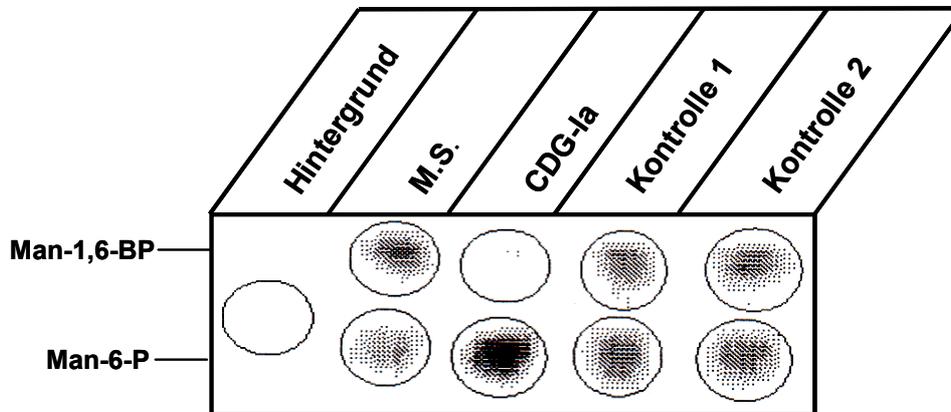


Abb.9: Aktivitätsbestimmung der PMM2 durch Hochspannungspapiererelektrophorese

Der Umsatz von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-6-P}$ (unten) zu $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-1,6-BP}$ (oben) in Gegenwart von Fibroblastenextrakten der Patientin bzw. Kontrollen wurde mit Hilfe der Hochspannungspapiererelektrophorese und anschließender Auswertung des Trägerpapiers im Flachbettscanner Tracemaster 20 bestimmt. Anschließend wurden das Verhältnis von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-1,6-BP}/[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-6-P}$ errechnet und darüber die Enzymaktivität bestimmt. Die Versuchsbedingungen sind so gewählt, daß PMM2 aus Kontrollen etwa 50% des angebotenen $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-6-P}$ zu $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-1,6-BP}$ umsetzt.

Parallel zur Aktivitätsbestimmung der PMM2 der Patientin wurden zwei Negativ- und eine CDG-Ia-Positivkontrolle mitgeführt. Bei den Negativ-Kontrollen zeigten sich bei der Hochspannungspapiererelektrophorese zwei gleichstarke Signale für $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-6-P}$ und $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-1,6-BP}$. Die CDG-Ia Positiv-Kontrolle zeigt aufgrund eines PMM2-Aktivitätsdefizits einen stark verminderten Umsatz zu Man-1,6-BP. Die Patientin hingegen weist einen ähnlichen Umsatz wie die Kontrollen auf. In Tabelle 4 sind die gemessenen cpm-Werte von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-6-P}$ und $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man-1,6-BP}$ der Kontrollen und der Patientin sowie die ermittelte jeweilige PMM2-Aktivität dargestellt.

Die Kontrollen 1 und 2 zeigen eine gemittelte PMM2-Aktivität von 0,885mU/ mg, wogegen die CDG-Ia-Positivkontrolle eine Aktivität von lediglich 0,09mU/ mg Protein aufweist, was in etwa $\frac{1}{10}$ der Enzymaktivität der gesunden Kontrollpersonen entspricht. Für die Patientin wurde eine PMM2-Aktivität von 1,53U/ mg Protein ermittelt, die im Vergleich zu den Kontrollen damit sogar im oberen Normbereich liegt. Ein Defekt in dem PMM2-Enzym konnte als Ursache für die Unterglykosylierung des Transferrins bei der Patientin somit ausgeschlossen werden.

Tabelle 4: Ermittlung der PMM2-Aktivität

	Net [cpm]	Net [cpm] ohne Hintergrund	Man-1,6-BP/ Man-6-P	PMM2-Aktivität [mU/ mg Protein]
Kontrolle 1 (M-6-P)	452,61	382,50	0,90	1,0
Kontrolle 1 (M-1,6-BP)	414,60	344,50		
Kontrolle 2 (M-6-P)	462,68	392,60	0,69	0,77
Kontrolle 2 (M-1,6-BP)	342,73	272,60		
CDG-Ia (M-6-P)	715,35	645,20	0,08	0,09
CDG-Ia (M-1,6-BP)	121,95	51,80		
M.S. (M-6-P)	286,68	216,60	1,39	1,53
M.S. (M-1,6-BP)	369,91	299,80		
Hintergrund	70,11			

4.2.3 Bestimmung der Aktivität der Phosphomannose Isomerase

Ein weiterer früher CDG-Defekt, der sich ebenfalls mit den Ergebnissen der IEF und des Western Blots für die Patientin decken würde, ist der Typ CDG-Ib. Die Bestimmung der Aktivität des hierbei betroffenen Enzyms Phosphomannose Isomerase erfolgte durch einen gekoppelten optischen Test, bei dem der Umsatz von Mannose-6-Phosphat über Fructose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton bestimmt wird. Die im letzten Schritt erfolgende Umsetzung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu NADP^+ durch die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase dient dabei zur photometrischen Quantifizierung (van Schaftingen und Jaeken, 1995). Bestimmt wurde die Aktivität der PMI aus Fibroblastenextrakten der Patientin sowie von drei Kontrollen. Die PMI-Aktivität der Patientin lag mit 11,32mU/mg Protein im Vergleich zu den drei mitgeführten Kontrollen, die über eine gemittelte Aktivität von 9,57mU/mg Protein verfügten, im Normbereich. Ein CDG-Ib-Defekt aufgrund einer verminderten Aktivität der PMI konnte damit neben CDG-Ia ausgeschlossen werden.

4.2.4 HPLC-Analyse Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S. zum Ausschluss der CDG-Typen Ic, Id, Ie, If und Ig

Nachdem die Erkrankungen vom Typ CDG-Ia und Ib im Fall der Patientin M.S. ausgeschlossen werden konnten, wurden weitere bekannte CDG-I Typen mit Hilfe der HPLC-Analyse von metabolisch mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose markierten Dolichol-

verknüpften Oligosacchariden aus Kontroll- und Patientenfibroblasten untersucht (Körner et al., 1998b). Nach der Abspaltung der Oligosaccharide durch milde saure Hydrolyse erfolgte eine Auftrennung mittels HPLC über einen Acetonitrilgradienten

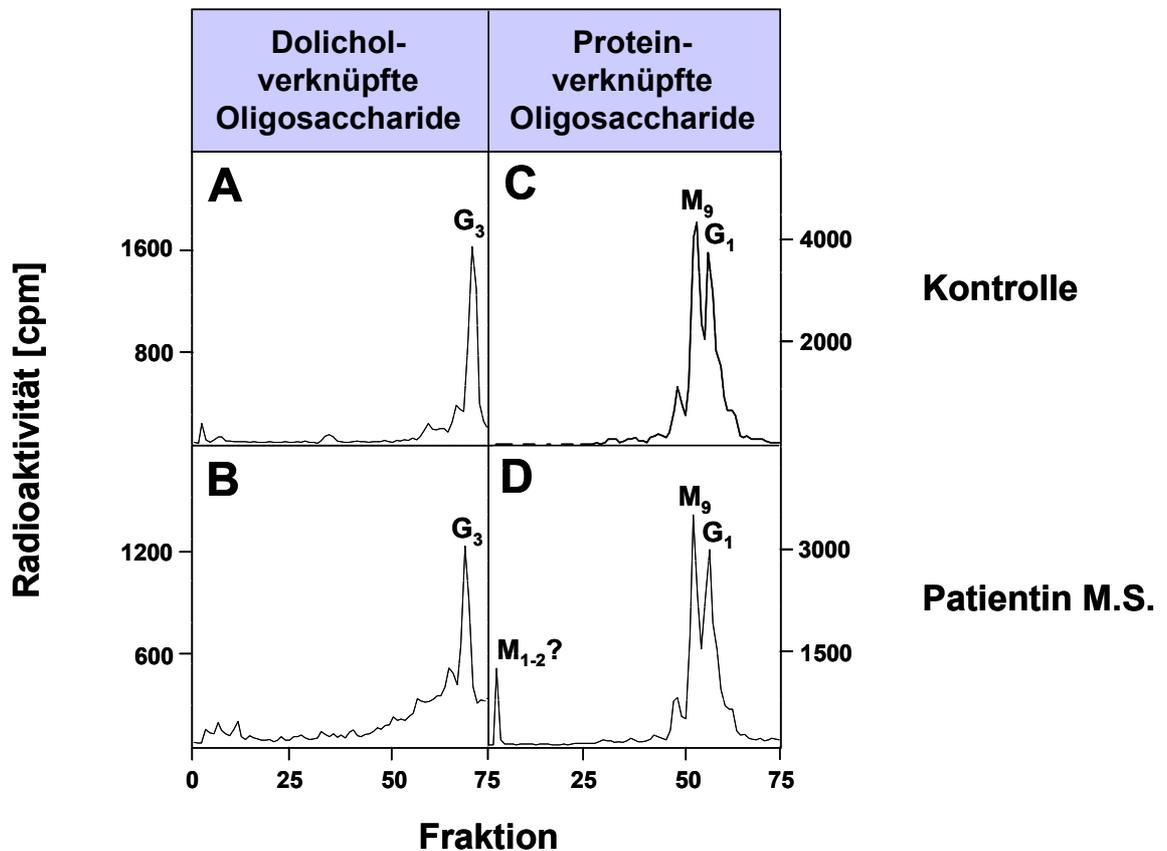


Abb. 10: HPLC-Analyse Dolichol-verknüpfter und Protein-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S. und einer Kontrolle

A und B: Analyse der Lipid-verknüpften Oligosaccharide der Kontrolle (A) und der Patientin M.S. (B). Fibroblasten einer Kontrolle und der Patientin wurden metabolisch mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ markiert und die markierten Oligosaccharide anschließend von den LLOs durch milde Säurebehandlung freigesetzt und durch HPLC analysiert. G_3 bezieht sich auf die Freisetzung von $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$.

C und D: Analyse der Protein-verknüpften Oligosaccharide der Kontrolle (C) und der Patientin M.S. (D). Fibroblasten einer Kontrolle und der Patientin wurden metabolisch mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}$ markiert und die markierten Oligosaccharide anschließend vom Protein mittels PNGase F-Verdau abgespalten und durch HPLC analysiert. M_9 und G_1 beziehen sich auf die Freisetzung von $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ bzw. $\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$. $M_{1-2}?$ steht für die vermutete Verbindung $\text{Man}_{1-2}\text{-GlcNAc}_2$.

und die anschließende Auswertung der HPLC-Fractionen im Szintillations-Messgerät. Wie in der Literatur beschrieben (für CDG-Ic: Körner et al., 1998c; für CDG-Id: Körner et al., 1999; für CDG-Ie: Imbach et al., 2000/ Kim et al., 2000; für CDG-Ig: Schenk et al., 2001/ Kranz et al., 2001; für CDG-Ig: Thiel et al., 2002/

Chantret et al., 2002/ Grubenmann et al., 2002), wären im Falle von CDG-Ic, Id, Ie, If und Ig folgende Akkumulationen von $[2\text{-}^3\text{H}]$ Oligosacchariden zu erwarten gewesen: CDG-Ic: $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$, CDG-Id und CDG-Ie: $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2$, CDG-If: $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2$ und $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$, CDG-Ig: $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_7\text{-GlcNAc}_2$.

Wie die Abb. 10 (A, B) zeigt, wiesen die $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose markierten Oligosaccharide der Patientin (10 B) keine der bisher beschriebenen Akkumulationen verkürzter Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide auf. Sie synthetisierte mit der Kontrolle (10 A) vergleichbare Mengen an vollständigem Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Damit konnten alle bekannten Ursachen für CDG-I im Fall der Patientin M.S. ausgeschlossen werden.

4.2.5 HPLC-Analyse Protein-verknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S.

Da durch Vorversuche alle bekannten CDG-I Fälle ausgeschlossen werden konnten, bestand die Möglichkeit, daß bei der Patientin ein Defekt in der Übertragung an vollständigen lipidverknüpften Zuckerketten auf naszierende Proteine durch die Oligosaccharyltransferase (OST) vorlag. Daher wurden proteinverknüpfte, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose-markierte Oligosaccharide mit Hilfe eines PNGase F-Verdau von den neusynthetisierten Glykoproteinen abgespalten und mittels HPLC analysiert (siehe Abb. 10 C, D), wobei sich bei der Patientin M.S. und der Kontrolle vergleichbare Mengen an $\text{Glc}_1\text{-}[^3\text{H}]\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ und $[^3\text{H}]\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ -Formen zeigten, was auf eine normale OST-Aktivität hinwies. Die OST katalysiert die Übertragung vollständiger Zuckerketten auf wachsende Proteine (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Nach der Übertragung der Oligosaccharide setzen Trimmingreaktionen durch Glucosidasen und Mannosidasen ein, wodurch die terminalen zwei bis drei Glucosereste sowie der terminale Mannoserest abgespalten werden (Parodi, 2000). Daraus resultiert, daß auf neusynthetisierten Glykoproteinen zu einem großen Teil $\text{Glc}_1\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ und $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ detektiert wird. Weiterhin ist oftmals auch eine Akkumulation von $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$ zu finden. Dies ist auch hier der Fall. Alle drei Verbindungen sind Anzeichen dafür, daß die unter 4.2.4 detektierten vollständigen lipidverknüpften Oligosaccharide der Form $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ auch tatsächlich von der OST übertragen wurden. Bei der Patientin M.S. zeigte sich eine weitere Akkumulation einer frühen Zuckerverbindung (10 D, links; Man_{1-2} ?), die bei der Kontrolle nicht zu detektieren war. Bei der Akkumulation konnte es sich um so frühe Intermediate wie $[^3\text{H}]\text{Man}_{1-2}\text{-GlcNAc}_2$ handeln. Diese Ergebnisse

deuteten darauf hin, daß statt eines Defekts in der Übertragung der lipidverknüpften Oligosaccharide durch die OST ein Defekt in einem frühen Schritt in der Synthese der LLOs für die Erkrankung der Patientin verantwortlich sein könnte. Weiterführende Untersuchungen betrafen die ersten Übertragungsschritte von Mannoseresten auf das lipidverknüpfte Oligosaccharid.

4.2.6 Dünnschichtchromatographie kurzkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide

Mit Hilfe der durchgeführten HPLC-Analyse für radioaktiv-markierte, langkettige, lipid- (siehe 4.2.4) und proteinverknüpfte Oligosaccharide (siehe 4.2.5) ließen sich aufgrund der Aufarbeitungsmethode des Probenmaterials kurze $[2\text{-}^3\text{H}]$ -Mannose-markierte, Dolichol-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen nicht detektieren. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die kurzkettigen mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ -Mannose-markierten, Dolichol-verknüpften Oligosaccharide mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Fibroblasten der Patientin M.S. und einer Kontrolle wurden mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose metabolisch markiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, der Dol-P-Man sowie kurze $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose-markierte LLOs enthaltende apolare Extrakte isoliert und anschließend mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe Abb. 11). Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit des mit Mannosen verknüpften Dol-PP-GlcNAc₂ direkt abhängig von der Anzahl der übertragenen Mannosereste.

