

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.) - Anna-Marlen Hutter

aus: Mannheim (Baden-Württemberg)

Tag der mündlichen Prüfung:

**Biallelische Varianten in *GZF1* und *VPS45*
verbinden das Larsen-Syndrom mit den '*Congenital
Disorders of Glycosylation*' (CDG)**

Gutachter: Prof. Dr. Sabine Strahl
Dr. Christian Thiel

Für Manuel & meine Eltern

Du kannst etwas verändern – jeden Tag und zu jeder Zeit!

Jane Goodall

Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung	1
B. Theorie	3
1. PROTEINGLYKOSYLIERUNG	3
1.1 GRUNDLAGEN DER GLYKOPROTEINBIOSYNTHESE	4
1.2 O-GLYKOSYLIERUNG	4
1.3 C-MANNOSYLIERUNG.....	5
1.4 GRUNDLAGEN DER N-GLYKOSYLIERUNG	5
1.5 DER LIPIDANKER DOLICHOL	7
1.6 BEREITSTELLUNG DER MANNOSE UND GALACTOSE IM ZYTOSOL	7
1.7 BILDUNG DER LIPID-VERKNÜPFTEN OLIGOSACCHARIDE (LLO'S).....	8
1.8 ÜBERTRAGUNG DER LLO'S AUF EIN PROTEIN	9
1.9 N-GLYKANBIOSYNTHESE IM GOLGI-APPARAT.....	11
2. GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTE - CONGENITAL DISORDERS OF GLYCOSYLATION.....	12
2.1 N-GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTE	13
3. ANAMNESE EINER PATIENTIN MIT MULTISYSTEMISCHEM KRANKHEITSBILD	16
C. Zielsetzung	20
D. Materialien und Methoden	21
1. MATERIALIEN	21
2. METHODEN.....	31
2.1 CDG-ROUTINEDIAGNOSTIK.....	31
2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN ZUM ARBEITEN MIT EUKARYONTISCHEN KULTUREN...	32
2.3 METHODEN ZUR ARBEIT MIT RETROVIREN	34
2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.5 METHODEN ZU MOLEKULARBIOLOGISCHEN ARBEITEN	38
E. Ergebnisse	44
1. IDENTIFIZIERUNG EINES KOMBINIERTEN N- UND O-GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTS.....	44
1.1 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG DES SERUMPROTEINS TRANSFERRIN	44
1.2 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG DES APOLIPOPROTEIN C-III SERUMPROTEINS.....	46
2. MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSEN DER N-GLYKANE AUS GESAMTSERUM	46
2.1 ANALYSEN DER N-GLYKANE DES SERUMRTRANSFERRINS	46
2.2 ANALYSEN DER N-GLYKANE IM GESAMTSERUM	51
3. ANALYSEN DER PATIENTEN FIBROBLASTEN.....	55
3.1 MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KONTROLL- UND PATIENTENZELLEN	55
3.2 VERÄNDERUNGEN IM ZELLWACHSTUM UND DER PROLIFERATION.....	55
4. UNTERSCHIEDE IM GLYKOSYLIERUNGSSTATUS DER FIBROBLASTEN.....	56
4.1 STUDIEN ZUR LEKTINBINDUNG.....	56

4.2	<i>STUDIEN MIT GLYKOSYLIERUNGS-MARKERPROTEINEN</i>	56
5.	IDENTIFIZIERUNG ZWEIER HOMOZYGOTER MUTATIONEN IN <i>GZF1</i> UND <i>VPS45</i>	58
6.	BESTÄTIGUNG DER HOMOZYGOTEN MUTATION IN <i>GZF1</i>	58
7.	VERMINDERTES <i>GZF1</i> -SIGNAL BEI ABWEICHENDER LOKALISATION	59
7.1	<i>VERMINDERTES GZF1 SIGNAL IM WESTERN BLOT</i>	59
7.2	<i>MRNA-EXPRESSION VON GZF1</i>	60
7.3	<i>HETEROGENE LOKALISATION VON GZF1 IN FIBROBLASTEN</i>	60
8.	VERÄNDERUNGEN DURCH KOMPLEMENTATION MIT <i>GZF1</i>	61
8.1	<i>EXPRESSION DES GZF1 PROTEINS IM „WESTERN BLOT“</i>	61
8.2	<i>GZF1 LOKALISATION IN FIBROBLASTEN</i>	62
8.3	<i>VERÄNDERTER GLYKOSYLIERUNGSSTATUS BEI KOMPLEMENTATION MIT GZF1</i>	63
9.	BESTÄTIGUNG EINER HOMOZYGOTEN MUTATION IN <i>VPS45</i>	64
10.	WILDTYPISCHE EXPRESSION UND LOKALISATION VON <i>VPS45</i>	66
10.1	<i>WESTERN BLOT ANALYSEN VON VPS45</i>	66
10.2	<i>VPS45 MRNA-ANALYSEN</i>	66
10.3	<i>LOKALISATION VON VPS45 IN FIBROBLASTEN</i>	66
10.4	<i>EXPRESSIONSANALYSEN DES COG-KOMPLEXES</i>	67
F.	<i>Diskussion</i>	69
1.	EIN MULTISYSTEMISCHES KRANKHEITSBILD MIT KOMBINIERTEM GLYKOSYLIERUNGSDEFEKT	69
2.	VERÄNDERTER GLYKOSYLIERUNGSSTATUS IN PATIENTENFIBROBLASTEN	71
3.	<i>GZF1</i> ALS URSACHE FÜR DAS LARSEN SYNDROM UND EINEN CDG-II DEFECT MIT BEEINTRÄCHTIGUNG DER <i>N</i> - UND <i>O</i> -GLYKOSYLIERUNG	72
4.	EINFLUSS EINER ZWEITEN MUTATION AUF DEN GLYKOSYLIERUNGSDEFEKT	77
G.	<i>Ausblick</i>	81
H.	<i>Referenzen</i>	<i>i</i>
I.	<i>Appendix</i>	<i>xii</i>
J.	<i>Publikationsliste</i>	<i>xxxix</i>
K.	<i>Konferenzteilnahmen</i>	<i>xl</i>
L.	<i>Versicherung an Eides statt</i>	<i>xli</i>
M.	<i>Danksagung</i>	<i>xlii</i>

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	$p \leq 0,05$ (signifikant)
**	$p \leq 0,005$ (hoch signifikant)
***	$p \leq 0,001$ (höchst signifikant)
~	Circa
<	Kleiner
>	Größer
±	Plus / Minus
≤	Kleiner / Gleich
°C	Grad Celsius
∞	Unendlich
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALG6	Asparagine-Linked Glycosylation 6 Homolog
ALG13	Asparagine-Linked Glycosylation 13 Homolog
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp.	Ampicillin
ApoCIII	Apolipoprotein-CIII
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP6AP1	ATPase H ⁺ transporting Accessory Protein 1
B4GALT1	β-1,4-Galactosyltransferase 1
B4GALT7	β-1,4-Galactosyltransferase 7
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BTB	Broad complex, Tramtrack und Bric-a-brac
bzw.	Beziehungsweise
c.	Codierende DNA Sequenz
cAMP	Cyclisches AMP
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CDG-I	Frühe Glykosylierungsdefekte
CDG-II	Späte Glykosylierungsdefekte
CDGS	Kohlenhydrat-defizientes Glykoproteinsyndrom
cDNA	Complementäre DNA
CHST3	Carbohydrat Sulfotransferase 3

cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COG	Conserved oligomeric Golgi Komplex
COG1-8	Untereinheiten 1-8 des Conserved Oligomeric Golgi Komplex
COP1	Coat Protein Complex 1
COS	Centre for Organismal Studies Heidelberg
CRISPR/Cas	engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated
Ct	„cycle threshold“/ Anzahl der Zyklen
d	Dezi- (10 ⁻¹)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOLK	Dolichol Kinase
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPM1-3	Dolicholphosphat-Mannosesynthase 1-3
Dr.	Doktor
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
et al.	Lat. „und andere“
EXT1	Exostosin Glycosyltransferase 1
EXT2	Exostosin Glycosyltransferase 2
F	Forward Primer
FCS / FKS	Fetales Kälberserum
FLNB	Filamin B
FUT8	Fucosyltransferase 8
G	Gauge (Kanülendurchmesser)
g	Erdbeschleunigung (g force)
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GDNF	Engl. glial cell line-derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat

