

Congenital Disorders of Glycosylation IIj (CDG-IIj):

Identifizierung eines Defekts der COG6-Untereinheit des
Conserved Oligomeric Golgi-Komplexes

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Lübbehusen

aus Vechta

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. K. von Figura

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2009

Meiner geliebten Nicole

&

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Glykosylierung von Proteinen | 1 |
| 1.1.1 | Bedeutung der Proteinglykosylierung | 1 |
| 1.1.2 | Die Biochemie der N- und O-Glykosylierung | 2 |
| 1.1.2.1 | Die N-Glykosylierung | 2 |
| 1.1.2.2 | Die O-Glykosylierung | 6 |
| 1.2 | Defekte der Proteinglykosylierung | 8 |
| 1.2.1 | Defekte der N-Glykosylierung | 8 |
| 1.2.2 | Defekte der O-Glykosylierung | 10 |
| 1.2.3 | Kombinierte Glykosylierungsdefekte | 11 |
| 1.2.3.1 | Der COG-Komplex | 12 |
| 1.3.1.2 | Funktion des COG-Komplexes | 13 |
| 1.3.1.3 | Defekte des COG-Komplexes | 14 |
| 2 | Problemstellung | 17 |
| 3 | Material und Methoden | 18 |
| 3.1 | Material | 18 |
| 3.1.1 | Geräte | 18 |
| 3.1.2 | EDV | 20 |
| 3.1.3 | Verbrauchsmaterial | 21 |
| 3.1.4 | Chemikalien | 22 |
| 3.1.5 | Puffer und Stammlösungen | 24 |
| 3.1.6 | Medien zur Anzucht von prokaryotischen Zellen | 25 |
| 3.1.7 | Zellkulturmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen | 26 |
| 3.1.8 | Enzyme, Standards und Reagenzien für molekularbiologische, proteinbiochemische und Zellbiologische Methoden | 26 |
| 3.1.9 | Oligonukleotide | 27 |
| 3.1.10 | Antikörper | 27 |
| 3.1.10.1 | Primärantikörper | 27 |
| 3.1.10.2 | Sekundärantikörper | 28 |
| 3.1.11 | Radioaktive Substanzen | 28 |

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.12 | Vektoren | 28 |
| 3.1.13 | Bakterienstämme | 28 |
| 3.1.14 | Zelllinien | 29 |
| 3.2 | Methoden | 29 |
| 3.2.1 | Molekularbiologische Methode | 29 |
| 3.2.1.1 | Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie | 29 |
| 3.2.1.2 | Isolierung genomischer DNA | 30 |
| 3.2.1.3 | Isolierung von RNA | 30 |
| 3.2.1.4 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 30 |
| 3.2.1.5 | Reverse Transkription von mRNA in cDNA | 31 |
| 3.2.1.6 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 31 |
| 3.2.1.7 | Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen | 32 |
| 3.2.1.8 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 33 |
| 3.2.1.9 | Ligation eines DNA-Fragments in einen Plasmidvektor | 33 |
| 3.2.1.10 | Amplifikation von Plasmid-DNA im Prokaryotensystem | 34 |
| 3.2.1.10.1 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>-Bakterien | 34 |
| 3.2.1.10.2 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>-Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung | 34 |
| 3.2.1.10.3 | Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>-Bakterien | 35 |
| 3.2.1.11 | Präzipitation von DNA mit Ethanol | 35 |
| 3.2.1.12 | Northern-Blot (Transfer von RNA auf Hybond N-Filter) | 35 |
| 3.2.1.13 | Markierung einer DNA-Sonde mit α-[³²P]dCTP | 37 |
| 3.2.1.14 | Hybridisierung der an Hybond N-Filter RNA mit radioaktiv markierten Sonden | 37 |
| 3.2.1.15 | Polymerase-Ketten-Reaktion | 38 |
| 3.2.1.16.1 | Primer-Design | 38 |
| 3.2.1.16.2 | Standard-PCR | 39 |
| 3.2.1.16.3 | PCR mit dem HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase-System | 40 |
| 3.2.1.16.4 | Sequenzierung von DNA | 40 |
| 3.2.1.17 | Transfektion von FNX-Eco-Zellen mit FuGENE6-Transfektionsreagenz | 40 |
| 3.2.1.18 | Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten | 41 |

| | | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2 | Proteinbiochemische Methoden | 42 |
| 3.2.2.1 | Serumpräparation aus venösem Blut | 42 |
| 3.2.2.2 | Eisensättigung der Serumproben | 42 |
| 3.2.2.3 | Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 43 |
| 3.2.2.3.1 | Isoelektrische Fokussierung von Serum-Transferrin | 43 |
| 3.2.2.3.2 | IEF des α -1-Antitrypsins | 44 |
| 3.2.2.3.3 | IEF des ApoCIII | 46 |
| 3.2.2.4 | Enzymatische Desialylierung von Serumproteinen durch Neuraminidase | 47 |
| 3.2.2.4.1 | Neuraminidase (<i>Vibrio cholerae</i>) | 47 |
| 3.2.2.4.2 | 2,3-Neuraminidase | 48 |
| 3.2.2.5 | Herstellung von Fibroblastenextrakten | 48 |
| 3.2.2.6 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) zur Auftrennung von Proteine | 48 |
| 3.2.2.7.1 | Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen ("Western-Blot") | 50 |
| 3.2.2.7.2 | Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen | 51 |
| 3.2.2.7.3 | Chemilumineszenz-Nachweis | 52 |
| 3.2.2.8 | Bestimmung der GDP-[¹⁴ C]Fucose-, CMP-[¹⁴ C]NANA und UDP-[³ H]Galactose Import-Aktivität in Golgi-angereicherten Fraktionen | 52 |
| 3.2.2.8.1 | Aufschluss der Fibroblasten für Import-Assay | 52 |
| 3.2.2.8.2 | Präparation Golgi-angereicherter Vesikel | 52 |
| 3.2.2.8.3 | Bestimmung der GDP-[¹⁴ C]Fucose-, CMP-[¹⁴ C]NANA und UDP-[³ H]Galactose-Import-Aktivität | 53 |
| 3.2.2.9 | Extraktion von humanem Transferrin aus Serum | 54 |
| 3.2.2.10 | Präparation und Markierung von Oligosacchariden | 55 |
| 3.2.2.10.1 | Enzymatische Deglykosylierung durch PNGase F | 55 |
| 3.2.2.10.2 | Aufreinigung der abgespaltenen Oligosaccharide | 55 |
| 3.2.2.10.3 | 2-AB Markierung von Oligosacchariden | 55 |
| 3.2.2.11 | Säulenchromatographische Methoden | 56 |
| 3.2.2.11.1 | Separation von Oligosacchariden mittels GlycoSepN | 56 |
| 3.2.2.11.2 | Separation mittels Anionenaustauschchromatographie (GlycoSepC) | 57 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2.11.3 | Gelfiltration mit der Superose 6 10/300 GL | 57 |
| 3.2.2.12 | Massenanalytik | 58 |
| 3.2.2.13 | Immunfluoreszenzmarkierung von Brefeldin A behandelten Fibroblasten | 59 |
| 3.2.3 | Zellbiologische Methoden | 59 |
| 3.2.3.1 | Methoden zur Arbeit mit bakteriellen Kulturen | 59 |
| 3.2.3.1.1 | Flüssigkulturen | 59 |
| 3.2.3.1.2 | Plattenkulturen | 60 |
| 3.2.3.1.3 | Zellernte | 60 |
| 3.2.3.2 | Zellbiologische Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Kulturen | 60 |
| 3.2.3.2.1 | Kultivierung von eukaryontischen Zellen | 60 |
| 3.2.3.2.2 | Trypsinieren und Ernten von Zellen | 60 |
| 3.2.3.2.3 | Kryokonservierung von Zellen | 61 |
| 3.2.3.2.4 | Auftauen und Revitalisieren von Zellen | 61 |
| 4 | Ergebnisse | 62 |
| 4.1 | Anamnese und Klinik der Patientin S.E.S. | 62 |
| 4.2 | Proteinbiochemische Untersuchungen | 62 |
| 4.2.1 | Isoelektrische Fokussierung von Serumproteinen | 62 |
| 4.2.2 | SDS-Page des Serumtransferrins | 64 |
| 4.2.3 | Analyse der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide | 65 |
| 4.2.4 | Gesamtglykananalyse von Serumglykoproteinen | 67 |
| 4.2.5 | Untersuchung der Core 1 O-Glykosylierung | 68 |
| 4.3 | Zuckernukleotidtransport- und Transferaseassay in Mikrosomen | 70 |
| 4.4 | Untersuchung des COG-Komplexes | 71 |
| 4.4.1 | Western-Blot Analyse | 71 |
| 4.4.2 | Sequenzanalyse von COG5, COG6 und COG7 | 72 |
| 4.4.3 | Vergleich der COG6 Proteinsequenz verschiedener Spezies | 73 |
| 4.5.1 | Northern-Blot Analyse zur Überprüfung der COG6-Expression | 75 |

| | | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5.2 | Expression der Wildtyp-cDNA in den Hautfibroblasten der Patientin | 76 |
| 4.5.3 | Komplementation des Defektes in Wildtyp-COG6 transduzierten Hautfibroblasten | 76 |
| 4.5.4 | Funktionalität des COG-Komplexes in Hautfibroblasten | 78 |
| 5 | Diskussion | 81 |
| 5.1 | Klinischer Vergleich der bekannten COG-Defekte | 81 |
| 5.2 | Der Defekt der Patientin S.E.S. stellt einen kombinierten Glykosylierungsdefekt dar | 82 |
| 5.3 | Identifizierung des Defekts | 84 |
| 5.4 | Untersuchung des COG-Komplexes | 86 |
| 5.5 | Ausblick | 87 |
| 6 | Zusammenfassung | 88 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 89 |
| 8 | Anhang | 101 |
| 8.1 | Nukleotid- und Aminosäuresequenz der humanen COG6-Untereinheit | 101 |
| 8.1.1 | Nukleotidsequenz der cDNA der humanen COG6-Untereinheit | 101 |
| 8.1.2 | Aminosäuresequenz der humanen COG6-Untereinheit | 102 |
| 8.2 | Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide | 102 |
| 8.2.1 | Primer für die Reverse-Transkriptase PCR | 102 |
| 8.2.2 | Primer für COG6-Exon-PCR | 102 |
| 8.2.3 | Primer für Sequenzanalysen | 103 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|------------------------------------------------|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Alg | Asparagin linked glycosylation |
| Amp | Ampicillin |
| ApoCIII | Apolipoprotein CIII |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| CDG | Congenital Disorders of Glycosylation |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CDP | Cytidindiphosphat |
| Ci | Curie (2,22x10 ⁶ counts per minute) |
| cm | Zentimeter |
| COG | Conserved Oligomeric Golgi |
| d.h. | das heißt |
| Da | Dalton |
| del | Deletion |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleotide |
| Dol | Dolichol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| et al. | et alii (lat.: und andere) |
| FKS | fötales Kälberserum |
| FUCT1 | Golgi GDP-Fucose Transporter |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| G418 | Geneticin® 418 |
| Gal | Galaktose |

| | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|
| GalNAc | N-Acetylgalaktosamin |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| Glc | Glucose |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamin |
| h | Stunde(n) |
| ³ H | Tritium |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| l | Liter |
| LB | Luria Broth |
| M | Molar |
| Man | Mannose |
| MCS | multiple cloning site |
| min | Minute(n) |
| MGAT2 | Golgi N-Acetyl-Glucosaminyltransferase II |
| MPI | Phosphomannose Isomerase |
| mRNA | messenger-Ribonukleinsäure |
| NANA | Sialinsäure |
| OD | Optische Dichte |
| OMIM | <u>O</u> nline <u>M</u> endelian <u>I</u> nheritance in <u>M</u> an |
| OST | Oligosaccharyltransferase |
| P | Phosphor |
| ³² P | Phosphor 32 |
| p.a. | pro analysi (lat.: zur Analyse) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PMM2 | Phosphomannomutase II |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| U/min | Umdrehung pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|------------|---------------------------------|
| s | Sekunde(n) |
| SSC | standard saline citrate |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| <i>Taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris(Hydroxymethyl)-aminoacetat |
| u | Unit |
| U | Uridin |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UMP | Uridinmonophosphat |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| w/v | Gewicht zu Volumen |
| WT | Wildtyp |
| xg | x-fache Erdbeschleunigung |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

Verwendete Vorsilben für Potenzen der Zahl Zehn:

| | | |
|-------|-------|-------------------------|
| p | Pico | (1×10^{-12}) |
| n | Nano | (1×10^{-9}) |
| μ | Mikro | (1×10^{-6}) |
| m | Milli | (1×10^{-3}) |
| k | Kilo | (1×10^3) |
| M | Mega | (1×10^6) |

Die Abkürzung der chemischen Elemente erfolgte mit den üblichen Symbolen. Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder im Ein-Buchstabencode angegeben. Die Verwendung englischer Fachtermini war nötig, da eine Übersetzung ins Deutsche unüblich und unzureichend ist.

1 Einleitung

1.1 Die Glykosylierung von Proteinen

1.1.1 Bedeutung der Proteinglykosylierung

Die Glykosylierung von Proteinen stellt einen der komplexesten Vorgänge der ko- und posttranslationalen Modifikationen dar. Mehr als 300 Proteine katalysieren dabei die variable Verknüpfung 13 unterschiedlicher Monosaccharide miteinander sowie deren kovalente Bindung an acht verschiedenen Aminosäuren. Dadurch kommt die enorme Vielfältigkeit Protein-gebundener Oligosaccharide zustande (Spiro, 2002).

Die beiden häufigsten Bindungsarten von Oligosacchariden an Proteine werden als N- und O-Glykosylierung bezeichnet (Abb. 1).

Am besten untersucht ist dabei der hochkonservierte Prozess der N-Glykosylierung, bei der die Zuckerkette mit der Amidgruppe eines Asparaginrestes (Asn) in der Konsensus-Sequenz Asn-X-Serin/Threonin (Ser/Thr) verknüpft ist, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin (Pro) sein kann (Medzihradsky, 2008). N-Glykane beeinflussen die Eigenschaften von Glykoproteinen, indem sie die Hydrophilizität erhöhen und dadurch Faltungseffizienz und Löslichkeit neusynthetisierter Proteine gewährleisten. Ferner erfüllen sie eine Vielzahl wichtiger biologischer Funktionen wie Schutz der Proteine vor proteolytischem Abbau und der Proteinstabilität gegen Säure- oder Hitzeeinwirkung. Auch Rezeptor-Ligand-Interaktionen für den intra- und interzellulären Transport sowie Zell-Zell-Wechselwirkungen werden durch N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide beeinflusst (Varki et al., 1993; Freeze, 2006).

Die Verknüpfung des Zuckers über eine O-glykosidische Bindung mit der Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder seltener Threonin wird als O-Glykosylierung bezeichnet. O-glykosidische Bindungen treten in großer Vielfalt auf. Sie umfassen nicht nur die Verknüpfung der Hydroxylgruppe mit verschiedenen Zuckern, sondern auch die Bindung dieser in unterschiedlichen anomeren Konfigurationen (Spiro, 2002). Die größte Gruppe der O-Glykane

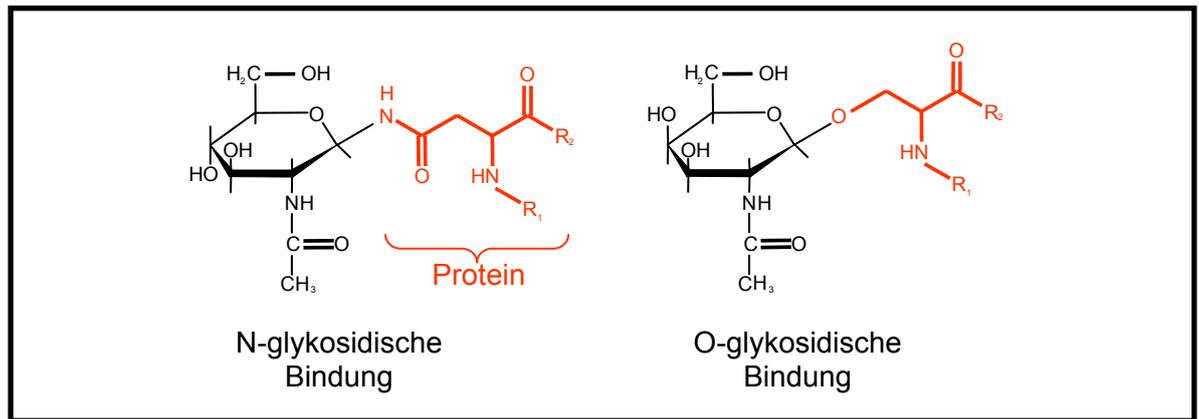


Abb.1: Verknüpfungsarten von Zuckern an die jeweilige AS eines Proteins. Dargestellt sind die Verknüpfungen von GlcNAc an Asn und GalNAc an Ser.

entspricht dem Mucin-Typ. Hier sind die Oligosaccharide über ein N-Acetylgalaktosaminrest (GalNAc) in α -Stellung mit der Hydroxylgruppe eines Serins, bzw. Threonins verbunden. Sie dienen u.a. auf Epithelzellen der Mukosa des Gastrointestinal-, Respirations- und Genitaltrakts als Schutzfaktor gegen Fremdorganismen. Darüber hinaus existieren noch weitere Formen der O-Glykosylierung, wie z.B. die Modifizierung von Proteinen mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc) als Gegenspieler zur Phosphorylierung (Hart et al., 2007), die O-Fucosylierung (Moloney et al., 2000a) und die O-Mannosylierung des α -Dystroglykans (Endo T, 2004).

1.1.2 Die Biochemie der N- und O-Glykosylierung

1.1.2.1 Die N-Glykosylierung

Die Biosynthese Asparagin-verknüpfter Oligosaccharide beginnt auf der zytosolischen Seite der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) und wird anschließend auf der luminalen Seite fortgesetzt (Abb. 2).

Die Synthese wird mit der Übertragung eines N-Acetylglucosamin-1-Phosphat-Restes von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) auf Dolicholphosphat (Dol-P) eingeleitet, wodurch N-Acetylglucosaminyl-pyrophosphoryl-Dolichol (Dol-PP-GlcNAc) gebildet wird. Die anschließende Elongation des Lipid-verknüpften Oligosaccharids mit einem weiteren GlcNAc-, sowie 5 Mannoseresten (Man) wird durch spezifische Glykosyltransferasen katalysiert, deren Substrat Nukleotid-aktivierte Zucker darstellen. Die biantennäre

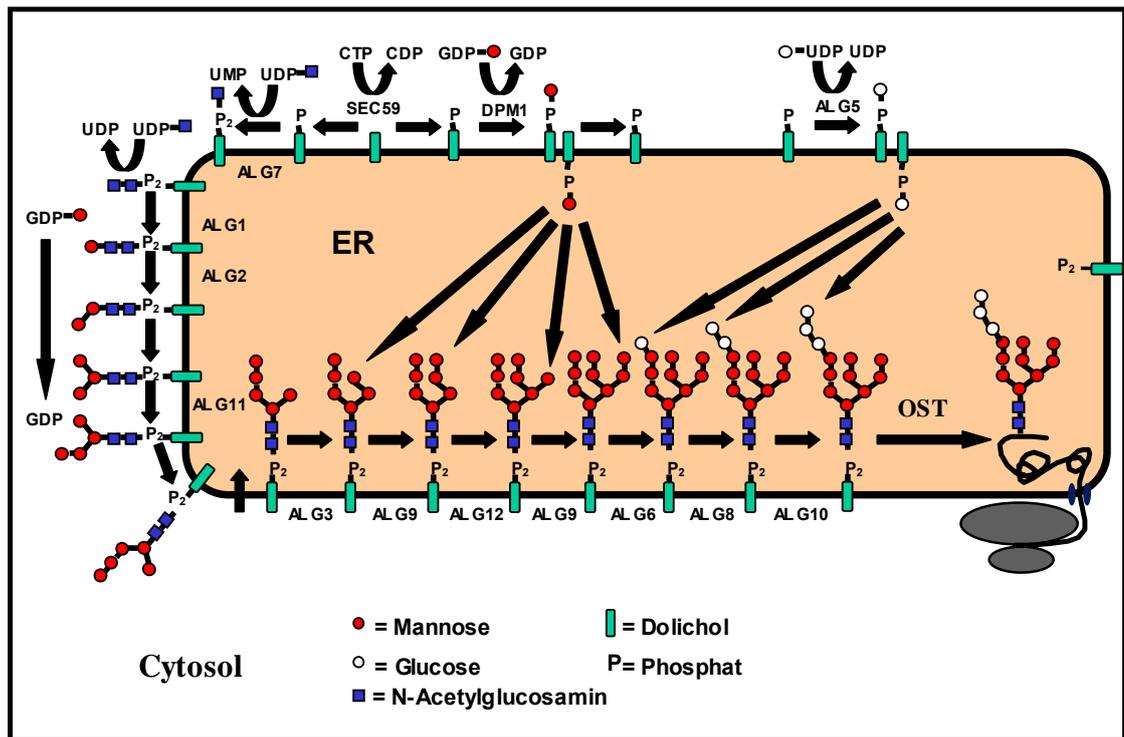


Abb. 2: Synthese der Dolichol-verknüpften Oligosaccharide und die Übertragung auf neusynthetisierte Proteine (nach Aebi & Hennet, 2001).

Zuckerkette wird durch das Protein RFT1 von der zytosolischen auf die luminale Seite der ER-Membran transloziert (Helenius und Aebi, 2002). Für die Verlängerung des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids innerhalb des ER müssen die Monosaccharidanteile der aktivierten Zucker Guanosindiphosphat-Mannose (GDP-Man) und UDP-Glucose (UDP-Glc) im Zytosol auf Dol-P übertragen werden. Auch die Dolichol-verknüpften Zucker werden durch RFT1 in das Lumen transloziert und dort von weiteren Glykosyltransferasen auf das lipidverknüpfte Oligosaccharid übertragen.

Das vollständige dolichol-verknüpfte Oligosaccharid, bestehend aus zwei GlcNAc-, neun Man- und drei Glc-Resten, wird durch einen Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) en bloc auf die Amidgruppe von Asn in der Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr in naszierenden Proteinen überführt (Knauer & Lehle, 1999), wobei Dolichol-Pyrophosphat freigesetzt wird (Lahrmann, 2007).

Im Rahmen der ersten Prozessierungsschritte erfolgt noch im ER durch den Calnexin-Calreticulin Zyklus, sowie weiteren beteiligten Proteinen, eine Chaperon-Kontrolle der korrekten Proteinfaltung, bevor der vesikuläre Transport des Glykoproteins zum Golgi-Apparat stattfindet (Tatu und Helenius, 1997) (Abb. 3).

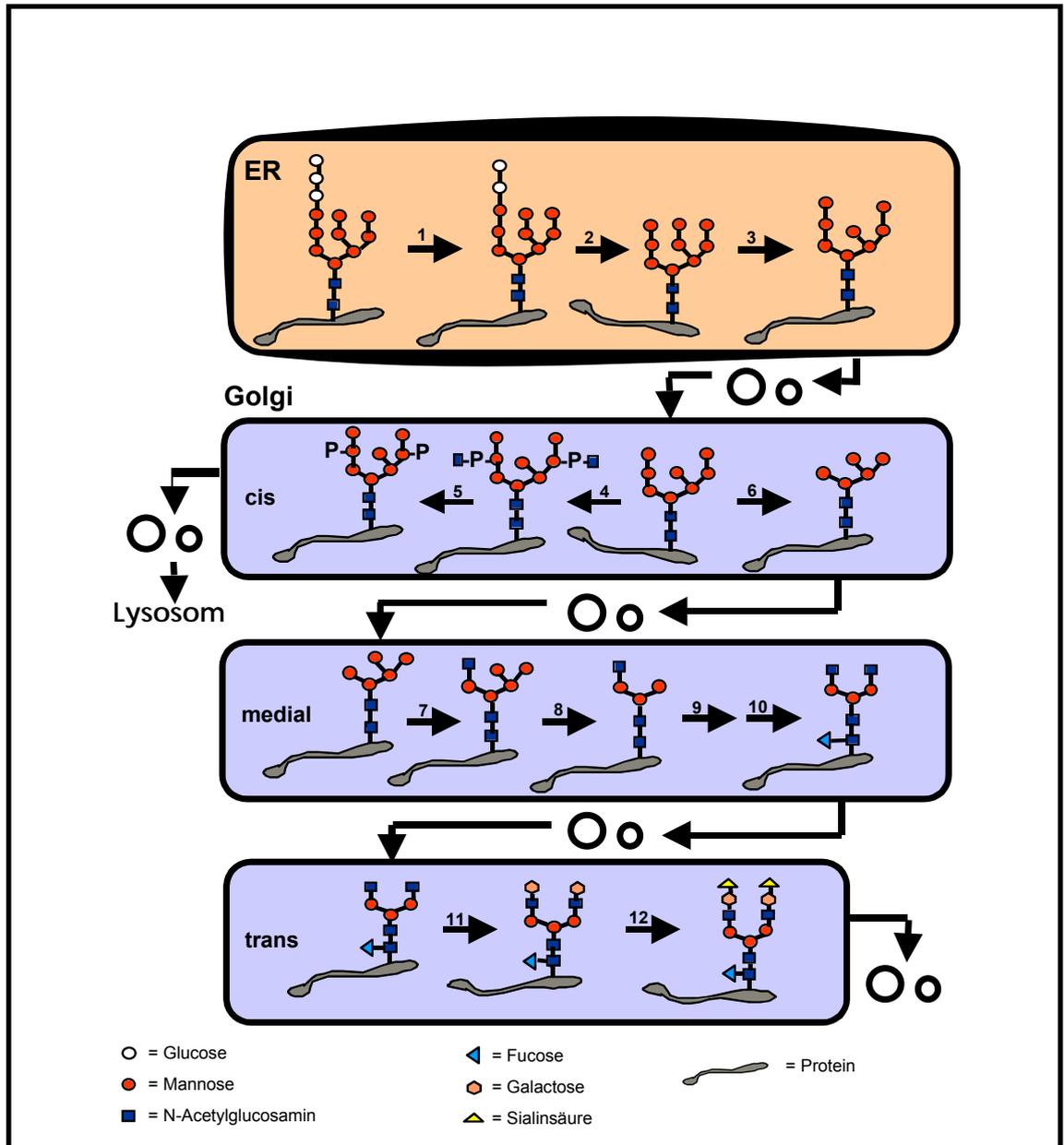


Abb. 3: Prozessierung Protein-verknüpfter Oligosaccharide. 1 = α -Glucosidase I, 2 = α -Glucosidase II, 3 = ER- α -1,2-Mannosidase, 4 = N-Acetylglucosaminylphosphotransferase, 5 = GlcNAc-1-P-diester- α -N-Acetylglucosaminidase, 6 = Golgi- α -Mannosidase I, 7 = N-Acetylglucosaminyltransferase I, 8 = Golgi- α -Mannosidase II, 9 = GlcNAc-Transferase II, 10 = Fucosyltransferase, 11 = Galactosyltransferase, 12 = Sialyltransferase

In den einzelnen Golgi-Kompartimenten findet dann die weitere Prozessierung der Glykanstrukturen statt, wobei die endgültige Form von der späteren Funktion des betreffenden Glykoproteins abhängt. Die an der Prozessierung beteiligten Glykosidasen und Glykosyltransferasen sind spezifisch in Zisternen des cis-, medialen- oder trans-Golgi-Apparates lokalisiert. Gegenwärtig existieren zwei

Transportmodelle für den Transport neusynthetisierter Proteine durch den Golgi-Apparat, das vesikuläre Modell und das Zisternen-Reifungs Modell.

Das vesikuläre Modell von Palade (1975) beschreibt den gesamten biosynthetischen Verkehr innerhalb der Zelle durch Vesikel, die durch Abknospung von einem stabilen Donorkompartiment entstehen und mit einem Akzeptorkompartiment fusionieren. Bei dem Zisternen-Reifungsmodell durchwandern die einzelnen Zisternen den Golgi-Apparat von der cis- zur trans-Seite, wobei die Frachtmoleküle im Lumen der jeweiligen Zisternen verbleiben. Zwingend erforderlich bei diesem Modell ist der retrograde vesikuläre Transport von Golgi-Enzymen zwischen den Zisternen. Da beide Modelle einzeln betrachtet nicht alle beschriebenen Phänomene des Golgi-Transportes erklären können, wurde von Mironov et al. (2005) eine Kombination beider Modelle, das sogenannte Carrier-Reifungs-Progressions-Modell, postuliert.

Die prozessierten Oligosaccharide können in drei Kategorien eingeteilt werden, den Komplex-, den Hybrid- und den Mannose-reichen-Typ (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Alle drei Typen basieren auf derselben Pentasaccharid-Kernsequenz (Core) $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Die Unterschiede liegen in den peripheren Bereichen der Oligosaccharide (Abb. 4).

In Vertebraten wird am häufigsten der Komplex-Typ gefunden, dessen Prozessierung im Golgi-Apparat erfolgt. Im cis-Golgi werden zunächst drei Mannosereste, im medialen Golgi zwei weitere Mannosereste abgespalten (Trimming) und gleichzeitig zwei GlcNAc und oftmals ein Fucoserest angehängt. Schließlich wird im trans-Golgi das Oligosaccharid durch die Verknüpfung von jeweils zwei Galaktosyl- (Gal) und Sialinsäureresten (NANA) komplettiert.

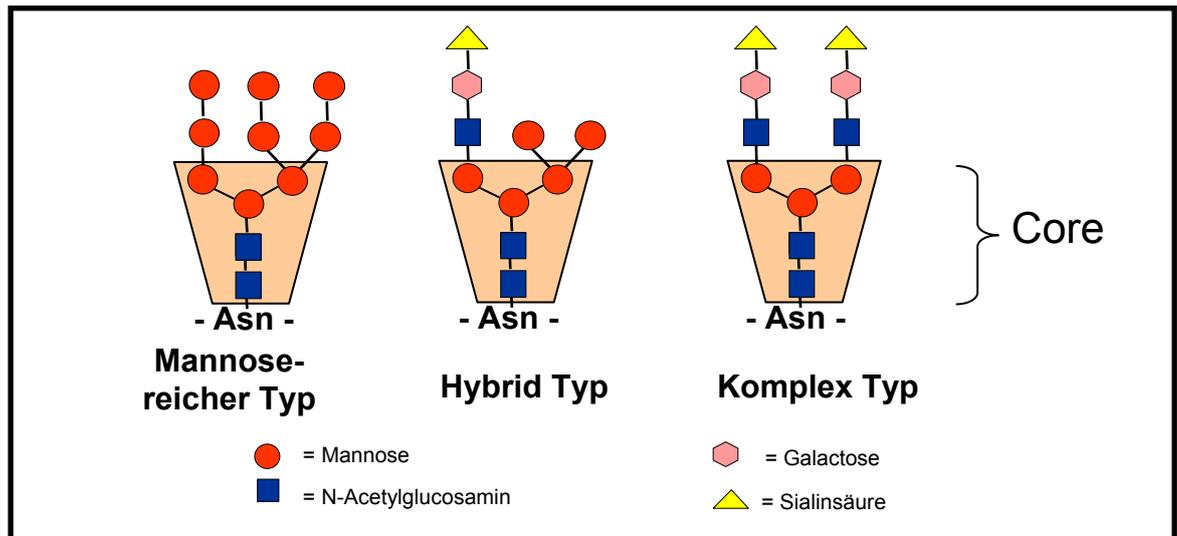


Abb. 4: Einteilung der N-verbundenen Oligosaccharide in den Mannose-reichen, den Hybrid- und den komplexen Typ.

