

Juliane Reichel  
Dr. med.

## **Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer Mutation im $\beta$ 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-Like Protein 1-Gen**

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Thiel

Eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen ist die Proteinglykosylierung. Diese ist von essentieller Bedeutung für ein fehlerfreies Funktionieren einer Vielzahl von im menschlichen Körper vorkommenden Proteinen und wird durch einen komplexen Apparat an Enzymen, Transportern und beigeschalteten Proteinen in Cytosol, endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat bewerkstelligt. Nach den an der Bindung zwischen Protein und Glykanen beteiligten Aminosäuren und Monosacchariden wird zwischen N-Glykosylierung, O-Glykosylierung, C-Mannosylierung, GPI-Ankersynthese und Phosphoglykosylierung unterschieden. Bei angeborenen Defekten der Proteinglykosylierung ist je ein Schritt im Zuge der Glykan-Synthese gestört. Bisher sind 104 verschiedene monogenetische Defekte bekannt. Diese werden als “Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) zusammengefasst. Das klinische Erscheinungsbild von CDG-Defekten ist sehr variabel, wobei sich häufig eine multisystemische Beteiligung mit schweren neurologischen Defekten zeigt.

Diese Arbeit befasst sich mit dem Fall eines 70-jährigen Patienten mit einer seit der Kindheit bestehenden, langsam progredienten neurologischen Multisystemerkrankung unbekannter Ursache, bei dem durch eine Exom-Sequenzierung heterozygote Mutationen im  $\beta$ 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-Like Protein 1-Gen (*B3GNTL1*-Gen) identifiziert wurden. Die Funktion des  $\beta$ 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase-Like Proteins 1 (*B3GNTL1*-Proteins) ist bisher weitgehend ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass es sich um ein an dem Prozess der O-Glykosylierung beteiligtes Protein handelt, dessen Aufgabe in der Übertragung eines N-Acetylglucosaminylrests in  $\beta$ 1,3-glykosidischer Orientierung auf einen Galaktoserest innerhalb eines an ein Protein gebundenen Glykans besteht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch eine nähere Charakterisierung des Defektes des Patienten sowie Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation und möglichen Funktion des *B3GNTL1*-Proteins der Frage nachgegangen werden, ob es sich im vorliegenden Fall um einen bisher unbekanntem CDG-Typ handeln könnte.

Dazu wurden zunächst die Mutationen des Gens auf genomischer Ebene sowie auf Ebene der cDNA mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt und charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass es bei dem Patienten durch Punktmutationen in Exon 7 (c.574G>A) und Exon 8 (c.718G>A) des *B3GNTL1*-Gens zu einem Austausch zweier hochkonservierter Aminosäuren (p.V192M und p.V240I) innerhalb des Proteins kommt.

Mittels isoelektrischer Fokussierung von Transferrin sowie  $\alpha$ -1-Antitrypsin des Patienten konnte ein N-Glykosylierungsdefekt ausgeschlossen werden. Eine isoelektrische Fokussierung von Apolipoprotein C-III erbrachte bei auffälligem Bandenmuster einen Hinweis auf eine O-Glykosylierungsstörung. Eine Immundetektion des B3GNTL1-Proteins mittels Westernblot zeigte eine verminderte Expression des Proteins in Fibroblasten des Patienten. Immunfluoreszenzanalysen an Fibroblasten zeigten eine mit Kontrollen vergleichbare Lokalisation des B3GNTL1-Proteins im Bereich des Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiments. Um die Auswirkung der verminderten Expression des Proteins bzw. eines möglichen fehlerhaften Funktionierens auf die Menge an  $\beta$ 1,3-verknüpften N-Acetylglucosaminylresten an Glykoproteinen des Patienten zu untersuchen, wurde eine Lektinblot-Analyse von Serum sowie Proteinextrakten aus Fibroblasten des Patienten vorgenommen, die keine spezifischen Befunde erbrachte.

Zur weiteren Untersuchung der Mutationen wurden COS7-Zellen mit der kodierenden Sequenz des Gens mit je einer der beiden Mutationen sowie der Wildtyp-Variante transfiziert. Mittels Immundetektion konnte gezeigt werden, dass die Expression des B3GNTL1-Proteins in der Zelllinie mit der in Exon 7 lokalisierten Mutation (c.574G>A) vermindert war, während transfizierte Zellen mit der Mutation aus Exon 8 (c.718G>A) eine mit Kontrollen vergleichbare B3GNTL1-Expression zeigten. Die Lokalisation des Proteins im Bereich des Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiments konnte anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen in den etablierten Zelllinien bestätigt werden.

Die genaue Funktion des Proteins konnte bisher nicht geklärt werden. Hierzu werden weitere Analysen u.a. der O-Glykanstrukturen des Patienten nötig sein. Erst dann wird sich auch die Frage beantworten lassen, ob es sich im vorliegenden Fall um einen neuen CDG-Typ handelt.