‘RF-Start’ markiert den Auftragspunkt der apolaren Extrakte der Patientin M.S. bzw. der Kontrolle. Dünnschichtchromatographisch erfaßt wurde eine Strecke von 14cm. Nicht an Dolichol-Phosphat gebundene $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose zeigt unter den gegebenen Laufbedingungen keine Migration in der Dünnschichtchromatographie. Sowohl bei der Patientin M.S. als auch bei der Kontrolle ist ungebundene $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose bei RF-Start zu erkennen. Weiterhin zeigen Patientin und Kontrolle eine schwache Akkumulation von an Dolichol-Phosphat gebundene $[2\text{-}^3\text{H}]$ -Mannose, die aufgrund der Laufbedingungen und ihrer Hydrophobizität am weitesten in der Chromatographie gelaufen ist und 8cm von RF-Start lokalisiert ist. Im Gegensatz zur Kontrolle, bei der keine Zwischenprodukte akkumulieren, sind bei der Patientin zwei weitere Spots in der Chromatographie zu erkennen, wovon sich der erste Spot 1cm und der zweite, stärkere Spot 2cm nach RF-Start zeigt. Bei diesen Akkumulationen

könnte es sich um $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ sowie um $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ handeln, wobei Dol-PP-GlcNAc_2 mit nur einem verknüpften Mannoserest aufgrund größerer Hydrophobizität weiter laufen würde als Dol-PP-GlcNAc_2 mit zwei

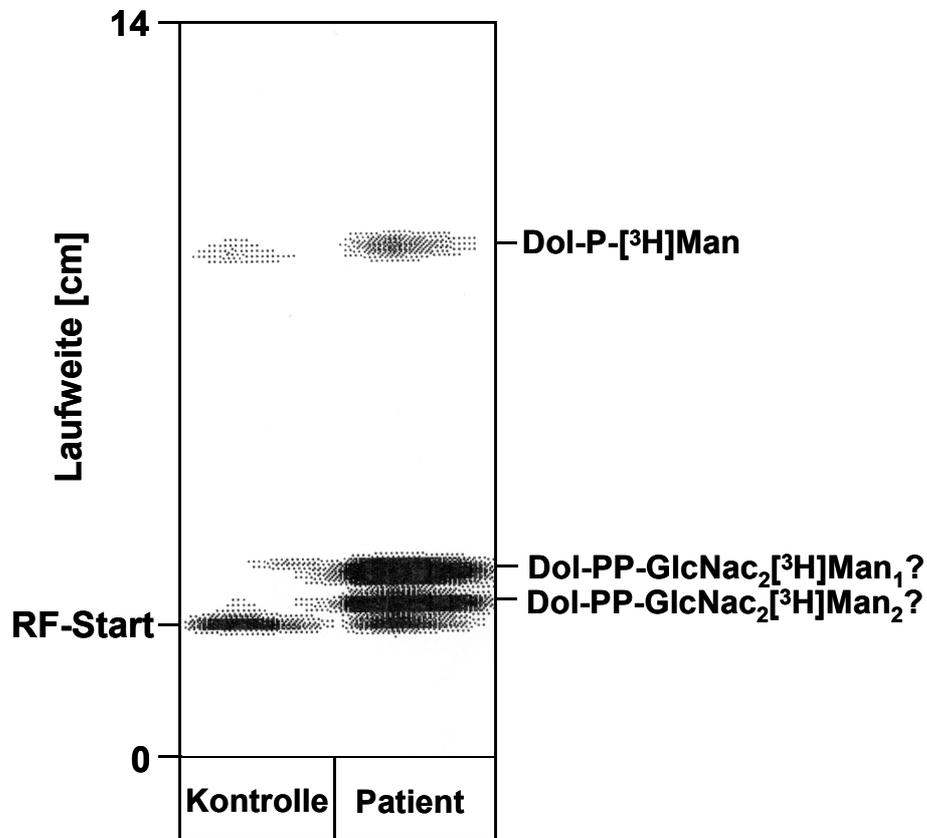


Abb. 11: Auftrennung kurzkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide mittels Dünnschichtchromatographie

Mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose markierte, kurzkettige LLOs der Patientin M.S. und einer Kontrolle wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Analyse der Chromatogramme mit Hilfe des Analysegerätes `Tracemaster 20` ergab im Falle der Patientin M.S. die Akkumulation zweier Substanzen, die bei den Kontrollen nicht detektiert werden konnten.

angehängten Mannoseresten. Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie, das die Akkumulation von zwei frühen Intermediaten der N-Glykosylierung zeigt, war der erste Beweis für einen tatsächlich vorliegenden Defekt in den ersten Schritten der Dolichol-verknüpften Oligosaccharidbiosynthese bei der Patientin M.S. Massenspektrometrische Untersuchungen der kurzkettigen, lipidverknüpften Oligosaccharide sollten Aufschluß über die akkumulierenden Verbindungen bei M.S. geben.

4.2.7 HPLC-Auftrennung kurzkettiger, lipidverknüpfter Oligosaccharide der Patientin M.S. und massenspektrometrische Analyse der Verbindungen

Die unter 3.2.3.13 erhaltenen Überstände, die Dol-P-Man[2-³H] sowie die [2-³H]Mannose-markierten, kurzkettigen LLOs enthielten, wurden einer milden Säurebehandlung unterzogen und anschließend mittels HPLC analysiert. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und nachfolgend zur Massenspektrometrie eingesetzt, um anhand der hierbei detektierten Massen auf die unter 4.2.6 detektierten, akkumulierenden Zuckerverbindungen rückschließen zu können.

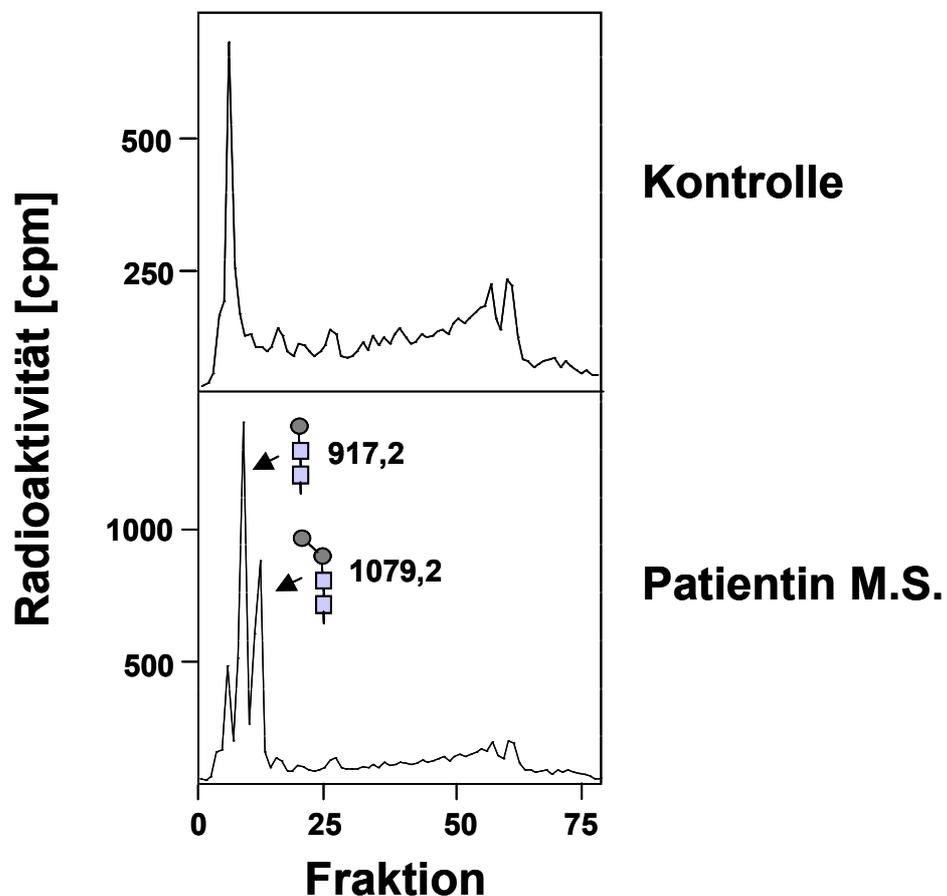


Abb. 12: HPLC und massenspektroskopische Analyse kurzkettiger, Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide nach metabolischer Markierung mit [2-³H]Mannose

Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden metabolisch mit [2-³H]Mannose für 30min. markiert. Anschließend wurden kurzkettige Dolichol-verknüpfte Oligosaccharide mit Hilfe eines Chloroform/Methanol(3:2)-Gemisches extrahiert, der Oligosaccharidanteil mittels mildsaurer Hydrolyse in 20mM HCl für 30min. bei 95°C vom Lipid-Anteil abgespalten und mit Hilfe der HPLC aufgetrennt. Die Oligosaccharide der zusätzlichen Peakfraktionen im Falle der Patientin M.S. wurden mit PMP verknüpft und zur massenspektrometrischen Analyse eingesetzt. Die Werte neben den HPLC-Peakfraktionen geben die detektierten Massen in Da an. Die Quadrate stellen N-Acetylglucosaminreste dar, während die Kreise Mannosereste symbolisieren.

Die Kontrolle zeigt einen Hauptpeak am Anfang des Laufs von 650cpm, der die freie, nicht eingebaute Mannose darstellt und charakteristisch ist für die Auftrennung der kurzkettigen Zuckerketten durch HPLC. Die weiteren Peaks mit Werten zwischen 100-220cpm zeigen die unterschiedlich langen Intermediate der Dolichol-verknüpften Oligosaccharidbiosynthese an. Bei der Patientin M.S. treten neben der freien, nicht eingebauten Mannose mit 490cpm zwei weitere Peakfraktionen mit cpm-Werten von 1400 für den ersten Peak und 820cpm für den zweiten Peak auf. Dieses HPLC-Ergebnis bestätigte das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie für die kurzkettigen LLOs der Patientin M.S., in der ebenfalls die Akkumulation zweier sehr früher Intermediate der Dolichol-verknüpften Oligosaccharidsynthese gefunden wurden.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Alfred Peng wurden die mittels HPLC aufgetrennten und nachfolgend isolierten, unbekanntes Peakfraktionen der kurzkettigen Dolichol-verknüpften Oligosaccharide der Patientin M.S. mit PMP gekoppelt und anschließend massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-Analyse untersucht. Hierbei ließen sich die bei der Patientin M.S. akkumulierenden Verbindungen anhand ihrer spezifischen Massen identifizieren. Die hierbei detektierte Masse von 917,2Da entspricht der Masse von $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PMP}_2$. Durch die Addition eines weiteren Mannoserests an $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PMP}_2$ ergibt sich die Verbindung $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PMP}_2$, die eine errechnete Masse von 1079,2Da besitzt. Neben 917,2Da ist auch diese Masse mittels MALDI-TOF detektiert worden. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der kurzkettigen Oligosaccharide der Patientin M.S. deutete zusammen mit den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie und der HPLC-Analyse der kurzkettigen Oligosaccharide daraufhin, daß in den Fibroblasten der Patientin M.S. eine Akkumulation auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2$ auftrat.

4.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Ergebnisse der proteinbiochemischen Untersuchungen deuteten im Fall der Patientin M.S. auf einen frühen Defekt in der N-Glykosylierung von Proteinen hin. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie, der HPLC sowie der massenspektrometrischen Analyse wiesen auf einen partiellen Defekt in der Übertragung von Mannoseresten vom Donorsubstrat Dolichol-Phosphat-Mannose auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und auf $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ hin.

4.3.1 Orthologe zum ALG2-Protein der Hefe

Die frühen Schritte der N-Glykosylierung wurden bisher nur in niederen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Rhizomucor pusillus* untersucht. Die Übertragung der Mannosereste auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ wird in der Bäckerhefe vom ALG2-Protein katalysiert (Jackson et al., 1989), dessen Ortholog in dem Pilz *Rhizomucor pusillus* die entsprechenden Übertragungen der nukleotidaktivierten Zucker katalysiert (Yamazaki et al., 1998).

Zum ALG2-Protein der Hefe (Acc.No.: NP_011450) sind in der Datenbank eine ganze Reihe sequenzhomologer Proteine zu finden, deren Funktion allerdings noch nicht nachgewiesen worden ist. Neben dem bereits erwähnten Pilz *Rhizomucor pusillus* (Acc.No.: BAA34296) lassen sich potentielle hALG2-Proteine auch beim Menschen (Acc.No.: CAC07999; AAH15126), in der Maus (Acc.No.: AK010673), *Schizosaccharomyces pombe* (Acc.No.: NP_595620), *Neurospora crassa* (Acc.No.: CAD21070), *Xanthomonas axonopodis* (Acc.No.: NP_642880) und *campestris* (Acc.No.: NP_637788) oder auch *Caenorhabditis elegans* (Acc.No.: NP_495010) finden. Die Homologie der potentiellen hALG2-Proteine von Mensch und Maus zu *Saccharomyces cerevisiae* beträgt nach der Clustal-Methode 32% (durchgeführt mit Protean, einem Unterprogramm von DNA-Star). *Schizosaccharomyces pombe* sowie *Neurospora crassa* zeigen eine 34%ige und *Rhizomucor pusillus* eine 36%ige Homologie zu der Hefe. Bei den beiden *Xanthomonas*-Stämmen sowie *Caenorhabditis elegans* wird eine 10%ige bzw. 19%ige Homologie berechnet. Ein Alignment von potentiellen ALG2-Proteinen verschiedener Spezies wird in Abb. 13 dargestellt.

Während in der Datenbank für die oben genannten Proteine der einzelnen Spezies nur jeweils ein Protein aufgeführt wird, wird beim Menschen neben einer langen

potentiellen ALG2-Isoform mit einer Länge von 417 Aminosäuren (Acc.No.: CAC07999) eine weitere kurze Isoform beschrieben, die die terminalen 249 Aminosäuren des C-Terminus der langen Isoform umfaßt (Acc.No.: AAH15126). Aufgrund der Homologie der humanen Proteine zum ALG2 der Hefe wird von den Autoren postuliert, daß es sich bei den humanen Proteinen um Orthologe zur Hefe-ALG2-Mannosyltransferase handeln könnte (Babbage, 2000; Isogai und Otsuki, 2002; Strausberg, 2001). Die lange hALG2-Form hat eine Masse von 47097Da, die kurze Isoform eine Masse von 28123Da. Beide hALG2-Isoformen werden von demselben Genlocus auf Chromosom 9q22 kodiert. Die mRNA für die

```

Mensch      MAEE--QGRERDSVPKPSVFLFHPDLGVGGAERLVLDAALALQARGCSVKIHTAHYDPGH 58
Maus        MAEN--LYRARSRVYSPSVFLFHPDMGIGGAERLVLDAALALQYEGCDVKIHTAHYDPNH 58
Sac.cerevisiae MIEK--DKR-----TIAFIHPDLGIGGAERLVDAALGLQQGHSVIITYTSHCDKSH 50
Schizosac.pombe MSQENSVHRSSTKKTIKIAFTHPDLGIGGAERLVDAAVGLQSLGKEVVVPTSHCDKSH 60
*  ::  *      .:  *::*:*:*****:***:.* * . * :*: * * *

Mensch      CFAESR--ELPVRACAGDWLPRGLGWGGRGAAVCAYVRMVFLALYVFLADEEFD--VVVCD 115
Maus        CFIETR--ELSVQCAGDWLPRSLGWGGRGAACISYVRMVFLALYVFLSAGEEERFGWCD 116
Sac.cerevisiae CFEEVKNQQLKVEVYGDFLPT--NFLGRFFIVFATIRQLYLVIQILQKKVNAAYQLIID 108
Schizosac.pombe CFEEIRDGTIKVKVYGDWLP--SIFGRLSIFCSSLRQVYLT--MILLTNYMHFDIIVD 116
** * :  : * . **:* . . * * . : : * :*. : : : : *

Mensch      QVSACIPVFLARRRKKILFYCHFPDLLLLTKRDSFLKRLYRAPIDWIEEYTTGMADCILV 175
Maus        QVSACIPVFKLARRRKRVLFYCHFPDLLLLTQRNSALKKRYRAPIDWIEEYTTGMADRILV 176
Sac.cerevisiae QLSTCIPLLHFSS--ATLMFYCHFPDQLLAQRAGLLKKIYRLLPDLIEQFSVSAADTVVV 167
Schizosac.pombe QLSTCVPLLASQ--MILFYCHFPDKYLAKRGGILKKLYRIPDPTVEAESVRLADRIVV 174
*:*:*:*: : : :***** *:* . *::** *:* :* :. * :**

Mensch      NSQFTAAVFKETFKSLSHIDPDVLYPSLNVTSFDSV---VPEKLDLVPKGGKFLLSI 231
Maus        NSQYTASVFKETFKTLSHRNPVLYPSLNIIGSPDLA---IPEKIDDLVPKGGKQFLFLSI 232
Sac.cerevisiae NSNFTKNTFFHQTFKYLSN--DPDVIYPCVDLSTIEIED---IDKFFKTVFNEGDRFYLSI 223
Schizosac.pombe NSKFTASVFKKAFKIRK--PLRIVHPCVDIEAASKPLEFQLEPKILYLRYSQRK--LLISV 232
**:* . *:*:* : : : :*: : : : . : : * : . . : : *

Mensch      NRYERKKNLTLALEALVQLRGLTSDQWERVHLIVAGGYDERVLENVEHYQELKMMVQQ- 290
Maus        NRYERKKNLPLALRSLVQLRNLRLPSQEWKVLHFMAGGYDDRIPENVEHYKELKMMVQE- 291
Sac.cerevisiae NRFEKKDVALAIKAFALSEDQIN---DNVKLVI CGGYDERVAENVEYLKELQSLADEY 279
Schizosac.pombe NRFERKDIRLAIDAFSALR--DLSANRPPEYLLVAGGYDIRVSENRRYKELQEFCEQK 291
**:*:*:*: ** : : . : : . * : .***** * : * : : * : : : :

Mensch      -----SDLGQYVT-----FLRSFSDKQKISLLHSCTCVLYTPSNEHFGI 329
Maus        -----SDLERHVT-----FLRSFSDRQKISLLHGCLCVLYTPSNEHFGI 330
Sac.cerevisiae ELSHTTIYYQEIKRVSDESFKTNNSKI IPLTSSSLKELLELERTMLLYTPAYEHFGI 339
Schizosac.pombe DLSYTTVKDN---WDNITVAPSTN--VLFLLSVPSKVRDALISSRILLYTPENEHFGI 345
.: : : : : * : . . . . : * : :***** *****

Mensch      VPLEAMYMQCPVIAVNNGGPLESIDHSVTG-----FLCEPDPVHFSEAIKFIKREP- 380
Maus        VPLEAMYMQCPVIAVNNGGPLESIVHKVTG-----FLCEPDPVHFSEAMEKFIHKP- 381
Sac.cerevisiae VPLEAMKLGKPVLAVNNGGPLETIKSYVGENESSATGWLKPAVPIQWATAIDESRKILQ 399
Schizosac.pombe VPLEAMLKRVPLAQTNNGPLETVIDGKNG-----WLRPRDAKIWNVIYEATTSTT 397
***** *:* . *****: * * : * : : : :

Mensch      SLKATMGLAGRARVKEKFSPEAFTEQLYRYVTKLLV----- 416
Maus        SLKATMGLAGKARVAEKFSADAFADQLYQYVTKLV----- 416
Sac.cerevisiae NGSVNFERNGLRVKKYFSREAMTQSFEENVEKVIWKEK--KYYPWEIFGISFSNFILHM 457
Schizosac.pombe YDTAAMGEAGSEWVKNEFSTDAMARKFESEIMSGIRSITPEKRLMRRVNGLLAVFVLFML 457
. . : * * : * * : * : : : : : :

Mensch      -----
Maus        -----
Sac.cerevisiae AFIKILPNNPWFPLMATFMVLYFKNYLWGIYW-AFVVALSYPYEEI----- 503
Schizosac.pombe FWGTCTIAATVPFAIKLYFAQTYSSVKLGFMLGTCIVSVSFLFTTYAKLTNL 511