1.1.2.2 Die O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung findet überwiegend in den sekretorischen Zellorganellen von Eukaryoten statt. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung, wo die Zuckerkette en bloc auf das Protein übertragen wird, werden bei der O-Glykosylierung die Monosaccharide nacheinander direkt auf das Glykoprotein übertragen. Der häufigste Vertreter der O-Glykosylierung ist der Mucin-Typ, dessen Zuckeranteil über eine α -Bindung des GalNAc an Ser/Thr mit dem Protein verknüpft ist. Eine Konsensussequenz, wie sie für die N-Glykosylierung existiert, konnte für die Initiierung der O-Glykosylierung bisher nicht gefunden werden. Allerdings ergaben vergleichende Studien Algorithmen für die Vorhersage O-glykosylierter Ser/Thr-Reste in Abhängigkeit von den umgebenen AS-Sequenzen (Hansen et al., 1996). So wurde häufig ein Prolin (Pro), bzw. eine geladene Aminosäure an Position -1 und +3 relativ zur glykosylierten AS gefunden. Ebenfalls scheinen sekundäre Strukturelemente eine Rolle zu spielen, da Pro ein α -Helix-Brecher ist und die Bildung von β -Faltblättern sowie β -Turns begünstigt. So wird die O-Glykosylierung häufig an vorhergesagten β -Turns vorgefunden (Gooley & Williams 1994, Wilson et al. 1991). Die ubiquitäre Übertragung des GalNAc wird durch mindestens 15 bislang beschriebenen GalNAc-Transferasen (ppGalNAcT) katalysiert, welche gewebespezifisch expremiert werden und zudem eine z.T. überlappende Substratspezifität aufweisen. Durch die nachfolgenden Verknüpfungen unterschiedlicher Monosaccharide zum initialen GalNAc-Rest sind bei den Mucinen eine Vielzahl an möglichen Zuckerstrukturen beschrieben

worden. Weiterhin können durch die unterschiedlichen Verknüpfungen die O-Glykane in mehrere Hauptklassen (Core 1-8) eingeteilt werden (Brockhausen, 1999) (Abb. 5).

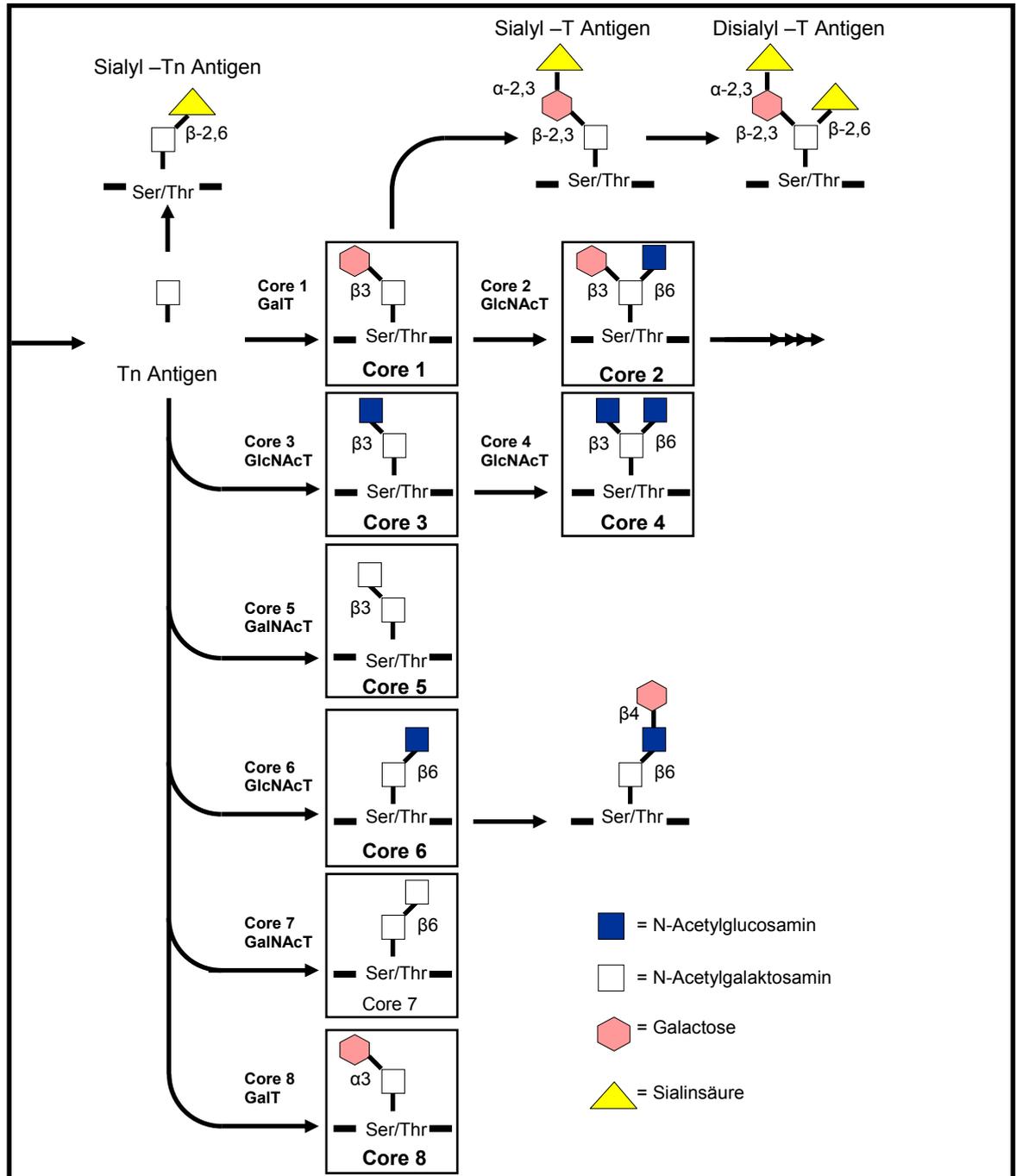


Abb. 5: Klassifizierung der Mucin-Typ O-Glykane .

1.2 Defekte der Proteinglykosylierung

1.2.1 Defekte der N-Glykosylierung

Erblich bedingte Störungen der N-Glykosylierung beim Menschen werden als Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) bezeichnet (Jaeken et al., 1991; Jaeken und Matthijs, 2007). Die Glykosylierungsdefekte werden durch Mutationen in spezifischen Proteinen hervorgerufen, welche einen Mangel an Nukleotid-aktivierten oder Lipid-verknüpften Zuckern, Defekte des Transfers von Zuckerresten oder Oligosacchariden auf Glykoproteine oder Defekte in der Prozessierung von Protein-verknüpften Oligosacchariden zur Folge haben.

Die CDG werden in zwei Gruppen unterteilt. Unter CDG-I fasst man Defekte zusammen, die die Synthese Lipid-verknüpfter Oligosaccharide im Cytosol und im ER sowie deren Transfer auf neusynthetisierte Glykoproteine betreffen. Defekte in der anschließenden Prozessierung im ER und Golgi-Apparat bezeichnet man als CDG-Typ II. Bisher konnten die molekularen Ursachen für 23 verschiedene CDG-Typen identifiziert werden (Tab. 1).

CDG tritt je nach Typ mit einer Inzidenz von 1:50.000 bis 1:100.000 (Seta N, 2004) auf, wobei CDG-Ia mit mehr als 500 (Krasnewichet al., 2007) betroffenen Patienten die mit Abstand häufigste Form darstellt, gefolgt von CDG-Ic und CDG-Ib. Der klinische Phänotyp äußert sich bei fast allen Erkrankung durch mehr oder weniger schwere Entwicklungsstörungen, psychomotorische Retardierung, Muskelhypotonie, Hirnatrophie und Krampfanfällen. Bei einzelnen Typen wurden zusätzliche Symptome wie Strabismus, invertierte Brustwarzen oder häufige Infektionen beobachtet (Leroy, 2006).

Die Diagnostik im Falle eines CDG-Verdachts beginnt mit der isoelektrischen Fokussierung des Serumtransferrin. Im Normalfall sind zwei biantennäre Komplextyp Oligosaccharide mit je zwei negativgeladenen Sialinsäureresten an das Serumtransferrin gebunden. Durch den partiellen oder auch vollständigen Verlust der Oligosaccharide und die damit einhergehende Ladungsveränderung kommt es zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Proteins (van Eijk et al., 1983). Im Anschluss können für einzelne Enzyme Aktivitätsmessungen durchgeführt werden, um einen Defekt biochemisch zu charakterisieren. Die abschließende Diagnose erfolgt über die molekularbiologische Analyse des entsprechenden Gens.

Tab. 1: Publierte CDG-Typen

| CDG-Typ | Betroffenes Protein | Gen | genet. Lokus | OMIM |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|------------------|
| CDG-Ia | Phosphomannomutase II | <i>PMM2</i> | 16p13 | 212065 601785 |
| CDG-Ib | Phosphomannose Isomerase | <i>MPI</i> | 15q22 | 154550 602579 |
| CDG-Ic | Dolichol-P-Glc:Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dolichol Glucosyltransferase | <i>hALG6</i> | 1p31 | 604566 604655 |
| CDG-Id | Dolichol-P-Man: Man ₅ GlcNAc ₂ -PP-Dolichol Mannosyltransferase | <i>hALG3</i> | 3q27 | 601110 |
| CDG-Ie | Dolicholphosphat-Mannose Synthase 1 | <i>DPM1</i> | 20q13 | 608789 |
| CDG-If | Bereitstellung von Dolichol-P-Mannose und Dolichol-P-Glucose im Lumen des endoplasmatischen Retikulums | <i>MPDU1</i> | 17p13 | 604041 |
| CDG-Ig | Dolichol-P-Man:Man ₇ GlcNAc ₂ -PP-Dolichol Mannosyltransferase | <i>hALG12</i> | 22q13 | 607143 |
| CDG-Ih | Dolichol-P-glucose:Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dolichol-□1,3-Glucosyltransferase | <i>hALG8</i> | 11p15 | 608104 |
| CDG-Ii | GDP-Man:Man ₁ GlcNAc ₂ -PP-Dolichol Mannosyltransferase | <i>hALG2</i> | 9q22 | 607906 |
| CDG-Ij | UDP-GlcNAc:Dolichol Phosphat N-Acetylglucosamine-1-Phosphat Transferase | <i>DPAGT1</i> | 11q23 | 608093 |
| CDG-Ik | GDP-Man:GlcNAc ₂ -PP-Dolichol Mannosyltransferase | <i>hALG1</i> | 16p13 | 608540 |
| CDG-Il | Dolichol-P-Mannose:□1,2 Mannosyltransferase | <i>hALG9</i> | 11q23 | 608776 |
| CDG-Im | Dolichol-Kinase | <i>DOLK</i> | 9q34 | 610768 |
| CDG-In | RFT1-Protein (Flippase) | <i>RFT1</i> | 3p21 | 611908 |
| CDG-Ila | Golgi N-Acetyl-Glucosaminyltransferase II | <i>MGAT2</i> | 14q21 | 212066 |
| CDG-Ilb | Glucosidase I im endoplasmatischen Retikulum | <i>GCS1</i> | 2p13 | 606056 |
| CDG-Ilc | Golgi GDP-Fukose Transporter | <i>FUCT1</i> | 11p11 | 605881 266265 |
| CDG-Ild | Golgi UDP-Galactose:N-Acetylglucosamin □-1,4-Galaktosyltransferase | <i>β4GALT1</i> | 9p13 | 607091 |
| CDG-Ile | Untereinheit 7 des COG-Komplexes innerhalb des Golgi-trafficking | <i>COG7</i> | 16p12 | 608779 606978 |
| CDG-Ilf | CMP-NANA Transporter | <i>CMP-NANA Transporter</i> | 6q15 | 603585 |
| CDG-Ilg | Untereinheit 1 des COG-Komplexes innerhalb des Golgi-trafficking | <i>COG1</i> | 17q25 | 611209 |
| CDG-IIh | Untereinheit 8 des COG-Komplexes innerhalb des Golgi-trafficking | <i>COG8</i> | 16q22 | 611182 |
| CDG-IIi | Untereinheit a2 der H ⁺ -ATPase | <i>ATP6V0A2</i> | 12q24 | 611716 |

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

1.2.2 Defekte der O-Glykosylierung

Diesen Defekten liegen Mutationen in einzelnen Glykosyltransferasen zugrunde, die für den partiellen oder sogar vollständigen Verlust der an Ser/Thr gebundenen Zuckerketten verantwortlich sind. Bisher konnten 12 unterschiedliche O-Glykosylierungsdefekte beschrieben werden (Tab. 2).

Tab. 2: Defekte der O-Glykosylierung

| Krankheit | Betroffenes Protein | Gen | genet. Lokus | OMIM |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|--------------|----------------------------|
| Walker-Warburg Syndrom | Protein O-Mannosyltransferase | <i>POMT1/POMT2</i> | 9q34/14q24 | 236670 |
| Fukuyama Muskeldystrophie | Fukutin | <i>FCMD</i> | 9q31 | 253800 |
| Congenital Muscular Dystrophy Typ 1c (MDC1C) | Fukutin-related Protein | <i>FKRP</i> | 19q13 | 606612 |
| Muscle-Eye-Brain disease (MEB) | Protein O-Mannosyl-1,2-N-GlcNAc-Transferase 1 | <i>POMGnT1</i> | 1p33 | 606822 |
| Congenital Muscular Dystrophy Typ 1d (MDC1D) | Putative Glykosyltransferase | <i>LARGE</i> | 22q12 | 608840 |
| Hereditary Inclusion body-myopathy-II (IBM2) | UDP-GlcNAc Epimerase/Kinase | <i>GNE</i> | 9p12 | 600737 |
| Ehlers-Danlos Syndrom | β -1,4-Galaktosyltransferase 7 | <i>B4GalT7</i> | 5q35 | 130070 |
| Hereditary multiple exostosis | Glucuronyltransferase/GlcNAc-Transferase | <i>Ext1/Ext2</i> | 8q24/11p12 | 133700 |
| Chondrodysplasias | Sulfat-Anion Transporter | <i>DTDST/SLC26A2</i> | 5q32 | 222600 600972 256050 |
| Spondyloepimetaphyseal Dysplasia | 3'-phosphoadenosin-5' Phosphosulfat Synthase | <i>ATPSK2</i> | 10q22 | 603005 |
| Macular corneal Dystrophy Types I and II | Keratansulphate 6-O-Sulfotransferase | <i>CHST6</i> | 16q22 | 217800 |
| Familial tumoral calcinosis | GalNAc Transferase 3 | <i>GalNT3</i> | 2q24 | 211900 |
| Tn Syndrom | Chaperone of β -1,3 GalT | <i>COSMC</i> | Xq23 | 300622 |

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

Der klinische Phänotyp dieser Erkrankungen ist sehr heterogen, unterscheidet sich aber in einigen Aspekten von CDG-Patienten. So werden bspw. Defekte von Enzymen (POMT1/POMT2, POMGnT1), welche die O-Mannosylierung betreffen, unter Congenital Muscular Dystrophy zusammengefasst (Mendell et al., 2006). Das klinische Bild ergibt sich aus der Hypoglykosylierung des α -Dystroglykans oder damit interagierender Proteine (Fukutin) und geht mit schweren Muskeldystrophien und Gehirn-Missbildungen einher. Zu dieser Gruppe gehören das Walker-Warburg Syndrom (Dobins et al., 1989), Fukuyama Muskeldystrophie (Fukuyama et al., 1960) sowie Muscle-Eye-Brain disease (Raitta et al., 1978). Bisher bekannte Defekte der Glykosaminoglykan Biosynthese werden durch Mutationen der B4GalT7 (Faiyaz-UI-Haque et al., 2004) und EXT1/EXT2 (McCormick et al., 2000) hervorgerufen und weisen Auffälligkeiten im Skelettbereich, den Knorpeln und der extrazellulären Matrix auf. Bei der familiären tumoralen Calcinose kommt es zu subkutanen Calciumeinlagerungen (Topaz et al., 2004), während das Tn-Syndrom durch das Fehlen des T-Antigens zu einer Autoimmunantwort führt, welches wiederum für die Entstehung von Anämien, Leukopenien und Thrombozytopenien verantwortlich ist (Ju & Crummings, 2005). Aufgrund des sehr unterschiedlichen Verlaufs der einzelnen Defekte existiert keine generelle Methode für die Routinediagnostik. Die Verdachtsfälle werden ausgehend von der Klinik auf bestimmte Gendefekte hin untersucht. Neuere Veröffentlichungen zeigten jedoch für Congenital Muscular Dystrophy, dass die Ausprägung des klinischen Phänotyps nicht nur von dem betroffenen Protein abhängig ist, sondern auch durch Mutationen anderer Proteine geprägt werden kann (Godfrey et al., 2007). So konnte bei einem Patient mit Walker Warburg Syndrom keine Mutationen in POMT1/POMT2 nachgewiesen werden, sondern in LARGE, dessen klinischer Phänotyp normalerweise durch die mildere Gliedergürteldystrophie geprägt ist.

1.2.3 Kombinierte Glykosylierungsdefekte

In den letzten Jahren wurden einige Erkrankungen mit multiplen Glykosylierungsstörungen gefunden, die sich nicht durch Defekte in einzelnen Schritten der Glykoproteinbiosynthese erklären lassen. So wurden bei CDG-Ile, CDG-IIg, CDG-IIh und CDG-IIi Störungen in der O- und N-Glykanbiosynthese beschrieben.

CDG-IIe (Wu et al., 2004), CDG-IIg (Foulquier et al., 2006) und CDG-IIh (Kranz et al., 2007) konnten auf Mutationen in verschiedenen Untereinheiten des Conserved Oligomeric Golgi-Komplex (COG-Komplex) zurückgeführt werden, die zu einer Störung des intra-Golgi Transportes führen.

CDG-IIi wird durch Mutationen in der A2 Untereinheit der V-ATPase (ATP6V0A2) hervorgerufen. Diese UE ist direkt am Protonentransport in den Golgi-Apparat beteiligt, wodurch generell sowohl die enzymatischen, als auch Transportprozesse innerhalb des Golgi-Apparates beeinträchtigt sind (Kornak et al., 2008).

1.2.3.1 Der COG-Komplex

Der COG-Komplex ist aus acht Untereinheiten aufgebaut (Tab. 3). Durch elektronenmikroskopische Analysen konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten des COG-Komplexes zwei Schleifen ausbilden (COG1-4 und COG 5-8) (Ungar et al., 2002). Interaktionsanalysen ergaben, dass sich 2 heterotrimere Strukturen, COG2-4 und COG5-7, ausbilden, die über das Heterodimer bestehend aus COG1 und COG8 miteinander verbunden sind (Ungar et al., 2006) (Abb.6). Untersuchungen der zellulären Lokalisation ergaben, dass der COG-Komplex Golgi-assoziiert im Zytoplasma vorliegt (Oka et al., 2004).

Tab. 3 : Frühere Nomenklatur der COG-Untereinheiten

| COG-UE | Hefe (alte Bezeichnung) | human (alte Bezeichnung) | Molekulargewicht (human) [kDa] |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| COG1 | Cod3p, Sec36p, Tfi1p | IdlBp | 109 |
| COG2 | Sec35p | IdlCp | 83 |
| COG3 | Grd20p, Sec34p | hSec34 | 94 |
| COG4 | Cod1p, Sec38p, Sgf1p, Tfi3p | hCod1 | 89 |
| COG5 | Cod4p, Api4p | GTC-90 | 92 |
| COG6 | Cod2p, Sec37p, Tfi2p | hCod2 | 68 |
| COG7 | Cod5p | - | 86 |
| COG8 | Dor1p | hDor1 | 89 |

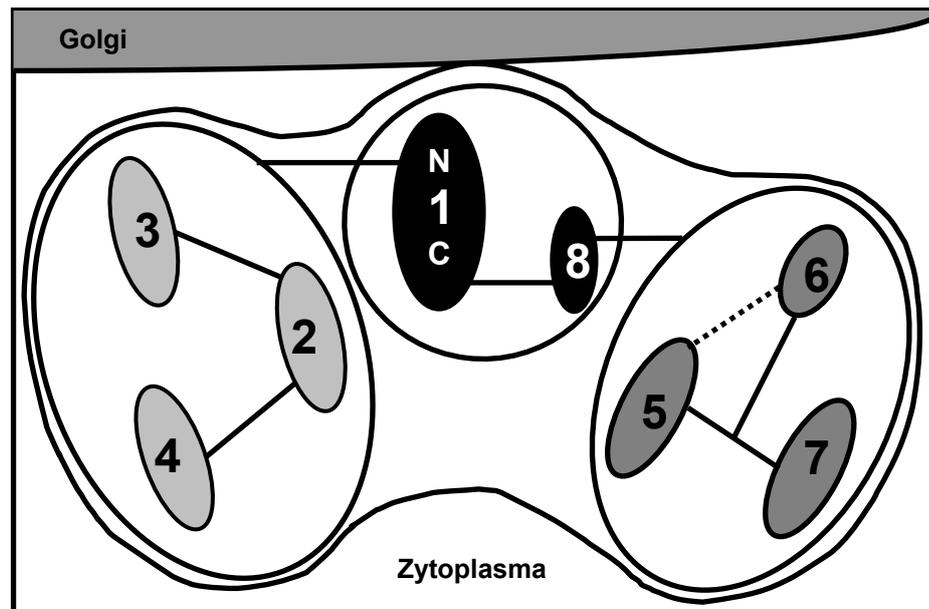


Abb. 6: Struktureller Aufbau des COG-Komplexes

1.3.1.2 Funktion des COG-Komplexes

Seit der Charakterisierung der ersten COG-Mutanten mit ihren multiplen Glykosylierungsstörungen gab es mehrere Hypothesen bzgl. der Wirkungsweise des Komplexes, bzw. dessen Untereinheiten. Eine Hypothese ist, dass der COG-Defekt generell das Milieu innerhalb des Golgi beeinflusst, was dessen generelle Funktion beeinträchtigt (Kingsley et al., 1986). Eine weitere Hypothese besagt, dass ein solcher Defekt mehrere Transportmechanismen, ER Ausgang und ER-Golgi Transport eingeschlossen, aufhebt (van Rheenen et al., 1998; van Rheenen et al., 1999; Kim et al., 1999; Morsomme und Riezmann, 2002). Eine Vielzahl an Veröffentlichungen verdeutlicht eine Rolle im retrograden Transport mittels COP1 Vesikeln innerhalb des Golgi-Apparates, sowie vom Endosom zum Golgi (Whyte und Munro 2001; Whyte und Munro 2002; Ram et al., 2002; Suvorova et al., 2002; Bruinsma et al., 2004; Oka et al., 2004; Zolov und Lupashin, 2005) (Abb. 7). Grund für diese Vermutung sind die Interaktionen des COG-Komplexes mit SNARE-Proteinen (soluble NSF attachment protein receptor), Rab GTPasen und Hüllproteinen von COP1-Vesikeln, allesamt an dem vesikulären Transport beteiligte Proteine. In COG-defizienten CHO-Zellen wurde die Verminderung von einigen Golgi-Proteinen, wie bspw. Mannosidase II, GPP130, Giantin und GS15, beobachtet (Oka et al., 2004). Ferner konnte in interferenz RNA Experimenten durch die effiziente Depletion von Cog 3 in

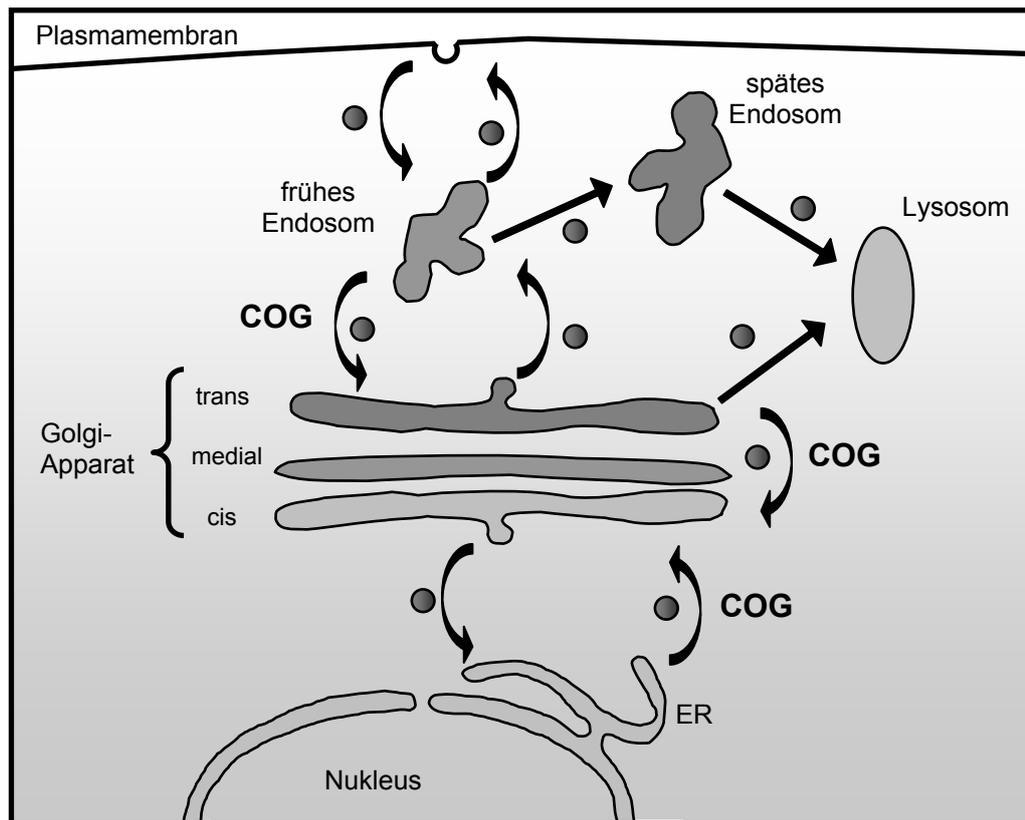


Abb. 7: Vereinfachte Darstellung des intrazellulären Vesikeltransportes in eukaryotischen Zellen. Dargestellt sind die Transportprozesse in denen der COG-Komplex involviert ist.

HeLa-Zellen eine Akkumulation von COG-Komplex abhängigen (COG-complex dependent, CCD) Vesikeln gezeigt werden, in denen die o.g. verminderten Proteine nachgewiesen werden konnten (Zolov und Lupashin, 2005). Daraus lässt sich ableiten, dass der COG-Komplex die Funktion eines 'tethering factors' innehat, dessen Aufgabe die initiale Interaktion der Vesikel mit der Zielmembran darstellt.

1.3.1.3 Defekte des COG-Komplexes

Erstmals beschrieben wurde ein Defekt des COG-Komplexes von Wu et al., 2004, wo bei zwei Geschwistern eine Defizienz der COG7-Untereinheit identifiziert wurde. Die Klinik dieser Patienten wies eine perinatale Asphyxie, generalisierte Hypotonie, Hepatosplenomegalie, Dysmorphien und schwere epileptische Anfälle auf (Tab. 4). Im Alter von fünf und zehn Wochen starben die Patienten in Folge von wiederkehrenden Infektionen und Herzinsuffizienz. Bis heute konnten insgesamt sieben COG7-Patienten identifiziert werden, die alle einen ähnlichen

klinischen Phänotyp zeigten wie der Indexpatient (Morava et al., 2007; Ng et al., 2007; Zeevaert et al., 2008). Allen gemein war, dass sie nordafrikanischer Herkunft waren und dass alle eine homozygote, intronische Mutation zeigten. 2006 wurde von Foulquier et al. erstmals eine Cog1-Defizienz beschrieben. Die portugiesische Patientin wies eine generalisierte Hypotonie bei normaler Muskelstärke, antimongoloide Augenlieder und verkleinerte Hände und Füße auf. Nach dem ersten Lebensmonat wurden Gedeihstörungen und nach sieben Monaten Wachstumsretardierung, eine progressive Mikrozephalie, eine leichte cerebrale und cerebellare Atrophie und eine vergrößerte Leber beobachtet. Die homozygote Insertion eines Nukleotids (c.2659-2660insC) führt dabei zu einem frühzeitigen Stop-Codon und damit zum Verlust der C-terminalen 80 Aminosäuren. Kürzlich wurden bei zwei weiteren Patienten eine homozygote intronische Mutation (c.1070+5G>A) beschrieben, die zu einer Reduktion auf 3% der normalen Transkriptmenge führte (Zeevaert et al., 2009). Beim ersten Patienten wurden Dysmorphien, wie zum Beispiel tiefliegende Ohren oder ein verkürzter Hals, sowie Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Mikrognathie und Osteopenie beobachtet. Der klinische Phänotyp des zweiten Patienten ist geprägt durch faciale Dysmorphien, eine moderate geistige Retardierung, Mikrozephalie, Strabismus und cerebellare Atrophie.

Tabelle 4: Klinischer Vergleich der COG-Patienten

| Klinik | COG1 | COG7 | COG8 |
|-----------------------------------|------|------|------|
| Letal im ersten Lebensjahr | - | + | - |
| Progressive Mikrozephalie | + | + | + |
| Mikrozephalie bei Geburt | - | + | - |
| Wachstumsretardierung | + | + | + |
| Gedeihstörungen | + | + | + |
| Hypotonie | + | + | + |
| Hyperthermisch Perioden | - | + | - |
| cerebrale Atrophie | + | + | + |
| reduzierte Körperlänge bei Geburt | - | + | - |
| Faltige, schlaffe Haut | - | + | - |
| Erhöhte Leberenzymwerte | + | + | + |

Defizienzen der COG8 Untereinheit konnten 2007 von Foulquier et al. und Kranz et al. gleichzeitig gezeigt werden. Die von Foulquier beschriebene spanische Patientin entwickelte sich in der frühen Säuglingsphase normal und erst ab dem 6. Lebensmonat wurde eine akute Enzephalopathie, der Verlust der psychomotorischen Fähigkeiten, Hypotonie, Pseudoptosis und eine wechselnde Esotropie festgestellt. Im späteren Verlauf kamen eine fortschreitende Ataxie und Muskelzucken hinzu. Die homozygote nonsense-Mutation 1611C>G führt auf Proteinebene zum Verlust der 76 C-terminalen Aminosäuren.