GM130	cis-Golgi Matrix Protein
GP130	Glykoprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
GZF1	Engl. GDNF Inducible Zinc Finger Protein 1
h	Human
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunofluoreszenz
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
in prep.	in Vorbereitung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo- (10 ³)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L-	Levo-Form, linksdrehende Enantiomere
LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
LB	Lysogeny Broth Nährmedium
LLO	Lipid Linked Oligosaccharide
m	Meter
m	Milli- (10 ⁻³)
M	Molar (mol pro Liter)
mA	Milliampere
MAL I	<i>Maackia amurensis</i> Leukagglutinin I
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
mg	Miligramm
MGAT2	α-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-β-N-acetylglucosaminyltransferase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Milimolar
MPDU1	Mannose-P-Dolichol Utilization Defect 1
MPI	Mannose-6-Phosphate Isomerase
mRNA	Engl. messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n	Nano- (10^{-9})
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP-40	Nonoxinol 40
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OST	Oligosaccharyltransferase
p	Piko- (10^{-12})
p	Probability of error
p.	Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	PBS mit Tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen	Penicillin
Perz.	Perzentilen
PFA	Paraformaldehyd
PGM1	Phosphoglucomutase 1
pH	Potentia Hydrogenii
PIG	Phosphatidylinositolglykan
PKA	Ras/cAMP/ProteinaseK
PLO	Protein Linked Oligosaccharide
PMI	Phosphomannose Isomerase
PMM2	Phosphomannomutase 2

pmol	Pikomol
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
POMGnT1	Protein O-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1
POMT1	Protein-O-Mannosyltransferase 1
POZ	Poxvirus und Zink Finger
PRKCSH	Protein Kinase C Substrate 80K-H
QC	Quality Control
qRT-PCR (qPCR)	Quantitative Echtzeit PCR
R	Reverse Primer
RAB7A	Ras-Associated Protein RAB7
RCA I	<i>Ricinus communis Agglutinin I</i>
RefSeq	Reference Sequence
RFP	Red Fluorescent Protein
RFT1	Requiring Fifty Three 1 Homolog
RIPA	Engl. Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS	Standard Deviation Scores
SLC35A2	Solute Carrier Family 35 Member A2
SLC35C1	Solute Carrier Family 35 Member C1
SLC39A8	Solute Carrier Family 39 Member A8
SNA	<i>Sambucus nigra Agglutinin</i>
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SSR4	Signal Sequence Receptor Subunit 4
Strep	Streptomycin
TAE	Tris Aceton EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	TBS mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
TMEM165	Transmembranprotein 165
TOF	Time Of Flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UDP	Uridindiphosphat
UK	United Kingdom

UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VPS45	Vacuolar Protein Sorting 45 Homolog
w/v	Gewicht pro Volumen
WES	Whole Exome Sequencing
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
X	X-Chromosom
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro- (10^{-6})
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol

Abkürzungen der Nukleinbasen:

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	beliebige Base

Abkürzungen von Aminosäuren im Drei-, sowie Einbuchstaben-Code:

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Leu	L	Leucin
Ile	I	Isoleucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin
Xaa	x	beliebige Aminosäure

Abkürzungen und Symbole zur Darstellung der Glykanstrukturen:

Dol	■	Dolichol
Fru	⬡	Fruktose
Fuc	▲	Fucose
Gal	●	Galactose
GalNAc	■	N-Acetylgalactosamin
Glc	●	Glucose
GlcNAc	■	N-Acetylglucosamin
Man	●	Mannose
Sia	◆	Sialinsäure
P		Phosphat
PP		Diphosphat

Abkürzungen zur Darstellung der N-Glykan Analysen:

A	Antennen
B	Bisektion
F	Fucose / Fucosylierung
G	Galactose / Galactosylierung
Ga	zwei verknüpfte Galactosen
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
(L)	Glykosidische Bindung
Lac	Galactose verknüpft mit N-Acetyl-Galactosamin
M	Mannose
n	Anzahl der Einfachzucker
S / Sg	Sialinsäure / Sialysierung

A. Zusammenfassung

Bis heute ist die Anzahl an Patienten aus der Gruppe der angeborenen Glykosylierungsdefekte (CDG) gering, wobei zu vermuten ist, dass dieser Stoffwechselbereich hochgradig unterdiagnostiziert ist. CDG zählen daher noch immer zu den seltenen Stoffwechselerkrankungen. Die Entdeckung und Charakterisierung neuer Glykosylierungsdefekte sollten daher einen noch höheren Stellenwert im Bereich der pädiatrischen Stoffwechselstörungen einnehmen. Mit meiner Arbeit konnte erstmals eine Verbindung zwischen Glykosylierungsdefekten und dem Larsen Syndrom hergestellt werden. Hierfür wurden Serumproben und Hautfibroblasten der Patientin molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert. Das multisystemische Krankheitsbild unserer Patientin äußerte sich bereits zum Zeitpunkt der Geburt durch Kleinwuchs, skelettale Dysplasien und multiple Gelenkluxationen. Die übrigen Symptome, wie Dysmorphien, Hyperlordose der Wirbelsäule, Gelenkanomalien und der Verlust des Hör- und Sehsinns, folgten im Laufe der ersten Lebensjahre. Aufgrund ihres multisystemischen Phänotyps wurde die CDG-Diagnostik eingeleitet, wobei ein kombinierter Defekt der N- und O-Glykosylierung im Serum festgestellt und darauffolgend auch in den Fibroblasten der Patientin bestätigt wurde. Durch „Whole Exome Sequencing“ konnte die homozygote Variante c.865G>T (p.Glu289*) im *GDNF-Transduzierbaren Zink Finger Protein 1 (GZF1)* nachgewiesen werden, die zum Larsen-Syndrom führt. Weiterführende Untersuchungen ergaben eine aus der Mutation resultierende Verminderung der mRNA- und Proteinexpression sowie das Fehlen von GZF1 in den Zellkernen der Patientenfibroblasten. In Komplementationsstudien nach viraler Infektion mit der Wildtyp-GZF1-cDNA konnte eine Erhöhung der GZF1-Proteinexpression und dessen wiederkehrende Lokalisierung im Zellkern erreicht werden. Weiterhin ergab das eingebrachte GZF1 eine teilweise Re-Glykosylierung und erhöhte Expression der beiden Glykomarkerproteine GP130 und LAMP2. Der Glykosylierungsdefekt der Patientin ist aber vermutlich noch in dem durch die homozygote Variante c.1174G>A (p.Ala392Thr) betroffenen *Vacuolar-Sorting-Protein 1 Homolog (VPS45)*-Gen begründet. Transkript- und Proteinexpressionsstudien von VPS45 und von drei Untereinheiten des mit VPS45 in Verbindung stehenden Conserved Oligomeric Golgi (COG)-Komplexes ergaben dementsprechend deutliche Auffälligkeiten, wie sie bereits von den COG-CDG-Defekten her bekannt sind. Ein hierdurch verursachtes Missorting von

Glykosyltransferasen im Golgi ist vermutlich neben GZF1 mitverantwortlich für den bei der Patientin beobachtete schweren Glykosylierungsdefekt.

Summary

Until to date, the number of patients from the group of congenital disorders of glycosylation (CDG) is low, so CDG still belong to the rare metabolic diseases. Nevertheless, it can be assumed that this metabolic area is highly underdiagnosed. The discovery and characterization of new glycosylation defects should therefore be of even greater importance in the area of pediatric metabolic disorders. With my work, a connection between glycosylation defects and the Larsen syndrome was established for the first time. For the studies, the patient's serum and skin fibroblasts were characterized by molecular biology and biochemistry. The multi-systemic clinical picture of our patient was present already at birth characterized by short stature, skeletal dysplasia and multiple joint dislocations. The other symptoms, such as dysmorphism, hyperlordosis of the spine, joint abnormalities and loss of hearing and sight, followed during the first years of life. Due to her multisystemic phenotype, CDG diagnostics was initiated, whereby a combined defect in *N*- and *O*- glycosylation was found in the serum which was subsequently also confirmed in the patient's fibroblasts. Whole exome sequencing revealed the homozygous variant c.865G>T (p.Glu289*) in the GDNF Transducible Zinc Finger Protein 1 (GZF1), which is known to lead to the Larsen syndrome. Further investigations revealed a reduction in mRNA and protein expression due to the mutation and the absence of GZF1 in the cell nuclei of the patient's fibroblasts. In complementation studies after viral infection with the wild-type GZF1 cDNA, an increase in GZF1 protein expression and its recurring localization in the cell nucleus could be achieved. Furthermore, the introduced GZF1 induced a partial re-glycosylation and increased expression of the two glycomarker proteins GP130 and LAMP2. However, the patient's glycosylation defect might also be due to the homozygous variant c.1174G>A (p.Ala392Thr) in the vacuolar sorting protein 1 homolog (VPS45) gene. Accordingly, transcript and protein expression studies of VPS45 and three subunits of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex associated with VPS45 revealed significant abnormalities, which are comparable to primary COG-CDG defects. A resulting missorting of glycosyltransferases in the Golgi is probably jointly responsible for the severe glycosylation defect observed in our patient in addition to GZF1.

B. Theorie

1. PROTEINGLYKOSYLIERUNG

Zellen bilden das Fundament des Lebens und besitzen ihrerseits Proteine als Grundbausteine. Diese können durch co- bzw. posttranslationale Modifikationen ihren Aufgaben entsprechend angepasst werden. Solche Umbildungen haben weitreichende Bedeutungen für die Eigenschaften des einzelnen Proteins, so erhöht sich beispielsweise die funktionelle Diversität. Sie haben aber auch Einfluss auf den gesamten Stoffwechsel des Organismus (Defaus et al. 2014, Moremen et al. 2012). Eine der häufigsten Formen dieser Proteinmodifikationen stellt die Glykosylierung dar, welche in Bakterien, Pflanzen, Tieren und Menschen beschrieben wurde (Dell et al. 2010, Moremen et al. 2012, Spiro 2002). Bei dieser biochemischen Reaktion entstehen, durch das Anheften von Zuckern an Proteine oder Lipide, Glykoproteine und Glykolipide, welche zusammengefasst als Glykokonjugate bezeichnet werden. Etwa 50 - 70% aller im menschlichen Körper vorkommenden Proteine sind glykosyliert (An et al. 2009). Hierzu zählen viele Membran-, sowie Matrixproteine, Hormone, Enzyme und Rezeptoren. Beispielhaft hierfür ist die Membranproteingruppe der Integrine, zu der neben den Cadherinen auch die Fibronektine der Fibroblasten, ebenso wie die Bindegewebsproteine, die Kollagene, zählen. Glykoproteine sind subzellulär, im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, Lysosomen, Peroxisomen und ebenso dem Zytosol, in extrazellulären Flüssigkeiten und den zellulären Membranen zu finden (Marth & Grewal 2008, Sairam 1989, Varki 2009). Sie werden sowohl für das Wachstum, als auch für die Differenzierung und Funktion aller Organe und Gewebe benötigt. Ebenso spielen sie bei der Signalübertragung, der Immunabwehr, bei Entzündungsreaktionen und malignen Entartungen eine Rolle (Murray et al. 2006). Von den angehängten Oligosaccharidketten sind außerdem gerichtete Transportprozesse abhängig. Hierbei werden die Glykoproteine sortiert und sowohl intrazellulär zwischen verschiedenen Organellen, als auch extrazellulär zu spezifischen Zielzellen transportiert (Sears 1998, Shental-Bechor 2008, Varki 1993). Vermutlich sind über 300 verschiedene Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Transportproteine an der Glykosylierung von Proteinen beteiligt. Bei dieser sogenannten Glykoproteinbiosynthese werden Kohlenhydratketten schrittweise aus verschiedenen Monosacchariden synthetisiert. Diese Oligosaccharidketten werden anschließend kovalent an definierte Aminosäurereste eines Proteins angeheftet und

nachfolgend je nach Verwendungszweck des Glykoproteins noch einmal modifiziert. Die vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten ergeben eine enorme Diversität der Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen (Spiro 2002).