```

ABB.13: Protein-Alignment von ALG2-Proteinen versch. Spezies

Die Proteinsequenzen von ALG2 des Menschen (in der langen Form), der Maus, der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und von *Schizosaccharomyces pombe* wurden nach der Clustal-Methode miteinander verglichen (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

lange Form hat eine Länge von 1835bp (Acc.No.: AK027417). Die mRNA für die kurze Isoform hat dagegen eine Länge von 2203bp (Acc.No.: AK027814). Der für das lange hALG2-Protein kodierende Bereich der *halg2*-cDNA hat eine Länge von 1251bp. Das *halg2*-Gen für die lange Isoform umfaßt einen Bereich vom Start- bis zum Stop-Codon von 3960bp und besteht aus zwei Exons und einem dazwischen liegenden 2710bp-Intron. Das erste Exon hat einen kodierenden Bereich von 348bp und das zweite Exon von 903bp. Über die zum Gen gehörenden 5'- sowie 3'-untranslatierten Bereiche lassen sich nur Vermutungen anstellen. Das Computerprogramm 'CBS Promotor 2.0' (www.cbs.dtu.dk/services/promotor) ist durch Sequenzvergleiche eines zu überprüfenden Gens mit in seiner Datenbank gespeicherten Genen in der Lage, Transkriptionsstartpunkte vorherzusagen. Für das *halg2*-Gen wurde der Startpunkt der Transkription, ausgehend vom Start-Codon der langen Isoform, auf genomischer Ebene auf -76bp vorhergesagt.

Der kodierende Bereich der cDNA für die kurze Isoform von hALG2 mit 249 Aminosäuren hat eine Größe von 747bp, wobei das Start-Codon an Position nt502-504 des kodierenden Bereichs der langen Isoform liegt. Auffällig ist, daß der 5'-untranslatierte Bereich für die kurze Isoform im Intron zwischen den beiden Exons für die lange Isoform beginnt. Beide Isoformen verwenden das gleiche Stop-Codon, weiterhin ist der 3'-UTR-Bereich bei beiden Isoformen identisch. Der Transkriptionsstart für die kurze Isoform wurde von dem 'CBS Promotor 2.0-Programm' auf -1326nt ausgehend vom Start-Codon der kurzen Isoform vorhergesagt.

4.3.2 Überprüfung des humanen *alg2*-Locus' durch Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob ein Defekt in dem für das humane ALG2-Protein kodierenden Genlocus die Ursache für eine verminderte Übertragung des zweiten und dritten Mannoserests bei der Patientin M.S. sein könnte, wurde die mRNA für die lange Isoform von hALG2 der Patientin M.S., deren Eltern sowie von Kontrollen mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung untersucht. Die reverse Transkription wurde mit Primer R1 und die zwei PCR-Runden zur Amplifikation der hierbei synthetisierten cDNA mit Primern F1/ R1 und F2/ R2 durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte mit einer Größe von 1313 bp wurden nach Gelextraktion mit den Primern F2, R2, Ex1-O und Ex2-L sequenziert.

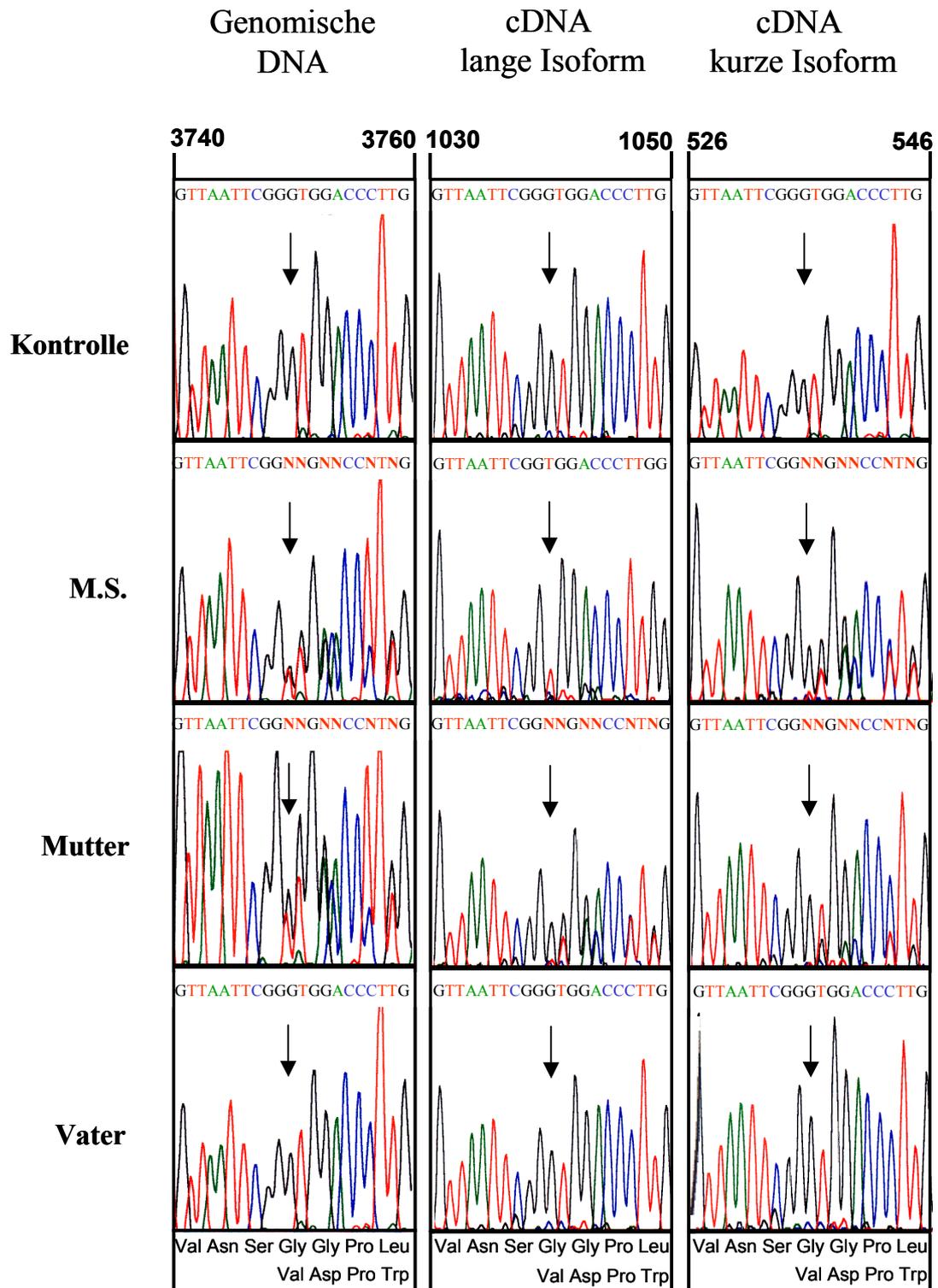


Abb.14 Identifizierung der Deletionsmutation ($\Delta 1040G/\Delta 536G$) bei Patientin M.S., die zu dem Verlust der terminalen 70 Aminosäuren in beiden hALG2-Isoformen führt.

Dargestellt sind Sequenzvergleiche der cDNAs der kurzen und langen Isoform sowie der genomischen DNA von Patientin M.S., deren Eltern und einer Kontrolle. Die hier dargestellte Kontrolle steht repräsentativ für zehn untersuchte Kontrollpersonen. Der Pfeil weist auf den Mutationsbereich hin. Die Zahlen über den jeweiligen Sequenzen geben den Ort der Mutation im Gen bzw. den beiden

cDNAs an, wobei sie sich bei der genomischen DNA sowie der cDNA für die lange Isoform auf das Startcodon der langen Isoform beziehen. Bei der cDNA der kurzen Isoform beziehen sie sich auf das Startcodon der kurzen Isoform.

In der cDNA für die lange Isoform zeigte sich bei der Patientin der Verlust der Base Guanin an Position 1040bp ($\Delta 1040G$). Die Mutter zeigte an gleicher Nukleotidposition eine Überlagerung in ihrer Sequenz, was auf die Deletionsmutation auf einem ihrer beiden Allele hindeutete. Der Vater und die Kontrollen zeigten die WT-Sequenz für *halg2*. Um Aufschluß darüber zu gewinnen, inwieweit auch die kurze Isoform des hALG2-Proteins der Patientin von der Deletionsmutation betroffen ist, wurde die cDNA für die kurze Isoform ebenfalls mittels RT-PCR und Sequenzierung überprüft. Aufgrund eines unterschiedlichen 5'-untranslatierten Bereichs von beiden Isoformen war es möglich, spezifisch die kurze *halg2*-Isoform durch RT-PCR zu amplifizieren. Als Primer in der reversen Transkription wurde der an beide mRNA-Formen bindende Primer R1 eingesetzt, so daß hier zunächst die cDNAs für beide Isoformen synthetisiert wurden. Die spezifische Amplifikation der kurzen *halg2*-Isoform erfolgte dann während der sich anschließenden zwei PCR-Runden mit den Primerpaaren Genom-ForwA/R1 in der ersten und Genom-ForwB/R2 in der zweiten PCR-Runde. Die 1356bp-langen PCR-Produkte wurden mit Primer Ex2-L sequenziert. Der Vater wies -wie die Kontrollen- die Wildtyp-Sequenz für *halg2* auf. Bei Patientin M.S. konnte ebenso wie bei der Mutter eine Überlagerung in der cDNA-Sequenz für die kurze Isoform aufgrund des Verlustes einer Guaninbase an Position 536 ($\Delta 536G$) detektiert werden. Guanin 536 in der kurzen Isoform entspricht Guanin 1040 in der langen Isoform. Dies zeigte das Vorliegen der gleichen Basendeletion in dem für beide hALG2-Isoformen kodierenden *halg2*-Gen hin. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird, wenn von der Deletionsmutation in den cDNAs beider Isoformen die Rede ist, folgende Benennung eingeführt: $\Delta 1040G/\Delta 536G$ (Mutation in der langen Isoform/ Mutation in der kurzen Isoform). Das Ergebnis der Sequenzierung der cDNA der kurzen Isoform, in dem zum einen ein WT-Transkript und zum anderen ein mutiertes Transkript erhalten wurden, stand im Widerspruch zu den erhaltenen Daten für die lange Isoform der Patientin, bei der die $\Delta 1040G$ -Mutation scheinbar in beiden Transkripten bei der Patientin M.S. detektiert worden war.

Die Analyse der genomischen DNA für das betroffene Gen der Patientin, ihrer Eltern und der Kontrollpersonen sollte Aufschluß über das Vorliegen der Deletionsmutation

in homo- oder heterozygoten Zustand bringen. Durch PCR erfolgte die Amplifikation des Genabschnitts, in dem die Mutation bei der Patientin gefunden worden war. Hierzu wurden zwei PCR-Runden mit den Primern Intron 1/R1 und den „nested“ Primern Intron 2/R2 gefahren. Die 976bp-langen PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung mit Primer Ex2-L analysiert.

Die Sequenzierung der genomischen PCR-Produkte zeigte bei der Mutter den erwarteten heterozygoten Zustand des bereits zuvor in den cDNAs für beide Isoformen detektierten Basenverlusts, was bewies, daß die $\Delta 1040G/\Delta 536G$ -Mutation der Patientin M.S. vom maternalen Allel stammte. Der Vater sowie die Kontrollen zeigten keine Veränderung in ihrer genomischen Sequenz, wodurch auch das Ergebnis ihrer cDNA-Sequenzierungen bestätigt wurde. Bei der Patientin wurde –wie bei der Mutter– eine Überlagerung in ihrer Sequenz detektiert, was auf den Verlust der Base Guanin auf nur einem ihrer Allele hinwies. Damit konnte zum einen das Ergebnis der cDNA-Sequenzierung von der kurzen Isoform der Patientin M.S. bestätigt werden. Zum anderen bewies es, daß bei der Patientin M.S. beide Allele für die kurze Isoform abgelesen und ein WT-Transkript vom paternalen Allel sowie ein mutiertes Transkript mit der $\Delta 536G$ -Mutation vom maternalen Allel erhalten wurden. Der Widerspruch zwischen den Ergebnissen der cDNA-Sequenzierung für die lange *halg2*-Isoform der Patientin, wobei die $\Delta 1040G$ -Mutation scheinbar in beiden Transkripten vorzuliegen schien, auf der einen Seite und den Daten der Sequenzierung für die kurze Isoform ($\Delta 536G$) und der genomischen DNA, bei der sich diese Mutation in heterozygotem Zustand zeigte, auf der anderen Seite ließ sich durch eine Mutation auf dem vom Vater stammenden Allel erklären, die zu einem instabilen Transkript für die lange Isoform führte.

Der bei der Patientin M.S. detektierte $\Delta 1040G/\Delta 536G$ -Basenverlust liegt im gemeinsamen kodierenden Bereich für die kurze und lange *halg2*-Isoform. Die Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und nachfolgend zu einem vorzeitigen Translationsstop. In der langen Isoform werden die Aminosäuren 347-372, in der kurzen Isoform die Aminosäuren 179-204 durch 26 neue Aminosäuren ersetzt, bevor es durch ein neuentstandenes Stop-Codon zu einem vorzeitigen Translationsstop und nachfolgend zum Verlust der terminalen 44 Aminosäuren im Protein kommt. Durch den Verlust der C-terminalen 70 Aminosäuren gehen für die lange Isoform 17% und für die kurze Isoform 28% der WT-Proteinsequenz verloren,

wovon auch die putative Dolichol-Bindungsstelle am C-Terminus beider hALG2-Isoformen betroffen wäre (siehe auch Abb. 15).