Der zweite COG8-defiziente Patient zeigte einen ähnlichen Phänotyp (Kranz et al., 2007). Im Alter von 8,5 Jahren war der Patient körperlich und geistig stark retardiert, zeigte einen generellen Muskelmangel bei erheblichen Ernährungsproblemen. Bei diesem Patienten wurden zwei heterozygote Mutationen entdeckt, einer Splice-Mutation (IVS3+1G>A) und die Deletion von 2 Basen 1687-1688delTT. Auf Proteinebene führen die Mutationen zu verkürzten Proteinen, bei der Splice-Mutation um 306 Aminosäuren und die Deletion die letzten 47 C-Terminalen Aminosäuren.

2 Problemstellung

‘Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)’ umfassen zurzeit eine Gruppe von 23 verschiedenen molekularen Defekten der Glykoproteinbiosynthese des Menschen, die in Abhängigkeit ihrer zellulären Lokalisation in CDG-I und CDG-II untergliedert werden.

Im Rahmen unserer CDG-Routinediagnostik konnte bei einer Patientin mit Krampfanfällen und Blutgerinnungsstörungen zunächst ein Glykosylierungsdefekt unklarer Genese identifiziert werden, wobei die isoelektrische Fokussierung des Serumtransferrins auf den Verlust einzelner Zuckerreste und damit auf eine Erkrankung des CDG-II Typs hindeutete. Weiterführende chromatographische und massenspektroskopische Untersuchungen der Protein-verknüpften Oligosaccharide des Transferrins bestätigten einen Defekt in der N-Glykosylierung, der auf das Fehlen von Galaktose-, sowie Sialinsäureresten zurückzuführen war. Darüber hinaus ergab die Untersuchung des Apolipoproteins CIII mittels isoelektrischer Fokussierung einen Defekt in der O-Glykosylierung. Diese Befunde deuteten auf einen generalisierten Defekt der Proteinglykosylierung hin, der nicht durch Defekte einzelner Glykosyltransferasen erklärt werden kann

Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Ursache des neuen Glykosylierungsdefektes unserer Patientin S.E.S. aufzuklären. Dabei sollte die Morphologie des Golgi-Apparates, die Lokalisation einzelner Golgi-residenter Proteine, sowie der intra-Golgi Transport untersucht werden. Nach der Aufklärung der genetischen Ursache der Erkrankung sollte durch Komplementationsstudien mit Hilfe retroviraler Expressionssysteme die Funktionalität der entsprechenden Mutation in den Patientenfibroblasten bewiesen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Äkta FPLC mit Fraction Collector Frac 900 | GE Healthcare, München |
| Analysenwaagen Typ M5P und CP3202P | Sartorius, Göttingen |
| Autoklav Typ 5075ELV | Tuttnauer Systec, Wettenberg |
| Biofuge pico | Heraeus, Osterode |
| Brutschrank Typ 2771 | Köttermann, Häningsen |
| Brutschrank Typ MCO-20AIC | Sanyo, Bad Nenndorf |
| DNA-Sequenzier Typ 310 | ABI Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Densitometer GS -700 | Bio-Rad, Karlsruhe |
| Dounce-Homogenisator | Kleinfeld Labortechnik, Gehrden |
| Durchlicht-Mikroskop Typ ID03 | Zeiss, Oberkochen |
| Eismaschine | Ziegra, Isernhagen |
| Elektrophoresekammern für Agarosegele | Eigenbau, Werkstatt des Instituts |
| Elektrophoresekammer für SDS-Page | GE Healthcare, München |
| Eppendorfzentrifugen Typ 5402, 5414, 5415D | Eppendorf, Hamburg |
| Eraser für Phosphoimager-Screens | GE Healthcare, München |
| Gefrierschrank -80°C | Colora Messtechnik, Lorch |
| GeneAmp PCR System 2700, 9700 | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Handcounter Typ LB122 | Berthold, Bad Wildbad |
| Heizblock Typ Thermostat 5320 | Eppendorf, Hamburg |
| Inkubationsschüttler Typ G25 | New Brunswick Scientific, Edison, USA |
| Inkubator | Memmert, Schwabach |
| Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO ₂ -Atmosphäre | Forma Scientific, Marietta, USA |
| Kodak RP X-Omat 2000 Processor | Kodak, Stuttgart |
| Kühlzentrifuge Typ J2-MC | Beckmann, München |

| | |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| JA-14 Rotor für Kühlzentrifuge | Beckmann, München |
| Kühlzentrifuge Typ Biofuge Fresco | Heraeus, Hanau |
| Liquid-Szintillation-Counter Typ LS6500 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Magnetrührer Typ MR3001 | Heidolph, Schwabach |
| Micro-Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Mikrowellenherd | Siemens, München |
| Mini-Protean III | Bio-Rad, Karlsruhe |
| Multiphor II | GE Healthcare, München |
| MultiTemp III | GE Healthcare, München |
| pH-Meter Typ InoLab | WTW, Weilheim |
| PhastSystem™ | GE Healthcare, München |
| Pipette (10 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe Typ Pipet Aid XP | Drummond, Broomall, USA |
| Schüttelwasserbad | Köttermann, Häningsen, Göttingen |
| Semi-Dry-Blot-System | cti GmbH, Idstein/Taunus |
| Spannungsgeräte | Hölzel, München |
| Spektralphotometer Spectra max plus 384 | Molecular Devices, Chicago, USA |
| Spinning Disk Confocal Laser Mikroskop (ERS6) | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| Sterilbank Typ Lamin Air HLB2448 | Heraeus, Osterode |
| Sterilbank Typ SG400 | Baker Company, Sanford, USA |
| Stickstofftank Biosafe Chronos | Messer, Griesheim |
| Thermomixer Typ compact und 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Typhoon Trio | GE Healthcare, München |
| Ultraflex TOF/TOF | Bruker Daltonik GmbH, Bremen |
| Ultraschall-Desintegrator Typ Sonifier 450 | Branson, Dietzenbach |
| Ultrazentrifuge Typ Optima LE-80K | Beckman Coulter, Krefeld |
| Ultrazentrifuge Typ Optima TLA | Beckman Coulter, Krefeld |
| UV-Transilluminator | MWG Biotech, Ebersberg |
| Vortex-Genie 2 | Bender & Hobein, Zürich, Schweiz |
| Waage Typ 1265MP | Sartorius, Göttingen |
| Wärmeschrank | Memmert, Schwabach |
| Waters Breeze HPLC System (Waters 1525 Binary HPLC pump, | Waters, Eschborn |

Waters 2487 Dual λ Adsorbance Detector,
 Waters Fraction Collector III,
 Waters In-Line Degasser,
 Säulenofen)

Wasserbad Typ 1003

Gesellschaft für Labortechnik,
 Burgwedel

Wipptisch Typ Rocky

Ilf Labortechnik, Wasserburg

Zentrifuge Typ Labofuge

Heraeus, Osterode

3.1.2 EDV

Hardware:

PC Pentium IV, 2.8 GHz, 512MB

G-DAS Datenservice, Hockenheim

Apple Macintosh Typ Power 7300/200

Apple Macintosh, Cupertino, USA

Canon i865 Tintenstrahldrucker

Canon, Krefeld

HL-5250DN Laserdrucker

Brother International GmbH, Bad Vilbel

CanoScanLide25

Canon, Krefeld

Software:

Adobe-Photoshop 6.0

Adobe, San Jose, USA

DNASStar (MegAlign, MapDraw,
 Protean, EditSeq)

DNASStar, Madison, USA

Flex Analysis

Bruker-Daltonic, Bremen

ImageQuant TL

GE Healthcare, München

Quantity One

Bio-Rad, Karlsruhe

Windows 2000 Professional

Microsoft, Bellevue, USA

Windows XP Professional

Microsoft, Bellevue, USA

Windows Office Professional 2003

Microsoft, Bellevue, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterial

6/24/96well-Zellkulturplatten

Greiner, Nürtingen

| | |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| DC Protein Assay Kits | Biorad, Karlsruhe |
| Deckgläser | Thermo Scientific Menzel GmbH, Braunschweig |
| Dialyse-Membran (cutt-off:12-14 kDa) | neolab, Heidelberg |
| Dounce Homogenisator | Wheaton, USA |
| Einfrierkästen | National Lab, Mölln |
| Gewebekulturschalen (3, 6, 10, 15 cm) | Greiner, Nürtingen |
| GelBond Film | GE Healthcare, München |
| Glaskolben | Schott, Mainz |
| GlycoSepC HPLC Säule | Ludger Ltd., Oxfordshire |
| GlycosepN HPLC Säule | Ludger Ltd., Oxfordshire |
| Hybond-N Filter (82 mm, 132 mm) | GE Healthcare, München |
| Hyperfilm ECL | GE Healthcare, München |
| IEF Electrode Strip | GE Healthcare, München |
| Kryoröhrchen | Nunc, Wiesbaden |
| Mikroeinsätze | Machery-Nagel, Düren |
| MTP 384 Ground Steel Targets | Bruker-Daltonic, Bremen |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Objektträger Typ Superfrost plus | Laborservice Brenzinger, Walldorf |
| Objektträger-Kästen | Neolab, Heidelberg |
| Parafilm | American National, Chicago, USA |
| Pasteurpipetten | Schütt, Göttingen |
| PCR-Gefäße Multiply-Pro (0,2 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Phast Gel Cassette | GE Healthcare, München |
| Phastgel Dry Gel | GE Healthcare, München |
| Phastgel Sample Applicator 8/1 | GE Healthcare, München |
| Phosphoimager-Screen | GE Healthcare, München |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Plastikpipetten, steril (2, 5, 10, 25 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Plastik-Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Plastikröhrchen (15, 50 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Plastik-Spritzen, steril BD Biosciences, | Heidelberg |
| Schraubfläschchen mit | Machery-Nagel, Düren |
| Dichtungsscheiben N8-1, braun | |

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Skalpelle, steril | Braun, Melsungen |
| Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Superose 6 10/300 GL | GE Healthcare |
| SW-40-Polyallomer-Röhrchen | Weinheim |
| VectaShield Hard Set | Vector Laboratories, Peterborough, UK |
| Mounting Medium with DAPI | |
| Whatman-Papier (2 mm, 3 mm) | Schleicher und Schüll, Germany |
| Zellkulturflasche (T25, T75) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturschalen (10cm, 15cm) | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht |

3.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| 1,10-Phenanthroline | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Acetonitril | Merck, Darmstadt |
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| Agar | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Agarose | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ameisensäure Suprapur (98%-100%) | Merck, Darmstadt |
| Ammoniak 25% | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ammoniumsulfat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ampholine pH 5-7 | GE Healthcare |
| Anthranilamid (2-AB) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Bacto-Hefe-Extrakt | Roth, Karlsruhe |
| Bacto-Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| Butanol 99,5% | Roth, Karlsruhe |
| CHAPS | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Denhardt's | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Dextransulfat | GE Healthcare, München |
| Dihydroxybenzoesäure (DHB) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| EDTA | Merck, Darmstadt |
| Eisen-(III)-chlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| Ethylacetat | Fluka, Seelze |
| Formaldehyd (36,5-38%) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glutardialdehyd 25% | Merck, Darmstadt |
| H_2O HPLC-Reinheitsgrad | Roth, Karlsruhe |
| HEPES | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumcarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt |
| Natriumsulfat | Roth, Karlsruhe |
| Nitrocellulose Membran ECL | GE Healthcare, München |
| NNN'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Serva, Heidelberg |
| Pharmalyte (pH 4,2-4,9) | GE Healthcare, München |
| Phospho-Wolfram-Säure | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Polyvinylpyrrolidon | Serva, Heidelberg |
| Rivanol (6,9-Diamino-2-ethoxyacridin Laktat) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Rotiphorese Gel 30 (30% Acryl-, 0,8% Bisacrylamidlösung) | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |
| Servalyt (pH 3-5) | Serva, Heidelberg |
| Silbernitrat | Merck, Darmstadt, Germany |
| Sodium dodecylsulfat | Serva, Heidelberg |
| Serva Blue R (Coomassie) | Serva, Heidelberg |

Sorbitol

Trichloressigsäure (TCA) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Merck, Darmstadt

(Tris)

Triton X-100 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tween 20 Roth, Karlsruhe

Urea Roth, Karlsruhe

Vectashield-HardSet Vector Laboratories

3.1.5 Puffer und Stammlösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschriften aus dem Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) angesetzt.

10x PBS: 2 g/l KCl
14,4 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4+2\text{H}_2\text{O}$
80 g/l NaCl
2 g KH_2PO_4
pH 7,4

Hanks: 8 g/l NaCl
0,4 g/l KCl
0,06 g/l KH_2PO_4
0,35 g/l NaHCO_3
1 g/l Glucose
pH 7,4

50xTAE: 2M Tris-Base
100 mM EDTA
pH 8,0 mit Eisessig

10x TE: 100 mM Tris/ HCl
10 mM EDTA
pH 7,6

Spezielle Puffer und Lösungen sind bei der entsprechenden Methode aufgeführt.

3.1.6 Medien zur Anzucht von prokaryotischen Zellen

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 800 ml H₂O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Zur selektiven Bakterienanzucht wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt.

Zur selektiven Bakterienanzucht auf Agarplatten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und einer Abkühlung auf 50 °C wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt. Die Agarlösung wurde in 9 cm Ø Petrischalen gegossen, bei RT abgekühlt und anschließend bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

3.1.7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

| | |
|-----------------------------------------|----------------------------|
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DMEM | PAA, Cölbe |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| FKS | PAA, Cölbe |
| PBS | PAA, Cölbe |
| Trypsin/EDTA | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ ml) | Invitrogen, Karlsruhe |
| L-Glutamin | Invitrogen, Karlsruhe |
| G-418 | Invitrogen, Karlsruhe |

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

3.1.8 Enzyme, Standards und Reagenzien für molekularbiologische, proteinbiochemische und zellbiologische Methoden

| | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| A2-2AB | Ludger Ltd., Oxfordshire |
| ABI PRISM Sequencing Kit | ABI, Foster City, USA |
| Alkalische Phosphatase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| ATP | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DC Protein Assay Kit | Bio-Rad, München |
| DNA-Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNA-Loading Dye | Fermentas, St. Leon-Rot |
| dNTP-Mix | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Fugene | Roche, Mannheim |
| Glucose-Homopolymer Standard | Ludger Ltd., Oxfordshire |
| HMW Gel Filtration Standard | GE Healthcare, München |
| HotStar <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | Qiagen, Hilden |
| Neuraminidase (aus <i>Vibrio cholerae</i>), 1 U/ml | Roche, Mannheim |
| 2,3-Neuraminidase | Takara, Saint-Germain-en-Laye |
| NGA2-2AB | Ludger Ltd., Oxfordshire |

| | |
|------------------------------------|-------------------------|
| N-Glycosidase F | Roche, Mannheim |
| Ampicillin | Calbiochem, Frankfurt |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Cölbe |
| N-Glycanase F | Roche, Mannheim |
| Prestained Protein Standard | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Protease Inhibitor Mix | Serva, Heidelberg |
| Proteinase K | Roth, Karlsruhe |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIA-Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| RediPrime II DNA Labeling Kit | GE Healthcare, München |
| Restriktionsendonukleasen | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Reverse Transcriptase (Omniscript) | Qiagen, Hilden |
| Rnase Inhibitor | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Rneasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| RNA-Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| RNA-Loading Dye | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Super Signal West Pico | Perbio, Bonn |
| Chemilumnescent Substrate (ECL) | |
| Salmon Sperm DNA | Invitrogen, Karlsruhe |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Ultrapure dNTP Set | Fermentas, St. Leon-Rot |

3.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primärantikörper

| | |
|----------------------------------------------|-------------------------|
| Kaninchen anti human α -1-Antitrypsin | DakoCytomation, Hamburg |
| Kaninchen anti human ApoCIII | Biotrend, Köln |

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Kaninchen anti human COG1 | Prof. Daniel Ungar |
| Kaninchen anti human COG4 | Prof. Daniel Ungar |
| Kaninchen anti human COG5 | Prof. Daniel Ungar |
| Kaninchen anti human COG6 | Prof. Daniel Ungar |
| Kaninchen anti human COG7 | Prof. Daniel Ungar |
| Kaninchen anti human Transferrin | DakoCytomation, Hamburg |
| Maus anti GM130 | BD Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgien |
| Maus anti β -Aktin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

3.1.10.2 Sekundärantikörper

| | |
|------------------------------------|-----------------------|
| Ziege anti Kaninchen, HRP Konjugat | Dianova, Hamburg |
| Ziege anti Maus, Alexa568 | Invitrogen, Karlsruhe |

3.1.11 Radioaktive Substanzen

| | |
|------------------------------------------------------|----------------------------|
| $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, Redivue | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| GDP- ^{14}C Fucose | GE Healthcare, München |
| UDP- ^3H Galactose | GE Healthcare, München |
| CMP- ^{14}C NANA | GE Healthcare, München |

3.1.12 Vektoren

| | |
|-------------------------|-------------------------|
| pBluescript SK II (+/-) | Stratagene, Heidelberg |
| pJET | Fermentas, St. Leon-Rot |
| pLNCXII | Clontech, Heidelberg |

3.1.13 Bakterienstämme

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

E. coli XL1-Blue (Genotyp: F-::Tn10 proA+B+ lacI Δ (lacZ)M15/recAI endAI gyrA96(Nal) thi hsdR17 (rK-mK+) supE44 relAI lac)

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

Genotypbezeichnung: siehe Bachmann (1987)

3.1.14 Zelllinien

Primäre Fibroblasten der Patientin S.E.S., eines COG7-Patienten und von Kontrollen wurden durch eine Hautbiopsie gewonnen.

Die retrovirale Verpackungszelllinie FNX-Eco ist eine retrovirale, ecotrope Verpackungszelllinie, die mit a) Moloney GagPol-IRES-Lyt2 (Hygro-Selektion) und b) ecotrope Moloney Hüllprotein (Diphtheria-Selektion) (Nolan et al., Stanford University).

RetroPack PT67 (Clontech) ist eine dualtrope, retrovirale Verpackungszelllinie (NIH 3T3-Derivate) mit Expression des dualtropischen Hüllproteins 10A1 (DHFRSelektion) und Moloney GagPol (TK- Selektion) (Miller und Miller, 1994).

Die stabil transfizierten Zelllinien S.E.S. mock und S.E.S. WT-COG6 wurden von uns mit dem pLNCXII-Vektor generiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methode

3.2.1.1 Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften (z.B. Gentechnikgesetz) durchgeführt. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen wurden, sofern nicht käuflich erworben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert.

Alle folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch "Molecular cloning" (Sambrook et al., 1989) entnommen.

3.2.1.2 Isolierung genomischer DNA

Primäre Hautfibroblasten aus Kulturen wurden trypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Pelletieren wurden die Zellen in 0,25 ml Lysispuffer überführt und resuspendiert. Dieser Ansatz wurde mit 30 µl frisch angesetzter Proteinase K-Stammlösung (10 mg/ml Proteinase K in Lysispuffer) versetzt und für mindestens 2 h bei 56°C im Schüttelinkubator bzw. Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proteinase K sorgt für die Inaktivierung endogener Nukleasen, so dass die DNA intakt bleibt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm (16.000 xg) in der Eppendorf-Zentrifuge wurde zum Überstand 1 ml Ethanol gegeben. Die dabei ausgefallene DNA wurde mit einer Glaspipette mit abgerundeter Spitze aufgenommen, nach einem Waschschrift in 70% Ethanol getrocknet, in 100 µl TE-Puffer oder Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 50 mM EDTA
 100 mM NaCl
 0,5% SDS

3.2.1.3 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das RNeasy-System der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Präparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (RNeasy Handbook, 2001).

3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde photometrisch ermittelt: Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen TE oder H₂O in einer Quarzküvette. $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

3.2.1.5 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Während der reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Für diese Reaktion wurde die Qiagen Omniscript Reverse Transcriptase eingesetzt, wobei nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen worden ist. Pro Reverse Transcriptase-Reaktion wurden jeweils 1 µg total-RNA aus humanen Fibroblasten als Template verwendet. Ein Standard-Ansatz sah folgendermaßen aus:

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| Standard-RT-Reaktion | 1 µg total-RNA |
| | 2 µl 10x Reverse Transcriptase-Puffer |
| | 2 µl 5 mM dNTP |
| | 2 µl spezifischer Primer (10 pmol/µl) |
| | 1 µl RNase Inhibitor |
| | 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase |
| | ad 20 µl H ₂ O _{RNase-frei} |
| | Inkubation für 1 h 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 3.2.16)

3.2.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Lehrach und Frischauf, 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (u) angegeben. Ein Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer h vollständig zu verdauen. Um sicherzustellen, dass der Verdau quantitativ abläuft, wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt.

| | | |
|------------------|----------|-----------------------------------------------------|
| Reaktionsansatz: | x µg | DNA |
| | 2 µl | geeigneter 10x Puffer (nach Angaben der Hersteller) |
| | 2 u | Restriktionsendonuklease |
| | ad 20 µl | H ₂ O |

3.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(QIAquick Gel Extraction Kit, Handbuch, Januar 1999)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Präparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (QIAquick Gel Extraction Kit, Handbook, 1999).

3.2.1.9 Ligation eines DNA-Fragments in einen Plasmidvektor

Über Ligation können DNA-Fragmente in einen Vektor integriert werden. Dazu wurden die DNA und der Vektor in getrennten Ansätzen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Der Vektor wird dabei im Klonierungsabschnitt (multiple cloning site, MCS) geöffnet. Um die Wahrscheinlichkeit des gewünschten Ligationereignisses zu erhöhen, wurde dem Verdauansatz des Vektors Alkalische Phosphatase hinzugefügt. Der dadurch an seinen 5'-Termini dephosphorylierte Vektor kann nun nicht mehr in seiner ursprünglichen Form, sondern nur unter Integration eines fremden Fragmentes ligiert und somit rezirkularisiert werden.

Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach folgendem Schema:

| | | |
|------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ligationsansatz: | x μ l | Vektor-DNA |
| | y μ l | DNA-Fragment (3-5 molarer Überschuss) |
| | 1 μ l | 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (400 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 5 mM ATP) |
| | 1 μ l | PEG 4000 (50 % (w/v); bei blunt end- Ligationen) |
| | z μ l | T4-DNA-Ligase (1 u/ μ l; 2 u bei sticky ends, 5 u bei blunt ends) |
| | ad 10 μ l | H ₂ O |

Die Ligation erfolgte über Nacht bei RT. Anschließend wurde die Ligase durch 15 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

3.2.1.10 Amplifikation von Plasmid-DNA im Prokaryotensystem

3.2.1.10.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

(Qiagen Handbuch "The QIAexpressionist", März 2001)

Zunächst wurden 4 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 99 ml LB-Medium mit 1-2 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis abgekühlt, in ein JA-14-Röhrchen überführt und danach bei 4°C für 5 min bei 4000 xg im JA-14 Rotor zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspension des Pellets in 4 ml kaltem TFB2-Puffer. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 µl und 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, mit KOH auf pH 6,8 eingestellt, sterilfiltriert

3.2.1.10.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung

50 µl kompetente *E. coli* XL-Blue oder DH5-Alpha wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Plasmid-DNA (z.B. nach Ligation) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 1-2 min bei 42 °C unterzogen und 2 min auf Eis wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 30 min im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. In dieser Phase wird die während des Hitzeschocks aufgenommene DNA exprimiert und somit die auf dem Plasmid kodierte Antibiotika-Resistenz ausgebildet. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 6.000 U/min. Das Zellpellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und (entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids) auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platte wurde

über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit den darauf gewachsenen Kolonien wurden jeweils 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft.

3.2.1.10.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

(QIAprep Miniprep Handbuch, Januar 1999)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien wurde das Mini-Plasmid Prep-Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Präparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (RNeasy Handbook, 2001).

3.2.1.11 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren, wurden Fällungen mit Ethanol 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 zugesetzt. Zu der wässrigen DNA-Lösung 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 anschließenden Zentrifugation zu verhindern (13.000 U/min, RT, 20min). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet durch Zugabe von 200 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen und erneut abzentrifugiert (13.000 U/min, 20min). Der Alkohol wurde anschließend vorsichtig entfernt, das Pellet getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

3.2.1.12 Northern-Blot (Transfer von RNA auf Hybond N-Filter)

RNA-Gele wurden in einer speziell nur für diesen Zweck benutzten Gelkammer gefahren, die zuvor 2 h in 5 N NaOH-Lösung inkubiert worden war. Dabei wurde die aus den Zellen isolierte RNA erst für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend mit 2x RNA-Loading Dye versetzt und im Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch bei 50-70 V aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in 20x SSC äquilibriert und die RNA mit dem in Abbildung 8 dargestellten Aufbau über Nacht mit 20x SSC als Transferpuffer auf die Hybond-Nylon-Membran übertragen. Der Pfeil zeigt die Richtung des Flüssigkeitsstromes an, durch den die RNA aus dem

Agarosegel auf den darüberliegenden Hybond-Nylon-Filter (Membran) übertragen wird.

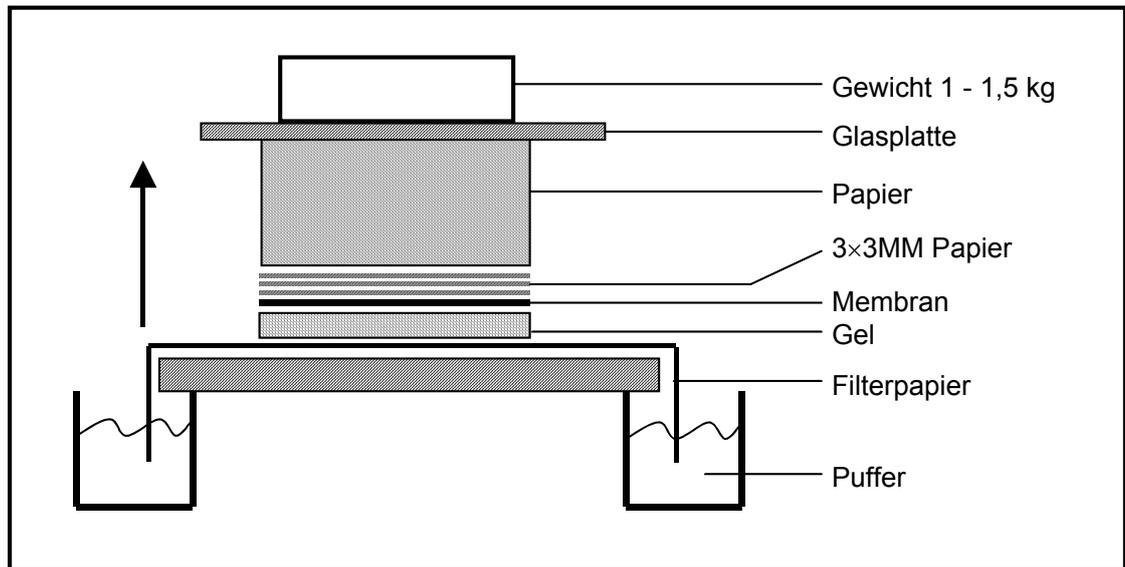


Abb. 8: Transfer von Nucleinsäuren aus Agarosegelen auf Hybond N-Filter.

Der Filter wurde bei RT getrocknet und für 11 sec auf dem UV-Transilluminator mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um die RNA kovalent an den Filter zu binden.

10x Gelpuffer: 200 mM MOPS
 50 mM Na-Acetat
 10 mM EDTA
 pH 7,0 (NaOH)

Agarosegel: 1x Gelpuffer
 1,2% Agarose
 aufkochen, nach Abkühlen auf 65°C:
 0,25 M Formaldehyd
 0,1 µg/µl Ethidiumbromid

Laufpuffer: 1x Gelpuffer
 0,25 M Formaldehyd

20x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Na-Citrat
 pH 7,0

3.2.1.13 Markierung einer DNA-Sonde mit α -[^{32}P]dCTP

25 ng der zu markierenden DNA-Sequenz wurden in 45 μl H_2O verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu einem Aliquot des RediPrimell Labeling Lyophilisats (GE Healthcare) gegeben. Auf die Zugabe von 5 μl ^{32}P -dCTP (50 μCi) und dem vorsichtigen Lösen des Lyophilisats folgten 15 min Inkubation bei 37°C. Um die markierte Sonde von freien Nukleotiden zu trennen, erfolgte eine Aufreinigung über eine QIAquick Gel Extraction-Säule. Dazu wurde der Ansatz mit 250 μl PN-Puffer versetzt auf eine Säule gegeben. Darauf folgten eine kurze Zentrifugation, zwei Waschschrte mit jeweils 500 μl PE-Puffer und die Elution der Sonde mit 200 μl EB-Puffer.

3.2.1.14 Hybridisierung der an Hybond N-Filter gebundenen RNA mit radioaktiv markierten Sonden

Zur Hybridisierung wurde die Membran mit dem Hybridisierungsmix (1 ml/10 cm^2) in einem Plastikröhrchen bei 42°C vorinkubiert. Nach ca. 10 min wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde, die vorher zusammen mit der Lachsspermien-DNA (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) 5 min bei 95°C denaturiert worden war, zur Membran in den Hybridisierungsmix pipettiert. Es wurden $1\text{-}2 \times 10^6$ cpm DNA-Sonde/ml Hybridisierungsmix eingesetzt.

Die Membran wurde über Nacht in der Hybridisierungslösung bei 42°C inkubiert, indem das Plastikröhrchen im Wärmeschrank gerollt wurde. Anschließend wurde die Membran aus dem Röhrchen mit der radioaktiven Hybridisierungslösung genommen und zunächst mit 2x SSC / 0,1% SDS 10 min bei RT, dann mehrfach mit 0,2x SSC / 0,1 % SDS 10 min bei 65°C im Schüttelwasserbad gewaschen, bis mit dem Handcounter nach Möglichkeit weniger als 40 cpm messbar waren.