1.1 GRUNDLAGEN DER GLYKOPROTEINBIOSYNTHESE

Bedingt durch die Art der Bindung zwischen Oligosaccharid und Protein können drei Glykosylierungsmechanismen unterschieden werden. Durch eine Verknüpfung mit einer Aminogruppe entstehen *N*-Glykosylierungen, durch Etherbindung *O*-Glykosylierungen und durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen *C*-Mannosylierungen, siehe hierzu Abbildung 1 (Dell et al. 2010, Spiro 2002). *N*-Glykosylierungen stellen im menschlichen Körper die häufigste Modifikation membrangebundener und sekretorischer Proteine dar. Die *O*-Glykosylierung wird in Abschnitt 1.2 (inklusive der *O*-Mannosylierung, sowie der *O*-Fucosylierung), die *C*-Mannosylierung in Abschnitt 1.3 zusammengefasst. Da sich diese Arbeit vorwiegend mit Defekten der *N*-Glykosylierung beschäftigt wird hierauf in Abschnitt 1.4 genauer eingegangen.

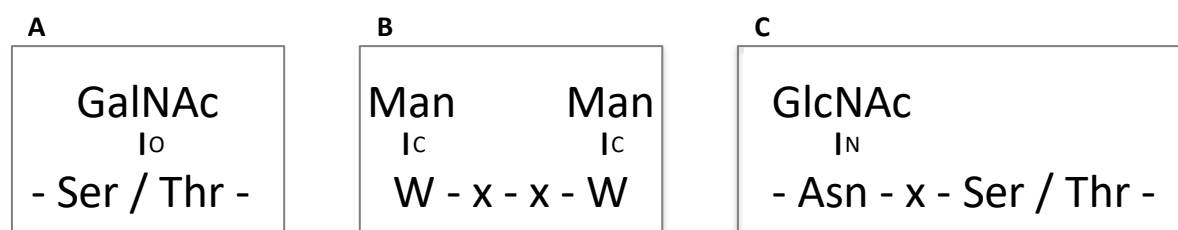


Abbildung 1: Spezifische Zielsequenzen der O-, C- und N-Glykosylierung - (A) Bei einer *O*-Glykosylierung des Muzin-Typs wird ein *N*-Acetylgalactosaminrest (GalNAc) über die Aminosäuren Serin oder Threonin verknüpft. **(B)** Im Falle einer *C*-Mannosylierung findet die Verknüpfung der Mannose (Man) über Tryptophanreste in der Zielsequenz WxxW statt. **(C)** Das bei der *N*-Glykosylierung zu findende Motiv NxS/T wird zur Bindung eines *N*-Acetylglucosaminrestes (GlcNAc) benötigt.

1.2 O-GLYKOSYLIERUNG

Die *O*-Glykosylierung ist nach dem zur Verknüpfung verwendeten Sauerstoffatom benannt. Im Gegensatz zur *en bloc* Übertragung des Glykans bei der *N*-Glykosylierung werden bei der *O*-Glykosylierung die einzelnen Monosaccharide nacheinander übertragen. Sie lässt sich in die Hauptgruppen Muzin-Typ, *O*-GlcNAc-Typ und Xylose-Typ unterteilen, welche abhängig von der Verknüpfung der Zucker und Aminosäurereste sind. In tierischen Zellen ist der Muzin Typ am häufigsten zu finden. Hier werden die *N*-Acetylgalactosaminreste (GalNAc) α -glykosidisch an Serin- oder Threoninreste gebunden (Abbildung 1A). Ähnlich funktioniert auch die Bindung des

O-GlcNAc-Typ, hier ist ein *N*-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) ebenfalls über den Hydroxylrest eines Serin- (S) oder Threonin-Restes (T) verknüpft. Auch beim Xylose-Typ spielen diese beiden Aminosäuren eine Hauptrolle, in Proteoglykanen binden daran spezifisch Xylosen (Spiro 2002, Tran & Ten Hagen 2013, Van den Steen et al. 1998). Die O-Fucosylierung einiger Repeat-Strukturen, wie Thrombospondin oder IGR (Holdener & Haltiwanger 2019), sowie die O-Mannosylierung des α -Dystroglykans (Endo 2004) werden ebenfalls zu den O-Glykosylierungen gezählt.

1.3 C-MANNOSYLIERUNG

Bei der C-Mannosylierung wird nur ein Mannose-Molekül auf den Tryptophan-Rest (W) eines Proteins übertragen (Abbildung 1B). Die hierfür spezifisch verwendete Zielsequenz WxxW liegt oft als Doppelmotiv (WxxWxxW) vor, bei dem an alle drei Tryptophan-Reste Mannosen gebunden werden können. Dieser im ER stattfindende Glykosylierungsprozess konnte bisher nur in tierischen und menschlichen Zellen beobachtet werden (Albuquerque-Wendt et al. 2019, Ihara et al. 2015).

1.4 GRUNDLAGEN DER N-GLYKOSYLIERUNG

Die N-Glykosylierung ist ein komplexer Prozess, der größtenteils proteinunabhängig im Zytoplasma, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat abläuft. Hierbei werden, über mehrere kombinierte Reaktionsmechanismen, Zuckerreste kovalent an Proteine gebunden. Die Bindung der Zuckerreste erfolgt über eine spezielle Erkennungssequenz aus drei Aminosäuren (Abbildung 1C). Ein Asparaginrest (N), an den die Zuckerstrukturen angelagert werden, eine beliebige Aminosäure (X) (mit Ausnahme von Prolin, Threonin und Serin) und ein Serin (S) oder Threonin (T) bilden dieses Glykosylierungsmotiv NxS/T (Medzihradzky 2008). Selten wird auch ein Asparaginrest (N) in Kombination mit einem Cystein (C) glykosyliert. Die entstehende Zielsequenz ist hierbei NxS/T (Lowenthal et al. 2016).

Eine Modifizierung findet allerdings nicht bei allen potentiellen Erkennungsmotiven statt, ca. ein Drittel ist nicht glykosyliert (Pitti et al. 2019, Schulz 2012).

Die N-Glykan-Biosynthese umfasst folgende vier Schritte (Varki 2009):

1. Synthese der Lipid-gebundenen Oligosaccharide (LLO's; *engl: lipid linked oligosaccharides*)
2. *En-bloc* Transfer der Glykanstrukturen an das naszierende Protein
3. Umformung der an das Protein gebundenen N-Glykane im ER

4. Modifikation der *N*-Glykane im Golgi-Apparat

Die entstehenden *N*-Glykane werden in drei Typen klassifiziert. Ein Pentasaccharid aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannoseresten bildet dabei die auch Kern- oder *Core*-Region ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$). Durch weitere Verknüpfungen an die terminalen Mannosen ist anschließend eine Differenzierung in den Mannosereichen-, den Komplexen- und den Hybrid-Typ möglich (Abbildung 2). Die Bildung dieser Glykantypen führt letztlich zu unterschiedlichen Glykoproteinen, die zielorientiert aus dem Golgi-Apparat entlassen werden (Varki 2009).

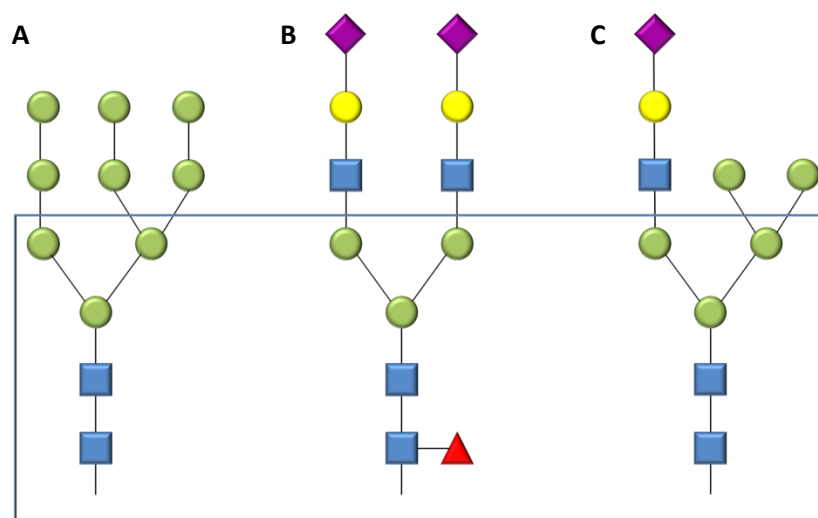


Abbildung 2: Unterscheidung der *N*-Glykan-Typen - Der alle drei Strukturen einschließende Kasten (blau) bezeichnet die sogenannte Kern-Struktur. **(A) Mannosereicher Typ** - Dieser Typ ist ausschließlich aus α -glykosidisch gebundenen D-Mannosen aufgebaut. **(B) Komplexer Typ** - Es finden Erweiterungen, beispielsweise mit *N*-Acetylglucosaminen und Galactosen, statt. Terminal sind *N*-Acetylneuraminsäuren oder Fucosen gebunden. Auch im Bereich der Kernregion sind zusätzliche Verknüpfungen mit Fucose, *N*-Acetylglucosamin oder Veresterungen mit anorganischen Säuren möglich. Diese sorgen für eine große Variabilität. **(C) Hybrid Typ** - Elemente der beiden anderen Typen werden kombiniert. Auch hier sind weitere Verknüpfungen im Kernbereich möglich.