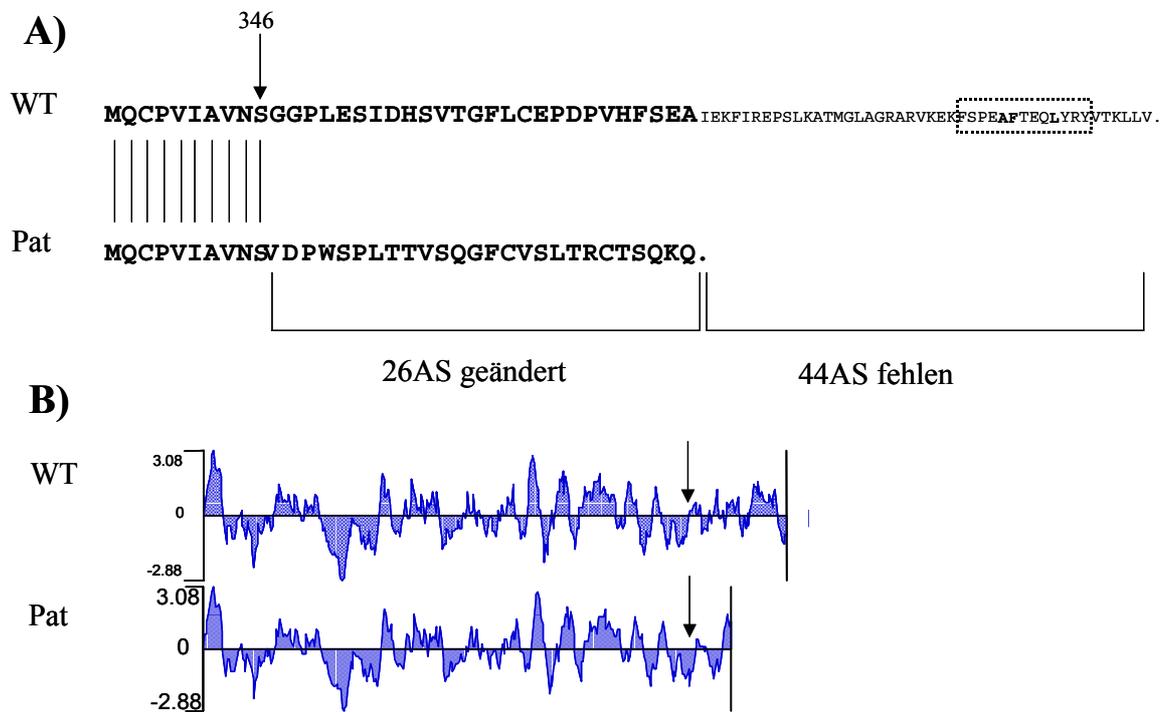


Abb. 15: Partielles hALG2-Alignment und Hydrophilizitätsplot nach Kyte-Doolittle von WT-hALG2 und mutiertem hALG2

A) Dargestellt ist ein partielles Alignment der Proteinsequenzen der langen Isoform des Wildtyp- und des Patienten-Proteins am C-Terminus. Der Pfeil an Aminosäureposition 346 weist auf den Beginn der veränderten Aminosäuresequenz in Folge der $\Delta 1040G$ -Mutation hin, wobei kursive Schrift die vertauschten 26 Aminosäurereste bei der Patientin M.S. anzeigt. Die C-terminalen 44 Aminosäurereste fehlen dem hALG2 der Patientin vollständig. Eine mögliche Dolichol-Bindungsstelle am C-Terminus des WT-hALG2 ist durch Kasten und fettgedruckte Buchstaben hervorgehoben.

B) Gezeigt ist ein Hydrophilizitätsplot nach Kyte-Doolittle, wobei dem langen WT-hALG2-Protein das mutierte hALG2-Protein von M.S. gegenüber gestellt ist. Die Pfeile weisen auf den Aminosäurerest Serin 346 im WT- bzw. Patienten-Protein hin.

4.3.3 Identifizierung einer Mutation auf dem paternalen Allel

Um die Mutation zu identifizieren, die vom Vater an die Tochter weitergegeben wurde und die für ein instabiles Transkript verantwortlich ist, wurde das *halg2*-Gen der Patientin, deren Eltern sowie von Kontrollen sequenziert. Hierbei wurde der Bereich 400bp stromaufwärts des vom 'CBS Promotor 2.0-Programm' vorhergesagten Transkriptionsstarts für die lange Isoform bis zum Stop-Codon für beide Isoformen

überprüft. Dabei wurde ein Bereich von 4437bp abgedeckt. Nach der oben beschriebenen Methode wurden zunächst spezifische Genbereiche durch PCR amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend sequenziert.

Die Kombinationen der verschiedenen Primer für die PCRs, die Größe der entstandenen PCR-Produkte nach der zweiten PCR-Runde sowie die verwendeten Primer zur Sequenzierung sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Primerkombinationen für die PCR mit genomischer DNA, Größe der entstandenen PCR-Fragmente und verwendete Sequenzierungsprimer

Primerkombination 1. PCR-Runde	Primerkombination 2. PCR-Runde	Größe des 2. PCR-Produktes	Sequenzierungs- primer
Intron J/ Ex1-O-rev	Intron K/ Ex1-N-rev	799 bp	Intron K; F1
Ex1-P/ Intron E	Ex1-N/ Intron E	688 bp	Ex1-P
Intron D/ Intron F-rev	Intron D/ Intron F-rev	1085 bp	Intron D; Intron M
Intron A/ Ex2-H-rev	Intron B/ Ex2-H-rev	1596 bp	Intron B; Genom-Fow-A; Ex2-H
Genom-Fw-A/ R1	Genom-Fw-B/ R2	1356 bp	Intron1; Ex2-H; Ex2-L

Bei der Patientin sowie beim Vater konnte eine Mutation in ihrer genomischen DNA identifiziert werden (Abb.16, linke Spalte), für die beide heterozygot waren und die weder bei der Mutter noch bei den untersuchten 10 Kontrollpersonen detektiert werden konnte. In der Abb. 16 steht die Kontrolle stellvertretend für die anderen 9 untersuchten Kontrollpersonen. Es handelt sich bei der Mutation um einen Basenaustausch einer Guaninbase gegen eine Thyminbase und ist 44bp stromabwärts vom Beginn des zweiten Exons für die lange Isoform (G393T in der cDNA) und 111bp vor dem Start-Codon im 5'-UTR-Bereich für die kurze Isoform gelegen (G-111T in der cDNA). Für den weiteren Verlauf der Arbeit wird die Benennung G393T/G-111T eingeführt, wenn von der gleichen Mutation in den cDNAs beider hALG2-Isoformen die Rede ist. Die G393T-Mutation in der cDNA für die lange Isoform würde zu einem Austausch von Lysin zu Serin an Position 131 im Protein führen (Lys131Ser). In der kurzen Isoform kann sich die gefundene Mutation nicht auf die Proteinsequenz auswirken. Bei Annahme, daß diese vom Vater stammende Mutation zu einem instabilen *halg2*-Transkript für die lange Isoform führt, dürfte sich in der entsprechenden cDNA beim Vater und der Patientin lediglich die

WT-Sequenz von *halg2* finden lassen. Dagegen sollte die G-111T-Mutation im 5'-UTR-Bereich der kurzen Isoform in heterozygotem Zustand detektierbar sein.

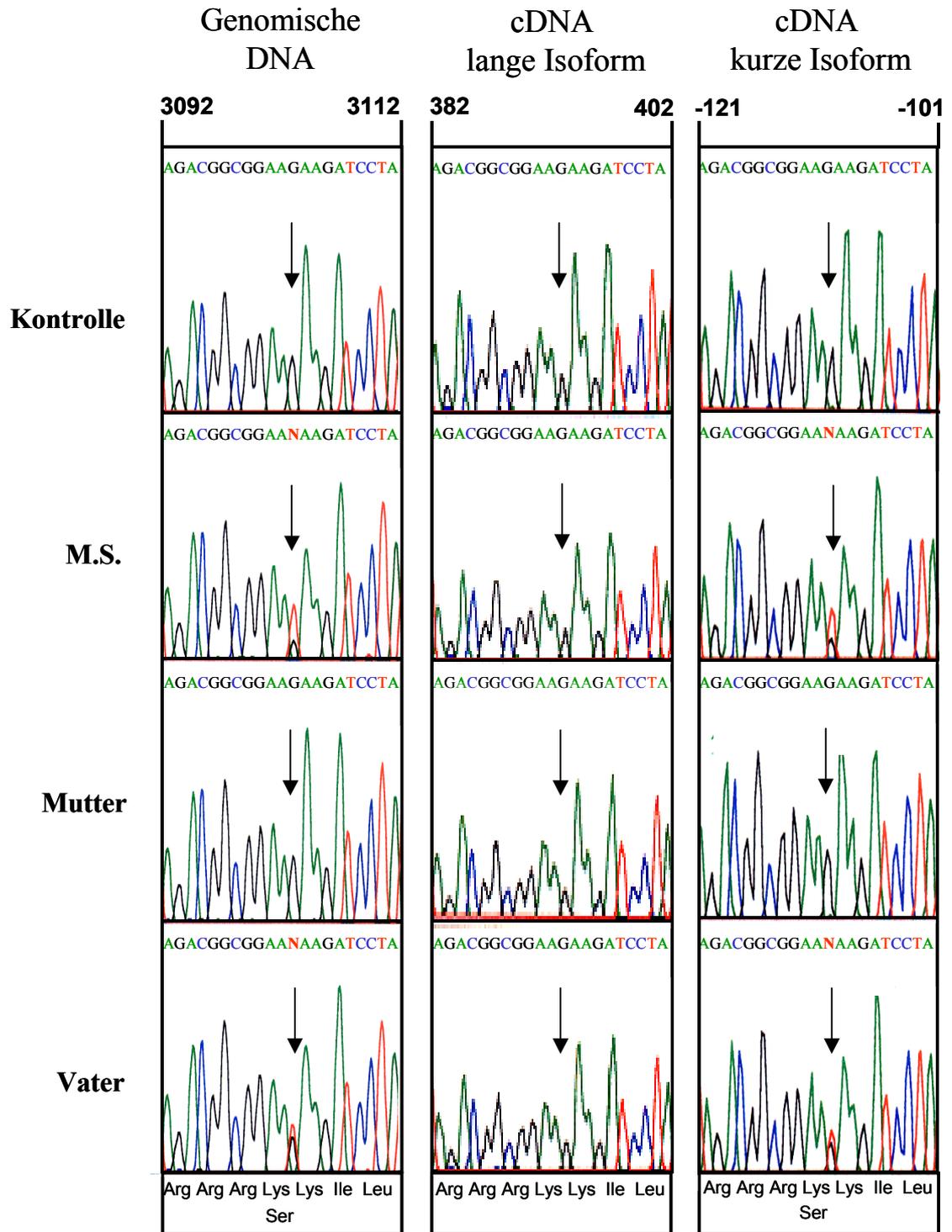


Abb.16 Identifizierung der Mutation G393T/G-111T bei Patientin M.S., die vermutlich zum Verlust des Transkripts für die lange hALG2-Isoform führt.

Dargestellt sind Sequenzvergleiche der cDNAs der kurzen und langen Isoform sowie der genomischen DNA von Patientin M.S., deren Eltern und einer Kontrolle. Die hier dargestellte Kontrolle steht repräsentativ für zehn untersuchte Kontrollpersonen. Der Pfeil weist auf das mutierte Nukleotid

hin. Die Zahlen über den jeweiligen Sequenzen geben den Ort der Mutation im Gen bzw. den beiden cDNAs an, wobei sie sich bei der genomischen DNA sowie der cDNA für die lange Isoform auf das Startcodon der langen Isoform beziehen. Bei der cDNA der kurzen Isoform beziehen sie sich auf das Startcodon der kurzen Isoform.

In der cDNA für die kurze Isoform von Vater und Patientin M.S. zeigte sich die Mutation (G-111T) im 5'-UTR-Bereich, was anhand des Doppelpeaks in der jeweiligen cDNA-Sequenz zu erkennen ist (Abb.16, rechte Spalte). Die Doppelpeaks bei Vater und Patientin wiesen auf das Vorliegen zweier stabiler Transkripte für die kurze *halg2*-Isoform hin. Sequenzvergleiche der genomischen DNA von Vater und Patientin M.S. mit denen der cDNA für die lange Isoform (Abb.16, mittlere Spalte) zeigten, daß sowohl beim Vater als auch bei der Patientin die G393T-Mutation in der cDNA für diese Isoform tatsächlich nicht detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis belegte, daß der Vater ein instabiles Transkript für die lange *hALG2*-Isoform an die Patientin M.S. vererbt hat.

4.3.4 Überprüfung der Expression der langen und kurzen *halg2*-Form mittels Northern Blot

Da die Resultate der cDNA- und genomischen DNA-Analyse auf ein instabiles Transkript für die lange *halg2*-Isoform im Fall der Patientin M.S. hindeuteten, wurde zur Kontrolle der entsprechenden RNA ein Northern Blot durchgeführt. Parallel zu der Patientin M.S. wurden vier Kontrollen überprüft. Neben der Überprüfung der Expression für die lange Isoform wurde gleichzeitig die Expressionshöhe für die kurze Isoform untersucht, um ein eventuell von den Kontrollen abweichendes Herauf- oder Herunterregeln für eine der beiden Isoformen der Patientin zu untersuchen. Um sicherzustellen, daß gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA für den Northern Blot eingesetzt wurden, wurde eine gegen β -Actin spezifische Sonde eingesetzt. Die verwendete *halg2*-Sonde war ein 563bp langes PCR-Fragment (amplifiziert mit Primern Ex2-L und R1) und interagiert sowohl mit dem 3'-Ende des kurzen als auch mit dem 3'-Ende des langen *halg2*-Transkripts. Die β -Actin-Sonde war ein den gesamten kodierenden Bereich umfassendes PCR-Produkt.

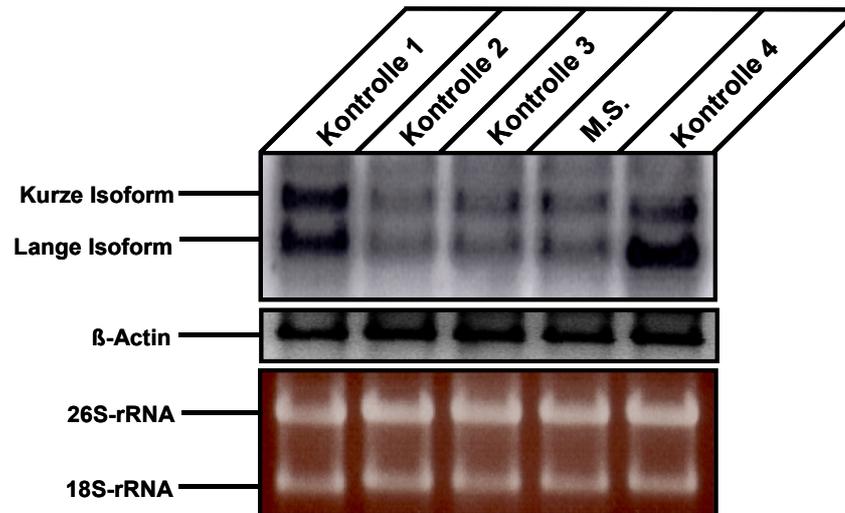


Abb. 17: Northern Blot

Ein Northern Blot mit Gesamt-RNA von Kontrollen und der Patientin M.S. wurde mit einer für beide *halg2*-Transkripte spezifischen PCR-Sonde hybridisiert. Um sicherzustellen, daß gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden, wurde nachfolgend eine Hybridisierung mit einer β -Actin-Sonde durchgeführt.