Die Membran wurde feucht in Folie eingeschweißt und mit einem Phosphoimager-Screen autoradiographiert. Für eine Hybridisierung derselben Membran mit einer

anderen Sonde wurde die erste Sonde durch einmaliges Waschen mit 0,5% SDS für 60 min bei 60°C entfernt.

| | | |
|---------------------|--------|----------------------|
| Hybridisierungsmix: | 72 ml | Formamid |
| | 36 ml | 20x SSC |
| | 1,5 ml | Tris/HCl 1 M, pH 7,5 |
| | 1,5 g | SDS |
| | 3 ml | 50x Denhardts |
| | 30 ml | 50 % Dextransulfat |

15 g Dextransulfat wurden mit H₂O auf 30 ml aufgefüllt und 80°C gelöst. Anschließend wurden die anderen Substanzen zugesetzt und das Volumen mit H₂O auf 150 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.2.1.15 Polymerase-Ketten-Reaktion

(Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können. Sie basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

- 1) Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge;
- 2) Annealing: Bindung von Oligonukleotiden (Primer) an beide Einzelstränge;
- 3) Extension/Elongation: Synthese der DNA durch die Polymerase, ausgehend von den gebundenen Primern.

Auswahl und Konzentration der Primer, Qualität (genomisch, Plasmid, lineares Fragment) und Menge des Templates, Pufferbedingungen, Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte beeinflussen die Synthese der DNA.

3.2.1.16.1 Primer-Design

(HotStar *Taq* PCR Handbuch, März 1999)

Das Design von Primer-Paaren ist für die PCR von entscheidender Bedeutung und wurde nach folgenden Grundregeln durchgeführt: Die Länge eines Primers

sollte zwischen 17 und 27 Basen liegen. Die Schmelztemperaturen T_m beider Primer eines Primer-Paares sollten nach Möglichkeit identisch sein. Die Kenntnis von T_m ist für die Festlegung der Annealing-Temperatur T_{ann} , bei der ein Primer spezifisch mit einer DNA-Matrize hybridisiert, notwendig. T_m eines Primers in einer PCR ist von den Salz- und Tris-HCl-Konzentrationen im Reaktionspuffer sowie von der Länge, der Konzentration und der Sequenz des Primers abhängig. Als Faustregel zur vereinfachten Berechnung diene folgende Formel:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Dabei stehen G, C, A und T für die Anzahl der jeweiligen Base im Primer.

T_{ann} sollte 5 bis 10°C unter T_m liegen und maximal gleich der optimalen Synthesetemperatur der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase (68-72°C) sein.

Weiterhin ist bei dem Design von Primern zu beachten, dass Dimerisierungen durch komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers oder eines Primer-Paares zu vermeiden sind und die Termini zur stabileren Matrix-Bindung möglichst aus einem oder zwei G oder C bestehen sollten.

3.2.1.16.2 Standard-PCR

Standard-PCR-Anwendungen wurden nach Protokollen aus dem Handbuch von McPherson et al. (1991) durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 25 und 50 µl.

Die eingesetzte DNA-Menge variierte, lag aber üblicherweise im Bereich zwischen 50 und 100 ng. Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| x ng | Template-DNA |
| 250 nM | sense(5')-Primer |
| 250 nM | antisense(3')-Primer |
| jeweils 0,2 mM | dNTPs |
| 1x | Reaktionspuffer |
| 0,025 u/µl | <i>Thermus aquaticus</i> (<i>Taq</i>)-DNA-Polymerase |

Als Thermocycler-Programm wurden folgende Temperaturen und Zeiten gewählt:

| | | | |
|----------------------|------|------------|-----------------------|
| 1 min | 94°C | } 25 - 35x | Denaturierung der DNA |
| 0,5 min | 94°C | | Annealing der Primer |
| 0,5 min | 55°C | | Elongation |
| 1 min pro kb + 2 min | 72°C | | finale Elongation |
| 10 min | 72°C | | |
| ∞ | 4°C | | |

3.2.1.16.3 PCR mit dem HotStar *Taq* DNA-Polymerase-System

Die HotStar *Taq* DNA-Polymerase benötigt einen initialen Aktivierungsschritt von 15 min bei 95 °C und eignet sich daher nicht für Amplifikationen von genomischer Template-DNA. Durch die beigefügte Q-Solution (Inhalt wird nicht angegeben) wird jedoch eine äußerst effektive und spezifische Amplifikation erzielt.

Der Ansatz und das Thermocycler-Programm wurden jeweils nach Angaben der Hersteller gestaltet, entsprechen aber im Prinzip dem der Standard-PCR.

3.2.1.16.4 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach Protokoll des Herstellers eine spezielle PCR durchgeführt. Als Template dienten entweder PCR-Produkte oder Plasmid-DNA, nicht jedoch genomische DNA. Das PCR-Produkt der Sequenzierungsreaktion wurde mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt, in 25 µl H₂O aufgenommen und in einem kapillarelektrophoretischen Verfahren in einem DNA-Sequenzierer automatisch sequenziert.

3.2.1.17 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 4 ml Medium in 60 mm 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 5 min inkubiert. 3 µg Plasmid (pLNCXII mit der WT-cDNA für COG6) bzw. nur pLNCXII-Vektor-DNA (mock), jeweils gelöst in 3 µl sterilem aqua bidest, wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß pipettiert und mit dem DMEM-Transfektionsreagenzgemisch vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

3.2.1.18 Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten

Die transiente Transfektion von FNX-Eco-Zellen wurde wie unter 3.2.1.17 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Stabilitätserhaltung retroviraler Partikel erfolgte dann ein Temperaturshift der Zellen auf 33°C und eine weitere Inkubation für 24 h. Der die ecotropen Viruspartikel enthaltende Überstand der FNX-Eco-Zellen wurde durch einen sterilen Zellulose-Acetat 0,45 µm-Filter zur Reinigung von den Verpackungszellen gegeben und mit 6 µg 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 60 mm Gewebekulturschalen ausplattiert worden waren. Nach einer Inkubation von 8 h bei 37°C erfolgte der Temperaturshift der Zellen auf 33°C für 16 h. Die Ernte der amphotropen Überstände erfolgte auf gleiche Weise wie bei den ecotropen Überständen. Die amphotropen Verpackungszellen erhielten 4ml frisches Medium und wurden für weitere 24 h bei 33°C zur Produktion eines zweiten amphotropen Virusüberstandes inkubiert. Mit dem geernteten ersten amphotropen Überstand wurden die 48 h zuvor ausplattierten primären, humanen

Fibroblasten (2×10^5 Zellen/60 mm Gewebekulturschale) ein erstes Mal infiziert und die Zellen für 16 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgezogen, durch neues Medium ersetzt und die Zellen für weitere 8 h kultiviert. 24 h nach Abnahme des ersten amphotropen 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 amphotropen Überständen behandelt worden waren, wurden für weitere 48 h in selektionsfreiem Medium kultiviert. Dann erfolgte der Wechsel auf Medium mit G418 (0,225 mg/ml Geneticin) und eine Selektion über 10 Tagen, um stabile Zelllinien zu erhalten.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Serumpräparation aus venösem Blut

Zur Gewinnung von humanem Serum erfolgte die Blutentnahme aus einer Ellenbeugenvene. Das erhaltene Blut wurde 2 h bei RT zur Gerinnung inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5.000 xg und RT für 10 min ließ sich das Serum als Überstand abpipettieren.

3.2.2.2 Eisensättigung der Serumproben

Zu 12,5 µl Serum (3.2.2.1) wurden 12,5 µl des Phosphat-Citrat-Puffers sowie 5 µl des Eisenchloridpuffers hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 1,5 h 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

Eisen-III-chlorid-Puffer: 2,4 mM FeCl₃ x 6H₂O

3.2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

3.2.2.3.1 Isoelektrische Fokussierung von Serumtransferrin

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 124 mm x 258 mm 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 2 g Sorbitol mit 19 ml aqua bidest. und 0,16 g IEF-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 aqua bidest. wurde aufgefüllt, der Ansatz mit einer Wasserstrahlpumpe entgast und auf 70°C abgekühlt. Unter Rühren wurden 1,3 ml Ampholine (pH 5-7) in den Erlenmeyerkolben hinzupipettiert. Der Ansatz wurde zwischen die Glasplatten pipettiert, anschließend erfolgte das Auspolymerisieren für 2 h bei RT. Vor Durchführung der IEF wurde das Gel in vier gleichgroße Teile zurechtgeschnitten (jeweils in der Größe von 6,4 mm x 12,4 mm). Als Laufkammer wurde die Multiphor II verwendet, die durch die MultiTemp konstant auf 10°C gehalten wurde. Nach Applikation von ein paar Tropfen aqua bidest. wurde das Gel symmetrisch auf die Multiphor II-Kammer platziert. Ein 6,4 mm langer, in 0,25 M NaOH Lösung getränkter Kathodenstreifen (IEF-Electrode Strip) sowie ein 6,4 mm langer, in 0,25 M Essigsäure getränkter Anodenstreifen (IEF Electrode Strip) wurden nach Abtropfen an den Enden des Gels aufgelegt. Anschließend wurde die

Glasplatte mit den Elektroden genau auf den jeweiligen Elektrodenstreifen gelegt. Bei 350 V und 30 mA erfolgte die Vorfokussierung des IEF-Gels für 45 min, 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 20 µl der unter 3.2.2.2 vorbereiteten Proben aufgetragen. Die Einfokussierung der Proben in das Gel erfolgte bei 100 V und 30 mA für 30 min bevor die Fokussierung bei 380 V und 30 mA über 2,5 h ablief. Im Anschluss an die IEF wurden 180 µl einer 1:3 verdünnten Lösung des Antikörpers 'Kaninchen-anti-human-Transferrin' (Dako) auf das Gel aufgetragen und mit einer gebogenen Pasteurpipette gleichmäßig auf dem Gel verteilt. Nach 15 min wurde das Gel in 0,9%ige NaCl-Lösung überführt und 3-12 h inkubiert bevor es einmal mit aqua bidest. gespült und weitere 30 min 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 aqua bidest. auf das Gel gelegt. Direkt auf das Gel wurden die dünnen Filterpapiere gelegt, darüber die zwei Lagen dickes Filterpapier und ein Gewicht von etwa 1 kg, das dazu diente, einen gleichmäßigen Druck auszuüben. Nach 30 min wurde das Filterpapier entfernt und das Gel mit einem Fön getrocknet. Zur Färbung wurde das Gel für 10 min 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 aqua bidest.

3.2.2.3.2 IEF des α -1-Antirypsins

IEF Phast Dry Gele wurden für 30 min bei RT in einer Lösung aus 60 ml/l Pharmalyte (pH 4,2-4,9) in der PhastGel Cassette rehydriert. Die Seren wurden 1:150 mit aqua bidest. verdünnt und 0,85 µl für die IEF auf den PhastGel Sample Applicator 8/1 aufgetragen. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 5 angegeben. Nach der IEF wurde das Gel für 40 min mit dem Antikörper Kanninchen anti

human α -1-Antitrypsin inkubiert und über Nacht in 150 mM NaCl gewaschen. Die automatisierte Silberfärbung erfolgte mit der Entwickler-Einheit des PhastSystems (Tab. 6) (Hackler et al., 1998; Noll et al., 1999).

Tab. 5 Laufbedingungen der IEF mit dem PhastSystem

| | | | | | |
|---------|--------|--------|-------|------|--------|
| Sep 1.1 | 2000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 75 Vh |
| Sep 1.2 | 200 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 15 Vh |
| Sep 1.3 | 2000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 100 Vh |
| Sep 1.4 | 1000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 280 Vh |

- Sample Applicator: down at 1.2, 0 Vh
- Sample Applicator: up at 1.3, 100 Vh
- Extra Alarm: to sound at 1.1, 73 Vh

Tab.6 Automatisierte Silberfärbung

| | | | |
|----------|----------------------|---------|------|
| Dev 1.1 | Fixierung | 5 min | 20°C |
| Dev 1.2 | Wasch Lösung 1 | 2 min | 50°C |
| Dev 1.3 | Wasch Lösung 2 | 2 min | 50°C |
| Dev 1.4 | Wasch Lösung 2 | 4 min | 50°C |
| Dev 1.5 | 8,3% Glutardialdehyd | 6 min | 50°C |
| Dev 1.6 | Wasch Lösung 2 | 3 min | 50°C |
| Dev 1.7 | Wasch Lösung 2 | 5 min | 50°C |
| Dev 1.8 | aqua bidest. | 2 min | 50°C |
| Dev 1.9 | aqua bidest. | 2 min | 50°C |
| Dev 1.10 | 0,5% Silbernitrat | 10 min | 50°C |
| Dev 1.11 | aqua bidest. | 0,5 min | 50°C |
| Dev 1.12 | aqua bidest. | 0,5 min | 50°C |
| Dev 1.13 | Entwickler | 0,5 min | 50°C |
| Dev 1.14 | Entwickler | 12 min | 50°C |
| Dev 1.15 | Stop-Lösung | 5 min | 50°C |
| Dev 1.16 | aqua bidest. | 5 min | 50°C |

| | |
|------------------------|-----------------------------------------------------|
| <u>Fixierung:</u> | 20% Trichloroessigsäure |
| <u>Wasch Lösung 1:</u> | 50% Ethanol/10% Essigsäure |
| <u>Wasch Lösung 2:</u> | 10% Ethanol/ 5% Essigsäure |
| <u>Entwickler:</u> | 2,5% (w/v) Natriumcarbonat/ 0,015% Fomaldehyd (v/v) |
| <u>Stop-Lösung:</u> | 50 mM EDTA |

3.2.2.3.3 IEF des ApoCIII

IEF Phast Dry Gele wurden für 90 min bei RT in einer Lösung aus 8 M Urea und 60 ml/l Ampholine, einer Mischung aus Pharmalyte (pH 4,2-4,9) und Servalyt (pH 3-5) im Verhältnis 2:1, in der PhastGel Cassette rehydriert. 0,5 µl Serum wurde für die IEF auf den PhastGel Sample Applicator 8/1 aufgetragen. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 7 angegeben. Nach der IEF wurden die Proteine für 1 h bei 60°C mittels Diffusion auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde dreimal für 5min in PBST gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in 5% Blotto bei 4°C inkubiert, zweimal 5min mit PBST gewaschen und für 1h bei RT mit Kaninchen anti human ApoCIII in einer 1:1.000 Verdünnung in PBST inkubiert. 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 H₂O_{bidest} gewaschen, bevor der Chemilumineszenz-Nachweis (3.2.2.7) geführt wurde.

Tab. 7 Laufbedingungen der IEF mit dem PhastSystem

| | | | | | |
|---------|--------|--------|-------|------|--------|
| Sep 1.1 | 2000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 75 Vh |
| Sep 1.2 | 200 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 15 Vh |
| Sep 1.3 | 1000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 100 Vh |
| Sep 1.4 | 2000 V | 2,5 mA | 3,5 W | 15°C | 495 Vh |

- Sample Applicator down at 1.2, 0 Vh
- Sample Applicator up at 1.3, 100 Vh
- Extra Alarm to sound at 1.1, 73 Vh

PBST: PBS/ 0,1% Tween-20

5% Blotto: 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS/T

3.2.2.4 Enzymatische Desialylierung von Serumproteinen durch Neuraminidase

Um zu untersuchen, ob das abweichende Laufverhalten von Proteinen in der IEF tatsächlich durch Glykosylierungsunterschiede hervorgerufen wird, wurden die Serumproteine einer Sialidasebehandlung unterzogen und anschließend erneut per IEF untersucht.

3.2.2.4.1 Neuraminidase (*Vibrio cholerae*)

Die Neuraminidase aus *Vibrio Cholerae* spaltet neben 2,6-verknüpften Sialinsäuren auch 2,3- und 2,8-verknüpfte Sialinsäuren ab. Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

| | |
|------------------|---------|
| Serum | 12,5 µl |
| 1 M NaAc (pH 5) | 2,5 µl |
| H ₂ O | 9,5 µl |
| Sialidase | 1 µl |

37°C, über Nacht

Die Proben wurden im Anschluss mittels IEF des ApoCIII (3.2.2.3.3) mit 1 µl Probenauftrag analysiert.

3.2.2.4.2 2,3-Neuraminidase

Die 2,3-Neuraminidase spaltet spezifisch nur die 2,3-verknüpften Sialinsäuren ab und nur zu einem sehr geringen Anteil 2,6- und 2,8verknüpfte. Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

| | |
|-------------------|---------|
| Serum | 12,5 µl |
| 0,5M NaAc (pH5,5) | 2,5 µl |
| H ₂ O | 9 µl |
| 2,3-Sialidase | 1 µl |
| 37°C, 30` | |

Die Proben wurden im Anschluss mittels IEF des ApoCIII (3.2.2.3.3) mit 1 µl Probenauftrag analysiert.

3.2.2.5 Herstellung von Fibroblastenextrakten

Die Fibroblasten einer T75-Zellkulturflasche wurden geerntet (3.2.3.2.2). Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension des Pellets in Lysispuffer und 30 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurde das Lysat abzentrifugiert und vom Überstand eine Proteinbestimmung gemacht.

| | |
|---------------------|---------------------------|
| <u>Lysispuffer:</u> | 1x TBS |
| | 1x Protease Inhibitor Mix |
| | 0,5% Triton X-100 |

3.2.2.6 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

10% Trenngel

| | |
|------------------------------------------------------|------------------|
| Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8%Bisacrylamid) | 10 ml |
| 4x Puffer 1,5M Tris/HCl (pH 8,8); 0,4% SDS | 7,5 ml |
| 10% APS | 250 μ l |
| TEMED | 25 μ l |
| H ₂ O | <u>12,225 ml</u> |
| | 30 ml |

Sammelgel**Ansatz für 1 großes Gel**

| | |
|------------------------------------------------------|----------------|
| Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8%Bisacrylamid) | 1,3 ml |
| 4x Puffer 0,5M Tris/HCl (pH 6,8); 0,4% SDS | 2,5 ml |
| 10% APS | 100 μ l |
| TEMED | 10 μ l |
| H ₂ O | <u>6,09 ml</u> |
| | 10ml |

4% Sammelgel**6-fach Probenpuffer**

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

Anodenpuffer: 50 mM Tris
380 mM Glycine
ad 5 l H₂O

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

Laufpuffer für Minigele: 25 mM Tris

190 mM Glycine

0,5% SDS

Zur Herstellung des Trenngels wurde die entsprechende Lösung frisch angesetzt, sofort zwischen die Glasplatten der Elektrophoreseeinheit gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 30-60 min) wurde das Sammelgel auf das mit aqua bidest. gespülte Trenngel gegossen und ein Kamm von oben zwischen die Glasplatten eingebracht. Das Sammelgel benötigte ca. 30 min bis zum vollständigen Auspolymerisieren. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit aqua bidest. gespült. Für die Minigele konnten die Volumina auf 6 ml für das Trenngel und 3 ml für das Sammelgel reduziert werden. Die zu untersuchenden Proben (50 µg Protein) wurden mit aqua bidest. und Probenpuffer auf ein Volumen von 60 µl für die großen Gele beziehungsweise 25 µl für die Minigele gebracht. Die Ansätze wurden 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und vor dem Aufbringen in die Geltaschen kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese des Mini-Gelsystems erfolgte durchgehend mit einer konstanten Spannung von 200 V bei RT. Die Elektrophorese der großen Gele erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 50 mA bei einer Temperatur von 4°C.

3.2.2.7.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen ("Western-Blot")

Für den immunologischen Nachweis wurde gelelektrophoretisch aufgetrenntes Protein durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wurde das Trenngel nach erfolgter SDS-Page (3.2.2.6) 10-15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Drei Lagen 3mm-Whatman-Papier sowie die Nitrozellulosemembran 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 45 min

bei 1 mA/cm². Anschließend wurde durch Anfärben des Gels mit Coomassie-Blau überprüft, ob die Proteine vollständig auf die Membran übertragen worden waren.

Kathodenpuffer: 40 mM ε-Aminocapronsäure (pH 9,0)
 25 mM 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.)

3.2.2.7.2 Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Auf Nitrozellulosemembran immobilisierte Proteine (3.2.2.7.1) können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Nitrozellulosemembran wurde zur Immunodetektion von Transferrin und der COG-Untereinheiten wie folgt unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Wippe inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min in PBST gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in 5% Blotto bei 4°C inkubiert, zweimal 5 min mit PBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem jeweiligen ersten Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung in PBST inkubiert. Bei Maus anti β-Aktin war eine 1:10.000 Verdünnung ausreichend. Die Membran wurde dreimal für jeweils 20 min mit PBST gewaschen. Mit dem Sekundärantikörper `Ziege anti Kaninchen´ (HRP-gekoppelt; 1:10.000 in PBST) wurde die Membran 1 h bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBST und einmal mit aqua bidest. gewaschen, bevor der Chemilumineszenz-Nachweis (3.2.2.7.3) geführt wurde.

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

3.2.2.7.3 Chemilumineszenz-Nachweis

Die Immunodetektion erfolgte mit Hilfe des Super Signal West Pico Chemilumnescent Substrate (ECL) indem die beiden Lösungen des Systems 1:1 gemischt und die Membran damit 2 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die

Membran in Folie eingeschlagen und ein Hyper Film ECL-Filme je nach Signalintensität für einige Sekunden bis zu wenigen Minuten aufgelegt.

3.2.2.8 Bestimmung der GDP-[¹⁴C]Fucose-, CMP-[¹⁴C]NANA und UDP-[³H]Galactose Import-Aktivität in Golgi-angereicherten Fraktionen

3.2.2.8.1 Aufschluss der Fibroblasten für Import-Assay

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und alle Lösungen auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden auf 15 cm-Zellkulturschalen ausplattiert und nach viermaligem waschen mit Hankspuffer und in 3,5 ml Puffer A (0,25 M Sucrose) abgeschabt. Nach Zentrifugation bei 1.000 xg wurde das Zellpellet in 0,75 ml Puffer A resuspendiert und in einen Dounce-Homogenisator überführt. Der Zellaufschluss erfolgte nach der Potter-Elvehjem-Methode. Das Homogenat wurde bei 1.000 xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellkerne und nichtaufgeschlossene Zellen von dem ersten postnukleären Überstand (PNS1) zu trennen. Das verbleibende Pellet wurde wiederum in 0,75 ml Puffer A resuspendiert und wie zuvor homogenisiert, um nach erneuter Zentrifugation einen zweiten Überstand (PNS2) zu erhalten.

3.2.2.8.2 Präparation Golgi-angereicherter Vesikel

(modifiziert nach Leelavathi et al., 1970)

Die beiden aus 3.2.2.8.1 resultierenden postnukleären Überstände wurden gepoolt und vorsichtig zur Dichtegradienten-Zentrifugation auf 5 ml eines Sucrosekissens aus 1,3 M Sucrose in ein SW-40-Polyallomer-Röhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 100.000 xg für 70 min bei 4°C in einem SW-40-Rotor. Die Golgi-angereicherten Vesikel sammelten sich an der 0,25/1,3 M-Sucrose Interphase und wurden nach Abnehmen der 0,25 M Sucrose-Phase vorsichtig mit einer Pasteurpipette als Membranfeld geerntet.

3.2.2.8.3 Bestimmung der GDP-[¹⁴C]Fucose-, CMP-[¹⁴C]NANA und UDP-[³H]Galactose-Import-Aktivität

(modifiziert nach Perez und Hirschberg, 1987)

Der Proteingehalt des Membranfeldes wurde mit Hilfe des DC Protein Assay Kits bestimmt. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

140 µl Membranfeld (100 µg Protein)
330 µl Puffer B mit 3 µM GDP-[¹⁴C]Fucose,
0,5 µM UDP-[³H]Galactose oder
1,5 µM CMP-[¹⁴C]NANA

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der mit jeweils einem der Zuckernukleotide supplementierte Puffer B wurde in 1,5 ml-Polyallomer-Reaktionsgefäßen vorgelegt und auf 37°C temperiert. Nach Zugabe des Membranfelds wurden die Ansätze mit GDP-[¹⁴C]Fucose und UDP-[³H]Galactose für 10 min, die Ansätze mit CMP-[¹⁴C]NANA für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 0,8 ml eiskalter Puffer B ohne radioaktiv markierte Zuckernukleotide zugegeben und sofort zum Pelletieren der Vesikel bei 100.000 xg für 30 min bei 4°C im TLA-45-Rotor zentrifugiert. Um den Background unspezifisch an Vesikel gebundener, radioaktiv markierter Zuckernukleotide zu bestimmen, wurden t₀-Werte mitgeführt, die direkt vor der Zentrifugation pipettiert wurden. Das Pellet wurde dreimal mit Puffer B gewaschen und nach der letzten Zentrifugation in 0,5 ml Lysispuffer durch viermal Ultraschall für 30 s resuspendiert und solubilisiert. Die freigesetzte Radioaktivität des Pellets stellt die insgesamt importierte Menge an Zuckernukleotid dar. Durch eine anschließende Säurefällung mit 50 µl Säurelösung konnte die importierte Zuckernukleotidmenge in zwei Komponenten differenziert werden: Eine Säure-fällbar Komponente, die den Anteil an auf Makromoleküle transferierte Zuckernukleotide enthielt, und den Importanteil löslicher GDP-[¹⁴C]Fucose, CMP-[¹⁴C]NANA bzw. UDP-[³H]Galactose im Golgi, die durch die Säurefällung nicht präzipitierbar war.

Der lösliche Anteil wurde nach der Fällung über Nacht bei 4°C und 20 min Zentrifugation bei 16.000 xg als Überstand abgenommen und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Das Pellet aus fällbarem Material wurde

dreimal mit 500 µl Säurelösung gewaschen, nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 0,2 ml 2,5 N NaOH aufgenommen und für 10 min bei 95°C resuspendiert. Nach dem Abkühlen der Proben bei RT wurden sie mit 0,6 ml H₂O und 0,2 ml Eisessig neutralisiert und zur quantitativen Bestimmung der importierten Radioaktivität quantitativ in Szintillationsflüssigkeit überführt und vermessen.

Puffer A: 0,25 M Sucrose

Puffer B: 10 mM Tris/HCl
150 mM KCl
1 mM MgCl₂
pH 7,5

Säurelösung: 20% TCA
1% Phosphowolframsäure
0,5 N HCl

3.2.2.9 Extraktion von humanem Transferrin aus Serum

Die Aufreinigung erfolgte nach der leicht abgewandelten Methode von Iourin et al. (1996). Dabei wurden 250 µl Serum mit 175 µl H₂O verdünnt. Während vorsichtigem Vortexen wurden 175 µl 3% Rivanollösung (6,9-di-amino-2-ethoxyacridin laktat) zugegeben. Die Probe wurde mit 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. 500 µl Überstand wurden abgenommen und zu 25 mg NaCl gegeben und gevortext. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde der daraus resultierende Überstand mit einem gleich großen Volumen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und für 10 min bei RT stehen gelassen, um ein Präzipitieren der Immunglobuline zu ermöglichen. Die Probe wurde danach ein letztes Mal mit 10.000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand über Nacht in einem Dialyseschlauch mit einem cut-off von 12-16 kDa gegen eine 10 mM Tris-Lösung (pH 7,4) dialysiert wurde. Die Proben wurden im Anschluss daran getrocknet und in 30 µl PBS resuspendiert.

3.2.2.10 Präparation und Markierung von Oligosacchariden

3.2.2.10.1 Enzymatische Deglykosylierung durch PNGase F

Zur Abtrennung der N-glykosidisch-verknüpften Kohlenhydratketten vom Transferrin wurde eine enzymatische Deglykosylierung mit N-Glycosidase F durchgeführt. Nach der Proteinbestimmung wurde der Probe soviel 0,1 M β -Mercaptoethanol/0,5% SDS zugefügt, dass das SDS in 1,2-1,5fachem (w/w) Überschuss zur Proteinmenge vorliegt. Die Probe wird für 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Für den N-Glycosidase F-Verdau musste bei die Proben die finale Konzentratione von 0,12 M Tris/HCl (pH 8,0), 0,01 M 1,10-Phenanthrolin und 1% Triton X-100 eingestellt werden, bevor 2,5 μ l (2,5 Units) N-Glycosidase F hinzugegeben und über Nacht im Heizblock bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde die Probe für 5 min bei 95°C im Heizblock gekocht.

3.2.2.10.2 Aufreinigung der abgespaltenen Oligosaccharide

Die Aufreinigung der Oligosaccharide von den anderen Komponenten erfolgte mittels absteigender Papierchromatographie auf Whatman-Papier (2 mm) in Butanol:Ethanol:Wasser (4:1:1) für 20 h (Patel et al., 1993). Unter diesen Bedingungen verbleiben die Oligosaccharide am Auftragspunkt. Der Auftragspunkt wurde ausgeschnitten und die Glykane im Ultraschallbad in 3x 750 μ l aqua bidest. Gelöst. Nach der Filtration (0,2 μ m) wurden die Proben lyophilisiert. Für die 2-Anthranilamid (2-AB) Markierung wurden die Zucker erneut resuspendiert, in Glasmikroeinsätze überführt und wieder getrocknet.

3.2.2.10.3 2-AB Markierung von Oligosacchariden

DMSO und Essigsäure wurden durch die Inkubation mit Natriumsulfat über Nacht bei 120°C dehydriert. 4,5 mg 2-Anthranilamid (2-AB) und 6,3 mg Natriumcyanoborhydrid wurden in 100 μ l DMSO:Essigsäure (7:3) gelöst und für 10 min bei 65°C vorinkubiert. Die Markierung begann mit der Zugabe von 10 μ l dieser Lösung zu den in 3.2.2.10.2 aufgereinigten, getrockneten Oligosacchariden in Glasmikroeinsätzen und wurde für 2 h bei 65°C unter Luftausschluss durchgeführt. Das freie 2-AB wurde durch eine aufsteigende

Papierchromatographie auf Whatman-Papier (2 mm) in Ethylacetat entfernt. Unter diesen Bedingungen verbleiben die Oligosaccharide am Auftragspunkt. Der Auftragspunkt wurde ausgeschnitten und die Glykane im Ultraschallbad in 3x 750 µl aqua bidest. gelöst. Nach der Filtration (0,2 µm), wurden die Proben lyophilisiert (Bigge et al., 1995; Iourin et al. 1996).

3.2.2.11 Säulenchromatographische Methoden

3.2.2.11.1 Separation von Oligosacchariden mittels GlycoSepN

Die GlycoSepN HPLC-Säule trennt Zuckerketten spezifisch ihrer Größe nach auf. Die Proben wurden in 65% Acetonitril, 35% 80 mM Ammoniumformiat (pH 4,4) aufgenommen. Die HPLC Läufe wurden mit dem Puffer A, 100% Acetonitril und dem Puffer B, 80 mM Ammoniumformiatlösung (pH 4,4) durchgeführt. Die Laufbedingungen werden in Tabelle 8 beschrieben. Die unterschiedlich eluierenden Zuckerketten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors bei einer Extinktionswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm detektiert und automatisch fraktioniert, lyophilisiert und zur Massenanalyse in Wasser aufgenommen.