Der Mannosereiche-Typ (Abbildung 2A) ist ausschließlich aus D-Mannosen aufgebaut, die α -glykosidisch verbunden sind. Er trägt auch terminal unsubstituierte Mannosereste.

Der Komplexe-Typ (Abbildung 2B) ist in Vertebraten der extrazellulär am häufigsten vorkommende (Trombetta 2003). Er besteht neben *N*-Acetylglucosaminen und Mannosen auch aus Galactosen und terminalen *N*-Acetylneuraminsäuren. Zudem können Fucosereste angehängt sein. Dieser Typ besitzt eine hohe Variabilität der Ausbildung von mono- bis pentaantennären Strukturen, wodurch diese Gruppe vielfältig und in verschiedenen Kombinationen vertreten ist (Ohtsubo & Marth 2006).

Der Hybrid- oder Hybridglykan-Typ (Abbildung 2C) verbindet Elemente der beiden anderen Typen. Er ist durch *N*-Acetylglucosamin-substituierende Enden komplexer Glykane und parallele Enden unsubstituierter Mannosereste gekennzeichnet.

1.5 DER LIPIDANKER DOLICHOL

Bevor Glykane am Lipidanker Dolichol aufgebaut werden können wird dieser im Zytosol synthetisiert. Dolichol (Abbildung 3) ist ein Isoprenderivat und eines der Produkte des Mevalonsäure-Zyklus. Im Zytosol wird aus den Ausgangsstoffen Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA über mehrere Zwischenschritte zuerst das Zwischenprodukt Farnesylpyrophosphat synthetisiert. Durch weitere Verarbeitungen entstehen neben Dolichol weitere Produkte, wie Ubiquinone, Cholesterol, Heme A, Sterol und andere Signalproteine. Dolichol wird auf der zytosolischen Seite in die Membran des endoplasmatischen Retikulums eingebaut und phosphoryliert. Das dadurch entstandene Dolicholphosphat dient als Lipidanker der *N*-Glykosylierung.

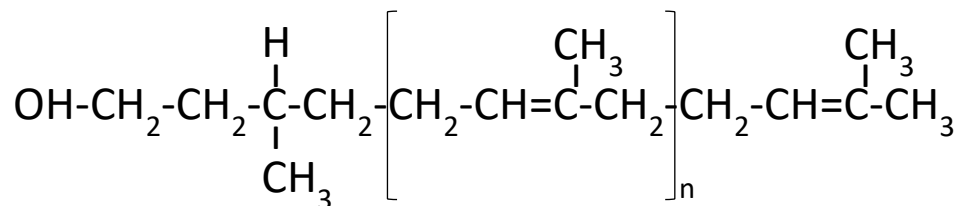


Abbildung 3: Strukturformel des Dolichols (C₁₀₀H₁₆₄O) – Der Lipidanker Dolichol dient als Trägermolekül bei der Synthese der Lipidverknüpften Oligosaccharide (LLO's).

1.6 BEREITSTELLUNG DER MANNOSE UND GALACTOSE IM ZYTOSOL

Die initialen Schritte der Glykoproteinbiosynthese erfolgen im Zytosol der Zelle. Hier werden die benötigten nukleotidaktivierten Zucker UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) GDP-Mannose (GDP-Man), UDP-Glucose (UDP-Glc) UDP-Galactose (UDP-Gal) und GDP-Fucose (GDP-Fuc), sowie der Lipidanker Dolichol synthetisiert (Caramelo & Parodi 2015, Lannoo & Van Damme 2015). Einzig die aktivierte CMP-Sialinsäure (CMP-Sia) wird im Zellkern synthetisiert und anschließend über das Zytosol in den Golgi-Apparat transportiert (Munster et al. 1998). Da für die ersten Schritte der *N*-Glykosylierung zuerst Mannose, Glucose und GlcNAc benötigt werden, sind in Abbildung 4 die zusammenhängenden Synthesewege von GDP-Man, UDP-Glc und UDP-GlcNAc aus Mannose bzw. Glucose gezeigt.

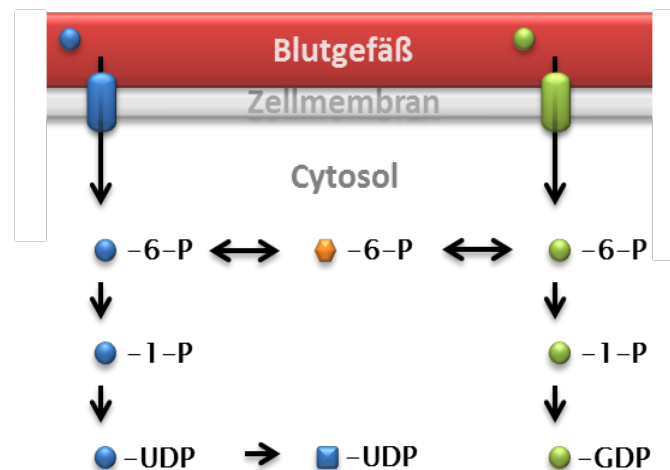


Abbildung 4: Bereitstellung von UDP-Mannose und UDP-GlcNAc im Zytosol - Mannose ●, Glucose ●, Fructose ● und N-Acetylglucosamin ■, sowie Phosphatreste (P) sind abgekürzt dargestellt. Import und Umwandlung von Glucose-6-Phosphat über Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose und UDP-N-Acetylglucosamin, sowie Mannose-6-P über Mannose-1-Phosphat zu UDP-Mannose. Auch eine reversible Umwandlung von Glucose-6-Phosphat über Fructose-6-Phosphat zu Man-6-Phosphat ist möglich.

1.7 BILDUNG DER LIPID-VERKNÜPFTEN OLIGOSACCHARIDE (LLO's)

Der primäre Schritt der *N*-Glykosylierung, die Bildung von sogenannten Lipid-verknüpften Oligosacchariden (LLO's), ist ein in der Natur hoch konservierter Prozess, der mit der Übertragung des Glykans auf das Protein endet. Bis dahin werden an den phosphorylierten Lipidanker Dolichol insgesamt zwei GlcNAc-, neun Mannose- und drei Galactose-Reste enzymatisch angelagert. Hieraus resultiert der LLO Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃. Der genaue Ablauf der LLO-Synthese ist in Abbildung 5A gezeigt und im Folgenden beschrieben. Zu Beginn wird auf das, an der zytosolischen Seite des ER, membranständige Dolichol-Phosphat ein UDP-aktiviertes *N*-Acetylglucosamin übertragen.

Diese Reaktion wird durch die UDP-GlcNAc:GlcNAc-1-Phosphotransferase katalysiert und setzt Uridinmonophosphat (UMP) frei. Im nächsten Reaktionsschritt wird das zweite *N*-Acetylglucosamin übertragen, dabei entsteht 2-*N*-Acetylglucosaminyl-pyrophosphoryl-Dolichol (Dol-PP-GlcNAc₂). Ebenfalls im Zytosol werden fünf der insgesamt neun Mannosereste angeknüpft. Hierbei wird durch spezifische Mannosyltransferasen die festgelegte Reihenfolge der Mannose-Verbindungen α -1,3-, α -1,6- und α -1,2 eingehalten. Zur weiteren Assemblierung des Oligosaccharides wird das im Zytosol entstandene Intermediat Dol-PP-GlcNAc₂Man₅ durch einen „Flippase“-Mechanismus, an dem RFT1 beteiligt ist, in das ER-Lumen transloziert (Hauptle et al. 2008, Helenius & Aebi 2002). Durch spezifische Mannosyl- und

Glucosyltransferasen werden sukzessiv vier weitere Mannose- (Man) sowie drei Glucosereste (Glc) auf das Dol-PP-GlcNAc₂-Man₅ übertragen. Die Donoren dieser Transfers sind Dol-P-Man und Dol-P-Glc. Beide wurden zuvor im Zytosol von GDP-Man bzw. UDP-Glc auf ein Dolichol-Phosphat transferiert. Die entstandene Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man) und Dolichol-Phosphat-Glucose (Dol-P-Glc) durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus und durch das Protein MPDU1 (Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein) in das Lumen des ER übertragen (Anand et al. 2001). Durch diese enzymatische Elongation ergibt sich das vollständige Lipid-verknüpfte Oligosaccharid Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃ (Hirschberg et al. 1998, Varki 2009).