Der Northern Blot zeigt das Vorliegen beider *halg2*-Isoformen bei der Patientin und den Kontrollen, wobei die mRNA der kurzen Isoform mit 2203bp (Acc.No.: AK027814) länger ist und damit im Agarosegel langsamer läuft als die mRNA der langen Isoform mit 1835bp (Acc.No.: AK027417). Ein Unterschied in der Signalstärke der langen Isoform der Patientin ist verglichen mit den Signalen der langen Isoformen der Kontrollen nicht erkennbar. Auch die Expression für die kurze Isoform zeigt bei der Patientin keine Auffälligkeit gegenüber den Kontrollen. Kontrolle 4 zeigt sogar eine weitaus stärkere Expression für die lange *halg2*-Isoform als die Patientin M.S. (Abb. 17, oben). Weiterhin ist anhand der Bandenstärke für β -Actin (Abb. 17, Mitte) sowie der Bandenstärke der 26S- und 18S-rRNA im Agarosegel (Abb.17, unten) ersichtlich, daß gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA für den Northern Blot eingesetzt wurden. Das Ergebnis zeigt, daß die Konzentration an dem langen *halg2*-Transkript bei der Patientin nicht, wie erwartet, deutlich reduziert war, sondern auf einem mit den Kontrollen vergleichbaren Level gehalten wurde.

4.3.5 Expression der WT-cDNA und der $\Delta 1040G$ -cDNA für die lange hALG2-Isoform in den Hautfibroblasten der Patientin

Die Deletionsmutation, die mit dem maternalen Allel an die Patientin M.S. weitergegeben wurde, wirkt sich sowohl auf die lange wie auch auf die kurze Isoform aus ($\Delta 1040G/\Delta 536G$). Vom paternalen Allel stammt eine Mutation (G393T/G-111T), die wahrscheinlich zu einem instabilen Transkript für die lange Isoform bei der Patientin führt. Um zu überprüfen, ob die $\Delta 1040G/\Delta 536G$ -Mutation für die Unterglykosylierung von Proteinen verantwortlich ist, wurde zum einen die Wildtyp- und zum anderen die $\Delta 1040G$ -cDNA für die lange Isoform in den Hautfibroblasten der Patientin mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems exprimiert. Die mit der Wildtyp-cDNA, der $\Delta 1040G$ -cDNA bzw mit dem pLNCXII-Vektor stabil transfizierten Patientenfibroblasten sowie die mock-transfizierten Kontrollfibroblasten wurden mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose}$ radioaktiv markiert, Dol-P-Man und die kurzen Dolichol-verknüpften Oligosaccharide wurden isoliert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

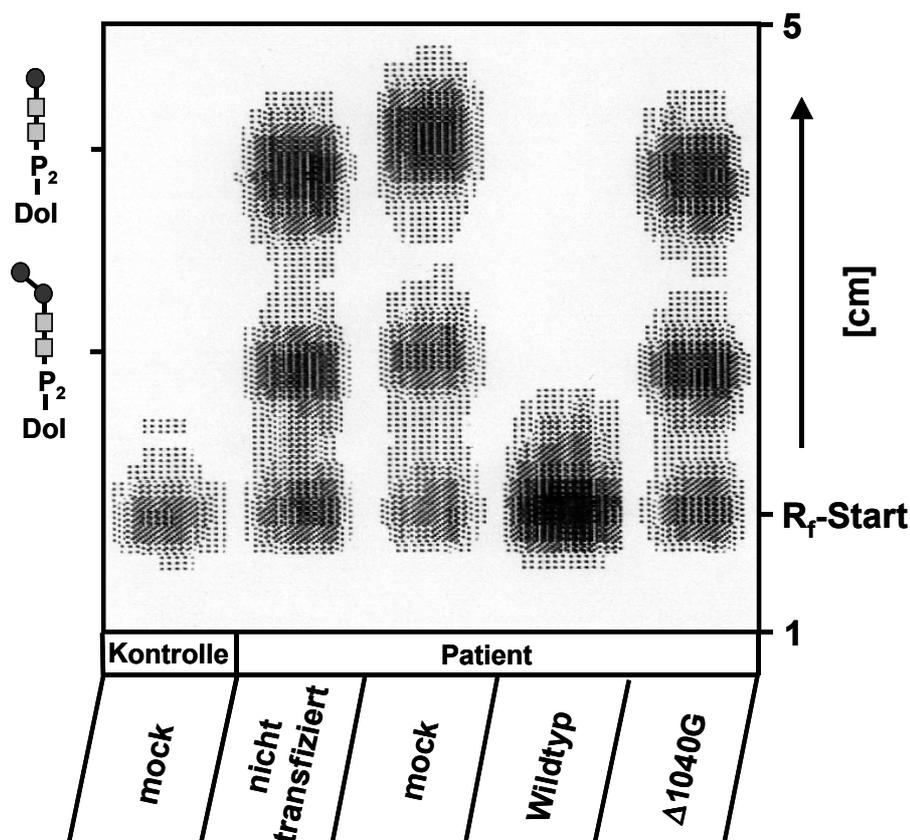


Abb. 18: Komplementation des GDP-Man:Man_{1,2}-GlcNAc₂-PP-Dol Mannosyltransferase Defekts
Aus Fibroblasten einer Kontrolle sowie der Patientin M.S., die den retroviralen Vektor alleine (mock), die Wildtyp- oder die $\Delta 1040G$ -cDNA für die lange hALG2-Isoform exprimierten, wurden

[2-³H]Mannose-markierte, Dolichol-verknüpfte Oligosaccharide isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die mögliche Struktur der Zuckerketten ist links im Bild dargestellt. Quadrate stehen für N-Acetylglucosamin, Kreise stehen für Mannose.

Die mock-transfizierten Kontrollfibroblasten zeigten lediglich einen Spot in der Dünnschichtchromatographie, der für eine Verunreinigung der Probe mit länger-kettigen LLOs bzw. freier [2-³H]Mannose charakteristisch ist, da diese aufgrund des verwendeten Dünnschichtchromatographielaufmittels nicht aufgetrennt werden können. Die unbehandelten sowie die mock-transfizierten Patientenfibroblasten wiesen zwei weitere Spots für [2-³H]Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol sowie [2-³H]Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol auf. Das Auftreten dieser für die Patientin M.S. typischen Spots wurde schon unter 4.2.6 beschrieben. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Transfektion mit dem retroviralen Vektor allein (mock) keine Auswirkungen auf die Glykosylierung von Proteinen hat. Infiziert man Patienten-Fibroblasten mit der Δ 1040G-cDNA, zeigt sich ebenfalls kein Effekt in der Dünnschichtchromatographie im Vergleich zu den nicht-transfizierten bzw. den mock-transfizierten Fibroblasten der Patientin M.S., was darauf hindeutet, daß die cDNA mit der Δ 1040G-Mutation der Patientin für ein inaktives Protein kodiert. Gleiches ist auch für die Δ 536G-Mutation für die kurze Isoform anzunehmen. Bringt man hingegen die *halg2*-WT-cDNA in die Patienten-Fibroblasten ein, so zeigt sich ein Spot in der Dünnschichtchromatographie, der vergleichbar mit der mock-transfizierten Kontrolle ist. Akkumulationen der frühen Zwischenstufen der N-Glykosylierung von Man₁₋₂-GlcNAc₂-PP-Dol (s.o.) treten in den komplementierten Patienten-Fibroblasten nicht mehr auf. Dieses Ergebnis zeigt, daß es sich bei der von der Mutter an die Patientin M.S. weitergegebenen Mutation (Δ 1040G/ Δ 536G) tatsächlich um die Mutation handelt, die auch für die Unterglykosylierung von Protein verantwortlich ist.

4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß bei der Patientin M.S. die Übertragung von Mannose vom Donor GDP-Man auf den Akzeptor Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol bzw. Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol gestört ist. Der Defekt konnte auf Mutationen im für die GDP-Man: Man₁₋₂-GlcNAc₂-PP-Dol Mannosyltransferase (*hALG2*) kodierenden Gen zurückgeführt werden.

5. Diskussion

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine im gesamten Tier- und Pflanzenreich häufig vorkommende Proteinmodifikation. Beim Menschen sind an der N-glykosidischen Verknüpfung von Zuckerketten auf Proteine vermutlich über 300 verschiedene Glykosyltransferase, Glykosidasen und Transportproteine beteiligt. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Anzahl der in den letzten sieben Jahren identifizierten 11 molekularen Ursachen der N-Glykosylierungsdefekte beim Menschen nur die Spitze eines Eisbergs darstellen.

Von den bisher beschriebenen sieben CDG-I-Typen (CDG-Ia bis CDG-Ig) sind die Typen CDG-IId (Körner et al., 1999a) sowie CDG-Ig (Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann et al., 2002) auf die verminderten Aktivitäten von Mannosyltransferasen zurückzuführen, die die Übertragungen von Mannoseresten von GDP-Mannose auf das lipidverknüpfte Vorläuferoligosaccharid im endoplasmatischen Retikulum katalysieren. Im Folgenden wird die Aufklärung eines neuen Mannosyltransferase-Defekts vorgestellt.

5.1 Die Unterglykosylierung von Glykanen der Patientin M.S. basiert auf keinem der bisher bekannten CDG-Typen

Der klinische Phänotyp der Patientin M.S. präsentierte sich mit einer multisystemischen Erkrankung, die mit einer Mikrozephalie, Entwicklungsstörungen, Krampfanfällen und Dysmorphien einherging. Aufgrund der Ergebnisse klinisch-chemischer Untersuchungen, die verlängerte Blutgerinnungszeiten (PTT) und einen stark verminderten Blutgerinnungsfaktor XI-Spiegel zeigten, wie sie bereits für eine Reihe anderer CDG-Typen beschrieben worden waren (z.B. Hanßke et al., 2002 für CDG-IId), wurde eine Analyse des Serumtransferrins der Patientin durchgeführt. Serumtransferrin ist ein eisenbindendes 77kDa Protein an das im Normalfall zwei biantennäre N-Glykanketten vom Komplextyp gebunden sind. Der Verlust der terminalen Sialinsäurereste durch Verkürzung (CDG-IIa, CDG-IId) oder komplettes Fehlen dieser Zuckerketten (CDG-Ia bis CDG-Ig) führt zum einen zum Verlust negativer Ladung und zum anderen zu einer verminderten Masse des Transferrins, die durch isoelektrische Fokussierung bzw. Western Blot nachgewiesen werden können.

Die Analyse des Serum-Transferrins der Patientin M.S. mittels isoelektrischer Fokussierung sowie Western Blot ergab ein im Vergleich zu den Kontrollen verändertes Laufmuster für das Markerprotein. Das Auftreten von asialo-, disialo- und tetrasialo Banden in der IEF, sowie der beobachtete Massenverlust von ca. 2000Da bzw. ca. 4000Da im Western Blot bei der Patientin M.S. deutete auf einen partiellen Verlust eines oder beider N-Glykane (MG eines N-Glykans vom biantennären Komplex-Typ ca. 2000Da) auf ihrem Serum-Transferrin hin, wie er bei Patienten mit CDG-Ia bis CDG-Ig beschrieben wurde (Jaeken et al., 1984; Niehues et al., 1998; Körner et al., 1998c; Körner et al., 1999a; Imbach et al., 2000; Kim et al., 2000; Schenk et al., 2001; Kranz et al., 2001; Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann et al., 2002). Da der partielle Verlust eines oder beider N-Glykane ein Charakteristikum für die Typ I Defekte der CDG darstellt, konnte ein CDG-II Defekt bei der Patientin M.S. somit ausgeschlossen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher überprüft, ob die Patientin M.S. unter einer der bekannten CDG-Typ I Erkrankungen litt.

Bei der enzymatischen Bestimmung der Aktivität der Phosphomannomutase 2 von M.S. zur Überprüfung des am häufigsten vorkommenden CDG-Typs, CDG-Ia, zeigte sich bei der Patientin eine PMM2-Aktivität von 1,53U/mg Protein, die im Vergleich zu den Kontrollen, die über eine gemittelte Aktivität von 0,89mU/mg Protein verfügten, um 71% über der Norm lag. Dieser Wert scheint hier zwar erhöht, er liegt aber im oberen Normbereich für die von unserer Arbeitsgruppe zuvor bestimmten PMM2-Aktivitäten von 55 anderen Kontrollpersonen, bei denen der Bereich der Aktivität von 0,8 bis 1,6 schwankte (Körner et al., 1997-2002, unveröffentlichte Labordaten). Für die Patientin M.S. konnte CDG-Ia als Ursache für ihre Erkrankung ausgeschlossen werden.

Als weiteres konnte CDG-Ib, ein Defekt der Phosphomannose Isomerase (PMI) ausgeschlossen werden. Die Aktivität der PMI von M.S. mit 11,32 mU/mg Protein lag auch hier im Vergleich zu den überprüften Kontrollen, die über eine gemittelte Aktivität von 9,57 mU/mg Protein verfügten, im Normbereich.

Die CDG-Typen Ic, Id, Ie, If und Ig können mit Hilfe der metabolischen Markierung von Hautfibroblasten mit [2-³H]Mannose und anschließender Analyse der Dolichol-verknüpften [2-³H]Oligosaccharide mittels HPLC identifiziert werden, wobei charakteristische Akkumulationen verkürzter Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide

gefunden werden. Eine Akkumulation von $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ deutet auf CDG-Ic (Körner et al., 1998c; Imbach et al., 1998) hin. Eine Anhäufung von $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ läßt auf CDG-Id (Körner et al., 1999a) oder CDG-Ie (Imbach et al., 2000; Kim et al., 2000) schließen, wohingegen bei CDG-If (Schenk et al., 2001; Kranz et al., 2001) eine $\text{Man}_5\text{-}$ sowie eine $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ -Akkumulation erwartet wird. Akkumuliert $\text{Man}_7\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ist das ein Hinweis auf die Erkrankung CDG-Ig (Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann et al., 2002). Da die HPLC-Analyse der $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose-markierten Dolichol-verknüpften Oligosaccharide der Patientin M.S. keine verkürzten Formen aufwies, wie sie für andere CDG-I Typen beschrieben worden waren, konnten neben CDG-Ia und CDG-Ib auch alle anderen bisher bekannten CDG-I-Defekte, CDG-Ic bis CDG-Ig, als molekulare Ursache für die Erkrankung der Patientin M.S. ausgeschlossen werden.

5.2. Die molekulare Ursache der Erkrankung der Patientin M.S. ist auf einen frühen Defekt in der Biosynthese Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide zurückzuführen

Eine mögliche Erklärung für die normale Synthese von Dolichol-verknüpften Oligosacchariden bei gleichzeitigem Verlust kompletter N-Glykanketten auf Glykoproteinen wie im Falle unserer Patientin wäre ein Defekt der Oligosaccharyltransferase (OST), die die Übertragung des Oligosaccharids $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ vom Dolichol-PP Carrier auf naszierende Proteine katalysiert. Dabei dienen Asparaginreste innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/ Thr als Akzeptoren, wobei X für jede Aminosäure mit Ausnahme von Prolin stehen kann (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die Oligosaccharyltransferase wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als ein Enzymkomplex aus neun Untereinheiten (OST1-6, STT3, Wbp1 und Swp1) beschrieben, von denen die vier Untereinheiten OST1, OST2 Wbp1 und Swp1 essentiell zum Überleben sind (Knauer und Lehle, 1999). Da beim Menschen bereits die humanen Orthologe zu diesen vier essentiellen Untereinheiten der Hefe identifiziert werden konnten (Ribophorin I und II, OST48 und DAD1; Fu und Kreibich, 2000) und sich weiterhin in der Datenbank potentielle Orthologe zu den anderen fünf Untereinheiten finden lassen, ist davon auszugehen, daß es auch beim Menschen weitere zum OST-Komplex gehörende Proteine gibt.

Um eine verminderte Übertragung von $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ -Resten vom Dol-PP-Carrier auf naszierende Polypeptide zu untersuchen, wurden metabolisch mit

[2-³H]Mannose markierte, neusynthetisierte Glycoproteine aus Kontroll- und Patientenfibroblasten nach dem Entfernen von kurzkettigen und langkettigen Dolichol-verknüpften ³H-Oligosacchariden mit Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) inkubiert. PNGase F ist ein Enzym aus *Flavobacterium meningosepticum*, das praktisch alle in einem Glykoprotein vorhandenen N-glykosidisch-verknüpften Kohlehydratketten zwischen dem proximalen N-Acetylglucosaminrest und dem Asparaginrest abspaltet, wobei letzteres zu Asparaginsäure modifiziert wird.