Tabelle 8: Laufbedingungen der HPLC-Analytik mittels GlycoSepN

| Zeit | Puffer A | Puffer B | Flussrate |
|---------|----------|----------|------------|
| 0 min | 65% | 35% | 0,4 ml/min |
| 72 min | 47% | 53% | 0,4 ml/min |
| 75 min | 0% | 100% | 0,4 ml/min |
| 77 min | 0% | 100% | 1,0 ml/min |
| 92 min | 0% | 100% | 1,0 ml/min |
| 95 min | 65% | 35% | 1,0 ml/min |
| 100 min | 65% | 35% | 0,4 ml/min |

Puffer A: 100% Acetonitril

Puffer B: 80 mM Ammoniumformiat
pH 4,4

3.2.2.11.2 Separation mittels Anionenaustauschchromatographie (GlycoSepC)

Die GlycoSepC HPLC-Säule trennt Zuckerketten spezifisch ihrer Ladung nach auf. Dabei interagieren Oligosaccharide mit negativ-geladenen Sialinsäuren stärker mit der Säulenmatrix als neutrale Zucker. Die Elution erfolgt über die Erhöhung des wässrigen Puffers. Die Proben wurden in 65% Acetonitril, 35% 80 mM Ammoniumformiat (pH 4,4) aufgenommen. Die HPLC Läufe wurden mit dem Puffer A, 100% Acetonitril und dem Puffer B, 80 mM Ammoniumformiatlösung (pH 4,4) durchgeführt. Die Laufbedingungen werden in Tabelle 9 beschrieben. Die unterschiedlich eluierenden Zuckerketten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors bei einer Extinktionswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm detektiert und automatisch fraktioniert, lyophilisiert und zur Massenanalyse in Wasser aufgenommen.

Tabelle 9: Laufbedingungen der HPLC-Analytik mittels GlycoSepC

| Zeit | Puffer A | Puffer B | Flussrate |
|--------|----------|----------|------------|
| 0 min | 100% | 0% | 1,0 ml/min |
| 50 min | 40% | 60% | 1,0 ml/min |
| 52 min | 20% | 80% | 1,0 ml/min |
| 56 min | 20% | 80% | 1,0 ml/min |
| 58 min | 100% | 0% | 1,0 ml/min |
| 65 min | 100% | 0% | 1,0 ml/min |

3.2.2.11.3 Gelfiltration mit der Superose 6 10/300 GL

Die Superose 6 10/300 GL ist eine Gelfiltrationsäule für FPLC-Anlagen, die Proteine der Größe nach auftrennen kann. Der optimale Trennbereich liegt im Bereich der Molekulargewichte 5.000 – 5×10^6 Da, aber die maximale Trenngröße ist bei einem Molekulargewicht von 4×10^7 angesiedelt. Die Detektion des HMW Gelfiltration Standards erfolgte über UV-Detektion. Das Ausschlussvolumen wurde durch die Elution von Blue-Dextran (MW 2×10^6) bestimmt.

Für die Untersuchung wurden je Fibroblasten von 2x T75-Zellkulturflaschen geerntet und in 500µl Lysispuffer aufgenommen und mit 20 Hüben im Dounce-

Homogenisator aufgeschlossen. Die Zellmembranen wurden durch die Ultrazentrifugation (100.000 xg, 30 min, 4°C) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinbestimmung wurden 400 µl Zelllysat mit einer maximalen Proteinkonzentration von 20 mg/ml bei einer Flussrate von 0,25 ml/min PBS aufgetrennt und fraktioniert. Die Fällung der fraktionierten Proteine erfolgte durch die Zugabe von 4 Volumen eiskaltem Aceton und die anschließende Inkubation bei -20°C über Nacht. Danach wurden die ausgefallenen Proteine 15 min bei 13.000 U/min und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 1x mit 50% eiskaltem Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes getrocknet.

Lysispuffer: 1x PBS
 1x Protease Inhibitor Mix
 0,75% CHAPS

3.2.2.12 Massenanalytik

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden auf einem MALDI-TOF des Typs Ultraflex TOF/TOF der Firma Bruker durchgeführt. Geladene Oligosaccharide wurden im negativen Modus (Powell und Harvey 1996), ungeladene Oligosaccharide im positiven Modus analysiert (Mock et al. 1991). Als Matrix wurde Dihydrobenzoesäure (DHB) verwendet. Zwei verschiedene Lösungen von DHB wurden jeweils frisch angesetzt.

Lösung A: 10 mg DHB
 in 500 µl Aceton

Lösung B: 10 mg DHB
 333 µl Acetonitril
 167 µl H₂O

Als erstes wurde Lösung A als dünne Schicht auf das Probenfeld des MTP 384 Ground Steel Targets aufgetragen, so dass sich eine leicht milchige Oberfläche bildete. Auf die jeweiligen Probenfelder wurden nun 1,0 µl der in Wasser gelösten

Probe aufgetragen und im Dunkeln durch einen leichten Luftstrom getrocknet. 0,5 µl der zweiten DHB-Lösung wurden nun auf die Proben aufgetragen und ebenfalls im Dunkeln durch einen leichten Luftstrom getrocknet.

3.2.2.13 Immunfluoreszenzmarkierung von Brefeldin A behandelten Fibroblasten

Der Brefeldin A-Assay wurde nach der Publikation von Steet und Kornfeld (2006) durchgeführt. Die Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausplattiert und für 16 h kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und durch vorgewärmtes Zellkulturmedium (3.2.3.2.1) mit 2,5 µg/ml Brefeldin A ersetzt und bis zu 15 min im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die Zellen auf Eis platziert, die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen wurden und mit 3% Paraformaldehyd für 20 min fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die freien Aldehydgruppen durch Zugabe 50 mM NH₄Cl in PBS für 10 min abgeblockt. Die Zellen wurden im Anschluss mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und mit dem Antikörper Maus anti GM130 (1:200 in PBS) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 2x waschen mit PBS wurde zum Blocken unspezifischer Bindestellen für 20 min 10%iges Ziegenerum auf die Zellen gegeben. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Ziege anti Maus Alexa568. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Vectashield Hard Set Mounting Medium mit DAPI auf Objektträger überführt. Die Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Spinning Disk Confocal Laser Mikroskop (ERS6, Perkin Elmer at Nikon Imaging Center Heidelberg) durchgeführt.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Methoden zur Arbeit mit bakteriellen Kulturen

3.2.3.1.1 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 Impfföse abgenommen und in der jeweiligen Kulturflüssigkeit geschwenkt wurde. Die Kultivierung erfolgte 37°C in einem Schüttelinkubator oder Schüttelwasserbad.

3.2.3.1.2 Plattenkulturen

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

3.2.3.1.3 Zellernte

Die Zellernte von Bakterienkulturen erfolgte durch pelletieren in Eppendorf-Cups mittels Zentrifugation für 1 min bei 13000U/min in einer Tischzentrifuge.

3.2.3.2 Zellbiologische Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Kulturen

3.2.3.2.1 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

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

3.2.3.2.2 Trypsinieren und Ernten von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte routinemäßig nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen ca. 5 min mit

Trypsin/EDTA bei 37°C bis zum Ablösen der Zellen (Mikroskop) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät oder zur weiteren Verarbeitung durch Zentrifugation (5 min, 1.000 U/min in der Labofuge) pelletiert und anschließend noch einmal mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen.

Trypsin-EDTA-Lösung 0,05% (w/v) Trypsin

3.2.3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und in der Labofuge pelletiert (5 min bei 1.000 U/min). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in beschriftete Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst für 4 h bei -20°C und anschließend für einen Tag -80°C bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

Einfriermedium: 10% (v/v) DMSO in jeweiligem Zellkulturmedium.

3.2.3.2.4 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es etwa 1 min bei RT erwärmt und anschließend in 70% Ethanol bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen, in 5 ml kaltes Medium überführt und in der Labofuge für 5 min bei 1000 U/min sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Zellpellet in 5 ml kaltem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

4 Ergebnisse

4.1 Anamnese und Klinik der Patientin S.E.S.

Die nichtkonsanguinen Eltern von S.E.S. brachten, neben der Patientin und einem gesunden Sohn, ein weiteres Kind zur Welt, welches in der perinatalen Periode verstarb. Sowohl bei S.E.S., die im Alter von 5 Wochen verstarb, als auch bei dem verstorbenen Kind konnte ein erhöhtes Blutungsrisiko festgestellt werden.

Die Schwangerschaft und die Geburt von S.E.S. verliefen normal, wenn auch das Geburtsgewicht mit 2.700 g zu niedrig war. Auffällig wurde sie mit schweren fokalen Krampfanfällen, häufigem Erbrechen und Verlust des Bewusstseins. Hervorgerufen wurden diese Symptome durch interkraniale Blutungen und der damit einhergehenden Entstehung von Gehirnödemen, die trotz einer Notoperation zum Tode führten.

Vorangegangene metabolische Untersuchungen zeigten bei der Patientin eine Cholestase und damit verbunden einen Vitamin K-Mangel, was als Ursache für die Blutungen angeführt wurde.

Die Laborwerte für Laktat, Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Kreatinkinase waren leicht erhöht, und es zeigte sich Cholestase basierend auf ihrem Bilirubin- und γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT) Wert.

4.2 Proteinbiochemische Untersuchungen

4.2.1 Isoelektrische Fokussierung von Serumproteinen

Im Rahmen der CDG-Diagnostik wurde zunächst der Glykosylierungsstatus des Serumtransferrin mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) untersucht (Abb. 9a). Das Serumtransferrin trägt normalerweise zwei biantennäre Komplex-Typ Oligosaccharide, deren terminale Zucker negativ-geladene Sialinsäurereste sind. Im elektrischen Feld erfolgt eine Auftrennung entsprechend der Ladung des Proteins. Sobald ein Protein seinen isoelektrischen Punkt innerhalb eines pH-Gradienten erreicht, bleibt es an der entsprechende Stelle liegen. Das Serumtransferrin der Kontrollperson zeigte aufgrund der vollständigen Glykosylierung ein Bandenmuster, bei der die Hauptbande der Tetrasialoform entspricht. Durch den partiellen oder vollständigen Verlust der Zuckerketten, womit der Verlust der Sialinsäuren einhergeht, kommt es zu Unterschieden im Laufverhalten des Proteins während der IEF. Im Falle eines CDG-Ia Patienten

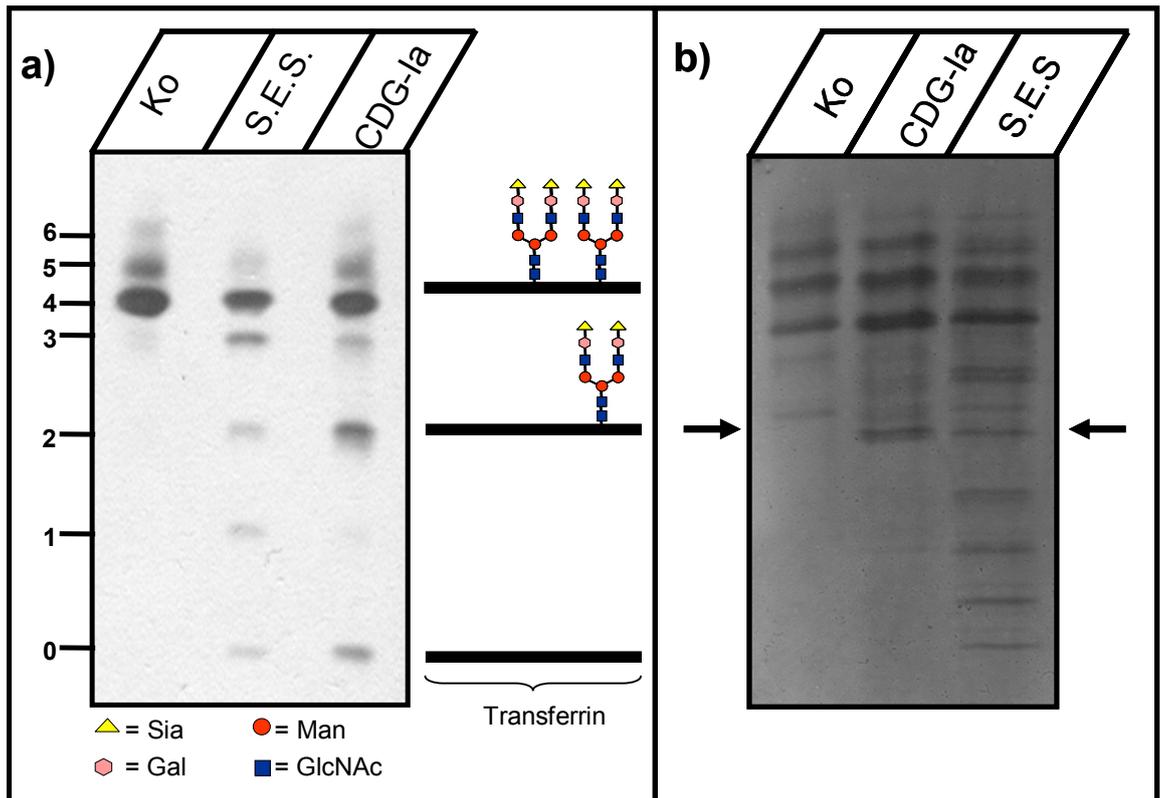


Abb. 9: a) IEF des Serumtransferrins der Patientin S.E.S. im Vergleich zu einer Normalkontrolle (Ko) und einem CDG-Ia Patienten. Am rechten Bildrand ist der Glykosylierungsstatus des Serumtransferrins des CDG-Ia Patienten schematisch dargestellt. Die Zahlen geben die Anzahl der Sia an.
b) IEF des α -1-Antitrypsins. Die Pfeile markieren die erste Bande, die als Folge der Glykosylierungsstörung auftritt.

können beispielsweise die zusätzliche Di- und Asialobande durch den Verlust vollständiger Zuckerketten erklärt werden. Dieses Bandenmuster ist charakteristisch für CDG-Typ I Patienten, da das Oligosaccharid im Falle des Übertragens vollständig prozessiert wird. Bei der Patientin S.E.S. zeigte sich indes ein Bandenmuster mit absteigender Intensität von der Tetra- bis hin zur Asialoform. Dieses Ergebnis deutet auf einen Defekt in der Prozessierung der N-Glykane und damit auf einen CDG-Typ II hin. Zur Bestätigung erfolgte die IEF des α -1-Antitrypsins, eines weiteren Serumglykoproteins, welches ebenfalls eine unvollständige Glykosylierung aufwies (Abb. 9b). Das α -1-Antitrypsin besitzt drei Glykosylierungsstellen, Asp 46, Asp 83 und Asp 247. Durch eine variable Kombination aus bi- und triantennären Oligosacchariden sowie durch verkürzte Isoformen des Proteins setzt sich das normale Bandenmuster aus insgesamt sieben Banden zusammen. Das Auftreten zusätzlicher Banden in Richtung der

Kathode deutet auf einen partiellen oder auch vollständigen Verlust der Oligosaccharide hin.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sowohl das Serumtransferrin, als auch das α -1-Antitrypsin unvollständig glykosyliert sind.

4.2.2 SDS-Page des Serumtransferrins

Zur Bestätigung des ungewöhnlichen Laufverhaltens des Serumtransferrins in der IEF wurde die Untersuchung des Serum-Transferrins mittels SDS-Page und Western-Blot durchgeführt, um durch die Massenunterschiede Rückschlüsse auf das Fehlen von einzelnen oder vollständigen Oligosaccharidketten machen zu können. Im Vergleich zu Kontrollen wies das Transferrin der Patientin S.E.S. einen Massenverlust auf, der geringer war als bei einem parallel dazu untersuchten CDG-Ia Patienten (Abb. 10). Das deutete darauf hin, dass bei der Patientin S.E.S. keine kompletten N-glykosidisch verknüpften Oligosaccharide fehlen, sondern es zum partiellen Verlust einzelner, terminaler Zuckerreste kam. Durch das Fehlen einzelner Zuckerreste ist der Massenverlust der einzelnen Proteinmoleküle im Vergleich zu CDG-Ia Patienten nicht so hoch und führt dadurch zu einer verbreiterten und verschmierten Bande.

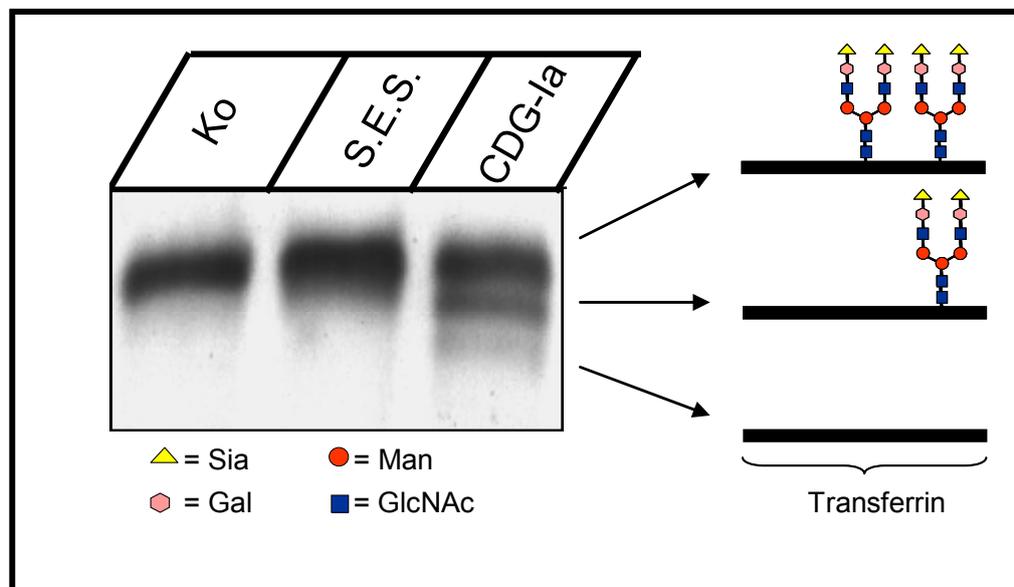


Abb. 10: Western-Blot Analyse des Serumtransferrins. Die Auftrennung erfolgte über ein 7,5% SDS-Gel. Im Vergleich zur Normalkontrolle (Ko) und einem CDG-Ia Patienten fehlen bei der Patientin S.E.S. nur einzelne Zuckerreste. Am rechten Bildrand ist der Glykosylierungsstatus des Serumtransferrins des CDG-Ia Patienten schematisch dargestellt.

4.2.3 Analyse der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide

Für die Untersuchung der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide wurde das Serumtransferrin der Patientin S.E.S., das in der IEF und der SDS-Page ein auffälliges Laufverhalten gezeigt hatte, ebenso wie das Serumtransferrin einer Kontrolle, nach einer modifizierten Methode nach Iourin et al. (1996) aufgereinigt. Zur weiterführenden Analyse der Transferrin-verknüpften N-Glykane erfolgte eine enzymatische Abspaltung der Oligosaccharide durch Protein-N-Glykanase F Verdau. Die abgespaltenen N-Glykane wurden nach ihrer Aufreinigung mittels absteigender Papierchromatographie mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid (2-AB) an ihrem freien, reduzierenden Ende markiert, um die Glykane für die anschließende HPLC-Analyse detektierbar zu machen. Im Vergleich zu Oligosaccharidstandards und zur Kontrolle konnten bei S.E.S. neben der normalen Zuckerstruktur weitere Formen detektiert werden, deren Retentionszeiten im Vergleich zu einem 2-AB markierten Glucose-Homopolymer auf das Fehlen einzelner Zucker hinwiesen (Abb. 11). Um Rückschlüsse auf die Struktur der markierten Glykane ziehen zu können, wurden fünf Fraktionen bei den Retentionszeiten 29, 34, 39, 44 und 49 Minuten isoliert und mit Hilfe des Maldi-ToF massenspektrometrisch untersucht (Tab. 9). In Fraktion 1, dessen Retentionszeit identisch mit dem des Oligosaccharidstandards $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-2AB}$ (NGA2-2AB) ist, konnte die Masse $[m/z]$ 1437,32 ermittelt werden. Der Massenverlust im Vergleich zum biantennären Komplex-Typ Oligosaccharid ($\text{Sia}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-2AB}$, 2343,86 Da) betrug 906,49 Da. Diese Differenz lässt sich durch das Fehlen beider terminalen Sialinsäuren (582,19 Da) und beider Galaktose-Reste (324,11 Da) erklären, was einen errechneten Massenverlust von 906,30 Da ergab. Fraktion 2 besitzt im Vergleich mit dem Glucose-Homopolymer-2AB Standard ein Monosaccharid mehr als NGA2-2AB. Dies bestätigte sich durch die Masse, die um 162,03 Da erhöht war, was der Masse einer gebundenen Hexose, hier also der Galaktose, entspricht. Das Oligosaccharid der dritten Fraktion entsprach einer monosialo-, monogalacto-, biantennären Struktur ($\text{SiaGalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-2AB}$, 1890,71 Da). Fraktion 4 stellte mit der gemessenen $[m/z]$ 2052,75 die Monosialoform ($\text{SiaGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-2AB}$, 2052,76 Da) dar und Fraktion 5 das vollständige biantennäre Oligosaccharid.

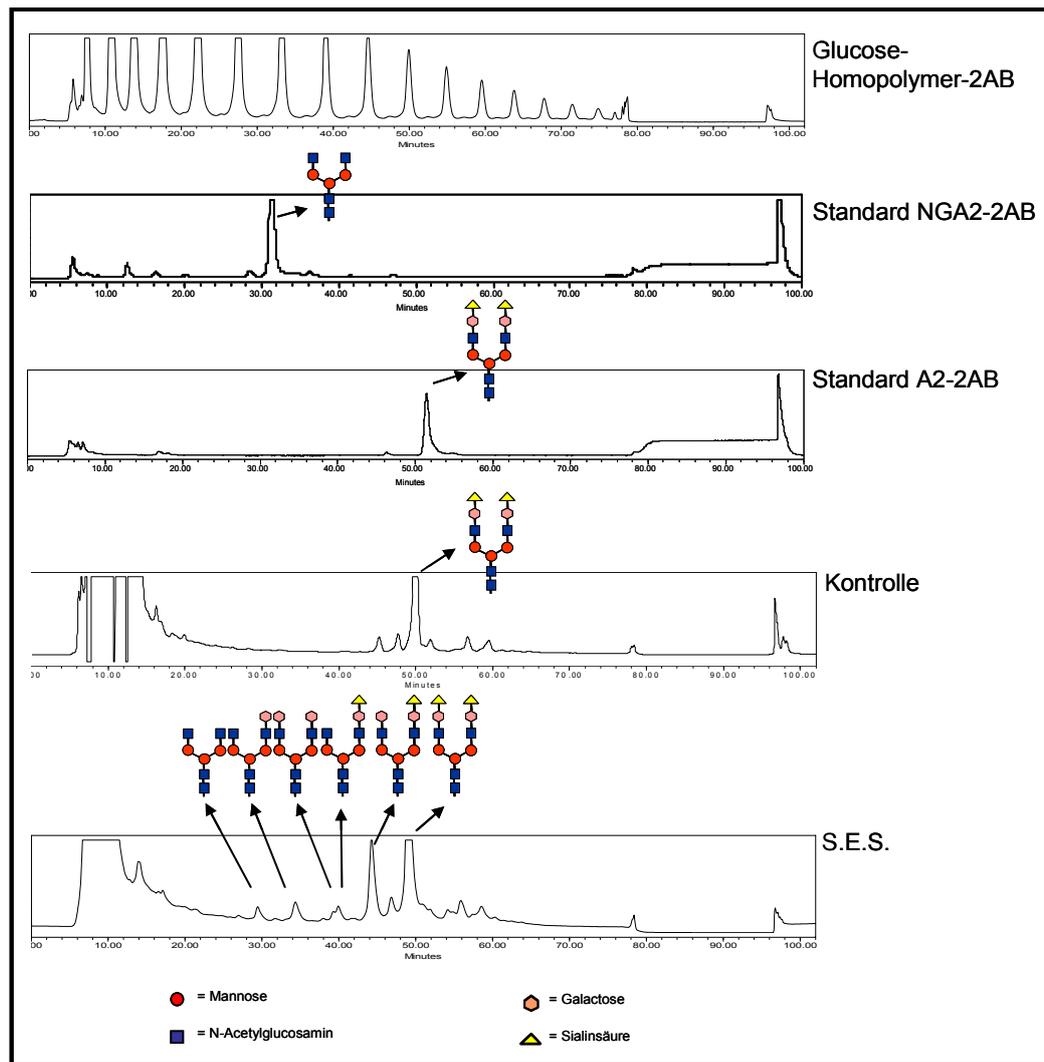


Abb. 11: Analyse der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide. Chromatogramme der 2-AB markierten Oligosaccharide des aufgereinigten Serumtransferrins der Patientin S.E.S. im Vergleich zu einer Kontrolle und 2-AB markierten Oligosaccharidstandards nach HPLC-Analyse. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie sind in Form der korrespondierenden Zuckerstrukturen schematisch dargestellt.

Tab 9: Massenanalyse der 2-AB markierten Oligosaccharide der Patientin S.E.S.

| Fraktion | Retentionszeit [min] | Errechnete Masse [Da] | Analysierte Masse [m/z] |
|----------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 | 29 | 1437,56 | 1437,32 |
| 2 | 34 | 1599,62 | 1599,35 |
| 3 | 39 | 1890,71 | 1890,74 |
| 4 | 44 | 2052,76 | 2052,75 |
| 5 | 49 | 2343,86 | 2343,81 |

Die Ergebnisse deuteten bei der Patientin S.E.S. nicht auf einen Transferasedefekt hin, da sowohl die Übertragung der Galaktose, als auch die der Sialinsäuren auf das Glykoprotein vermindert war.

4.2.4 Gesamtglykananalyse von Serumglykoproteinen

Um zu zeigen, wie stark sich die beim Serumtransferrin und α -1-Antitrypsin gefundene Glykosylierungsstörung auf die Gesamtheit der Serumglykoproteine auswirkt, wurden die Seren der Patientin S.E.S. und einer Kontrolle mit Protein-N-Glykanase F inkubiert, welches spezifisch N-Glykane abspaltet. Nach anschließender papierchromatographischer Aufreinigung und 2-AB Markierung wurden die Oligosaccharide mittels Anionenaustauschchromatographie mit der GlycoSepC-Säule analysiert (Abb. 12). Für die Ermittlung der Retentionszeiten von neutralen und negativ geladenen, also sialylierten Zuckern wurden die Oligosaccharidstandards NGA2-2AB, A2-2AB und ein Glucose-Homopolymer-2AB verwendet. Das neutrale Glucose-Homopolymer eluierte innerhalb der ersten 30 Minuten, und aus dem Chromatogramm geht hervor, dass zusätzlich zu der Ladung der Zucker auch die Komplexität der Zucker Einfluss auf die Retentionszeit hat. Zur Ermittlung des Elutionsverhaltens biantennärer Komplex-Typ Oligosaccharide wurden die Standards NGA2-2AB und A2-2AB chromatographisch analysiert, wobei NGA2-2AB nach 19 Minuten und A2-2AB nach 31 Minuten eluierte.

Das Chromatogramm der Kontrolle zeigte neben dem Hauptpeak bei 31 Minuten, das dem A2-Standard entspricht, auch N-Glykane mit drei (34 Minuten) und vier (37 Minuten) Sialinsäureresten. Die Retentionszeit der Oligosaccharide erhöhte sich dabei mit jedem zusätzlichen Sialinsäurerest um 3 Minuten. Bei der Kontrolle trägt der größte Teil der N-Glykane zwei Sialinsäuren, gefolgt von mono- und trisialylierten Formen in gleicher Menge. Tetrasialylierte Glykane sind kaum zu finden. Bei der Patientin S.E.S. geht aus dem Chromatogramm hervor, dass die Menge der disialylierten Glykane gleich bleibt, sich die tri- und tetrasialylierten Formen verringern und gleichzeitig ein stärkeres Signal bei Glykanen mit einer Sialinsäure sowie bei den neutralen Oligosacchariden detektiert werden kann.

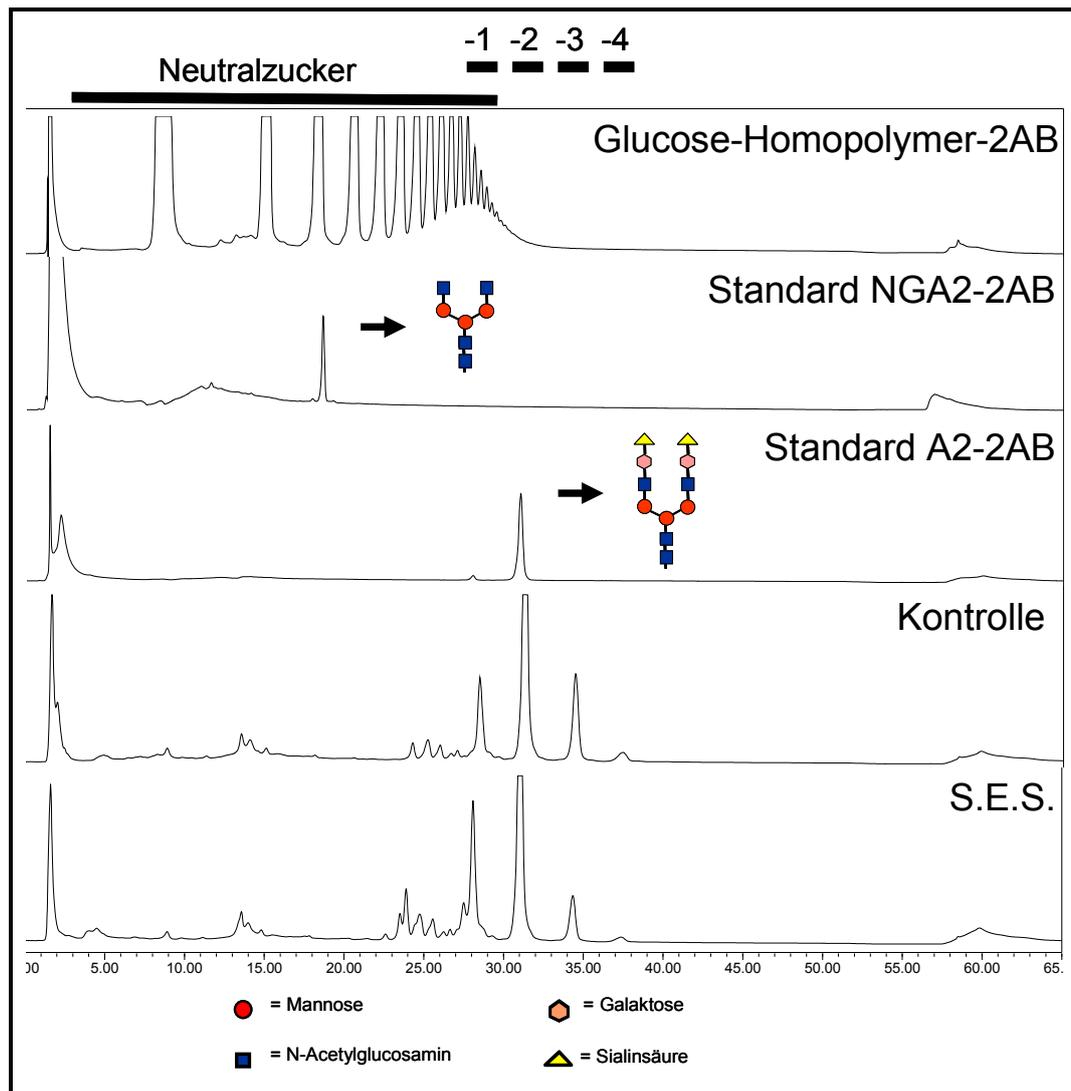


Abb. 12: Gesamtglykananalyse mittels Anionenaustauschchromatographie. Chromatogramme der Gesamtglykananalyse des Serums der Patientin S.E.S. im Vergleich zu einer Kontrolle und 2-AB markierten Oligosaccharidstandards nach HPLC-Analyse mittels der GlycoSepC-Säule. Mit den Balken werden die Retentionszeiten der neutralen und der durch die Anzahl der negativen Ladungen gekennzeichneten N-Glykane angezeigt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der Transferrin-gebundenen Oligosaccharide, bei der der überwiegende Teil der Glykane als mono- oder disialyliertes Oligosaccharid vorlag.