1.8 ÜBERTRAGUNG DER LLO'S AUF EIN PROTEIN

Der zweite Abschnitt des Syntheseprozesses im ER beginnt mit der cotranslationalen kovalenten Übertragung der LLO's auf einen definierten Asparaginrest (Asn) eines naszierenden Proteins (Abbildung 5B) (Knauer 1999). Dieser Prozess findet unter Freisetzung des Dolichol-Pyrophosphats statt (Lehrman 2007, Varki 2009) und wird durch den Oligosaccharyltransferasekomplex (OST) katalysiert.

Im Anschluss setzen, ebenfalls im ER-Lumen, sogenannte „Trimming“-Schritte ein. Durch die spezifischen α -Glucosidasen I und II, sowie die ER-Mannosidase I werden in sequentiellen Schritten alle drei Glucose-, sowie ein Mannose-Rest abgespalten (Varki 2009). Das Protein mit dem Man₈GlcNAc₂Asn-Intermediat durchläuft eine Qualitätskontrolle, die korrekte Faltung wird durch eine Wechselwirkung zwischen UDP-Glucose:Glykoprotein-Transferase (UGGT), den Chaperonen Calnexin und Calreticulin, sowie der α -II-Glucosyltransferase kontrolliert (Tatu & Helenius 1997).

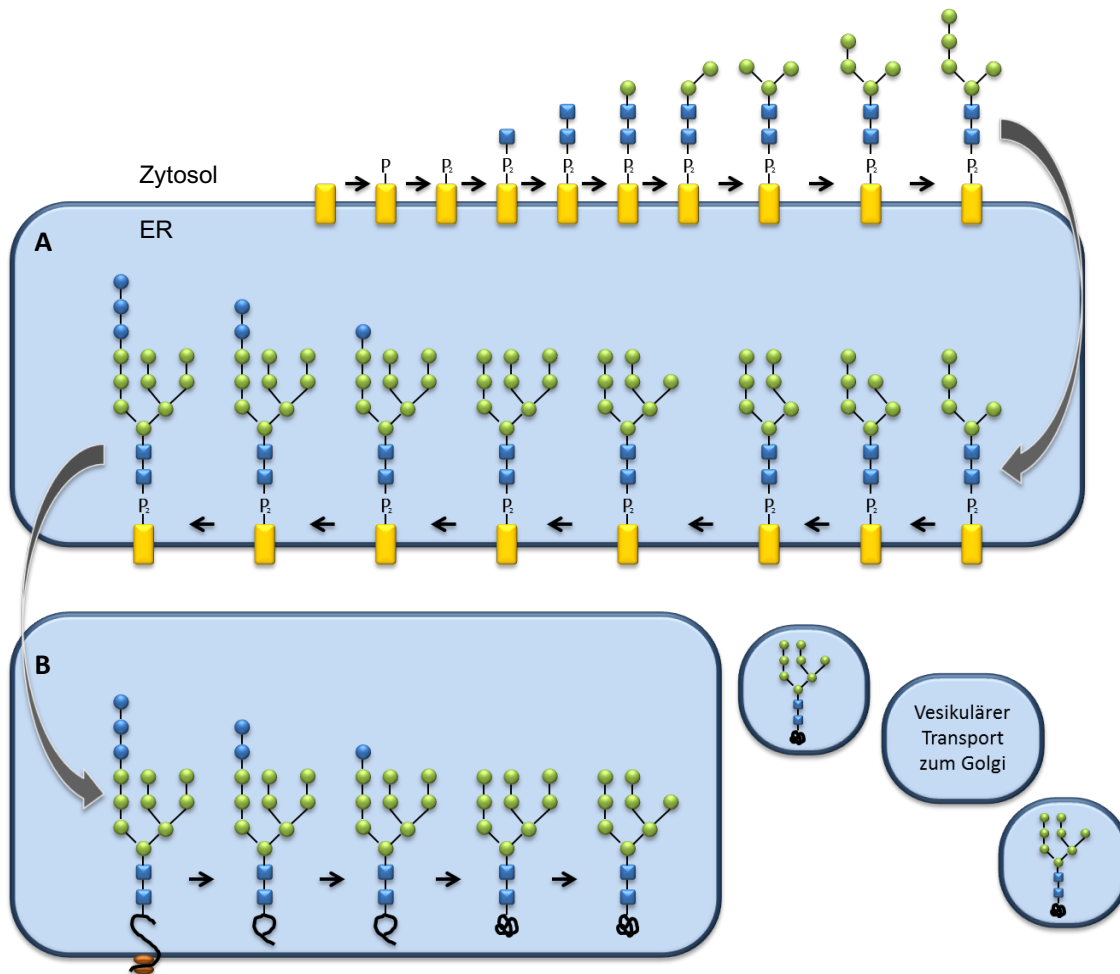


Abbildung 5: Aufbau der Oligosaccharidstruktur im Endoplasmatischen Retikulum (ER) - (A) Der Aufbau des lipidverknüpften Oligosaccharids (LLO) startet im Zytosol an der Außenseite des ER, hier werden erste Zuckerreste (Mannose ● und N-Acetylglucosamin ■) an den phosphorylierten Lipidanker Dolichol ■ gebunden. Der Prozess wird im Inneren des ER Fortgesetzt, nachdem der LLO Vorläufer Dol-PP-GlcNAc₂-Man₅ unter Beteiligung von RFT1 ins ER-Lumen „geflippt“ wurde. Zusätzlich zu vier weiteren Mannosen werden drei Glucose-Residuen ● angehängt. **(B)** Nach der Übertragung des Glykans Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃ auf das naszierende Protein durch die Olygosaccharidtransferase (OST) beginnt noch im ER das Trimming der Glykanstruktur.

1.9 N-GLYKANBIOSYNTHESE IM GOLGI-APPARAT

Nachdem das Glykoprotein vesikulär zum Golgi-Apparat transportiert wurde erfolgen weitere Strukturveränderungen. Diese entscheidet auch darüber, ob das Oligosaccharid letztlich zum Komplex-, Hybrid- oder Mannosereichen-Typ umgewandelt wird (Yamamoto et al. 2013). Für alle Glykoproteine gleich ist, die im cis-Golgi-Kompartiment stattfindende, einleitende Prozessierung zu $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-Asn}$ durch das Abspalten dreier Mannosereste mittels der Golgi-Mannosidase I. Anschließend kann ein Wiederaufbau der Glykanstruktur durch GlcNAc-, Galactose-, Fucosereste sowie Sialinsäurereste stattfinden (Abbildung 6):

- (A) Cis-Golgi-Kompartiment: Glykoproteinen, die für sekretorische Vesikel oder für eine Lokalisation in der Plasmamembran bestimmt sind, werden um drei Mannose-Reste reduziert.
- (B) Mediales-Golgi-Kompartiment: Hier findet der Wiederaufbau der Glykane mit GlcNAc, Fucose und Galactose statt.
- (C) Trans-Golgi-Kompartiment: Es erfolgt die abschließende, terminale Modifikation mit Sialinsäuren.

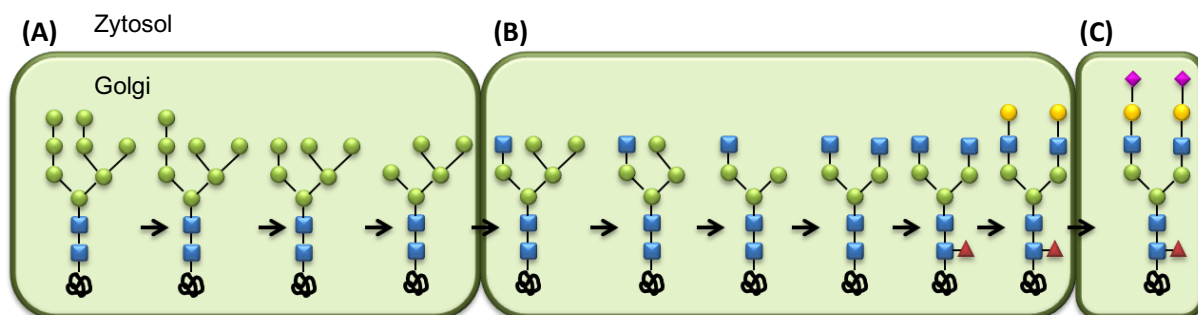


Abbildung 6: Prozessierung der Glykane im Golgi-Apparat – (A) Cis-Golgi-Kompartiment: Die Glykoproteine werden um drei terminale Mannose-Reste ● reduziert. (B) Mediales-Golgi-Kompartiment: N-Acetylglucosamin ■, Fucose ▲ und Galactose ● werden zur Modifikation der Glykane angefügt. (C) Trans-Golgi-Kompartiment: Hier erfolgt die terminale Modifikation mit Sialinsäure ◆.

2. GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTE - CONGENITAL DISORDERS OF GLYCOSYLATION

Die Glykosylierung von Proteinen greift in eine Vielzahl von biologischen Prozessen ein. Ein Fehler während der Glykoproteinbiosynthese kann daher gravierende Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben. Bei Menschen werden diese angeborenen Glykosylierungsdefekte seit 1999 unter dem Akronym CDG (*engl.: Congenital Disorder of Glycosylation*) zusammengefasst (Aebi et al. 1999). Zuvor waren sie unter dem Namen CDGS (Kohlenhydrat-defizientes Glykoproteinsyndrom; *engl.: Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome*) bekannt. Dieser wurde 1980 durch den Kinderarzt und Entdecker der ersten CDG Fälle, Jaak Jaeken, geprägt (Jaeken et al. 1980). Bis heute gehören die angeborenen Defekte der Glykosylierung mit einer geschätzten Prävalenz zwischen 1:20.000 und 1:100.000 zu den sehr seltenen Stoffwechselerkrankungen. Obwohl die Anzahl der gefundenen Typen seit der Erstbeschreibung stetig ansteigt wird die Anzahl in den nächsten Jahren weiterwachsen. Grund hierfür sind vor allem verbesserte genetische Analysen (Abbildung 7).