Die Auftrennung der aus neusynthetisierten Glykoproteinen durch PNGase F abgespaltenen N-glykosidisch-verknüpften Kohlenhydratketten mittels HPLC zeigte Glc₁-Man₉-GlcNAc₂- sowie Man₉-GlcNAc₂-Peakfraktionen die auf die Aktivitäten der ER-Glucosidasen I und II und somit auf die Übertragung der vollständigen Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-Zuckerkette auf das naszierende Protein durch die OST hinweist (Parodi, 2000). Darüberhinaus zeigte diese Untersuchungen, dass im Falle der Patientin M.S. im Vergleich zu Kontrollen ähnliche Mengen an Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-Resten auf neusynthetisierte Glykoproteine übertragen wurden, was nicht auf eine OST-Defizienz hindeutet.

Gegen einen OST-Defekt bei der Patientin M.S. sprechen außerdem die Erkenntnisse, die durch knock-out- sowie Mutations-Untersuchungen der OST-Komplexe in *Saccharomyces cerevisiae* oder auch der Maus gewonnen wurden. Schaltet man beispielsweise in der Hefe die nicht-essentiellen Untereinheiten OST3 und OST6 oder die essentiellen Untereinheiten OST1 (Silberstein et al., 1995) bzw. WBP1 (te Heesen et al., 1993) durch knock-out aus, so zeigt sich zum einen eine starke Unterglykosylierung auf den untersuchten Glykoproteinen. Zum anderen lassen sich aber in der HPLC-Analyse der LLOs auch Akkumulationen von verschiedenen Intermediaten der N-Glykanbiosynthese von Man₅-GlcNAc₂-PP-Dol bis Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-PP-Dol klar nachweisen, wovon besonders Man₅-GlcNAc₂-PP-Dol und Man₈-GlcNAc₂-PP-Dol stark hervortreten (Knauer und Lehle, 1998).

Neben den Glc₁-Man₉-GlcNAc₂- und Man₉-GlcNAc₂-Resten konnte bei der Patientin M.S. im Vergleich zu Kontrollen in mehreren Experimenten ein zusätzlicher Peak in frühen HPLC-Fraktionen detektiert werden, der daraufhindeutete, dass sehr kurze [2-³H]Mannose-markierte Oligosaccharide wie z.B. Man₁- oder Man₂-GlcNAc₂ auf neusynthetisierte Proteine übertragen werden. Jackson et al. (1989) konnten für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, daß in einer Hefemutante die verkürzten aber nicht glucosylierten Vorläuferoligosaccharide der Man₁- und Man₂-

GlcNAc₂ Form auf Proteine übertragen werden. Man₂- und Man₁-GlcNAc₂ stellen in der Hefe demnach ein Substrat für den OST-Komplex dar. Es bleibt allerdings dahingestellt, wie effektiv die Übertragung dieser verkürzten Zuckerketten ist. Murphy und Spiro konnten 1981 *in vitro* sowie Burda und Aebi 1998 *in vivo* zeigen, daß das vollständige Oligosaccharid Glc₃-Man₉-GlcNAc₂-PP-Dol besonders gut von dem OST-Komplex erkannt wird und daß gerade die terminale, dritte Glucose in α 1,2-Orientierung für eine effektive Übertragung des vollständigen Oligosaccharids auf das naszierende Protein in der Hefe notwendig ist. Übertragen werden können allerdings auch so verkürzte Strukturen wie Man₅GlcNAc₂, Glc₁-Man₅-GlcNAc₂ oder Glc₁-Man₈-GlcNAc₂ (Parodi, 2000). Auch bei CDG-Patienten konnten verkürzte Zuckerketten auf Proteinen detektiert werden, die zuvor von der OST übertragen worden sind. So zeigte sich beispielsweise auf dem Serum-Transferrin des CDG-Ic-Patienten Man₅-GlcNAc₂ und Glc₁-Man₅-GlcNAc₂ (Körner et al., 1999). Hingegen wurde bei den CDG-Ic-Patienten, die Man₉-GlcNAc₂-PP-Dol akkumulieren (Körner et al., 1998c; Imbach et al., 1998), keine Übertragung der verkürzten Oligosaccharide nachgewiesen, was die Bedeutung der Glucosylierung für die Erkennung und anschließende Übertragung des Oligosaccharids durch die OST unterstreicht. Eine Übertragung der stark verkürzten Oligosaccharidstrukturen Man₂-GlcNAc₂ oder Man₁-GlcNAc₂ auf Proteine wie sie bei der Patientin M.S. offenbar stattfindet, konnte bisher beim Menschen noch nicht nachgewiesen werden. Bei der Annahme, daß bei der Patientin M.S. der Defekt in der Übertragung von Mannoseresten vom Donor GDP-Man auf den Akzeptor Man₁- bzw. Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol zu finden ist, könnten die für die Anheftung der drei Glucosereste wichtigen Mannosereste, die in α 1,2-Stellung auf den in α 1,3-verknüpften Mannoserest übertragen werden, nicht angehängt werden, da sie vermutlich keinen entsprechenden Akzeptor für die ER-Glucosyltransferasen ALG6, ALG8 und ALG10 darstellen. Bei der im Falle der Patientin M.S. gefundenen verkürzten Zuckerkette auf dem Protein handelt es sich daher eventuell um einen unspezifischen Transfer durch die OST.

Fraglich ist weiterhin, ob durch so stark verkürzte Strukturen wie Man₂- und Man₁-GlcNAc₂ auf dem Protein überhaupt das Passieren der Qualitätskontrolle (Calnexin/Calreticulin) in der Zelle möglich ist. Hammond et al. (1994) haben postuliert, daß Glykoproteine solange von den Lektinen Calnexin und/ oder Calreticulin im ER festgehalten und glucosyliert sowie deglucosyliert werden, wie sie noch nicht die korrekte Zusammensetzung ihrer Glykanstruktur erhalten haben. Proteine, die sich

nicht korrekt glykosylieren lassen, sollen dann abgebaut werden. Neuere Erkenntnisse stellen diese Vorstellung inzwischen in Frage. So konnte neben *Saccharomyces cerevisiae* (Hong et al., 1996; Jörgensen et al., 1999) auch in Melanoma-Zellen (Petrescu et al., 1997; Branza-Nichita et al., 1999) gezeigt werden, daß auch falsch gefaltete Proteine zu ihren Zielorten transportiert und nicht abgebaut werden.

Im Falle der Patientin M.S. wäre es vorstellbar, daß Teile der N-Glykosylierungsstellen der Glykoproteine mit Man_2 - und $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2$ -Strukturen besetzt sind, die nicht weiter prozessiert werden können. Wenn diese Proteine im Rahmen der Qualitätskontrolle nicht abgebaut und die vollständigen N-Glykane auf den anderen Glykosylierungsstellen normal getrimmt und prozessiert würden, könnte dies das isoelektrische Fokussierungsmuster des Serum-Transferrins der Patientin M.S. erklären, in dem neben der tetrasialo-Bande, die bei gesunden Menschen die Hauptbande darstellt, vor allem disialo und asialo Formen des Transferrins auftreten, die in diesem Fall auf eine starke Verkürzung der N-Glykane zurückzuführen wären.

Durch die auf Proteine übertragenen, verkürzten Zuckerketten, die mit Hilfe des PNGase F Verdaus detektiert worden waren, ergab sich für den weiteren Verlauf der Arbeit die Theorie, daß bei der Patientin ein früher Defekt in der N-Glykan-Biosynthese vorlag, wobei beispielsweise die Übertragung eines der ersten Mannosereste auf das Vorläuferoligosaccharid Man_1 - bzw. $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ betroffen wäre.

Da sich diese Oligosaccharide mit unserer HPLC-Analytik aufgrund der Aufreinigungsmethode nicht detektieren lassen, erfolgte im Weiteren eine Analyse kurzkettiger, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Mannose-markierter, Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in Gegenwart des apolaren Laufmittels Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4). Nach unserer Arbeitshypothese erwarteten wir dabei im Falle der Patientin M.S. neben $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Dol-P-Man}$, dem Mannosendonator im Lumen des ER, auch die Detektion von $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ oder $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Dabei sollte $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ aufgrund der höheren Hydrophobizität ein schnelleres Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie aufweisen als $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Überraschenderweise konnten bei der Patientin M.S. neben dem erwarteten Spot für $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Dol-P-Man}$ im Vergleich zu einer Kontrolle, die Akkumulation von zwei weiteren

Verbindungen gezeigt werden, bei denen es sich um die eben erwähnten radioaktiv markierten Man_1 - sowie $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ -Verbindungen handeln konnte. Neben der zuvor gezeigten Übertragung verkürzter Zuckerketten auf Proteine, deutete auch das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie auf einen frühen Defekt in der Übertragung von Mannoseresten auf das Vorläuferoligosaccharid hin, wobei auch hier die genaue Identifizierung der akkumulierenden Verbindungen nicht möglich war. Anders als im PNGase F-Verdau zeigte sich bei der Dünnschicht-Analyse die Akkumulation von zwei frühen Vorstufen der Dolichol-verknüpften Oligosaccharid Biosynthese. Der Befund, daß bei der HPLC-Analyse der proteinverknüpften Oligosaccharide nur eine Peakfraktion im Bereich der kurzen Oligosaccharidstrukturen detektiert werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, daß eine der beiden in der Dünnschichtchromatographie akkumulierenden Verbindungen kein Substrat für den OST-Komplex darstellt und folglich nicht übertragen wird.

Letzlich konnte nur eine massenspektrometrische Analyse der akkumulierenden Substanzen Aufschluß darüber geben, auf welcher Stufe der Mannoseresteübertragung von GDP-Man auf das Vorläuferoligosaccharid der Transfer zum Erliegen kommt. Zur Vorbereitung auf die Massenspektrometrie wurden die bei der Patientin M.S. akkumulierenden kurzkettigen, $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose}$ -markierten, Dolichol-verknüpften Oligosaccharide mit Hilfe der mildsauren Hydrolyse vom Lipidcarrier abgespalten und über HPLC aufgetrennt, wobei drei frühe Peakfraktionen detektiert werden konnten. Bei der ersten dieser Peakfraktionen, die bei Kontrolle und Patient gefunden wurde, handelt es wahrscheinlich um freie $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose}$, während es sich bei den beiden zusätzlichen Peakfraktionen im Falle der Patientin M.S. um Man_1 - und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2$ -Reste handeln konnte. Die Analyse dieser beiden Peaks erfolgte nach Kopplung an PMP durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF) und ergab Molekulargewichte von 917Da bzw. 1075Da, die der Masse von Man_1 - bzw. $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-PMP}$ entsprachen. Dieses Resultat deutete daraufhin, daß bei der Patientin M.S. tatsächlich ein früher Defekt in der N-Glykosylierung von Proteinen vorlag, bei dem die Übertragung von Mannoseresten vom Donor GDP-Man auf die Vorläuferoligosaccharide Man_1 - bzw. $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ betroffen war.

Die Biosynthese der lipidverknüpften N-Glykane ist ein geordneter Prozeß, in dem die einzelnen Zuckerreste in einer bestimmten Reihenfolge auf das wachsende

Oligosaccharid übertragen werden (Hubbard und Ivatt, 1981; Kornfeld und Kornfeld, 1985). Hierbei wird der erste Mannoserest in β 1,4-Orientierung an GlcNAc₂-PP-Dol angehängt. Anschließend erfolgt die Übertragung des zweiten Mannosrestes in α 1,6-Stellung und des dritten Mannoserestes in α 1,3-Stellung auf den ersten Mannoserest (Parodi, 2000).

5.3 Die Überprüfung des humanen Orthologs zum Hefe *alg2*-Gen der Patientin M.S. zeigte zwei Mutationen

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* katalysiert das ALG2-Protein (Acc.No.: NP_011450) die Übertragung des zweiten und dritten Mannoserests vom Donor GDP-Man auf das Vorläuferoligosaccharid Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol und Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol. Bei einer Hefemutante, die über Mutationen im *alg2*-Gen verfügte, traten Akkumulationen von Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol sowie Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol auf (Huffacker und Robbins, 1983). Entsprechende Akkumulationen konnten auch bei einer Mutante des Pilzes *Rhizomucor pusillus* gezeigt werden, in dem das Ortholog zum Hefe-ALG2-Protein mutiert war (Yamazaki et al., 1998). Für die Hefe konnte weiterhin belegt werden, daß diese verkürzten, nicht glycosylierten Zuckerketten auch auf Proteine übertragen werden (Jackson et al., 1989).

Dies deutete auf einen Defekt der Patientin M.S. in dem humanen Ortholog zum Hefe ALG2-Protein hin. In der Datenbank waren für den Menschen zwei potentielle Orthologe zum Hefe-ALG2-Protein aufgeführt, deren Funktion allerdings noch nicht bestimmt worden war. Es handelte sich hierbei um eine lange ALG2-Isoform mit einer Länge von 417 Aminosäuren (Acc.No.: CAC07999) sowie eine kurze Isoform mit einer Länge von 249 Aminosäuren, die mit dem C-Terminus der langen Isoform identisch war (Acc.No.: AAH15126). Weiterhin ließen sich die Sequenzen der mRNAs für die lange Isoform (Acc.No.: AK027417) und die kurze Isoform (Acc.No.: AK027814) aus der Datenbank entnehmen. Beide Isoformen werden vom gleichen Genlocus auf Chromosom 9q22 kodiert.

Sequenzüberprüfungen des *alg2*-Genlocus ergaben, daß die Patientin M.S. auf ihrem maternalen Allel eine Mutation trägt, die in dem gemeinsamen C-terminalen Bereich der kurzen (Δ 536G) und langen ALG2-Isoform (Δ 1040G) liegt. Diese Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und nachfolgend zu einem vorzeitigen Translationsstop, wodurch jeweils die terminalen 70 Aminosäurereste beider Isoformen verloren gehen. Bei der langen Isoform mit 417 Aminosäuren

entspricht dieser Verlust 17% am Wildtypprotein, wohingegen bei der kurzen Isoform 28% der WT-Proteinsequenz verloren gehen. Für beide mutierten Isoformen gilt, daß 19 geladene Aminosäurereste (R, K, H, Y, C, D, E), 18 hydrophobe Aminosäurereste (A, I, L, F, W, V), neun saure Aminosäurereste (D, E) und sieben basische Aminosäurereste (K, R) durch die Verschiebung des Offenen Leserahmens verloren gehen. Bei der langen Isoform der Patientin M.S. wirkt sich der Aminosäureverlust dahingehend aus, daß das ALG2-Protein statt einer Masse von 47097Da nur 42126Da zeigt. Gravierender erscheint, daß sich auch der isoelektrische Punkt des Proteins der Patientin von pH 6,89 auf pH 7,26 verschiebt und sich letztlich auch die Ladung des Proteins von -0,58 (bei pH 7,0) auf +1,04 (bei pH 7,0) ändert. Bei der kurzen Isoform vermindert sich im Falle des ALG2-Proteins der Patientin M.S. die Masse von 28123Da auf 23152Da. Der isoelektrische Punkt verschiebt sich von pH 6,45 auf pH 6,83 für das mutierte Protein. Die Ladung des WT-ALG2 bei pH 7,0 beträgt -2,05. Das verkürzte Protein der Patientin hat bei pH 7,0 eine Ladung von -0,43 (Daten errechnet mit Protean, einem Unterprogramm von DNA-Star). Es erscheint fraglich, ob ein Protein, dem 17% bzw. 28% an der WT-Sequenz der jeweiligen ALG2-Isoform fehlen, was auch zum Verlust von vier der potentiellen 16 Phosphorylierungsseiten führt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), überhaupt noch katalytisch aktiv sein kann. Hinzu kommt weiterhin, daß den mutierten ALG2-Proteinen der Patientin M.S. die putative Dolichol-Bindungsstelle fehlt (siehe Abb. 15), die sich innerhalb der letzten 20 Aminosäurereste des humanen Proteins befindet. Die in der Literatur vorgeschlagenen Consensussequenzen der Bindungsstellen für *Saccharomyces cerevisiae* sind zum einen LFVxFxxIPxFY, wobei x hier für jede Aminosäure stehen kann (Albright et al., 1989). Zum anderen wird die Sequenz ILFIxFXXIabxF, wobei a entweder P und b F bzw. Y ist, oder a aber I oder L und b für die Aminosäure P steht, beschrieben (Jackson et al., 1993). Die Dolichol-Bindungsstelle des humanen ALG2-Proteins weist drei übereinstimmende Aminosäurereste mit der zuletzt genannten Hefe-Sequenz aus 13 Aminosäureresten auf (XXX-FSPE**A**FTEQ**L**YRY-XXX, übereinstimmende AS hier fett und unterstrichen). Da der Konservierungsgrad von Hefeproteinen zu den humanen Orthologen aber maximal 30% beträgt, wäre eine stärkere Übereinstimmung auch unwahrscheinlich. In höheren Organismen ist bisher noch keine alternative Consensussequenz für die Dolichol-Bindungsstelle beschrieben worden.