4.2.5 Untersuchung der Core 1 O-Glykosylierung

Als Markerprotein der Core 1 O-Glykane wurde das Serumprotein Apolipoprotein CIII (ApoCIII) untersucht. Dieses mit 79 AS sehr kleine Protein trägt an Thr 74 ein Core 1 O-Glykan, das normalerweise zum Sialyl-T-, bzw. zum Disialyl-T-Antigen

sialyliert wird (Abb. 5). Beim ApoCIII treten diese beiden Formen im Verhältnis von ca. 1:1 auf (Wopereis et al., 2003). Die IEF des ApoCIII der Patientin S.E.S. zeigte im Vergleich zur Kontrolle ein auffälliges Bandenmuster mit einer Erhöhung der Monosialobande (Abb. 13). Diese Ladungsdifferenz kann einerseits durch eine Hyposialylierung des Glykans, aber auch durch eine Mutation im Proteinanteil selbst entstehen. Die Inkubation des Serums mit einer Sialidase, die 2,6-, 2,3- und 2,8-verknüpfte Sialinsäuren abspaltet, gibt Aufschluss darüber, ob der Ladungsunterschied durch das Fehlen von Sialinsäureresten entsteht oder durch Mutationen im Proteinanteil des ApoCIII. Ein Abbau der 2,3-verknüpften Sialinsäure mit einer spezifischen 2,3-Sialidase zeigt an, welche Sialinsäure betroffen ist. Im Falle der Patientin S.E.S. konnte hierdurch das Fehlen der 2,6-verknüpften Sialinsäure gezeigt werden. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass es sich um einen kombinierten Glykosylierungsdefekt handelt, da sowohl die N-, als auch die O-Glykosylierung betroffen ist. Durch den partiellen Verlust der α -2,6-verknüpften Sialinsäure wird angenommen, dass der zugrundeliegende Defekt im trans-Golgi lokalisiert ist, wo die betreffende Reaktion stattfindet.

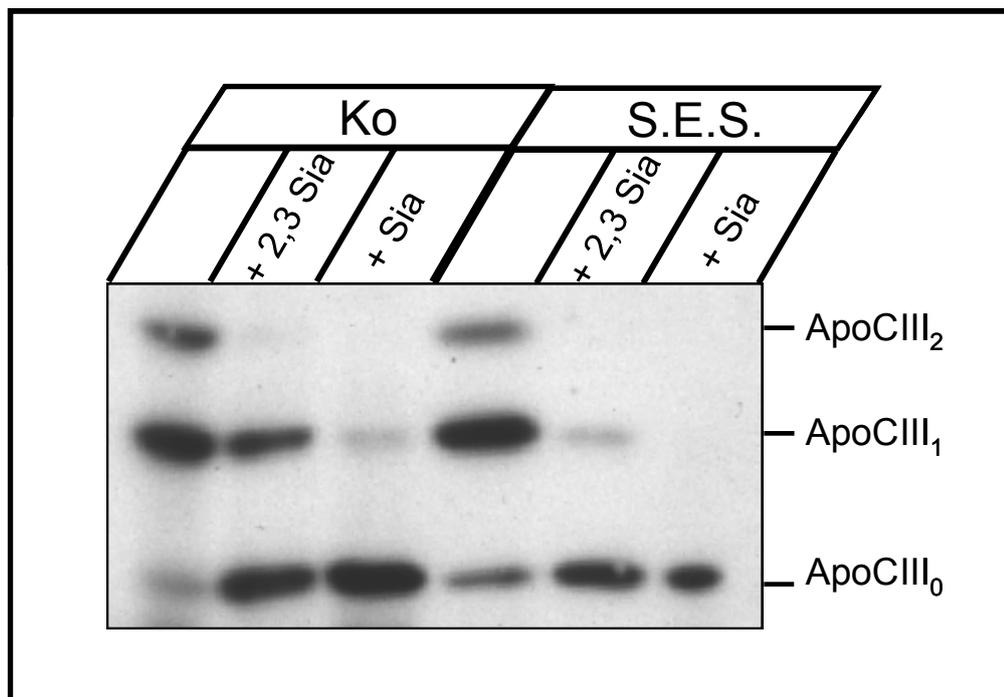


Abb. 13: IEF des Apolipoproteins CIII der Patientin S.E.S. und einer Kontrolle.

Neben den unbehandelten Proben wurden die Seren einmal mit 2,3-Sialidase, die spezifisch 2,3-Sialinsäure abspaltet und einer weiteren Sialidase, die sämtliche Sialinsäuren abspaltet, inkubiert. Am rechten Rand sind je nach Sialyierungsgrad die drei zu detektierenden Isoformen des Apolipoproteins CIII aufgeführt.

4.3 Zuckernukleotidtransport- und Transferaseassay in Mikrosomen

Um einen Transportdefekt der Zuckernukleotide UDP-Galaktose und CMP-NANA ins Lumen des Golgi-Apparates sowie einen Übertragungsdefekt der Monosaccharide auf das zu prozessierende Oligosaccharid auszuschließen, wurden die Mikrosomen von primären Fibroblasten der Patientin S.E.S. und einer Kontrolle mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Eine auf den Proteingehalt bezogene, definierte Menge mikrosomaler Vesikel wurde mit den radioaktiven Zuckernukleotiden UDP-[³H]-Galaktose, CMP-[¹⁴C]-NANA und GDP-[¹⁴C]-Fucose inkubiert. Der GDP-[¹⁴C]-Fucose Import, bzw. der Transfer der Fucose auf Glykoproteine, diente als Maß für die Menge an Golgi-Vesikeln innerhalb der mikrosomalen Fraktion. Im Vergleich zur Kontrolle war der Import von UDP-Galaktose bei S.E.S. normal und der für CMP-NANA leicht erniedrigt (Abb. 14). Daraus kann abgeleitet werden, dass durch den Defekt der Patientin der Import der nukleotidaktivierten Zucker nur gering betroffen ist. Neben dem normalen Import konnte bei der Galaktose ein erhöhter Transfer auf Glykoproteine gemessen werden. Grund hierfür könnte das Fehlen der Galaktosereste in Glykoproteinen sein, was durch die Inkubation mit einer erhöhten Substratkonzentration

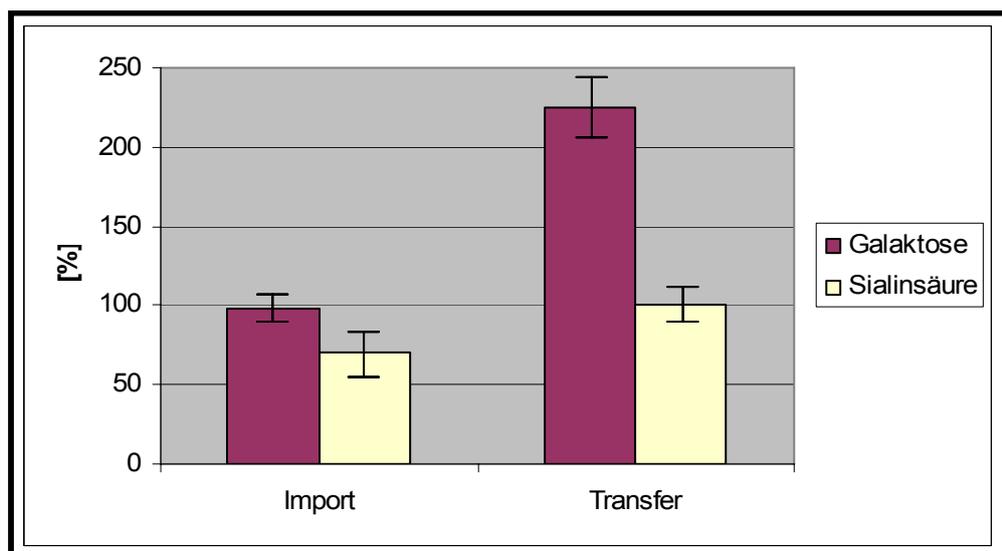


Abb. 14: Nukleotidimport- und Transferaseassay in Mikrosomen der Patientin S.E.S. Angegeben ist die relative Transportaktivität von radioaktiv markierten Nukleotidzuckern in mikrosomale Vesikel und die Transferrate auf Glykoproteine bezogen auf die Kontrolle.

kompensiert wird. Der normale Transfer der Sialinsäure liegt vermutlich in der Synthese der O-Glykane, da deren erhöhte Sialylierung, bedingt durch die erhöhte Substratkonzentration, die Hyposialylierung der N-Glykane ausgleicht.

4.4 Untersuchung des COG-Komplexes

4.4.1 Western-Blot Analyse

Aufgrund von Publikationen über Patienten mit einem Defekt im COG-Komplex, die einen ähnlichen kombinierten Defekt der N- und O-Glykosylierung zeigten, folgte die Western-Blot Analyse des COG-Komplexes. Die acht Untereinheiten des COG-Komplexes bilden normalerweise zwei heterotrimere Strukturen, COG 2-4 und COG 5-7, aus, die über das Heterodimer, bestehend aus COG1 und COG8, miteinander verbunden sind (Ungar et al., 2006). Aus vorangegangenen Untersuchungen zum COG-Komplex in HeLa-Zellen ging hervor, dass die Depletion einer Untereinheit die Reduktion benachbarter Untereinheiten innerhalb des Subkomplexes zur Folge haben kann (Zolov und Lupashin, 2005; Oka et al., 2005). Die Verringerung einzelner Untereinheiten, hervorgerufen durch Mutationen oder der Depletion benachbarter Untereinheiten, konnte auch in den meisten bereits beschriebenen COG-Patienten gezeigt werden (Foulquier et al., 2006; Foulquier et al., 2007; Kranz et al., 2007; Morava et al., 2007).

Da bisher nicht für alle Untereinheiten des COG-Komplexes Antikörper verfügbar sind, konnte dieser Nachweis nur für fünf der acht Untereinheiten durchgeführt werden (Abb. 15). Die von uns untersuchten Untereinheiten decken dabei jeden Subkomplex ab. Der Blot zeigte bei der Patientin S.E.S., bezogen auf β -Aktin und im Vergleich zu einer Kontrolle, ein auf $21\% \pm 8$ erniedrigtes Signal bei COG6. Während auch bei COG5 ($55\% \pm 7$) und COG7 ($62\% \pm 4$), den übrigen Untereinheiten des Subkomplexes, die Signalstärken fast auf die Hälfte reduziert waren, konnten bei COG1 ($97\% \pm 5$) und COG4 ($100\% \pm 2$) ein mit der Kontrolle vergleichbares Signal detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf einen Defekt von COG6 selbst oder des Subkomplexes bestehend aus COG5, COG6 oder COG7 hin.

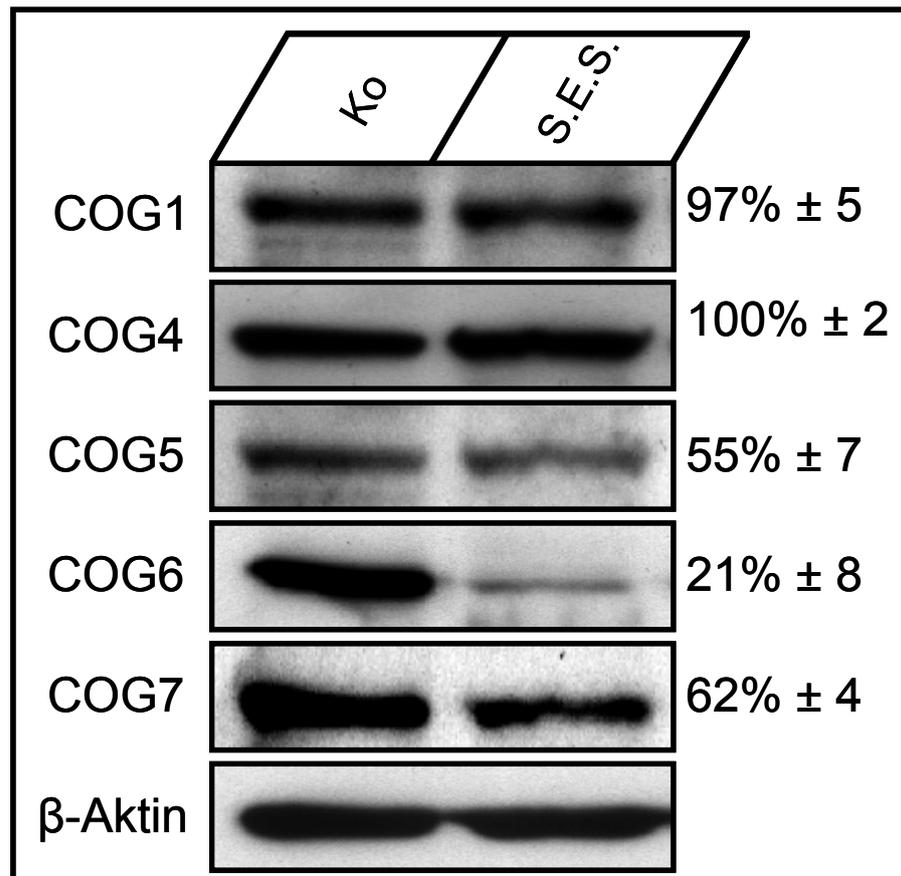


Abb. 15: Western-Blot Analyse der einzelnen COG-Untereinheiten. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine COG1, COG4, COG5, COG6 und COG7 der Patientin S.E.S. und einer Kontrolle erfolgte über ein 10%iges SDS-Gel. Die relativen Signalintensitäten der Untereinheiten sind als Mittel \pm SA ($n=4$) und bezogen auf β -Aktin und der Signalstärke der Kontrolle dargestellt.

4.4.2 Sequenzanalyse von COG5, COG6 und COG7

Um zu untersuchen, ob der zugrundeliegende Defekt COG6 oder den Subkomplex bestehend aus COG5, COG6 und COG7 betrifft, wurden die kodierenden Bereiche der cDNAs dieser Untereinheiten sequenziert. Während im Fall von COG5 und COG7 keine Mutationen gefunden wurden, zeigte sich bei COG6 im Falle der Patientin S.E.S. ein homozygoter Basenaustausch (G1646T) (Abb. 16), der auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäure Glycin zu Valin an Position 549 (G549V) führte. Da diese Mutation bei der Überprüfung von 50 Kontrollallelen nicht gefunden wurde, kann ein Polymorphismus mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

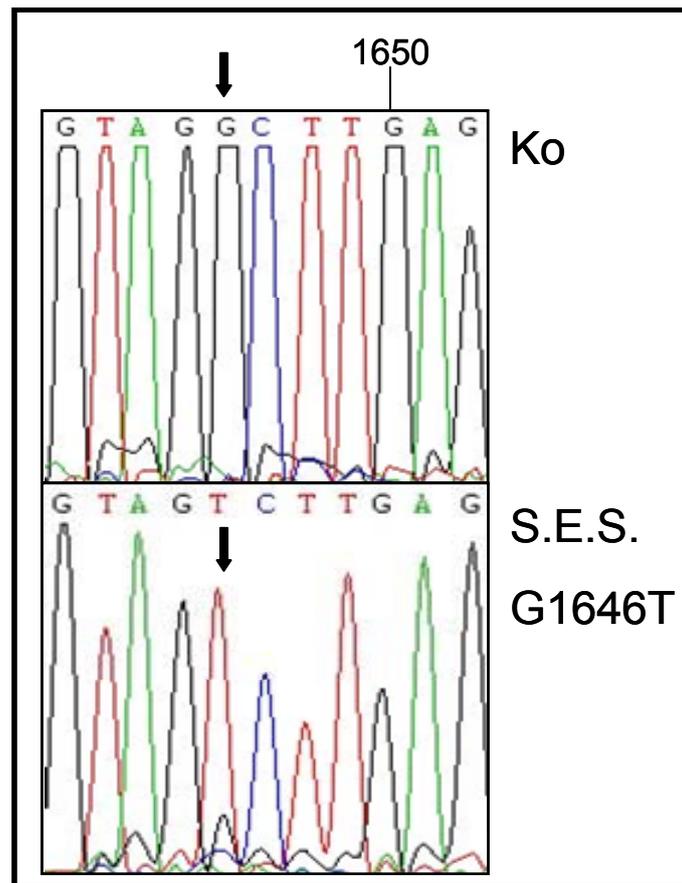


Abb. 16: Identifizierung der Mutation G1646T bei Patientin S.E.S. Dargestellt sind Sequenzvergleiche der cDNAs der Patientin S.E.S. und einer Kontrolle. Die hier dargestellte Kontrolle steht repräsentativ für 25 untersuchte Kontrollpersonen. Der Pfeil markiert die Base, bei der die Patientin die homozygote Mutation G1646T zeigte.

4.4.3 Vergleich der COG6 Proteinsequenz verschiedener Spezies

Die Proteinsequenzen von COG6 des Menschen, der Maus und der Bäckerhefe wurden mit dem CLUSTALW-multiple sequence Alignment-Programm miteinander verglichen (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Abb. 17). Beim Menschen konnte neben dem normalen COG6 eine weitere Transkriptvariante gefunden werden, deren C-Terminus um 42 Aminosäuren verkürzt vorliegt. Das humane und murine Protein waren mit 657 deutlich kleiner als das der Hefe (839 Aminosäuren), bei der der größte Teil der zusätzlichen Aminosäuren N-Terminal lokalisiert ist. Der Vergleich des humanen mit dem murinen COG6 ergab eine Sequenzhomologie von 91% und im Vergleich zur Hefe von 16%. Die bei der Patientin S.E.S. gefundene Mutation, die zum Aminosäureaustausch G549V führt, stellt eine in allen drei Spezies konservierte Aminosäure dar.

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| H.sapiens | -----MAEGSGEVVAV | 11 |
| M.musculus | -----MADASGEVAAV | 11 |
| S.cerevisiae | MDFVVDYQTYAMADTATPELPEPEPRLNLTSDAQSQPTGKLDLQFKLPDLPQRYSNNNATL | 60 |
| | : * . : . : | |
| H.sapiens | SATGAANG----- | 19 |
| M.musculus | PASGAANG----- | 19 |
| S.cerevisiae | PVDNDGAGSKDLHKMTHYAMSSIDKIQLSNPSKQLGQNSQDEKLSQEQNSQNFNTYEPKN | 120 |
| | * | |
| H.sapiens | -----LNNGAGTSATTCNPLSRKHLKILETRLNDKEMLEALKALSTFFVEN----- | 67 |
| M.musculus | -----FSGAGATPAQPNNPLSRKHLKILETRLENDKEMLEALKALSFAFFVEN----- | 67 |
| S.cerevisiae | LDLSKLVSPSSGSKNTTNLVLNKLKILNNTYQATVQLRKLKLVLENKERLSL | 180 |
| | . . . : * ** * * * * : : : * : : * * | |
| H.sapiens | -----SLRTRRNLRGDIERKSLAINEEFVSIKVEKKEELESISEDVQAMSNCCQ | 116 |
| M.musculus | -----SLRTRRNLRGDIERRSLAINEEFVNIKFDVKEELESINEDVQAMSSCCQ | 116 |
| S.cerevisiae | DEQKLMNPEYVGTLLARRALRTDLESQLLKEHITVLEEFKPIIRRIKRLSSSVEKIORTSE | 240 |
| | . : * * * * * : * : . : . * : : . : . * : : . : | |
| H.sapiens | DMTSRLQAAKEQTQDLIVKTTKQLQESQKLEIRAQVADAFLSKFQLTSDMSLLRGTRG | 176 |
| M.musculus | DMTSRLQAAKEQTQDLIVKTTKQLQAEQRLEIRAQVADAFQAKFQLTSDMSLLRGTRG | 176 |
| S.cerevisiae | KLLSNETNEVPTNNVVLQEQIDQYRLKAEQLKLLKLLSIRDRFTLNQVEDDVI--NG | 297 |
| | . : * . . . : : : : : : : : : : : : : * * . . * . : : * | |
| H.sapiens | PITEDFFKALGRVKQIHNDVKVLLRTNQQTAGLEIMEQMALLQETAYERLYRWAQSECRT | 236 |
| M.musculus | PVTEDFFKALGRVKQIHNDVKVLLRTNQQTAGLEIMEQMALLQETAYERLYRWAQSECRA | 236 |
| S.cerevisiae | TIDNIFFEVVKVINIKDESSFLTLPLNLAGNALIMGVNEILEKTNKKIFNYLIDFLYS | 357 |
| | . : : * * . : : * : : : : . * * : * * : : : : * . : : : : . : : | |
| H.sapiens | LTQES-----CDVSPVLTQAMEALQDRPVLYKYTLDEFGTARRSTVVRGFIDALT | 286 |
| M.musculus | LTQES-----CDVSAVLSQAMEALQDRPVLYKYTLDEFGTARRSTVVRGFIDALT | 286 |
| S.cerevisiae | FESSNLLNDHGTTEQESLNI FRKSLVFLSSDLELFNELLKRVTTLRKSKILDEFLSQFD | 417 |
| | . : . * . : : : : : * . . * : : * . . * : : * . : : * . : : | |
| H.sapiens | RGGPGGTPRPIEMHSHDPLRYVGDMLAWLHQATASEKEHLEALLKHVTTQGVENIQEVV | 346 |
| M.musculus | RGGPGGTPRPIEMHSHDPLRYVGDMLAWLHQATASEKEHLEALLKHVTAQGVKENIQEVV | 346 |
| S.cerevisiae | MN--STTSKPIILSAHDIRYIGDVLASVHSIIANEADPVKSLDFQDEDLKDTPIISILQ | 475 |
| | . . . * . : * * : : * * * * * * * * * * . : . * . : : | |
| H.sapiens | G-----HITTEGVCRLKVRIEQVIVAEVAVLLYKISNLLKFKYHHTISGIV | 392 |
| M.musculus | G-----HITTEGVCRLKVRIEQVILAEVAVLLYKISNLLKFKYHHTISGIV | 392 |
| S.cerevisiae | QNKTFKLGIDNKLNDIIQSLNSCRIRIEQIVRFEENPIINFEIVRLLKLYRVMFERKG | 535 |
| | . * . : . . . : : * * * * : * . : : : * * * * * : . : | |
| H.sapiens | GNSATALTTIEEMHLLSK-KIFFNLSLHASKLMDKVELPPDLPSSALNQTLMLLRE | 451 |
| M.musculus | GNSAATLTTIEEMHLLSK-KIFFTSLHANKLMDKVELPPDLPSSALSQTLTLLRD | 451 |
| S.cerevisiae | IQDDSSIINLKSLEDISKNRIGYEDYMKQTVMAETKNSDDLPEWLSSEYMNKLV | 595 |
| | . : . : . : . : . : . : * * * * : . . . * : : . . * * . * : : * : : | |
| H.sapiens | VLASHDSSVPLDARQADFVQVLS-----CVLDPLLQCTVSASN-LGTADM | 497 |
| M.musculus | ILASHDSSVPLDARQADFVQVLS-----CALDPLLQCTVSASN-LGTADM | 497 |
| S.cerevisiae | LFETIYEKTHAAEEDSEDNKLLSSKNLQTTIVEQPIKDVLLKQLQTSFPLAKKNEKESASL | 655 |
| | : : : : . : * . . * : * : * * . . : : * * . * . : | |
| H.sapiens | ATFMVNSLYMKTTLALFE-----FTDRRLEMLQFQIEAHLDTLINEQASYVLRVGL | 550 |
| M.musculus | ATFMVNSLYMKTTLALFE-----FTDRRLEMLQFQIEAHLDTLINEQASYVLRVGL | 550 |
| S.cerevisiae | LTIEINCFDLIKSRLQPFEGLEFAQDDSRKITIIVCDKLEKTKQMLTLQIKFLFENTGL | 715 |
| | * : * . : : * * * * : : : : : : . : . : * . : : . * * * | |
| H.sapiens | SYIYNTVQQHKPEQSSLANMPNLDVTLK----AAMVQFDRYLSAPDNLLIPQLN---- | 601 |
| M.musculus | SYIYNTIQQRPDQSSLANMPNLDVAVLK----AAMAQFDRYLSAPDHLMLPQLN---- | 601 |
| S.cerevisiae | DLYSNLVNMIFFVDSVKDELVDYDMLALRDNLSMELDMVRKNVHDKLNYLPLQALTDVQG | 775 |
| | . * : : * . : : : : : : : : : : : : : : : : * * : | |
| H.sapiens | ----FLLSATVKEQIVKQSTELVCRAYGEVYAAVMNPINEYKD-PENILHRSPQQVQTLL | 656 |
| M.musculus | ----SLLSATVKEQIIKQSTELVCRAYAEVHAAVMNPDNAYKD-PESILHRSPQVKTLL | 656 |
| S.cerevisiae | NLLFKLTSPMIADEICDECFFKLSLFYNI FRKLLIHLYPNKKDQVFEILNFSDEFDMLI | 835 |
| | * * . : * * . : . : . * . : : : * * * * * * * * . : . * * * | |
| H.sapiens | S--- 657 | |
| M.musculus | S--- 657 | |
| S.cerevisiae | GIDH 839 | |
| | . | |

Abb. 17: Protein-Alignment von COG6-Proteinen verschiedener Spezies. Die Proteinsequenzen von COG6 des Menschen (*H.sapiens*), der Maus (*M.musculus*) und der Bäckerhefe (*S.cerevisiae*) wurden nach der ClustalW-Methode miteinander verglichen (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Der Pfeil markiert die Position der Mutation, die bei der Patientin gefunden wurde. * = konservierte Reste, : = konserviert substituierte Reste, . = semi-konserviert substituierte Reste.

4.5.1 Northern-Blot Analyse zur Überprüfung der COG6-Expression

Die Verminderung des bei Patientin S.E.S. gezeigten COG6-Proteins kann zum einen durch eine verminderte Translation oder durch nachfolgende Degradationsprozesse, zum anderen durch eine verminderte Expression hervorgerufen werden. Zur Überprüfung der Expression des COG6 wurde mit Gesamt-RNA der Patientin und Kontrollen ein Northern-Blot durchgeführt (Abb. 18). Um sicherzustellen, dass gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden, wurde eine gegen β -Aktin spezifische Sonde eingesetzt.

Der Northern-Blot mit der COG6-Sonde zeigt bei Patientin S.E.S. ein auf $16\% \pm 4$ reduziertes Signal im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 18, oben). Anhand der Signalstärke für β -Aktin (Abb. 18, mitte) sowie der Bandenstärke der 26S- und 18S-rRNA im Agarosegel (Abb. 18, unten) konnte sichergestellt werden, dass gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA für den Northern-Blot eingesetzt wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die verminderte Proteinkonzentration des COG6 nicht durch die Degradation des Proteins hervorgerufen wird, sondern die Expression aufgrund einer instabilen mRNA herabgesetzt ist.

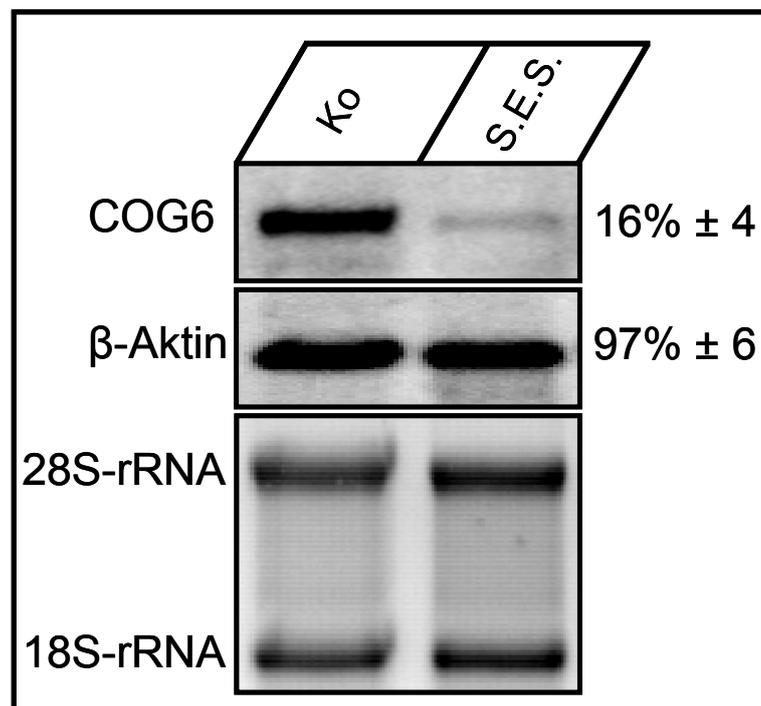


Abb. 18: Northern-Blot Analyse. Ein Northern Blot mit Gesamt-RNA von Kontrollen und der Patientin S.E.S. wurde mit einer für COG6 spezifischen PCR-Sonde hybridisiert. Um sicherzustellen, dass gleiche Konzentrationen an Gesamt-RNA eingesetzt wurden, wurde nachfolgend eine Hybridisierung mit einer β -Aktin-Sonde durchgeführt. Die relativen Signalintensitäten der Untereinheiten sind als Mittel \pm SA ($n=4$) und bezogen auf β -Aktin und der Signalstärke der Kontrolle dargestellt.