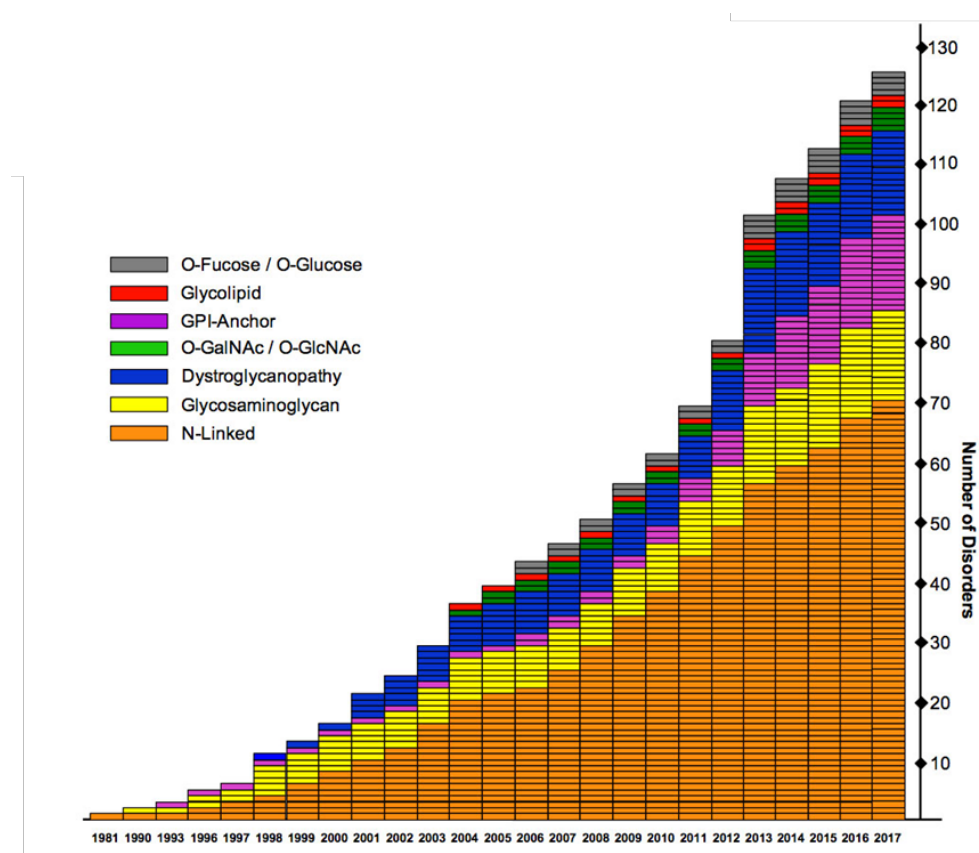


Abbildung 7: Anzahl der beschriebenen CDG-Typen – Übersicht über die zwischen 1981 und 2017 beschriebenen CDG-Defekte inklusive Unterteilung der Möglichen Glykosylierungsarten (Aus Ng & Freeze 2018).

Über die Hälfte der bisher entdeckten glykosylierungsbedingten Erkrankungen machen Defekte der *N*-Glykosylierung aus, danach folgen in absteigender Reihenfolge Defekte der Glykosaminoglykan Synthese, der Glykosylphosphatidylinositol (GPI-) Anker Synthese, Dystroglykanopathien, Defekte der *O*-Fukosylierung und *O*-Glykosylierung, sowie *O*-GalNAc und *O*-GlcNAc Defekte und zuletzt Defekte des Glykolipidstoffwechsels (Ng & Freeze 2018). Abhängig vom betroffenen Syntheseweg sind also Defekte in allen unterschiedlichen Glykosylierungen möglich.

2.1 *N*-GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTE

Die angeborenen Glykosylierungsdefekte der *N*-Glykosylierung betreffen die Bereitstellung, die Synthese oder die Prozessierung der neusynthetisierten Zuckerkonjugate im Zytosol, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat. Häufig betroffen sind die Gene der Glykosyltransferasen, der Nukleotid-Zucker-Transporter oder der involvierten zytoplasmatischen Proteine (Varki 2009).

Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse in der CDG-Diagnostik anhand des Markerproteins Transferrin ist eine weitere Untergliederung der *N*-Glykosylierungsdefekte in CDG-I und CDG-II möglich. Typ-I kennzeichnet dabei alle frühen Defekte, welche ab dem Beginn der Glykosylierung im Zytosol und dem ER bis einschließlich des Transfers des LLO's auf das naszierende Protein. Alle nach diesem Zeitpunkt folgenden späten Defekte der Prozessierung, des Trimmings oder der Elongation im ER und dem Golgi-Apparat werden unter Typ-II zusammengefasst.

Die Benennung eines CDG-Defekts richtet sich nach dem Namen des betroffenen Proteins, an den der Erkrankungsname „-CDG“ angehängt wird (z.B. PMM2-CDG („*Phosphomannomutase 2*“), PMI-CDG („*Phosphomannose Isomerase*“) oder MGAT2-CDG („ *α -1,6-mannosyl-glycoprotein 2- β -N-acetylglucosaminyl-transferase*“)) (Jaeken et al. 2008, Jaeken et al. 2009).

Die Vererbung dieser Defekte findet, bis auf wenige Ausnahmen, autosomal-rezessiv statt. Abweichend konnte bisher für die beiden Varianten EXT1/2-CDG („*exostosin glycosyltransferase 1/2*“) und die PRKCSH-CDG („*Glucosidase 2-Untereinheit β* “) ein dominanter Erbgang aufgezeigt werden (Janssen et al. 2010, Stancheva-Ivanova et al. 2011). Die Defekte ATP6AP1-CDG („*ATPase H^+ -transporting accessory protein 1*“), ALG13-CDG („*UDP-N-acetylglucosaminyltransferase*“), SLC35A2-CDG („*UDP-Galactose Transporter*“), sowie SSR4-CDG („*signal sequence receptor*“)

subunit 4“) wiederum sind auf dem X-Chromosom lokalisiert und werden gonosomal vererbt (Sparks & Krasnewich 1993, Supraha Goreta et al. 2012).

Eine weitere Sonderform sind durch „*de novo*“ Mutationen hervorgerufene Defekte, wozu einige Varianten in *ALG6* („*Dolichol pyrophosphate Man₉GlcNAc₂ α-1,3-glycosyltransferase*“) (Eklund et al. 2006) und *SLC35A2* (Kimizu et al. 2017) zählen.

CDG Patienten zeigen oftmals multisystemische Erkrankungsbilder und damit einhergehend psychomotorische und neurologische Retardierungen (Jaeken 2013). Die Defekte äußern sich vor allem bei der Gehirnentwicklung und den Funktionsweisen des Magen-Darm-Traktes, der Leber, sowie des Immunsystems, des Herzens oder der Entwicklung der Knochen. Häufig zeichnen sie sich klinisch zusätzlich durch schwere Entwicklungsstörungen, Muskelschwäche, invertierte Brustwarzen, ein verringertes Kleinhirnvolumen, Krampfanfälle, Strabismus oder eine verzögerte Sprachentwicklung aus (Peanne et al. 2018).

Die Komplexität der CDG-II Typen zeigt sich neben der Vielfalt an Symptomen vor allem in der Anzahl, der am *N*-Glykosylierungsprozess beteiligten Proteine. Neben Glykosyltransferasen wie der Fukosyltransferase 8 (FUT8) der β-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAcT-II), die durch das Gen *MGAT2* codiert wird, oder der durch *B4GALT1* codierten β-1,4-Galactosyltransferase, sind häufig Nukleotid-Zucker-Transporter, wie der UDP-Galactose Transporter, durch *SLC35A2* codiert, oder das Transmembranproteins 165 (*TMEM165*) betroffen (Foulquier et al. 2012, Hanßke et al. 2002, Ng et al. 2013, Ng et al. 2018, Ramaekers et al. 1991).

Sowohl bei CDG-I Defekten, wie beispielsweise MPDU1-, DOLK- oder DPM1-3-CDG mit Defekten der *O*-Mannosylierung (van Tol et al. 2019), als auch bei CDG-II Patienten kann neben der *N*-Glykosylierung zusätzlich die *O*-Glykosylierung betroffen sein. Hierzu gehören beispielsweise Defekte in *B4GALT1*, *EXT1/EXT2*, der *O*-Mannosyltransferase 1 (*POMT1*), der *O*-Mannosyl-b-1,2N-acetylglucosaminyltransferase 1 (*POMGnT1*) (Jaeken 2003). Auch Patienten mit Defekten des konservierten oligomeren Golgi-Komplexes („*Conserved oligomeric Golgi*“, COG) zeigen kombinierte Auffälligkeiten der *N*- und *O*-Glykosylierung, genauer Auffälligkeiten der Glykane des *O*-Mucintyps (Smith & Lupashin 2008).

Bei CDG-Verdachtspatienten wird zuerst das Glykosylierungsmuster des Serum-Proteins Transferrin auf Veränderungen der beiden biantennären sialylierten Oligosaccharide hin untersucht. Dieses Glykoprotein dient als Markerprotein in der

CDG-Diagnostik und trägt normalerweise zwei Antennen des komplexen Typs, mit negativ geladenen Sialinsäureresten an den terminalen Enden. Ein Fehlen dieser Reste hat eine Ladungsverschiebung zur Folge. Diese geht mit einer Veränderung des Isoelektrischen Punktes einher und kann mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nachgewiesen werden (Marklova & Albahri 2007). Bei Patienten mit CDG-I zeigt sich der Verlust kompletter Oligosaccharidketten, bei CDG-II dagegen der Verlust einzelner Monosaccharide und dadurch veränderten Glykanstrukturen (Varki 2009). Diese Analyse dient seit den 1980er Jahren als einleitende CDG-Diagnostik und hat sich seitdem CDG-Standardsuchtest etabliert.