Durch eine ALG2-Hefemutante, in der die Aminosäuren 377Gly und 386Gln gegen Arg bzw. Lys ausgetauscht waren, konnte gezeigt werden, daß diese beiden Veränderungen in der Aminosäuresequenz bereits ausreichten, um zu den erwähnten Akkumulationen von Man₁-GlcNAc₂-PP-Dol und Man₂-GlcNAc₂-PP-Dol in der Hefe zu führen (Jackson et al., 1993). In ALG2-Mutanten des Pilzes *Rhizomucor pusillus* zeigten sich ebenfalls die bei der Hefe auftretenden kurzkettigen, lipidverknüpften Oligosaccharide, obwohl auch hier nur einzelne Aminosäuren entsprechend zu der Hefemutante ausgetauscht worden sind. Bei der Patientin M.S. muß dies letztlich zu der Annahme führen, daß bei einem Verlust von 70 Aminosäuren die beiden ALG2-Isoformen, die vom maternalen Allel kodiert werden, biochemisch inaktiv sein müssen.

Auf dem paternalen Allel konnte bei der Patientin M.S. eine Mutation identifiziert werden, die in der langen Isoform zum Austausch von Lysin131 zu Serin führen würde. Da sich der entsprechende Basenaustausch G353T weder bei der Patientin noch bei dem Vater in der für die lange Isoform kodierenden cDNA identifizieren ließ, führte das zu der Annahme, daß das vom paternalen Allel kodierte Transkript für die lange Isoform instabil sein mußte. In diese Richtung gehend war auch die Beobachtung, daß sich die gleiche Mutation bei Vater und Patientin in heterozygoter Form im 5'-UTR-Bereich der cDNA (G-111T) für die kurze Isoform detektieren ließ, was bedeutete, daß hier sowohl das paternale als auch das maternale Allel abgelesen und stabile Transkripte synthetisiert worden sind. Es bleibt zu klären, ob es sich bei der auf dem paternalen Allel identifizierten Mutation (G353T/ G-111T) tatsächlich um die Mutation handelt, die auch zu der Instabilität der mRNA für die lange Isoform führt. Die Literatur besagt dazu, daß bereits eine einzelne Basenmutation im Exonbereich eines Gens ausreicht, um Transkripte instabil werden oder gar nicht erst entstehen zu lassen (so u.a. Mendell und Dietz, 2001). Die Annahme, daß der Patientin M.S. das vom paternalen Allel kodierte lange *alg2*-Transkript fehlt, ließ vermuten, daß sich im Northern Blot für *alg2* Auffälligkeiten in Bezug auf die Expression der beiden Isoformen von M.S. erkennen ließen. Erwartet wurde hier, daß die Patientin etwa 50% weniger Transkript für die lange Isoform aufzuweisen hatte als die Kontrollen. Dies war nicht der Fall. Vielmehr zeigte der Northern Blot, daß keinerlei Unterschiede in der Expression der beiden untersuchten Isoformen der Patientin im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden waren. Erklärbar ist das allein durch eine erhöhte Transkription der mRNA für die lange Isoform, die

vom maternalen Allel abgelesen wird. Wäre dagegen die Transkription des paternalen *alg2*-Locus erhöht worden, hätte sich im Laufe der zahlreichen Sequenzierungen der cDNA für die lange Isoform zumindest in einigen Fällen das WT-Transkript neben dem mutierten $\Delta 1040G$ -Transkript zeigen müssen. Dies ist jedoch nicht eingetreten.

5.4 Die Expression der WT-cDNA für die lange hALG2-Isoform in den Patientenfibroblasten führte zur Normalisierung des Glykosylierungsmusters

Durch die retrovirale Expression der WT-cDNA für die lange hALG2-Isoform in den Patientenfibroblasten konnte eine Normalisierung des Glykosylierungsmusters der Dolichol-verknüpften Oligosaccharide herbeigeführt werden. Dieser Befund zeigte, daß es sich bei dem putativen hALG2-Protein des Menschen tatsächlich um das Ortholog zum Hefe ALG2 handelte. Weiterhin konnte durch die Expression der mutierten cDNA ($\Delta 1040G$) für die lange Isoform des hALG2 in den Patientenfibroblasten keine Normalisierung des Glykosylierungsmusters der LLOs erzielt werden, was darauf hindeutet, daß es sich bei den mutierten hALG2-Proteinen, die vom maternalen Allel kodiert werden, höchstwahrscheinlich um inaktive Proteine handelt. Mit diesem Ergebnis konnte die molekulare Ursache für die Erkrankung der Patientin M.S. als Defekt des hALG2 funktionell belegt werden. Somit stellt die Erkrankung einen neuen CDG-Typ, CDG-Ih, dar.

Für die Patientin M.S. bedeuten alle erhaltenen Ergebnisse zusammengenommen, daß sie aufgrund der von den Eltern vererbten Mutationen wahrscheinlich keine biochemisch-aktive lange ALG2-Isoform besitzt, da vom Vater ein instabiles Transkript und von der Mutter eine mutierte und inaktive Form weitergegeben wurde. In Bezug auf die kurze ALG2-Isoform der Patientin M.S. ist zu sagen, daß sie aufgrund der Mutation, die vom maternalen Allel stammt, ebenfalls ein inaktives Protein für die kurze Isoform synthetisiert. Die kurze Isoform, die vom paternalen Allel kodiert wird, sollte dagegen vollständig aktiv sein.

Durch den wahrscheinlich kompletten Ausfall der langen und den partiellen Ausfall der kurzen hALG2-Isoform kommt es im Falle der Patientin M.S. zur Akkumulationen von $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, was vermutlich zu einer verminderten Bereitstellung von $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ für die N-Glykan-Biosynthese im ER und damit zu einer Unterglykosylierung von Glykoproteinen führt. Unser Befund, dass die Menge an $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ in

Patientenfibroblasten im Vergleich zu Kontrollen relativ normal ist, läßt sich entweder durch eine Restaktivität der mutierten hALG2 oder die Aktivität der einen verbleibenden normalen kurzen hALG2 Isoform erklären. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass in anderen Organen mit hoher Glykoproteinbiosyntheserate, wie etwa der Leber, die Bereitstellung von $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ nicht ausreichend ist.

Eine weitere Möglichkeit für die pathologischen Effekte von CDG-Ih ist eine mögliche Toxizität des akkumulierenden $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, über die in der Literatur allerdings bisher nichts beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das humane ALG2-Protein sowohl die Übertragung des zweiten Mannoserestes auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ als auch die Übertragung des dritten Mannoserestes auf $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ katalysiert. Bisher war nur vom ALG9-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, daß zum einen die Übertragung von Mannoseresten von Dol-P-Man auf $\text{Man}_6\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ sowie auf $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ katalysiert, bekannt, daß das gleiche Enzym zwei Übertragungsschritte in der Biosynthese von N-Glykanen katalysiert (Cipollo und Trimble, 2000). Im Gegensatz zu ALG2 wurde hier allerdings nur eine einzige Form von ALG9 beschrieben. Weiterhin muß erwähnt werden, daß die Mannosereste, die von ALG9 übertragen werden, beide in $\alpha 1,2$ -Orientierung angehängt werden, wohingegen im Falle von hALG2 ein Mannoserest in $\alpha 1,6$ -Stellung und ein Mannoserest in $\alpha 1,3$ -Orientierung an den ersten Mannoserest auf dem lipidverknüpften Oligosaccharid angehängt wird (Parodi, 2000). Es erscheint fraglich, ob das gleiche Protein zwei so unterschiedlich Verknüpfungsarten katalysieren kann. Hier ergibt sich allerdings auch Raum zu der Annahme, daß gerade dies der Grund dafür sein kann, daß es zwei Isoformen von ALG2 gibt, von der die eine Isoform die $\alpha 1,6$ - und die andere die $\alpha 1,3$ -Übertragung der Mannosereste katalysiert. Da bei der Patientin M.S. zuletzt $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ akkumuliert, bedeutet dies, daß die Übertragung des zweiten Mannoserestes von GDP-Man auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ stattfindet. Da die Patientin nur über eine aktive kurze Isoform von ALG2 verfügt, ließe sich annehmen, daß die kurze ALG2-Isoform die Übertragung des Mannoserestes in $\alpha 1,6$ -Orientierung katalysiert, wohingegen die lange Isoform, deren Aktivität bei der Patientin M.S. komplett fehlt, für die Anheftung des dritten Mannoserestes in $\alpha 1,3$ -Stellung zuständig wäre.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der molekularen Ursache eines bis dahin unbekanntem Typs aus der Gruppe der 'Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)' bei einer Patientin, die unter einer multisystemischen Erkrankung mit schwerpunktmäßig neurologischen Störungen litt.

Im Vorfeld wurde eine Untersuchung des Serumtransferrins der Patientin M.S. mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung und des Western Blots durchgeführt, wobei sich der Verdacht auf einen Defekt aus der Gruppe der 'Congenital Disorders of Glycosylation' vom Typ I ergab. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme PMM2 bzw. PMI die CDG-Typen Ia und Ib als Ursache für die Unterglykosylierung des Transferrins ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte mit Hilfe der HPLC-Analytik keine Akkumulation längererkettiger [2-³H]Mannose-markierter Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide nachgewiesen werden, wie sie für die CDG-Typen Ic, Id, Ie, If und Ig beschrieben worden sind. Bei der anschließenden dünnschichtchromatographischen Auftrennung kurzkettiger Dolichol-verknüpfter [2-³H]Oligosaccharide konnte im Fall der Patientin M.S. die Akkumulation von zwei Substanzen nachgewiesen werden, die im weiteren Verlauf der Untersuchungen mit Hilfe der HPLC und anschließender Massenspektrometrie als Dol-PP-GlcNAc₂-Man₁ und Dol-PP-GlcNAc₂-Man₂ identifiziert werden konnten. Aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* war bekannt, daß im Verlauf der Biosynthese Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide die Übertragung des zweiten Mannoserestes von GDP-Man auf Dol-PP-GlcNAc₂-Man₁ durch das Genprodukt des *alg2*-Gens katalysiert wird. Das humane Ortholog zum Hefe-*alg2*-Gen war bisher nur in der Datenbank beschrieben worden, ohne daß die Funktionalität des Enzyms nachgewiesen wurde.

Bei der molekulargenetischen Untersuchung des *alg2*-Gens in Kontrollpersonen konnte gezeigt werden, daß -zumindest beim Menschen- eine lange Isoform des Enzyms mit 417 Aminosäuren sowie eine kurze Isoform mit 249 Aminosäuren existieren, wobei die 249 Aminosäuren der kurzen Isoform der terminalen Hälfte der langen Isoform entsprechen. Beide Isoformen des Enzyms werden von dem selben Genlocus kodiert, weisen aber unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte auf. Das längere *alg2*-Transkript wird von zwei Exons, das kürzere Transkript hingegen nur von einem Teil des zweiten Exons der langen Isoform kodiert.

Im Falle der Patientin M.S. konnte auf einem Allel eine Deletionsmutation identifiziert werden, die in dem gemeinsamen kodierenden terminalen Bereich der langen und der kurzen Isoform liegt ($\Delta 1040G$ in der cDNA der langen und $\Delta 536G$ in der cDNA der kurzen Isoform). Der Basenverlust führt zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Translationsstop. Die Sequenz der C-terminalen 70 Aminosäuren der kurzen und langen Isoform gehen verloren und werden durch eine Sequenz von 26 neuen Aminosäuren ersetzt. Die $\Delta 1040G/\Delta 536G$ -Mutation wurde von der Mutter vererbt.

Die Mutation, die sich auf dem vom Vater vererbten Allel befindet, liegt im translatierten Bereich der langen Isoform (G393T), bzw. im 5'-untranslatierten Bereich der kurzen Isoform (G-111T). Diese Mutation führt bei der langen Isoform zum Austausch von Lys131Ser. Da diese Mutation bei der Patientin M.S. und beim Vater in der RNA der langen Isoform nicht detektiert werden konnte, nehmen wir an, daß die G393T-Mutation das Transkript für die lange Isoform destabilisiert.

Während die kurze Isoform, die durch das maternale Allel weitergegeben wird, die Mutation $\Delta 536G$ trägt, weist die kurze Isoform, die durch das paternale Allel weitergegeben wird, keine Mutation auf. Dies erklärt vermutlich das normale LLO-Profil der Patientin in Bezug auf die Anwesenheit von $G_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

Um nachzuweisen, daß die $\Delta 1040G$ -Mutation, die vom maternalen Allel stammt, tatsächlich zum Verlust der Enzymaktivität der langen Isoform des humanen ALG2-Proteins führt, wurde zum einen die Wildtyp- und zum anderen die $\Delta 1040G$ -cDNA der langen Isoform in den Hautfibroblasten der Patientin mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems exprimiert. In Zellen, die die Wildtyp-cDNA exprimierten, konnte keine Akkumulation von $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ nachgewiesen werden, während Zellen, die die $\Delta 1040G$ -cDNA exprimierten, nach wie vor $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ akkumulierten.

Diese Befunde belegen zum einen, daß es sich bei der in der Datenbank veröffentlichten cDNA-Sequenz um das humane Ortholog zum Hefe *alg2*-Gen handelt. Zum anderen zeigen sie, daß die molekulare Ursache der Erkrankung der Patientin M.S. und die damit verbundene Akkumulation von $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ auf Mutationen in diesem Gen zurückzuführen sind.

Es bleibt bislang unklar, warum im Falle der Patientin neben $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ auch $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ akkumuliert. Die Übertragung des dritten Mannoserests sollte durch ein weiteres, bisher unbekanntes Enzym katalysiert werden, da es sich

in diesem Fall um einen α -1,3 glykosidisch-verknüpften Mannoserest handelt, während der zweite Mannoserest α -1,6 glykosidisch mit Dol-PP-GlcNAc₂Man₁ verknüpft ist. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß die humanen ALG2-Proteine sowohl den zweiten als auch den dritten Mannoserest übertragen.

7 Ausblick

Die molekulare Ursache des Defekts in der N-Glykosylierung der Patientin M.S. konnte im Rahmen dieser Arbeit zunächst biochemisch charakterisiert und anschließend molekulargenetisch aufgeklärt werden.

Bei weiterführenden Untersuchungen sollen alle ungeklärten CDG-Verdachtsfälle mit Hilfe der dünnschichtchromatographischen Auftrennung kurzkettiger, [2-3H]Mannose-markierter, Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide analysiert werden, die wie die Patientin M.S. ein CDG-Typ I Muster in der isoelektrischen Fokussierung aufweisen und keine Verkürzungen ihrer Oligosaccharidstruktur in der HPLC-Analyse längerer Dolichol-verknüpfter Oligosaccharide zeigen.

Parallel dazu gilt es zu klären, welcher gewebs- und entwicklungspezifischen Kontrolle die Expression der kurzen bzw. langen Isoform des ALG2-Proteins unterliegt und welche Funktion den N-terminalen 168 Aminosäuren der langen Isoform zukommt. Hierzu könnte die Generierung eines Mausmodells hilfreich sein, in dem die lange Isoform ausgeschaltet, die Funktion der kurzen Isoform aber erhalten bleibt. Um eine mögliche frühe embryonale Letalität in der Entwicklung der Mäuse zu verhindern, sollte ein konditionaler knock-out von ALG2, beispielsweise mit Hilfe des Cre/ loxP-Systems, generiert werden.