4.5.2 Expression der Wildtyp-cDNA in den Hautfibroblasten der Patientin

Um zu überprüfen, ob die bei der Patientin S.E.S. gefundene Mutation G1646T (G549V) die Ursächlichkeit für den Defekt des COG-Komplexes darstellt, wurde die Wildtyp-cDNA von *COG6* mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems (pLNCXII) in den Hautfibroblasten der Patientin exprimiert. Die Selektion transduzierter Hautfibroblasten erfolgte mit G418.

4.5.3 Komplementation des Defektes in Wildtyp-COG6 transduzierten Hautfibroblasten

Sowohl in HeLa-Zellen, als auch in den meisten COG-Patienten, konnte gezeigt werden, dass durch die Depletion, bzw. durch Mutationen in Unterheiten, der jeweilige Subkomplex zerfällt und die Reduktion der anderen Untereinheiten zur Folge haben kann (Zolov und Lupashin, 2005; Oka et al., 2005; Foulquier et al., 2006; Foulquier et al., 2007; Kranz et al., 2007; Morava et al., 2007). Bei unserer Patientin S.E.S. bewirkt die *COG6*-Mutation G1646T eine verminderte *COG6*-Expression. Wie auch bei anderen Patienten beschrieben, bewirkt die Reduktion des *COG6*-Proteins eine Verminderung der benachbarten Untereinheiten des Subkomplexes, *COG5* und *COG7*.

Zur Untersuchung des gesamten COG-Komplexes wurden die Hautfibroblasten in Lysispuffer mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und die Zellmembranen pelletiert. Der Überstand wurde über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt, fraktioniert und über Western-Blot mit unterschiedlichen Antikörpern analysiert (Abb. 19). Bei der Kontrolle war das Signal hauptsächlich in den Fraktionen 15-20 detektierbar, das dem Gesamtkomplex (~800 kDa) entspricht. Ein weiteres Signal ist ab Fraktion 25 und nachfolgend immer schwächer werdend, zu beobachten. Die beinahe identische Retentionszeit vom Proteinstandard Thyroglobulin (669 kDa) lässt vermuten, dass es sich hierbei um den Subkomplex *COG2-COG4* zusammen mit *COG1* und *COG8* handelt. Ähnliche Beobachtungen konnten Oka et al. (2005) bei ihren Untersuchungen zur Organisation und Funktion des COG-Komplexes machen. In unterschiedlichen Säugerzellen fanden sie neben dem vollständigen Komplex auch kleinere Komplexe, die sich aus den Subkomplexen *COG2-4*, *COG5-7* und *COG1+COG8*, aber auch *COG1-4+COG8* und *COG5-8* zusammensetzten. Diese Mischung an Subkomplexen würde das bei den

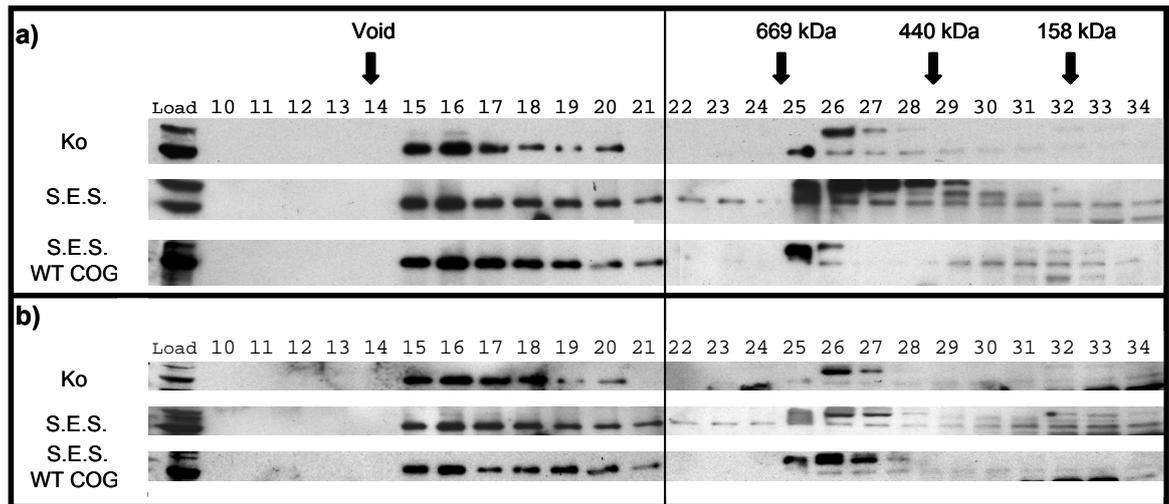


Abb. 19: Gelfiltrationchromatographische Analyse des COG-Komplexes. Zelllysate von primären und mit Wildtyp-COG6 transduzierten Hautfibroblasten der Patientin S.E.S. wurden im Vergleich zur Kontrolle über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Oben angegeben sind die Retentionszeiten der Proteinstandards entsprechender Größe, sowie das Ausschlussvolumen (Void).
a) Analyse der Fraktionen mit COG4-Antikörper
b) Analyse der Fraktionen mit COG7- Antikörper

Kontrollen zwar schwache, aber dennoch detektierbare Signale ab Fraktion 26 erklären. Bei der dominanten oberen Bande der Fraktion 26 und 27 handelt es sich um ein unspezifisches Signal, das auch bei den anderen Proben zu beobachten ist. Mit dem COG7-Antikörper erhält man bei der Kontrolle ein ähnliches Bild wie mit dem COG4-Antikörper, außer dass die Signale für die kleineren Komplexe nur sehr schwach zu sehen sind. Auch hier sind die Signale ober- (Fraktion 26 und 27) und unterhalb (Fraktion 24 und 32-35) der zu erwartenden Banden unspezifische Signale und bei allen Proben zu finden.

Bei der Patientin S.E.S. sind Signale mit dem COG4-Antikörper ab Fraktion 15 durchgängig bis Fraktion 34 sichtbar. Im Vergleich zur Kontrolle treten bei S.E.S. sehr viel mehr kleinere Komplexe auf. Dieses verstärkte Auftreten der kleineren Komplexe ist darauf zurückzuführen, dass im Falle der Patientin COG6 stark, sowie COG5 und COG7 moderat vermindert sind. Zusätzlich zu dem auch bei der Kontrolle erkennbaren Subkomplex bestehend aus den Untereinheiten COG1-4 + Cog8, kann bei der Patientin scheinbar auch noch COG5 und COG7 mit den Subkomplex interagieren. Gestärkt wird diese Vermutung durch die Inkubation des Western-Blots mit dem COG7-Antikörper. Zwar sind auch hier durchgängig verkleinerte Komplexe detektierbar, jedoch sind die Signale im Verhältnis zum COG4-Antikörper schwächer.

Bei den mit Wildtyp-COG6 transduzierten Fibroblasten tritt im Vergleich zur Patientin eine Verminderung der kleineren Komplexe auf. Ein solches Ergebnis würde man auch erwarten, da sich durch die Expression des COG6-Proteins der vollständige Komplex wieder ausbilden kann.

Dieses Ergebnis zeigt, dass durch eine Verminderung des COG6 der vollständige COG-Komplex zwar vorliegt, aber zusätzlich kleinere, unvollständige Subkomplexe akkumulieren. Durch die Expression von Wildtyp-COG6 in den Patientenzellen konnte dieser Effekt zwar nicht vollständig komplementiert werden, aber eine Verminderung der kleineren Komplexe konnte erreicht werden.

4.5.4 Funktionalität des COG-Komplexes in Hautfibroblasten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in den Hautfibroblasten der Patientin S.E.S. neben dem vollständigen COG-Komplex auch kleinere Subkomplexe akkumulieren, musste nun noch die Funktionstüchtigkeit des Komplexes nachgewiesen werden. 2006 zeigten Richard Steet und Stuart Kornfeld bei Fibroblasten des COG7-Indexpatienten, dass diese durch die Störung des retrograden intra-Golgi Transportes resistenter gegenüber einer Brefeldin A-Behandlung waren. Brefeldin A ist ein Metabolit aus Pilzen und stört durch die selektive Inhibition des GTP-Austauschfaktors, das die GTPase Arf1p aktiviert. Arf1p wiederum ist beteiligt an Bildung von Transportvesikeln. Durch diese Inhibition kommt es zur Akkumulation von Golgi-Proteinen im ER, wodurch die Golgi-Zisternen kollabieren. Da bei COG-Patienten der retrograde Transport von Proteinen beeinträchtigt ist, bleibt die Golgi Struktur unter Brefeldin A-Einwirkung länger erhalten. Sollte der retrograde Transport bei der Patientin S.E.S. durch den COG6-Defekt beeinträchtigt sein, sollten sich die Hautfibroblasten resistenter gegenüber Brefeldin A verhalten als die Normalkontrollen.

Dafür wurden Fibroblasten von Kontrollen, der Patientin S.E.S., S.E.S. WT-COG6, S.E.S. Mock-transduzierte Zellen und Zellen eines COG7-Patienten als Positivkontrolle mit Brefeldin A behandelt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Fibroblasten fixiert und die Struktur des Golgi-Apparates mit GM130, einem Golgi-Marker, mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 20).

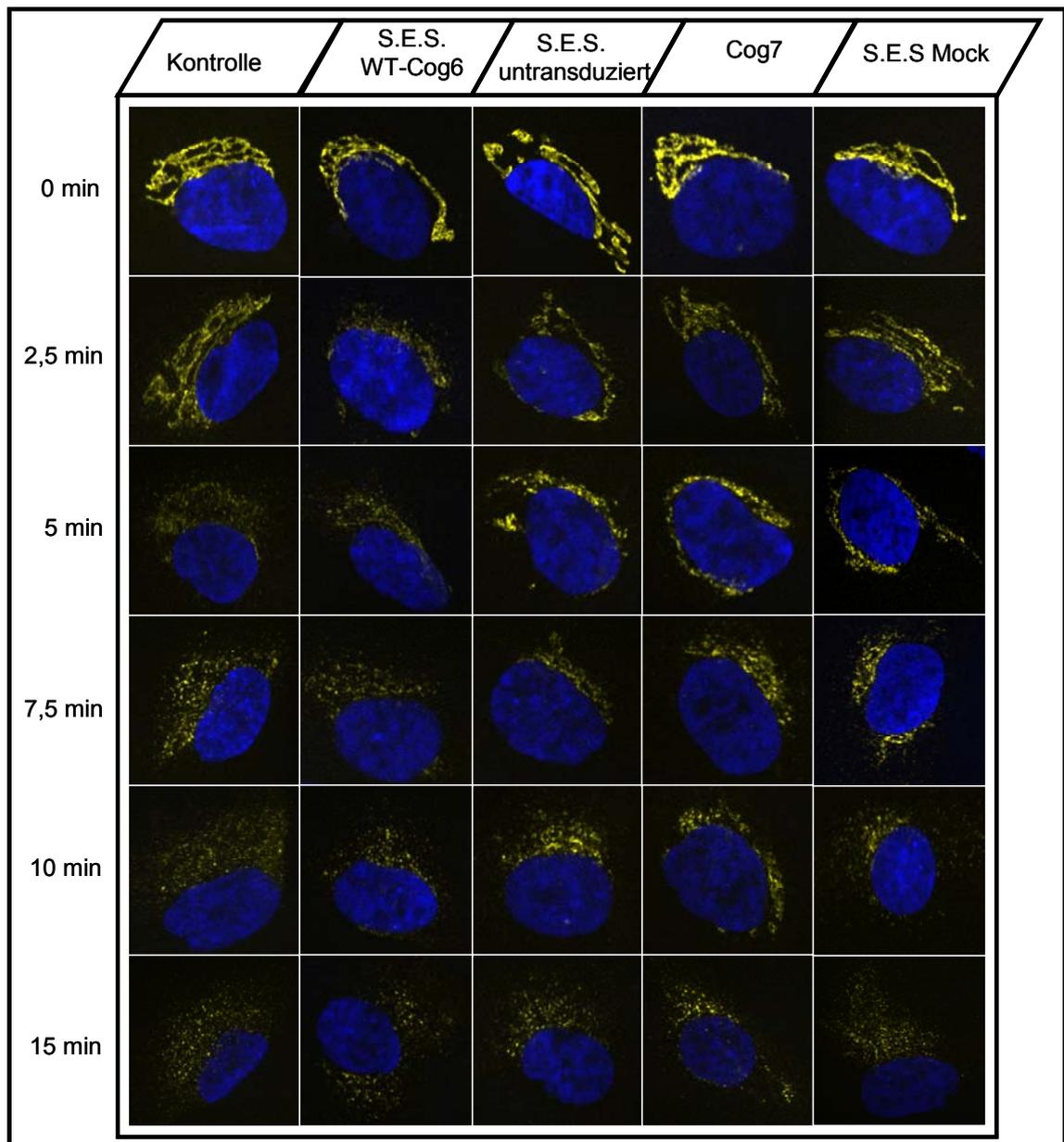


Abb. 20: Brefeldin A-Assay. Hautfibroblasten von Kontrollen, S.E.S., S.E.S. WT-COG6, eines COG7-Patienten und einer Mock transduzierten Patientenzellen von S.E.S. wurden mit 2,5 µg/ml Brefeldin A inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation des Golgi-Marker GM130 (gelb) Immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt.

Bei den Kontrollen war nach 2,5 Minuten Brefeldin A-Behandlung der Golgi-Apparat noch weitgehend intakt, während bereits nach 5 Minuten der Golgi zerfallen ist und das Fluoreszenzsignal nur noch vesikulär auftritt. Nach 15 minütiger Inkubation hat sich das Signal über die gesamte Zelle verteilt. Bei der Patientin S.E.S. verläuft der Zerfall des Golgi-Apparates langsamer, so ist nach 7,5 minütiger Inkubation mit Brefeldin A das Fluoreszenzsignal des GM130 noch um den Zellkern lokalisiert, während bei der Kontrolle das Signal schon über einen

großen Teil der Zelle verteilt ist. Im Vergleich mit dem COG7-Patienten verläuft der Zerfall des Golgi annähernd gleich langsam im Vergleich zu Normalkontrollen. Nach 15 Minuten ist aber auch bei den Patienten der Golgi-Apparat nahezu vollständig zerfallen. Durch die Transduktion der Patientenzellen mit Wildtyp-COG6 verläuft der Zerfall des Golgi schneller als bei den untransduzierten Zellen, aber langsamer als bei den Kontrollzellen, bei denen der Strukturverlust des Golgi-Apparates nach 5 minütiger Brefeldin A-Inkubation weiter fortgeschritten ist. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von Wildtyp-COG6 in den Patientenzellen der retrograde Transport zumindest teilweise wieder hergestellt werden konnte. Aus der Untersuchung Mock-transduzierter Patientenzellen wird ersichtlich, dass der Zerfall des Golgi vergleichbar mit den untransduzierten Fibroblasten ist und dass daher die Komplementation des Defektes auf das Wildtyp-COG6 zurückzuführen ist.

5 Diskussion

Bei der Proteinglykosylierung handelt es um eine der häufigsten und komplexesten ko- und posttranslationalen Modifikationen sezernierter und Membran-gebundener Proteine in eukaryotischen Zellen (Spiro, 2002). Störungen in der Proteinglykosylierung können durch Mutationen in spezifischen Proteinen hervorgerufen werden, was einen Mangel an Nukleotid-aktivierten oder Lipid-verknüpften Zuckern, Defekte des Transfers von Zuckerresten oder Oligosacchariden auf Glykoproteine oder Defekte in der Prozessierung von Protein-verknüpften Oligosacchariden zur Folge hat. Dabei führt die unvollständige oder fehlerhafte Glykosylierung von Proteinen bei den Patienten zu einem multisystemischen Phänotyp, der sich häufig in Entwicklungsstörungen, psychomotorischen Retardierungen, Krampfanfällen sowie Blutgerinnungsstörungen äußert.

5.1 Klinischer Vergleich der bekannten COG-Defekte

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen neuen Defekt in der COG6 Untereinheit des COG-Komplexes. Bislang konnten Mutationen in den COG1, COG7 und COG8 Untereinheiten identifiziert werden, deren Mutationen vom vorzeitigen Translationsstop bei COG1 und COG8, bis hin zu Splice-site Mutationen bei COG1 und COG7 reichen (Foulquier et al., 2006; Foulquier et al., 2007; Kranz et al., 2007; Morava et al., 2007; Ng et al., 2007; Wu et al., 2004; Zeevaert et al., 2008). Bei der COG6-Indexpatientin S.E.S. wurde eine homozygote Punktmutation nachgewiesen, die zum Austausch der konservierten Aminosäure Glycin zu Valin an Position 549 führt.

Der klinische Phänotyp der einzelnen Defekte ist sehr heterogen und reicht von einer milden Ausprägung bis hin zur postnatalen Letalität. Patienten mit einem COG1 Defekt weisen einen milden Phänotyp auf, der mit leichter bis moderater psychomotorischer Retardierung, Wachstumsverzögerung, Hypotonie und Gedeihstörungen einhergeht. Mutationen in der COG8-Untereinheit führen zu Hypotonie, stärkeren psychomotorischen und Wachstumsretardierungen und schwerer neurologischer Regression. Am schwersten betroffen sind COG7-Patienten, bei denen ebenfalls erhebliche psychomotorische und Wachstumsretardierungen, starke neurologische Regressionen und Dysmorphien beobachtet wurden, die innerhalb des ersten Lebensjahres zum Tode führten.

5.2 Der Defekt der Patientin S.E.S. stellt einen kombinierten Glykosylierungsdefekt dar

Ähnlich wie bei bisher bekannten CDG-Typen wurden bei der Patientin S.E.S. fokale Krampfanfälle und Blutgerinnungsstörungen beobachtet. Deshalb wurde eine Analyse des Serumtransferrins durchgeführt. Serumtransferrin ist ein 77 kDa schweres Eisen bindendes Protein, an das unter physiologischen Bedingungen zwei biantennäre Komplex-Typ Oligosaccharide gebunden sind. Der partielle oder vollständige Verlust der Oligosaccharidketten führt durch den damit einhergehenden Verlust der negativ geladenen Sialinsäuren zur Veränderung des isoelektrischen Punktes des Proteins. Im Falle der Patientin S.E.S. zeigte sich ein Bandenmuster mit Tetra-, Tri-, Di-, Mono- und Asialotransferrin mit absteigender Intensität, während bei einem CDG-Ia Patienten das charakteristische Bandenmuster mit erhöhtem Di- und Asialotransferrin, das durch das Fehlen kompletter Zuckerketten hervorgerufen wird, gefunden wurde. Da eine Veränderung des isoelektrischen Punktes eines Proteins durch Mutationen in der Aminosäuresequenz hervorgerufen werden kann, wurde der Ladungsverlust des Transferrins durch einen Glykosylierungsdefekt mit Hilfe der IEF eines weiteren Serumglykoproteins, α -1-Antitrypsins, bestätigt. Anschließend wurde das Fehlen vollständiger Zuckerketten am Serumtransferrin mittels SDS-Page und Western-Blot Analyse ausgeschlossen.

Das Auftreten verkürzter Oligosaccharide im Falle unserer Patientin, das zur Entstehung des absteigenden Bandenmusters in der IEF des Transferrins führt, kann einerseits durch das Fehlen der terminalen Sialinsäuren, andererseits durch unvollständige Übertragung der Galaktose und der damit einhergehenden Hyposialylierung erklärt werden. Bei der Analyse der Transferrin-gebundenen N-Glykane mittels HPLC fanden sich neben der normalen, vollständig prozessierten Disialoform auch verkürzte Formen, die zu einem früheren Zeitpunkt eluierten. Bei einer vergleichenden Analyse mit einem Glucose-Homopolymerstandard ergab sich, dass die Oligosaccharide jeweils um einen Zuckerrest verkürzt waren. Die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung der verkürzten Oligosaccharide führte zu dem Ergebnis, dass bei der Patientin S.E.S. sowohl die Übertragung von Galaktose-, als auch von Sialinsäureresten auf N-Glykane vermindert ist, womit der Defekt einer einzelnen Galaktosyl-, bzw. Sialyltransferase ausgeschlossen werden konnte. Wie stark sich

dieser Glykosylierungsdefekt auf die im Serum vorkommenden N-Glykane von Glykoproteinen auswirkt, konnte mit Hilfe der Gesamtglykananalyse mittels Anionenaustauschchromatographie ermittelt werden. Bei der Untersuchung der N-Glykane der Patientin wurde lediglich eine leichte Erhöhung neutraler und einfach-sialylierter Oligosaccharide und eine geringfügige Erniedrigung dreifach- oder vierfach-sialylierter Zuckerketten gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten aus der Analyse der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide überein, bei der neben den verkürzten Formen ein erheblicher Teil der Oligosaccharide vollständig prozessiert war. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Ursächlichkeit der Erkrankung der Patientin S.E.S. lediglich auf die Hypoglykosylierung der Proteine zurückzuführen ist oder ob durch den gestörten retrograden Transport andere Enzyme, die nicht an ihren Wirkungsort gelangen, andere, in diesem Zusammenhang bislang noch nicht untersuchte, fehlende Modifikationen für das Krankheitsbild verantwortlich sind. Dabei ist zu beachten, dass neben der Prozessierung Protein-verknüpfter N- und O-Glykane im Golgi-Apparat noch eine Reihe weiterer Proteinmodifikationen katalysiert werden wie bspw. die Anheftung von Lipidankern oder die Modifikation einzelner Aminosäurereste, durch Sulfatierungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Carboxylierungen. Zum Nachweis eines kombinierten N- und O-Glykosylierungsdefektes wurden Core 1 O-Glykane mittels IEF des Apolipoproteins CIII (ApoCIII) untersucht. ApoCIII ist ein Serumprotein, das ein einzelnes Core 1 O-Glykan am Threoninrest 94 trägt. In der IEF des ApoCIII sind drei Isoformen (ApoCIII₀ – ApoCIII₂) detektierbar, die sich durch die Anzahl der gebundenen Sialinsäuren unterscheiden (Wopereis et al., 2006). In diesem Zusammenhang spricht man nach der Verknüpfung einer Sialinsäure in 2,3-Orientierung an die terminale Galaktose auch vom Sialyl T-Antigen und nach einer weiteren Sialylierung in 2,6-Orientierung an den initialen GalNAc-Rest vom Disialyl T-Antigen. Quantitativ betrachtet ist im Normalfall die Menge von Sialyl T-Antigen zu Disialyl T-Antigen annähernd gleich, während die nicht-sialylierte Form unterhalb der Nachweisgrenze liegt (Wopereis et al., 2006). Bei der Patientin S.E.S. konnte im Rahmen der ApoCIII Analyse eine Hyposialylierung beobachtet werden. Dabei konnte das Fehlen von Galaktoseresten in den Core 1 Glykanen mittels der 2,3-Sialidase Behandlung ausgeschlossen werden. Diese Sialidase spaltet spezifisch die an Galaktose gebundene Sialinsäure ab, während die an GalNAc in 2,6-Orientierung gebundene Sialinsäure nicht abgespalten wird. Bei der

Patientin S.E.S. geht die ursprünglich detektierte Monosialoform (ApoCIII₁) nach der 2,3-Sialidase Behandlung nahezu vollständig in die Asialoform (ApoCIII₀) über. Daraus lässt sich folgern, dass die an Galaktose gebundene Sialinsäure fast ausschließlich für die Bildung der Monosialoform verantwortlich ist.

Die N-Glykan Prozessierung beginnt im cis-Golgi Kompartiment mit dem Trimming der Zuckerkette, das nach der Übertragung des ersten GlcNAc-Restes im medialen-Golgi abgeschlossen wird. Der Transfer von weiteren GlcNAc-Resten findet ebenfalls im medialen Golgi statt, während die nachfolgende Übertragung der Galaktose und Sialinsäurereste im trans-Golgi lokalisiert ist. Da im Falle der Patientin S.E.S. sowohl die Übertragung von Galaktose, als auch von Sialinsäure betroffen ist, ist der Defekt der Patientin im trans-Golgi-Kompartiment lokalisiert. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung findet die O-Glykosylierung nicht Kompartiment-spezifisch, sondern in allen sekretorischen Zellorganellen statt. Die Monosaccharide werden dabei nacheinander an die wachsende Zuckerkette angehängt. Bei der Patientin S.E.S. konnte bei der Untersuchung der Core 1 O-Glykane fast ausschließlich das Sialyl-T Antigen detektiert werden. Die Verknüpfung der Sialinsäure in β -2,6 Orientierung an den initialen GalNAc-Rest ist der letzte Schritt der Disialyl-T Antigen Biosynthese und ist wahrscheinlich im späten medialen- oder im trans-Golgi Kompartiment lokalisiert.

5.3 Identifizierung des Defekts

Ein kombinierter Defekt der N- und O-Glykosylierung kann nicht durch eine Defizienz spezifischer Glykosyltransferasen hervorgerufen werden, vielmehr muss der Defekt in einem übergeordneten System lokalisiert sein. So konnte zum Beispiel von Abeijon et al. (1993) gezeigt werden, dass in einer GDPase Null-Mutante von *S.cerevisiae* die N- und O-Glykosylierung teilweise beeinträchtigt ist. Die GDPase ist eine Ectoapyrase, die im Lumen des Golgi-Apparates vor allem GDP zu GMP und P_i dephosphoryliert. Generell fungieren Nukleotiddiphosphate im Golgi als Inhibitoren der entsprechenden Zuckernukleotidtransferasen (Hirschberg et al., 1998). Außerdem werden die Nukleotidmonophosphate durch spezifische Nukleotidzuckertransporter im Antiport gegen Nukleotidzuckermoleküle ins Zytosol transportiert. Durch die Verminderung der Ectoapyraseaktivität werden also die spezifischen Transferasen

inhibiert und darüber hinaus weniger Nukleotid-aktivierte Zucker in den Golgi transportiert.

Um bei der Patientin Defekte des Imports von Nukleotidzuckern in den Golgi, bzw. in der Übertragung der Zuckerreste auf Oligosaccharide auszuschließen, wurden sowohl der Import in Mikrosomen, als auch der Transfer der Monosaccharide auf Proteine bestimmt. Dazu wurden Mikrosomen aus Primärfibroblasten der Patientin und Kontrollen präpariert und anschließend mit radioaktiv markierten Nukleotidzuckern inkubiert. Der Import von UDP-Galaktose zeigte im Vergleich zu den Kontrollen keine Auffälligkeiten, während der Import von CMP-N-Acetylneuraminsäure geringfügig erniedrigt war. Die vergleichbare Einbaurrate von N-Acetylneuraminsäure in Oligosaccharide aus mikrosomalen Präparationen von Kontrollen und unserer Patientin beruht vermutlich auf einem kompensatorischen Einbau von N-Acetylneuraminsäureresten in O-Glykane, die in Folge der Hypogalaktosylierung nicht auf N-Glykane transferiert werden können.

Im Falle der Galaktose konnte bei der Patientin in *in vitro* Transportstudien ein erhöhter Einbau in Glykoproteine nachgewiesen werden, der vermutlich durch die Kompensation der krankheitsbedingten Hypogalaktosylierung der N-Glykane in Folge der erhöhten Substratkonzentration zustande kommt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass Defekte im Transport von Zuckernukleotiden in den Golgi als Ursache für die Erkrankung der Patientin S.E.S. ausgeschlossen werden können.

In den vergangenen Jahren konnten die molekularen Ursachen einer Reihe von Defekten der Glykoproteinbiosynthese, bei denen sowohl die Akkumulation verkürzter N- als auch Core 1 O-Glykane gefunden wurde, aufgeklärt werden (Wu et al., 2004 ; Foulquier et al., 2006; Foulquier et al., 2007; Zeevaert et al., 2008). Die Glykosylierungsstörung wurde dabei nicht von hypomorphen Glykosyltransferasen oder –transportern hervorgerufen, sondern durch einen Defekt im COG-Komplex. Dieser Komplex setzt sich aus insgesamt acht Untereinheiten zusammen und ist essentiell für die normale Struktur und Funktion des Golgi. Der COG-Komplex ist dabei in den retrograden Transport über COPI Vesikel involviert und übernimmt dabei die Rolle als `tethering factor` für die initiale Interaktion von Vesikel mit der Zielmembran (Ungar et al., 2005). Bei unserer Patientin S.E.S. konnte wir im Rahmen der Western-Blot Analyse eine Reduktion des COG6-Proteins auf 21% nachweisen. Ebenfalls erniedrigt waren

die übrigen Untereinheiten des Subkomplexes COG5 und COG7. Die Sequenzanalyse ergab den homozygoten Basenaustausch G1646T, der zu dem Austausch der konservierten Aminosäure Glycin zu Valin an Position 549 führt. Allerdings führte nicht der Aminosäureaustausch zu einer Verminderung des COG6-Proteins, sondern eine instabile mRNA, die die Expression der COG6-cDNA auf $16\% \pm 4$ im Vergleich zu Kontrollen verminderte. Eine solche Reduktion der Expression konnte bei den übrigen COG-Patienten nicht gefunden werden.

5.4 Untersuchung des COG-Komplexes

Die Untersuchung des COG-Komplexes aus Fibroblastenlysat wurde mittels Gelfiltration durchgeführt. Bei der Kontrolle findet man die COG4 Untereinheit fast ausschließlich im Gesamtkomplex, während bei der Patientin zusätzlich zum Gesamtkomplex mehrere kleinere Subkomplexe beobachtet werden. Die bisherigen Untersuchungen zum COG-Komplex ergaben, dass jeweils ein Subkomplex (COG2-COG4 oder COG5-COG7) mit v-SNARE-Proteinen assoziiert ist, während der andere Subkomplex zusammen mit COG1 und COG8 den initialen Kontakt zur Zielmembran herstellt (Oka und Krieger, 2005; Shestakova et al., 2007). Im Anschluss übernehmen SNARE-Proteine den weiteren 'tethering-Vorgang' und leiten damit die Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran ein. Die Akkumulation von COG-Subkomplexen, wie wir sie im Fall der COG6 Indexpatientin gefunden haben, könnte den 'tethering-Vorgang' partiell inhibieren und damit den besonders schweren, multisystemischen Phänotyp der Erkrankung hervorrufen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse zur Blockierung des anterograden Transports zum Golgi mittels des Inhibitors Brefeldin A unterstützt. Dabei kommt es in den Fibroblasten der Indexpatientin im Vergleich zu Kontrollzellen zu einer verlangsamten Auflösung des Golgi-Apparates. Nach der retroviralen Transduktion der Patientenzellen mit Wildtyp COG6 cDNA konnte nach Gelfiltration und Western-Blot Analyse eine deutliche Verminderung der Subkomplexe im Verhältnis zum Gesamtkomplex beobachtet werden. Bei dem Brefeldin A-Assay zeigte sich bei den transduzierten Patientenzellen eine höhere Sensitivität gegenüber Brefeldin A, die sich in einer beschleunigten Auflösung des Golgi-Apparates äußerte. Die Komplementation des biochemischen Defekts in den Hautfibroblasten unserer Patientin durch eine Erhöhung der COG6-Konzentration beweist, dass die Mutation in der COG6 Untereinheit ursächlich für

die Erkrankung ist. Die erhöhte Menge an COG6-Protein ermöglicht die Ausbildung des Gesamtkomplexes, was zur partiellen Normalisierung des retrograden Transports führt.