Die ebenfalls im Serum enthaltenen Proteine α 1-Antitrypsin und Apolipoprotein C-III (Apo-CIII) dienen als weitere Marker der CDG-Diagnostik. Eine α 1-Antitrypsin Analyse wird bei nicht eindeutigen Transferrin-IEF Banden oder als Kontrolle auffälliger Ergebnisse eingesetzt. Durch drei N-Glykosylierungsstellen, die mit N-Glykanen des komplexen Typs besetzt, sind kann der Verdacht eines Defekts in der N-Glykan Biosynthese bestätigt werden. Das Apo-CIII besitzt ein O-glykosidisch verknüpftes Glykan des Core-1 Mucin-Typs.

Die meisten CDG-Patienten werden, aus Ermangelung an Therapiemöglichkeiten, rein symptomatisch behandelt. Für einige wenige Defekte besteht eine Behandlungsmöglichkeit durch die orale Gabe von Einfachzuckern, wie Mannose, Fucose oder Galactose. Zu diesen Defekten zählen PMI-CDG, PGM1-CDG („*Phosphoglucomutase1*“), SLC35C1-CDG („*GDP-Fucose Transporter 1*“), TMEM165-CDG und SLC35A2-CDG (Dörre et al. 2015, Harms et al. 2002, Marquardt et al. 1999, Mention et al. 2008, Morava 2014, Morelle et al. 2017, Schrapers et al. 2015).

Einen sekundären Wirkmechanismus der Galactosesupplementation konnte von Park et al. am Beispiel des Zink Transporters SLC39A8 (Solute Carrier family 39 Member 8) nachgewiesen werden (Park et al. 2015). Neben dem namensgebenden Zink werden durch SLC39A8 auch Cadmium und Mangan aus dem Zytosol in den Golgi-Apparat transportiert. Da Mangan seinerseits von der β -1,4-Glykosyltransferase B4GALT1 benötigt wird, führt ein Defekt in SLC39A8 zum Mangan-Mangel und somit zu einer, durch die verminderte Aktivität von B4GALT7 sekundär verursachten, Typ-II CDG Erkrankung. Auch dieser Symptomatik kann durch die Behandlung der Patienten mit Galactose entgegengewirkt werden (Park et al. 2015).

3. ANAMNESE EINER PATIENTIN MIT MULTISYSTEMISCHEM KRANKHEITSBILD

Die Patientin wurde als drittes Kind konsanguiner Eltern (Cousins) 2008 in Saudi-Arabien geboren. Eine vierte Schwangerschaft der Mutter endete durch einen spontanen Abort. Im Gegensatz zu den beiden Geschwistern, die keine Krankheitssymptome zeigen, leidet neben unserer Patientin ein Cousin/ eine Cousine der Familie ebenfalls an Kleinwuchs und einer Hornhauttrübung (Corneal clouding). Auch bei diesem/ dieser besteht ein konsanguiner familiärer Hintergrund.

Die erste Vorstellung der Patientin in unserer Klinik erfolgte im Alter von acht Jahren als Anamnese mit ganzheitlichen Untersuchungen zur Vorbereitung auf die anstehende Operation ihrer angeborenen Verknöcherungen der Schädelnähte (Kraniosynostose) mit Spitzschädel (Oxycephalus). Neben den hierbei gewonnenen patientenbezogenen Daten stehen nur wenige Informationen zu Schwangerschaft, Geburt und familiärem Hintergrund zur Verfügung, diese beziehen sich ausschließlich auf Aussagen der Eltern.

Die Patientin zeigte sich schon bei Geburt dystroph mit einem Geburtsgewicht von 1,6 kg. Weitere Symptome, wie die Hornhauttrübung und den Hörverlust, entwickelte sie im Laufe des ersten Lebensjahres. Die bei uns erhobenen Daten im Alter von acht Jahren und zwei Monaten zeigen weiterhin deutlich die Dystrophie mit Perzentilenflucht der Länge, des Gewichts und des Kopfumfangs und weisen auf Kleinwuchs hin (siehe auch Abbildung 8):

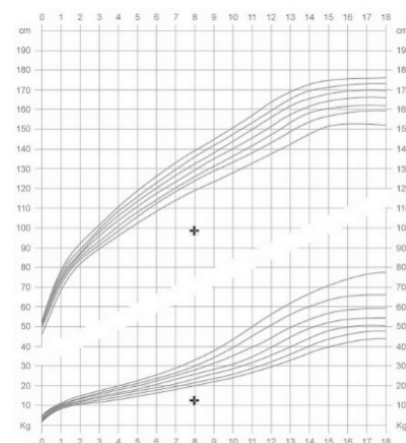


Abbildung 8: Perzentilenvergleich bei der Patientin. Größe (oben) und Gewicht (unten) der Patientin (Kreuze) im Vergleich zu normal wachsenden Kindern (Perzentilenkurven in grau dargestellt). Als Grundlage dient die Züricher Longitudinale Wachstumsstudie (Prader A et al, Helv, Paediatr. Acta 1989; Suppl52)

Größe	99 cm	<1. Perz.	SDS -6,72
Gewicht	12,30 kg	<1. Perz.	SDS -6,64
Kopfumfang	49,00 cm	<1. Perz	SDS -3,33
BMI	12,55 kg/m ²	1. Perz.	SDS -2,47
Wachstum	10,60 cm/Jahr	>99. Perz.	SDS 6,15

Neben dem Kleinwuchs zeigte die Patientin später einen multisystemischen Phänotyp mit globaler Entwicklungsverzögerung, dysmorphen Merkmalen wie einer Mittelgesichtshypoplasie, Verkrümmungen der Wirbelsäule (Hyperlordose), Gelenkanomalien, wie Knickplattfüßen (Pes planovalgus), sowie konduktivem Hörverlust und Hornhauttrübungen mit schwerer Sehbehinderung. Bei der Erstuntersuchung von Blut und Urin wurden mehrere dysregulierte Werte gefunden, diese sind in Tabelle 1 gelistet. Eine Übersicht über alle hierbei gemessenen Laborwerte findet sich in Tabelle 3 im Appendix.

In den allgemeinen Laboruntersuchungen konnte neben einem minimal erhöhten Natriumwert von 146 mmol/l (Referenzwerte 135 – 145 mmol/l), ein wenig erniedrigter Kaliumspiegel von 3,44 mmol/l (Referenzwerte 3,5 – 4,8 mmol/l) gemessen werden. Dies bestätigten die kapillären Blut-, sowie Blutgaswerte von Kalium (3,24 mmol/L, Referenzwert 3,6 – 4,8 mmol/L). Bei dieser Analyse zeigte sich außerdem Chlorid mit 109 mmol/L im Vergleich zur Referenz mit 95 – 105 mmol/L erhöht. Das Glykoprotein Fibrinogen war mit 1,02 g/l im Vergleich zu den Referenzwerten zwischen 1,7 – 4,5 g/l verringert.

Bei hämatologischen Untersuchungen zeigten sich mehrere Werte erniedrigt, darunter Erythrozyten (2,6 /pl, Referenz 4 – 5,2 /pl), Hämoglobin (8,0 g/dl, Referenz 11,5 – 15 g/dl), Haematokrit (0,220 l/l, Referenz 0,33 – 0,40 l/l), Thrombozyten (137 /nl, Referenz 180 – 530 /nl), Lymphozyten (10,0 %, Referenz 25 – 40 %) und eosinophile Granulozyten (0,4 %, Referenz 2 – 4 %). Einzig die neutrophilen Granulozyten waren sowohl in der mechanischen Messung (87,3 %, Referenz 50 – 80 %), als auch im Absolutwert (10,6 /nl, Referenz 1,8 – 7,7 /nl) deutlich erhöht. Auch in den kapillären Blut-, sowie Blutgaswerten war Hämoglobin reduziert (8,2 g/dl, Referenzwert 11,5 – 15 g/dl). Einige der übrigen Werte konnten durch das hämatologische Speziallabor bestätigt werden. Erythrozyten (3,18 /pl, Referenz 4 – 5,2 /pl), Haemoglobin (9,4 g/dl, Referenz 11,5 – 15 g/dl) und Haematokrit (0,290 l/l, Referenz 0,33 – 0,40 l/l) waren erneut erhöht, die eosinophilen Granulozyten erniedrigt (0 %, Referenz 2 – 4 %). Einzig die im hämatologischen Labor zu niedrigen Thrombozyten zeigten in den Analysen des Speziallabors den gegenteiligen Effekt und waren mit 613 /nl (Referenzwert 180 – 530 /nl) erhöht. Zusätzlich vielen die hier erstmalig untersuchten Retikulozyten mit einer Erhöhung auf 52,9 % (Referenzwert 5 – 15 %) auf.

Im endokrinologischen Labor war ausschließlich der T3-Wert mit 1,09 ng/ml zu niedrig (Referenzwert 1,18 – 2,14 ng/ml).

Die kapilläre Blut-, sowie Blutgaswerte zeigten außerdem eine Verringerung des pH-Wertes auf 7,28 bei Referenzwerten zwischen 7,37 – 7,45. Auch der Basenaustausch (Base Exchange) war mit -8,6 (BE/Std., Referenz -2 – +3 mmol/L) und -5,6 (BE/akt., Referenz -2 – +3 mmol/L) reduziert.