Weiterhin ist in Zusammenarbeit mit Prof. Ludwig Lehle in Regensburg geplant, Analysen zur Aktivität des humanen ALG2 in Hefestämmen durchzuführen. Dabei soll überprüft werden, ob das ALG2-Protein des Menschen tatsächlich neben der Übertragung des zweiten Mannoserests auf $\text{Man}_1\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ auch die sich direkt anschließende Reaktion der Übertragung des dritten Mannoserests auf $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ katalysiert. Eine weitere interessante Fragestellung betrifft die Überprüfung der zeitlichen Abfolge der Verknüpfung des zweiten und dritten Mannoserests in $\alpha 1,6$ - oder in $\alpha 1,3$ -Stellung, die durch die acetolytischen Spaltung der säurelabilen $\alpha 1,6$ -Bindung an aufgereinigtem $\text{Man}_2\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ und $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ aus den entsprechenden Hefemutanten untersucht werden soll.

8 Literaturverzeichnis

Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, Hennet T, Imbach T, Stutz A, Bjursell C, Uller A, Wahlstrom JG, Briones P, Cardo E, Clayton P, Winchester B, Cormier-Dalre V, de Lonlay P, Cuer M, Dupre T, Seta N, de Koning T, Dorland L, de Loos F, Kupers L, et al.

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J.* 1999;669-71.

Albright CF, Orlean P, Robbins PW.

A 13-amino acid peptide in three yeast glycosyltransferases may be involved in dolichol recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*1989;86:7366-9

Anand M, Rush JS, Ray S, Doucey MA, Weik J, Ware FE, Hofsteenge J, Waechter CJ, Lehrman MA

Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol Biol Cell.* 2001;12:487-501

Babbage, A

Acc.No.: CAC07999, Direct Submission, Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire, GB, 2000

Bachmann BJ

Linkage map of *Escherichia coli* K12, Edition 7; in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* – cellular and molecular biology 1987, (Neidhardt, F.C./ ed.); ASM, Washington D.C. 2: 807-876

Bergen HR, Lacey JM, O'Brien JF, Naylor S.

Online single-step analysis of blood proteins: the transferrin story. *Anal Biochem.* 2001;296:122-9

Berger, SL

The use of Cerenkov radiation for monitoring reactions performed in minute volumes: Examples for recombination DNA technology. *Anal. Biochem* 1984; 136: 515-519

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254

Branza-Nichita N, Petrescu AJ, Dwek RA, Wormald MR, Platt FM, Petrescu SM.

Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *J Biochem Biophys Res Commun.*;261:720-5.

Burda P, Aebi M.

The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. *Glycobiology.* 1998;8: 455-62

Burda P, Jakob CA, Beinhauer J, Hegemann JH, Aebi M

Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* 1999; 9, 617-625

Burda P, te Heesen S, Brachat A, Wach A, Dusterhoft A, Aebi M.

Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the ALG9 gene encoding a putative mannosyl transferase. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 7160-5

Chantret I, Dupre T, Delenda C, Bucher S, Barnier A, Charollais A, Heron D, Bader-Meunier B, Danos O, Seta N, Durand G, Oriol R, Codogno P, Moore SE

Congenital disorders of glycosylation type Ig is defined by a deficiency in dolichyl-P-mannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase, *J Biol Chem.* 2002; 277: 25815-22

Cipollo JF, Trimble RB.

The accumulation of Man(6)GlcNAc(2)-PP-dolichol in the *Saccharomyces cerevisiae* Deltaalg9 mutant reveals a regulatory role for the Alg3p alpha1,3-Man middle-arm addition in downstream oligosaccharide-lipid and glycoprotein glycan processing. *J Biol Chem.* 2000;275:4267-77

de Lonlay P, Seta N, Barrot S, Chabrol B, Drouin V, Gabriel BM, Journal H, Kretz M, Laurent J, Le Merrer M, Leroy A, Pedespan D, Sarda P, Villeneuve N, Schmitz J, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J, Körner C, Munnich A, Saudubray JM, Cormier-Daire V

A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet.* 2001; 38: 14-19

De Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, De Paepe AM, Chan NW, Dacremont GA, Van Coster RN

A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 1744-56

Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM

Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA-fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 1975; 96: 171-84

Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni-Baruch R

Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1789-92

Frydman M, Etzioni A, Eidlitz-Markus T, Avidor I, Varsano I, Shechter Y, Orlin JB, Gershoni-Baruch R

Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype. *Am J Med Genet.* 1992; 44: 297-302

Fu J und Kreibich G

Retention of Subunits of the Oligosaccharyltransferase Complex in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 3984-3990

Gabius HJ.

Vertebrate lectins and their possible role in fertilization, development and tumor biology *In Vivo.* 1987; 75-83.

Grubenmann CE, Frank CG, Kjaergaard S, Berger EG, Aebi M, Hennet T

ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 2331-2339

Hammond C, Braakman I, Helenius A

A Role of N-linked oligosaccharid recognition, glucose trimming, and calnexin in glykoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 913-917

Hanefeld F, Körner C, Holzbach-Eberle U, von Figura K

Congenital disorder of glycosylation-Ic: case report and genetic defect. *Neuropediatrics.* 2000: 60-2

Hansen SH, Frank SR, Casanova Je

Cloning and characterization of human phosphomannomutase, a mammalian homologue of yeast SEC53. *Glycobiology* 1997; 7: 829-34

Hanßke B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Honing S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Körner C

Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId. *J Clin Invest.* 2002; 109: 725-33

Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C

Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 49-69.

Hogan B, Constantini F, Lacy E

Manipulating the mouse, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1986, Cold spring Harbor, N.Y.

Hubbard SC, Ivatt RJ.

Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:555-83.

Imbach T, Burda P, Kuhnert P, Wevers RA, Aebi M, Berger EG, Hennet T

A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 6982-7

Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grjunewald S, Bailie NM, King MD, Jaeken J, Matthijs G, Berger EG, Aebi M, Hennet T

Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J Clin Invest.* 2000; 105: 233-9.

Inoue H, Nojima H

Okayama H High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 1990; 96: 23-28

Isogai T and Otsuki T

Acc.No.: BAB55099, Direct Submission, Helix Research Institute, Yana, Kisarazu, Japan, 2002

Jackson BJ, Warren CD, Bugge B, Robbins P

Synthesis of lipid-linked Oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Man₂GlcNAc₂ and Man₁GlcNAc₂ are transferred from Dolichol to protein in Vivo. Arch Biochem Biophys 1989; 272: 203-209

Jackson BJ, Kukuruzinska MA, Robbins P.

Biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: the alg2 mutation. Glycobiology. 1993;3:357-64.

Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P

Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TGB deficiency, increased serum arylsulfatase A and increased CSF protein: a new syndrom? Pediatr Res. 1980; 14: 179

Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E.

Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. Clin Chim Acta. 1984; 144: 245-7

Jaeken J, Carchon H.

The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. J Inherit Metab Dis. 1993; 16: 813-20

Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G

Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. Arch Dis Child. 1994; 71:123-7

Jesse J

Use of competent cells of DNA transformation. Fucos 1984; 6: 5-6

Jörgensen MU, Emr SD, Winther JR.

Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem. 1999;260:461-9.

Kim S, Westphal V, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Karnes PS, Patterson MC, Freeze HH.

Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie) J Clin Invest. 2000; 105: 191-8.

Kepes F und Schekman R

The yeast SEC53 gene encodes phosphomannomutase. J. Biol. Chem. 1988, 263: 9155-61

Knauer R und Lehle L

The Oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 1999; 274: 17249-17256

Körner C, Lehle L, von Figura K

Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. Glycobiology 1998a; 8:165-71

Körner C, Lehle L, von Figura K

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose. Glycoconj J. 1998b: 499-505.

Körner C, Knauer R, Holzbach U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichyl-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998c; 95: 13200-5

Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, von Figura K

Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. EMBO J. 1999;18: 6816-22

Kornfeld R, Kornfeld S

Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem. 1985; 54: 631-64

Kranz C, Denecke J, Lehrman MA, Ray S, Kienz P, Kreissel G, Sagi D, Peter-Katalinic J, Freeze HH, Schmid T, Jackowski-Dohrmann S, Harms E, Marquardt T.

A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If). J Clin Invest. 2001; 108: 1613-9

Laemmli UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970, 680-685

Lennarz, W.

Glycoprotein Synthesis and embryonic development. Crit. Rev. Biochem. 1993; 14: 257-272

Lübke T, Marquardt T, von Figura K, Körner C

A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. J Biol Chem. 1999; 274: 25986-9

Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C

Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. Nat Genet. 2001; 28: 73-6

MacGillivray RTA, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K.

The primary structure of human serum transferrin. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 3543-3553

Marquardt T, Luhn K, Srikrishna G, Freeze HH, Harms E, Vestweber D.

Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood.* 1999;94:3976-85

Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaftingen

E Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome) *Nat Genet.* 1997: 88-92

Matthijs G, Schollen E, Van Schaftingen E, Cassiman JJ, Jaeken J.

Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 542-50

Matthijs G, Schollen E, Bjursell C, Erlandson A, Freeze H, Imtiaz F, Kjaergaard S, Martinsson T, Schwartz M, Seta N, Vuillaumier-Barrot S, Westphal V, Winchester B.

Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat.* 2000: 386-94.

Mayatepek E, Kohlmüller D.

Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 605-6

Mendell JT, Dietz HC.

When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell.* 2001;107:411-4.

Miller DG, Miller AD

A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry. *J. Virol.* 1994; 68: 8270-6

Murphy LA, Spiro RG.

Transfer of glucose to oligosaccharide-lipid intermediates by thyroid microsomal enzymes and its relationship to the N-glycosylation of proteins. *J. Biol Chem.*; 1981;256:7487-94.

Niehues R, Hasilik M, Alton G, Korner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, Marquardt T

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1414-20

Panneerselvam K, Freeze HH

Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1478-87

Panneerselvam K, Etchison JR, Freeze HH

Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation. Evidence for the functional importance of transported mannose. *J Biol Chem.* 1997; 272: 23123-9

Parodi, AJ

Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* 2000, 348, 1-13

Peters V, Penzien JM, Reiter G, Körner C, Hackler R, Assmann B, Fang J, Schaefer JR, Hoffmann GF, Heidemann

PH Congenital disorder of glycosylation IIId (CDG-IIId) -a new entity: clinical presentation with Dandy-Walker malformation and myopathy. *Neuropediatrics.* 2002; 33: 27-32

Petrescu SM, Petrescu AJ, Titu HN, Dwek RA, Platt FM.

Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J Biol Chem.* 1997; 272:15796-803

Powell LD, Paneerselvam K, Vij R, Diaz S, Manzi A, Buist N, Freeze H, Varki A

Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? *J Clin Invest.* 1994; 94: 1901-9

Ramaekers VT, Stibler H, Kint J, Jaeken J.

A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14: 385-8

Rearick JI, Fujimoto K, Kornfeld S.

Identification of the mannosyl donors involved in the synthesis of lipid-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1981;256: 3762-9.

Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, Khan SH, Menchen SM, Heiner CR, Chen SM

New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 4500-4504

Saiki RK, Scharf S, Faloona, F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, N.Y.

Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond GV, Hurvitz H, Raas-Rotschild A, Luder AS, Jaeken J, Berger EG, Matthijs G, Hennet T, Aebi M.

MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1687-95.

Silberstein S, Collins PG, Kelleher DJ, Rapiejko PJ, Gilmore R

The alpha subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex is essential for vegetative growth of yeast and is homologous to mammalian ribophorin I. *J Cell Biol* 1995; 128: 525-36

Southern EM

Measurements of DNA length by gelelectrophoresis; *Anal. Biochem.* 1979, 100: 319-323

Strausberg R.

Acc.No.: AAH15126, Direct Submission, National Institutes of Health (MGC), Bethesda, USA 2001

Tatu U, Helenius A

Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1997 10; 136: 555-65

te Heesen S, Knauer R, Lehle L, Aebi M

Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *EMBO J* 1993; 12: 279-284

Thiel C, Schwarz M, Hasilik M, Grieben U, Hanefeld F, Lehle L, Von Figura K, Körner C

Deficiency of dolichyl-P-Man:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase causes congenital disorder of Glycosylation-Ig. *Biochem J.* 2002; 367: 195-201

Turco SJ, Stetson B, Robbins PW.

Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 4411-4.

Van Schaftingen E, Jaeken J

Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.* 1995; 377: 318-20.

Varki A

Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 1993; 3: 97-130.

Westermeier R

Isoelectric focusing. *Methods Mol. Biol.* 1996; 59: 239-248

Westphal V, Peterson S, Patterson M, Tournay A, Blumenthal A, Treacy EP, Freeze HH.

Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genet Med.* 2001;3:393-8

Yamashita K, Ohkura T, Ideo H, Ohno K, Kanai M.

Electrospray ionization mass spectrometric analysis of serum transferrin isoforms in patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J. Biochem.* 1993; 114: 766-9

Yamazaki H, Shiraishi N, Takeuchi K, Ohnishi Y, Horinouchi S

Characterization of *alg2* encoding a mannosyltransferase in the zygomycete fungus *Rhizomucor pusillus*. *Gene* 1998; 221: 179-184

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura für die Vergabe des interessanten Themas und für sein umfassendes Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sowohl seine zahlreichen Anregungen als auch seine immerwährende Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Erfolg beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottschalk bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Herrn PD. Dr. Christian Körner danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, das freundschaftliche Verhältnis in seiner Arbeitsgruppe und für die zahlreichen zusammen angestellten großen und kleinen Streiche, die das Arbeiten im Institut verschönt haben. Bei den anderen Mitgliedern im Institut entschuldige ich mich hiermit.

Für das freundschaftliche Klima in unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich weiterhin bei Torben Lübke, Bengt Hanßke, Martin Hasilik, Jan Rindermann, Christina Hellbusch und Jürgen Lübbehusen danken.

Frau Poldi Sander sei an dieser Stelle ganz besonders für ihren stetigen Unterstützungswillen und ihre Fürsorglichkeit gedankt.

Meiner Mutter, Oma und meinen Schwiegereltern danke ich für die ständige liebevolle Unterstützung und Hilfen bei den angefallenen großen und kleinen Problemen während dieser Doktorandenzeit.

Der größte, herzlichste Dank gilt meiner Liebsten.

Veröffentlichungen

Schöber U, **Thiel C**, Jendrossek D.

Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*.

Appl Environ Microbiol. 2000;66:1385-92.

Hanßke B, **Thiel C**, Lübke T, Hasilik M, Höning S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Körner C.

Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IIId. J Clin Invest. 2002;109:725-33

Thiel C, Schwarz M, Hasilik M, Grieben U, Hanefeld F, Lehle L, Von Figura K, Körner C.

Deficiency of dolichyl-P-Man:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase causes congenital disorder of Glycosylation-Ig. Biochem J. 2002; 367: 195-201

Die Daten dieser Dissertation stehen zur Veröffentlichung an.

Lebenslauf

Name: Christian Thiel
Anschrift: Schöneberger Straße 15, 37085 Göttingen
Geboren: 04.09.1972 in Göttingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Anja Schlesier-Thiel, geb. Schlesier;
zwei Kinder, geb. 10.09.2000 und 05.02.2002

Schulbildung:

1979-1983 Brüder Grimm Schule Göttingen
1983-1985 Orientierungsstufe Göttingen Nord
1985-1992 Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen
20.05.1992 Abitur

01.07.1992-30.06.1993 Wehrdienst beim Panzergrenadierbataillon 12, Osterode

Studium:

WS 1993-SS 1999 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
12.07.1999 Diplom im Studiengang Biologie

Titel der Diplomarbeit: "Molekularbiologische Untersuchungen zur Substratspezifität der PHV-Depolymerase aus *Pseudomonas lemoignei*"

15.07.1999-30.09.2000 Stipendiat im Graduiertenkolleg "Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse" in der Abt. Biochemie II, Universität Göttingen

ab 01.10.2000 Doktorand (BAT IIa/2)
in der Abt. Biochemie II, Universität Göttingen

Göttingen, 16.09.2002