5.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die molekulare Ursache für eine neue Erkrankung aus der Gruppe der 'Congenital Disorders of Glycosylation' im Falle der Patientin S.E.S. biochemisch und molekulargenetisch als ein Defekt der COG-Untereinheit 6 identifiziert werden.

Da bisher nur für vier der insgesamt acht COG Untereinheiten erbliche Glykosylierungsdefekte beim Menschen beschrieben wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch in den übrigen Untereinheiten Mutationen zu schweren Erkrankungen führen können. Deshalb sollen in Zukunft Untersuchungen sowohl zu den anderen COG-Untereinheiten als auch zu weiteren Komponenten des retrograden Transports durchgeführt werden. So könnte man sich, ähnlich wie beim COG-Komplex, Defekte im Bereich des Vesikel tethering durch SNARE vorstellen, wodurch nicht nur der retrograde, sondern ebenfalls der anterograde Transport betroffen sein könnte. Das bislang noch kein Krankheitsbild auf defekte SNARE-Proteine zurückzuführen ist, kann zum einen daran liegen, dass Mutationen in diesen Proteinen nicht mit dem Leben vereinbar sind, zum anderen, dass der Defekt durch andere SNARE-Proteine kompensiert werden könnte.

In wie weit andere Proteinmodifikationen als die Glykosylierung durch COG-Defekte beeinträchtigt werden, soll ein weiterer Punkt zukünftiger Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Ursache eines noch unbekanntens Typs der 'Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)' bei der Patientin S.E.S. zu identifizieren.

Die isoelektrische Fokussierung des Serumtransferrin ergab bei der Patientin ein Bandenmuster mit absteigender Intensität von der Tetra- bis hin zur Asialoform, was auf einen Defekt in der Prozessierung der N-Glykane und damit auf eine Erkrankung vom CDG-Typ II hinwies. Nachfolgende chromatographische und massenspektroskopische Untersuchungen der Transferrin-verknüpften Oligosaccharide ergaben das Fehlen von Galaktose- und Sialinsäureresten. Die Gesamtglykananalyse der Serumglykoproteine wies eine leichte Erhöhung der Neutralzucker und Monosialoformen und eine leichte Erniedrigung der Tri- und Tetrasialylierten N-Glykane. Die Untersuchung der Core1 O-Glykane mittels isoelektrischer Fokussierung des Apolipoproteins CIII ergab ebenfalls ein auffälliges Bandenmuster.

Zunächst konnten Defekte im Bereich des Nukleotidzuckertransports in den Golgi und des Transfers Nukleotid-aktivierter Zucker auf Glykoproteine ausgeschlossen werden. Anschließend wurden mit Hilfe der Western-Blot Analyse des hetero-octameren Conserved Oligomeric Golgi (COG)-Komplexes, der die Funktion eines 'tethering factors' für die Interaktion von Transportvesikeln mit Zielmembranen hat, eine erhebliche Verminderung des COG6-Proteins in Patientenfibroblasten nachgewiesen. Die weiterführende Sequenzanalyse des *COG6-Gens* ergab einen homozygoten Basenaustausch (G1646T), der auf Proteinebene zum Aminosäureaustausch G549V führt. Eine Untersuchung der *COG6-mRNA* mittels Northern-Blot zeigte ein auf 16% erniedrigtes Expressionsniveau.

Die Untersuchung zur Integrität des COG-Komplexes wurde durch Ausschlusschromatographie mit anschließender Western-Blot Analyse durchgeführt. Im Fall der Patientin S.E.S. konnten neben dem Gesamtkomplex mehrere Subkomplexe detektiert werden, die nach der retroviralen Transduktion der Patientenfibroblasten mit *COG6* Wildtyp cDNA nur noch vermindert nachgewiesen werden konnten. Ebenso konnten Defekte im COG-abhängigen retrograden Vesikeltransport nach Expression der *COG6* Wildtyp cDNA in Patientfibroblasten aufgehoben werden.

Literaturverzeichnis

Abeijon C, Yanagisawa K, Mandon EC, Hiiusler A, Moremen K, Hirschberg CB, Robbins PW

GDPase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *S.cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(2):307-23

Aebi M and Hennet T

Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* 2001 11: 136-141.

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

Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB

Nonselective and efficient fluorescent labelling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem.* 1995 230:229-38.

Brockhausen I

Pathways of O-Glycan biosynthesis in cancer cell. *Biochim Biophys Acta* 1999 1473: 67-95.

Bruinsma P, Spelbrink RG, Nothwehr SF

Retrograde transport of the mannosyltransferase Och1p to the early Golgi requires a component of the COG transport complex. *J. Biol. Chem.* 2004 279:39814–39823.

Dobyns WB, Pagon RA, Armstrong D, Curry CJR, Greenberg F, Grix A, Holmes LB, Laxova R, Michels VV, Robinow M, Zimmerman RL

Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1989 32: 195-210

Endo T

Structure, function and pathology of O-mannosylglycans. *Glycoconj J* 2004 21: 3-7

Faiyaz-UI-Haque M, Zaidi SHE, Al-Ali M, Al-Mureikhi MS, Kennedy S, Al-Thani G, Tsui LC, Teebi AS

A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. *Am. J. Med. Genet.* 2004 128A: 39-45

Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Jaeken J, Mills P, Winchester B, Krieger M, Annaert W, Matthijs G

Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3764-9

Foulquier F, Ungar D, Reynders E, Zeevaert R, Mills P, García-Silva MT, Briones P, Winchester B, Morelle W, Krieger M, Annaert W, Matthijs G

A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 1;16(7):717-30

Freeze HH

Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology* 2001 11:129R-143R.

Freeze HH (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.* 7(7):537-51. Erratum in: *Nat Rev Genet.* 2006 Aug;7(8):660

Fukuyama Y, Kawazura M, Haruna H

A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy: report of fifteen cases. *Paediat.* 1960 Univ. Tokyo 4: 5-8

Godfrey C, Clement E, Mein R, Brockington M, Smith J, Talim B, Straub V, Robb S, Quinlivan R, Feng L, Jimenez-Mallebrera C, Mercuri E, Manzur AY, Kinali M, Torelli S, Brown SC, Sewry CA, Bushby K, Topaloglu H, North K, Abbs S, Muntoni F

Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007 Oct;130(Pt 10):2725-35.

Gooley AA and Williams KL

Towards characterizing O-glycans: the relative merits of in vivo and in vitro approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites. *Glycobiology*. 1994 Aug;4(4):413-7. Review.

Hackler R, Arndt T, Peters V, Assmann B, Hoffmann GF, Steinmetz A

Automated isoelectric focusing of serum isotransferrins for laboratory diagnosis of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome using the PhastSystem™. *Scand J Clin Lab Invest* 1998 58 (supplement 228): 66-67.

Hansen JE, Lund O, Nielsen JO, Brunak S

O-glycbase: a Revised Database of O-glycosylated Proteins. *Nucleic Acids Res*. 1996 24, 248-252

Hart GW, Housley MP, Slawson C

Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007 446: 1017-22

Helenius A. and Aebi M

Transmembrane movement of dolichol-linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2002 13: 171-178.

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

Hofsteenge J, Müller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF

New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* 1994 33:13524-30.

Iourin O, Mattu TS, Mian N, Keir G, Winchester B, Dwek RA, Rudd PM

The identification of abnormal glycoforms of serum transferrin in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I by capillary zone electrophoresis. *Glycoconj J.* 1996 13:1031–1042

Jaeken J, Stibler H, Hagberg B

The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991 375:1-71.

Jaeken J, Artigas J, Barone R, Fiumara A, de Koning TJ, Poll-The BT, de Rijk-van Andel JF, Hoffmann GF, Assmann B, Mayatepek E, Pineda M, Vilaseca**MA, Saudubray JM, Schluter B, Wevers R, Van Schaftingen E**

Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectrofocusing pattern of serum sialotransferrins. *J Inherit Metab Dis* 1997 20:447-9.

Jaeken J, Matthijs G

Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007 8:261-78

Ju T, Cummings RD

Chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* 2005 437: 1252 only

Kim DW, Sacher M, Scarpa A, Quinn AM, and Ferro-Novick S

High-copy suppressor analysis reveals a physical interaction between Sec34p and Sec35p, a protein implicated in vesicle docking. *Mol. Biol. Cell* 1999 10, 3317–3329

Kingsley DM, Sege RD, Kozarsky KF, Krieger M

DNA-mediated transfer of a human gene required for low-density lipoprotein receptor expression and for multiple Golgi processing pathways. *Mol Cell Biol.* 1986 Jul;6(7):2734-7.

Knauer R. und Lehle L.

The oligosaccharyltransferase complex in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1999 1426: 259-273.

Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Budde B, Nürnberg P, Foulquier F, ARCL Debré-type Study Group, Lefeber D, Urban Z, Gruenewald S, Annaert W, Brunner HG, van Bokhoven H, Wevers R, Morava E, Matthijs G, Van Maldergem L, Mundlos S

Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):32-4

Kornfeld R. und Kornfeld S.

Assembly of asparagin-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985 54: 631-664.

Kranz C, Ng BG, Sun L, Sharma V, Eklund EA, Miura Y, Ungar D, Lupashin V, Winkel RD, Cipollo JF, Costello CE, Loh E, Hong W, Freeze HH

COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 1;16(7):731-41

Krasnewich D, O'Brien K, Sparks S

Clinical features in adults with congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007 Aug 15;145C(3):302-6

Laemmli UK

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

Lahrmann MA

Teaching dolichol-linked oligosaccharides more tricks with alternatives to metabolic radiolabeling. *Glycobiology*. 2007 Aug;17(8):75R-85R

Lehrach H and Frischauf AM

EMBL Lab-Manua 1982, Heidelberg.

Leroy JG

Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects. *Pediatr Res*. 2006 Dec;60(6):643-56

Leelavathi DE, Estes LW, Feingold DS, Lombardi B

Isolation of a Golgirich fraction from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1970 211:124-38.

McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F

The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2000 97: 668-673

McDowell G, Gahl W

Inherited disorders of glycoprotein synthesis: Cell biological insights. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997 215:145-57.

Medzihradzky KF

Characterization of site-specific N-glycosylation. *Methods Mol Biol*. 2008;446:293-316

McPherson MJ, Quirke P, Tayler GR

PCR I : A Laboratory Approach. IRL Press at Oxford University Press 1991, London.

Mendell JR, Boué DR, Martin PT

The congenital muscular dystrophies: recent advances and molecular insights. *Pediatr Dev Pathol.* 2006 9(6):427-43.

Miller DG, Miller AD

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

Mironov AA, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Trucco A

Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jul 10;1744(3):340-50

Mock KK, Davey M, Cottrell JS

The analysis of underivatized oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 177:644-651.

Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, Haltiwanger RS

Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found in epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* 2000a 275:9604-11.

Morava E, Zeevaert R, Korsch E, Huijben KM, Wopereis S, Matthijs G, Keymolen K, Lefeber D, De Meirleir L, Wevers RA

A common mutation in the COG7 gene with a consistent phenotype including microcephaly, adducted thumbs, growth retardation, VSD and episodes of hyperthermia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007 15:638–645.

Morsomme P and Riezman H

The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus. *Dev Cell.* 2002 Mar;2(3):307-17.

Ng BG, Kranz C, Hagebeuk EE, Duran M, Abeling NG, Wuyts B, Ungar D, Lupashin V, Hartdorff CM, Poll-The BT, Freeze HH

Molecular and clinical characterization of a Moroccan Cog7 deficient patient. *Mol Genet Metab.* 2007 Jun;91(2):201-4

Noll B, Hackler R, Pelzer M, Pelzer S, Nusser P, Maisch B, Schaefer JR, Steinmetz A

Semi-automated rapid isoelectric focusing of apolipoproteins C from human plasma using PhastSystemTM and immunofixation. *Clin Chem Lab Med* 1999 37: 643-648.

Oka T, Ungar D, Hughson FM, Krieger M

The COG and COPI complexes interact to control the abundance of GEARs, a subset of Golgi integral membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 2004 (5):2423-35.

Oka T, Vasile E, Penman M, Novina CD, Dykxhoorn DM, Ungar D, Hughson FM, Krieger M

Genetic analysis of the subunit organization and function of the conserved oligomeric golgi (COG) complex: studies of COG5- and COG7-deficient mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):32736-45

Palade, G

Intracellular aspects of the process of protein. *Science* 1975 189, 347–358.

Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Jaques A, Parekh R

Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry* 1993 32:679-93.

Powell AK and Harvey DJ

Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by Positive Ion Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996 10:1027-1032.

Perez M and Hirschberg CB

Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi-apparatus. *Methods Enzymol* 1987 138:709-15.

Raitta C, Santavuori P, Lamminen M, Leisti J

Ophthalmological findings in a new syndrome with muscle, eye and brain involvement. *Acta Ophthal.* 1978 56: 465-472

Ram RJ, Li B, Kaiser CA

Identification of Sec36p, Sec37p, and Sec38p Components of Yeast Complex That Contains and Sec35p. *Mol Biol Cell.* 2002 May;13(5):1484-500.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T

Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

Seta N

The CDG syndrome Orphanet encyclopedia. Orphanet 2004

Spiro RG

Glycoproteins. *Adv. Protein Chem* 1973 27: 349-467.

Spiro RG

Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002 12: 43R-56R.

Steet R. and Kornfeld S.

COG-7-deficient Human Fibroblasts Exhibit Altered Recycling of Golgi Proteins. *Mol Biol Cell.* 2006 May;17(5):2312-21.

Suvorova ES , Duden R, Lupashin VV

The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *J Cell Biol.* 2002 May 13;157(4):631-43

Tatu U and Helenius A

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

Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrahi M, Khamaysi Z, Behar D, Petronius D, Friedman V, Zelikovic I, Raimer S, Metzker A, Richard G, Sprecher E

Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat Genet.* 2004 36(6):579-81.

Ungar D, Oka T, Brittle EE, Vasile E, Lupashin VV, Chatterton JE, Heuser JE, Krieger M, Waters MG

Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *J Cell Biol.* 2002 Apr 29;157(3):405-15

Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM

Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):32729-35

Ungar D, Oka T, Krieger M, Hughson FM

Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol.* 2006 Feb;16(2):113-20

van Eijk HG, van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C

The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta.* 1983;132:167-71

VanRheenen SM, Cao X, Lupashin VV, Barlowe C, Waters MG

Sec35p, a novel peripheral membrane protein, is required for ER to Golgi vesicle docking. *J. Cell Biol.* (1998)141, 1107–1119

VanRheenen SM, Cao X, Sapperstein SK, Chiang EC, Lupashin VV, Barlowe C, Waters MG

Sec34p, a protein required for vesicle tethering to the yeast Golgi apparatus, is in a complex with Sec35p. *J Cell Biol.* 1999 Nov 15;147(4):729-42.

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

Whyte JR, Munro S

Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci.* 2002 Jul 1;115(Pt 13):2627-37

Whyte JR, Munro S

The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev Cell.* 2001 Oct;1(4):527-37.

Wilson IBH, Gavel Y, von Heijne G

Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* 1991 275, 529—534.

Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, Spaapen L, Kornfeld S, Freeze HH

Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med.* 2004 May;10(5):518-23

Zeevaert R, Foulquier F, Dimitrov B, Reynders E, Van Damme-Lombaerts R, Simeonov E, Annaert W, Matthijs G, Jaeken J

Cerebrocostomandibular-like syndrome and a mutation in the conserved oligomeric Golgi complex, subunit 1. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb 1;18(3):517-24. Epub 2008 Nov 13.

Zeevaert R, Foulquier F, Jaeken J, Matthijs G

Deficiencies in subunits of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex define a novel group of Congenital Disorders of Glycosylation. *Mol Genet Metab.* 2008 Jan;93(1):15-21. Epub 2007 Sep 29

Zolov SN and Lupashin VV

Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol.* 2005 Feb 28;168(5):747-59. Epub 2005 Feb 22.

Anhang

8.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der humanen COG6-Untereinheit

8.1.1 Neukleotidsequenz der cDNA der humanen COG6-Untereinheit

GTGGTCCCTGCCTGGCTGAGGTGGCAGCAGGGGGCGGGACGCGCAGCGCT**ATGGCAGAGG** 60
 GCAGCGGGGAAGTGGTCGCAGTGTCTGCGACCGGGCTGCCAACGGCCTCAACAATGGGG 120
 CAGGCGGGACCTCGGCGACGACCTGCAACCCGCTGTGCGCAAGCTGCATAAGATCCTGG 180
 AGACGCGGCTGGACAACGACAAGGAGATGTTAGAAGCTCTCAAGGCACCTTCAACCTTTT 240
 TTGTTGAAAATAGTCTGCGGACTCGAAGAAATTTACGTGGAGATATTGAACGTAAAAGTT 300
 TAGCCATCAATGAAGAATTTGTAAGCATTTTCAAGGAAGTGAAGGAGGAACCTGAAAAGCA 360
 TAAGCGAAGATGTTCAAGCAATGAGCAACTGTTGTCAAGATATGACAAGTCGCCTACAGG 420
 CAGCAAAGGAACAGACTCAAGATTTAATAGTAAAAACCACTAAGCTTCAATCTGAAAGCC 480
 AAAAATTAGAGATAAGAGCTCAAGTTGCAGATGCCTTCTTATCCAAGTTCCAAGTACTT 540
 CTGATGAAATGAGTCTTCTCCGAGGTACAAGAGAAGGACCCATTACTGAGGATTTTTTCA 600
 AGGCACCTGGGAAGAGTAAAAACAGATTGATAATGATGTCAAAGTTCTCTTGCCTACAAATC 660
 AACAAACGGCAGGTTTAGAAATTATGGAACAGATGGCCTTACTTCAAGAAAACGGCTTATG 720
 AAAGACTTTACCGATGGGCTCAAAGTGAATGCAGAACATTGACACAAGAATCATGTGACG 780
 TATCTCCGGTATTGACACAGGCAATGGAAGCCCTGCAGGACAGACCTGTCTTATATAAAT 840
 ATACCTTAGATGAATTTGGAACAGCCAGAAGAAGTACAGTTGTTTCGTGGATTTATTGATG 900
 CGCTCACAAGAGGGGGCCCCGGAGGTACACCTAGACCAATTGAAATGCATTTCTCATGACC 960
 CTTTGAGGTATGTAGGAGATATGTTGGCTTGGCTCCATCAAGCTACTGCTTCTGAAAAGG 1020
 AACACCTTGAAGCTCTCTTAAAGCATGTAACCTACACAAGGTGTTGAAGAAAATATTCAAG 1080
 AAGTTGTTGGGCATATCACTGAAGGTGTGTGCAGGCCTCTAAAAGTTTCGAATTGAGCAAG 1140
 TAATAGTTGCTGAACCTGGGGCAGTTTTTATTATATAAAAATTTCTAATCTCCTCAAATTTT 1200
 ATCACCATAACAATCAGTGGTATTGTTGGAAATAGTGCAACTGCATTATTGACTACCATTG 1260
 AAGAAATGCATTTGCTAAGCAAAAAAATATTCTTCAATAGCTTGAGTCTTCATGCAAGTA 1320
 AATTAATGGACAAGGTTGAACTCCCACCACCTGATCTTGGACCAAGTTCTGCACTAAATC 1380
 AGACACTCATGTTGCTGCGTGAAGTTTTAGCATCTCACGATTCTTCAGTTGTACCATTAG 1440
 ATGCTCGTCAAGCTGATTTTTGTGCAGGTTTTATCATGTGTCTTGGATCCTCTCCTACAGA 1500
 TGTGTACTGTATCAGCCAGCAATTTAGGCACAGCTGACATGGCCACTTTCATGGTCAATT 1560
 CACTATATATGATGAAGACAACATTAGCTCTATTTGAATTCCTGACAGACGCTCTGGAAA 1620
 TGCTACAGTTTCAGATCGAAGCACATTTGGACACACTTATAAATGAGCAAGCCTCTTATG 1680
 TTTTAACTAGGGTAGGCTTGAGTTACATCTATAACACTGTACAGCAACATAAAACCTGAAC 1740
 AGGGCTCTTTAGCTAATATGCCAACCTAGATTCTGTGACACTGAAGGCTGCAATGGTTC 1800
 AGTTTGATCGTTATCTGTGACCCCGAGACAACCTATTGATACCACAGCTGAACTTTCTTC 1860
 TAAGTGCCACAGTGAAAGAGCAGATCGTAAAACAATCTACAGAATTAGTCTGCAGAGCCT 1920
 ATGGTGAAGTGTATGCAGCCGTGATGAATCCAATCAATGAATACAAAGATCCAGAGAACA 1980
 TTCTTCACCGATCGCCGAGCAAGTGCAGACGCTTCTTTCT**GA**TATCTTATTTTCATTG 2040
 TGTTAGCAAAATATGACCTCCCTAAAACACTGAAGGTTATTTTTTATTCTTTGAATTTTT 2100
 ACTCTATAATTTGATAGTTACAGTTTTCTTTGTATCATAAGATTGTAAGTCCCGATAAAT 2160
 TTTTTTTTTTTGGTCTCAGTAACAGGGAAGTAAGTAACATGTTGACCTGAGCTAGTATTA 2220
 CTGTGTATCTACTCTAAATGAGATGATCTATTTTTTTGTAGCCATCTCTCCAGCTCTGC 2280
 AGTTTTCACTGTATTCAGGAAGCATAAAGTAGTATGAAAGGTTTGAAGAATTTTTTTTTTA 2340
 CAAGACTAGTTCTAAATTAACAGCTTATAAAAAATTTGTCTAAATTTAATAATTAGTATA 2400
 AGGATATGACCTAATAAATGTCTCCTTACCTAAAGATTCATTTGCTTTCTTTTAATATGA 2460
 GTAGGCATACTTAGTAGCTTTTCTGAACCTAGCCTATGTCTCTGTCCCCAAAATAGCTGC 2520
 CCTTAAAGAGTTGTTAGCAGAGAGAAAAATAACAGTGAATGTGCTCCTGGTGTATATGGC 2580
 AGTGAATCTCCTTTCTGTTCTACTTTAGCATACTATATATATTTGACTGTGTACATTTCT 2640
 ATGCAATTTTAAAGTATACACTCAGCAATAATTAGAAAAAAGGAGAGAGAAAAGTGATTT 2700
 AAACAGGGTGGATTCCACTCTGTGGGAGCCTTCGATGGAACTCAAGGTGGAGCTCAGCCT 2760
 TTCCAATGAGCTCTAAGCATGTAGATAGCCTGAGCTGTGTCTAAGCCTGGTGTPTTAAAGA 2820
 TGGGTATTTGTACATAAATATGGGTCTAAATCCAACCAACTACACATTTTATCTGGTGT 2880

| | |
|--------------------------------------------------------------|------|
| TCAAACCAAAGAAACAATGATCTACTCAAACATTGGAGAAAAAACTGCCAGAGGAGGAG | 2940 |
| TTGCCAATTGGCAGTGTGTCTTATCTCCATGTTGTAAGTGGACTCTGACTTTAGACCATT | 3000 |
| ACCTATTAGGAAGATTAAAAATGACTGTATTTTTTAAAGGAATAAATCCCAGTGCCTGA | 3060 |
| TTTGACATTCTTGTGCGGCAAAAAAACTTAATTTCTAGTAAATCTATAAAAAATGGGTAA | 3120 |
| GTCCCTAAATTACAAATGAGAAAATTGAAGCACAAAGGAAAAAAATAACTAGTTTGAATA | 3180 |
| TTTTGAAAAGTAATAACATAAACTAGTATTTGTAGAAGATTATGTGTTGTATATAACAA | 3240 |
| ATTAGTATTTATAGAATATGACCTATTTATCTGAAGTTTATAATTGTTTATACCTAATAC | 3300 |
| AGTTCTTTTTGGAGTAAGAATGATTATATAATCGTTATCCATTTGGGTATAAATCTGTAT | 3360 |
| TTTTAGTTTTTCCCTTTGATTAGTATGTGTTACATATAAAGACAGAAAAATAAAGTATAA | 3420 |
| ATCAAGAAAAAATAAATAA | 3442 |

8.1.2 Aminosäuresequenz der humanen COG6-Untereinheit

| | |
|-----------------------------------------------------|-----|
| MAEGSGEVVAVSATGAANGLNNGAGGTSATTCNPLSRKLHKILETRLDND | 50 |
| KEMLEALKALSTFFVENSRLRTRNLRGDIERKSLAINEEFVSIKFKEVKEE | 100 |
| LESISEDVQAMSNCCQDMTSRLQAQKEQTQDLIVKTTKLQSESQKLEIRA | 150 |
| QVADAFLSKFQLTSDMSLLRGTRREGPITEDFFKALGRVKQIHNDVKVLL | 200 |
| RTNQQTAGLEIMEQMALLQETAYERLYRWAQSECRTLTQESCDVSPVLTQ | 250 |
| AMEALQDRPVLYKYTLDEFGTARRSTVVRGFIDALTRGGPGGTPRPIEMH | 300 |
| SHDPLRYVGDMLAWLHQATASEKEHLEALLKHVTTQGVENIQEVVGHIT | 350 |
| EGVCRPLKVRIEQVIVAEPGAVLLYKISNLLKFYHHTISGIVGNSATALL | 400 |
| TTIEEMHLLSKKIFFNSLSLHASKLMDKVELPPDLGPSSALNQTLMLLR | 450 |
| EVLASHDSSVPLDARQADVFQVLSVLDPLLQMCVTSASNLGTADMATF | 500 |
| MVNSLYMMKTTLALFEFTDRRLEMLQFQIEAHLDTLINEQASYVLTRVGL | 550 |
| SYIYNTVQQHKPEQGSANMPNLDVTLKAAMVQFDRYLSAPDNLLIPQL | 600 |
| NFLLSATVKEQIVKQSTELVCRAYGEVYAAVMNPINEYKDPENILHRSPQ | 650 |
| QVQTLLS. | 657 |

8.2 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

8.2.1 Primer für die Reverse-Transkriptase PCR

R1 5'-CTTACTTCCCTGTTACTGAGAC-3'.

F1 5'-GGTCCCTGCCTGGCTGAGG-3'

F2 5'-GAGGTGGCAGCAGGGGGC-3'

R2 5'-CCTTCAGTGTTTTAGGGAGGTC-3'

8.2.2 Primer für COG6-Exon-PCR

Ex2-F1 5'-GTTAGCAGACTCGTTAAAGACAA-3'

Ex2-R1 5'-GTGCCACTGCACTCCAGCC-3'

Ex2-F2 5'-GTTACTAATATATAAAGTAGATATGTA-3'

Ex2-R2 5'-GAAATGGAACAATATAGCAAATTAG-3'

8.2.3 Primer für Sequenzanalysen

F2 5'-GAGGTGGCAGCAGGGGGC-3'

R2 5'-CCTTCAGTGTTTTAGGGAGGTC-3'

F3 5'-GACAAGTCGCCTACAGGCAG-3'

F4 5'-GATGGCCTTACTTCAAGAAACG-3'

F5 5'-GTGGTATTGTTGGAAATAGTGC-3'

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura für die Vergabe des interessanten Themas und für die Übernahme des Referat auch nach unserem Umzug nach Heidelberg bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Körner für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sein Vertrauen in meine Arbeit und für die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb seiner Arbeitsgruppe.

Für das freundschaftliche Klima in unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich weiterhin bei Christian Thiel, Virginia Bauersfeld, Nina Rind, Diana Popovici und Kathi Schiller bedanken, es macht sehr viel Spaß in einer solchen Gruppe zu arbeiten

Natürlich bedanke ich mich auch den übrigen Arbeitskollegen der Abt.1 des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin Heidelberg für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Ein großer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung und das Verständnis während all der Zeit.

Schließlich will ich mich am meisten bei meiner Nicole bedanken, die mir in all den Jahren treu, verständnisvoll und vor allem geduldig zur Seite stand. Vielen Dank dafür!

Lebenslauf

Am 15. Oktober 1976 wurde ich als sechstes Kind meiner Eltern Elisabeth Lübbehusen, geb. Henke, und August Lübbehusen in Vechta geboren. Von 1983 bis 1987 besuchte ich die Grundschule Erlte/Hagstedt, von 1987 bis 1989 die Orientierungsstufe in Visbek. Meinen anschließenden Besuch des Gymnasiums Antonianums in Vechta schloss ich 1997 mit der allgemeinen Hochschulreife ab. Von September 1997 bis Juli 1998 leistete ich meinen Wehrdienst erst beim III./Luftwaffenausbildungsregiment 1 in Heide/Holstein und anschließend bei der Luftwaffensicherungsstaffel/FlaRakGschw 1 in Ahlhorn. Im Oktober 1998 begann ich das Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Die mündliche Diplom-Hauptprüfung wurde von mir im Hauptfach Biochemie, sowie den Nebenfächern Mikrobiologie und Organische Chemie abgelegt. Das Studium schloss ich im Juni 2003 mit der Abgabe meiner Diplom-Arbeit, die im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura angefertigt wurde, mit der Note „sehr gut“ ab. Das Thema meiner Diplomarbeit war die "Generierung eines „Knock-In“ Maus-Modells für Congenital Disorders of Glycosylation Ic (CDG-Ic)".

Im August 2003 begann ich am gleichen Institut unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Kurt von Figura in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Christian Körner mit meiner Promotion. Im Jahr 2004 wechselte ich mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christian Körner an das Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Heidelberg, wo der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation mit dem Thema "**Congenital Disorders of Glycosylation IIj (CDG-IIj):** Identifizierung eines Defekts der COG6-Untereinheit des Conserved Oligomeric Golgi-Komplexes" erfolgte.