In der lysosomalen Diagnostik zeigten sich die Arylsulfatase A (33 %; Referenzwert 38 – 116 %), die β -Galactocerebrosidase (20 %; Referenzwert 38 - 246 %), die α -L-Iduronidase (36 %; Referenzwert 58 – 152 %) und die Arylsulfatase B (32 %; Referenzwert 56 – 187 %) erniedrigt.

Hoch auffällig war die in der Erstbestimmung aus Patientenplasma mit 1837 %, bei Referenzwerten zwischen 37 % und 226 %, stark erhöhte α -Mannosidase. Eine erneute Plasmauntersuchung bestätigte die erste Tendenz, bei gleichbleibenden Referenzwerten zeigte sich die α -Mannosidase auf 1781 % erhöht. Eine später durchgeführte α -Mannosidase Messung in den erhaltenen Patientenfibroblasten zeigte das in den Referenzwerten liegende Ergebnis von 54 %

Trotz der auffälligen Werte konnte die Krankheitsursache durch diese Analysen nicht aufgeklärt werden. Da die Patientin, kurz nach ihrer Entlassung aus unserer Klinik, mit ihren Eltern zurück in das gemeinsame Heimatland gereist ist, kann über den weiteren Verlauf der Erkrankung keine Aussagen gemacht werden.

Tabelle 1: Auffällige Laborwerte der Patientin.

Allgemeines Labor			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
Natrium (ISE)	146	↑	135 – 145 mmol/l
Kalium (ISE)	3,44	↓	3,5 – 4,8 mmol/l
Fib. (Clauss) Fibrinogen	1,02	↓	1,7 – 4,5 g/l
Hämatologisches Labor			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
Erythrozyten	2,6	↓	4 – 5,2 /pl
Hämoglobin	8,0	↓	11,5 – 15 g/dl
Haematokrit	0,220	↓	0,33 – 0,40 l/l
Thrombozyten	137	↓	180 – 530 /nl
Neutrophile Granulozyten (mech.)	87,3	↑	50 – 80 %
Lymphozyten (mech.)	10,0	↓	25 – 40 %
Eosinophile Granulozyten (mech.)	0,4	↓	2 – 4 %
Neutrophile Granulozyten (abs.)	10,6	↑	1,8 – 7,7 /nl
Hämatologisches Speziallabor			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
Erythrozyten	3,18	↓	4 – 5,2 /pl
Haemoglobin	9,4	↓	11,5 – 15 g/dl
Haematokrit	0,290	↓	0,33 – 0,40 l/l
Retikulozyten	52,9	↑	5 – 15 %o
Thrombozyten	613	↑	180 – 530 /nl
Eosinophile Granulozyten	0	↓	2 – 4 %
Endokrinologisches Labor			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
T3	1,09	↓	1,18 – 2,14 ng/ml
Kapilläre Blut-/Blutgaswerte			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
pH	7,28	↓	7,37 – 7,45
BE/Std.	-8,6	↓	-2 - +3 mmol/L
BE/akt.	-5,6	↓	-2 - +3 mmol/L
Kalium	3,24	↓	3,6 – 4,8 mmol/L
Chlorid	109	↑	95 - 105 mmol/L
Hämoglobin	8,2	↓	11,5 – 15 g/dl
Lysosomale Diagnostik			
Parameter	Wert		Normbereich/Dimension
α-Mannosidase	7,90	↑	0,16 – 0,97 mU/ml
% der Norm	1837	↑	37 – 226 %
Arylsulfatase A	88,8	↓	102,5 – 429,8 nmol/17h
% der Norm	33	↓	38 – 116 %
β-Galactocerebrosidase	6,22	↓	11,94 – 76,97 nmol/17h
% der Norm	20	↓	38 – 246 %
α-L-Iduronidase	0,52	↓	0,93 – 2,44 mU/mg
% der Norm	36	↓	58 – 152 %
Arylsulfatase B	0,18	↓	0,321 – 1,068 mU/mg
% der Norm	32	↓	56 – 187 %

C. Zielsetzung

Co- und posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Funktionalität, die Faltung sowie den Transport von Proteinen. Glykoproteine werden durch komplexe Prozesse im Zytosol, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat mit Zuckerstrukturen moduliert. Angeborene Defekte dieser Glykoproteinbiosynthese (engl. *Congenital Disorders of Glycosylation*" (CDG)) führen meist zu schweren, multisystemischen Erkrankungen. Obwohl bis heute über 140 CDG-Typen beschrieben wurden, sind die Defekte vieler Patienten nicht vollständig geklärt. Um CDG-Erkrankungen schneller zu erkennen und die genauen Erkrankungstypen besser diagnostizieren zu können, ist eine umfassende molekularbiologische Charakterisierung der ungeklärten CDG-Fälle sehr wichtig. Die Charakterisierung einer neuen CDG-Verdachtspatientin und die Aufklärung ihrer Pathophysiologie waren die Ziele dieser Arbeit.

Hierfür wurden biochemische und molekularbiologische Untersuchungen an Patientenseren und -fibroblasten durchgeführt. Das Versuchsspektrum umfasste neben den isoelektrischen Fokussierungen der Serumproteine Transferrin und Apolipoprotein-CIII auch die Überprüfungen der von Proteinen abgespaltenen *N*-Glykane mittels Massenspektrometrie sowie Mutations- und Aktivitätsanalysen, Lektin- und Antikörperbindestudien sowie Immunfluoreszenzuntersuchungen. Abschließend sollte die Funktionalität der entdeckten Mutation durch Komplementationsstudien mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystems überprüft werden.

D. Materialien und Methoden

1. MATERIALIEN

Patientenmaterialien

Die unter Anlehnung an die Erklärung von Helsinki durchgeführten Studien wurden vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät Heidelberg genehmigt. Die Erziehungsberechtigten der Patientin wurden über die Forschung unterrichtet, willigten in diese ein und stimmten einer möglicherweise daraus resultierenden Veröffentlichung der Daten zu.

Verbrauchsmaterialien

4-, 6-, 24-well Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Blotting Papier 330 g/cm ²	neoLab, Heidelberg
Deckgläser Stärke No. 1 rund 12 mm	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen T25, T75, T125	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschalen 60 mm, 100 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Glaskolben 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
IEF Electrode Strip	Amersham Biosciences, Freiburg
IEF/SDS applicator strip	Amersham Biosciences, Freiburg
Immersionsöl 518C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen Sterican (steril), 20G, 22G, 23G	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Microplatte, 96-Well, flacher Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulose Membran Hybond ECL	GE Healthcare, München
Objektträger mit Mattrand	LaborService Brenzinger, Walldorf
Parafilm	American National, Neenah, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
PCR Platten Schutzfolie Star Seal	Star Lab, Hamburg
PCR-Gefäße MultiPLY-Pro 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Phast Gel Casette	GE Healthcare, München
Phast Gel Dry Gel	GE Healthcare, München
Phast Gel Sample Applicator	GE Healthcare, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Petrischalen 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
Thermo Fast 96-well PCR Platten	Applied Biosystems
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman-Vertrieb, Göttingen

Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid /0,8 % Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin bovine Fraction V, pH 7,0	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, ACS, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid, entwässert, gepulvert, rein 95 %	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, getrocknet (max. 0,025 % H ₂ O)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat, Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol ≥ 99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt, ≥ 99,8 %, mit ca. 1 % MEK	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid - Lösung 1 %	Appllichem, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 4 %	Merck Darmstadt
Glycerin, wasserfrei, p.a.	neoLab, Heidelberg
Glycin, ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe
HEPES ≥ 99,5 %, BioScience-Grade	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, reinst, Lebensmittelqualität	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol, ≥ 99,9 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
MOPS Pufferan ≥ 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat, kristallin, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid ≥ 99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, reinst, DAC	Roth, Karlsruhe
Phosphoric acid, ACS reagent, ≥85 wt. % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PNGase F (500 U/vial)	Roche Diagnostics, Mannheim
Pyridin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyrophosphatase, Inorganic from baker's yeast	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend 37 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
TEMED, 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan/Chloroform, ≥ 99 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, ≥ 99,9 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Solution	Fluka, Buchs, Schweiz
Tween 20, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe
UltraPure Agarose	ThermoFisher, Waltham, USA

Kits, Standards, Enzyme mit dazugehörigen Puffern und Lösungen

Adenosintriphosphat (ATP)	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Amp.)	Calbiochem, Frankfurt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Loading Dye	Fermentas, St. Leon Rot
DNase I, RNase-free (1 U/μl)	ThermoFisher, Waltham, USA
dNTP Mix, 10 mM each	ThermoFisher, Waltham, USA
ECL Plus Western Blotting Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford
GeneRuler 1 kb/100 bp DNA Ladder	ThermoFisher, Waltham, USA
MgCl ₂ , 25 mM	ThermoFisher, Waltham, USA

NheI	5' - G*CTAGC - 3' (* Schnittstelle)	ThermoFisher, Waltham, USA
Omniscrypt RT Kit (50)		Qiagen, Hilden
PageRuler Prestained Protein Ladder		ThermoFisher, Waltham, USA
peqGOLD Gel Extraction Kit		Peqlab, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I		Peqlab, Erlangen
Protease Inhibitor Mix		Serva, Heidelberg
Protease Inhibitor complete Mini (10 x)		Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K		Roth, Karlsruhe
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit		ThermoFisher, Waltham, USA
RiboLock RNase Inhibitor		Fermentas, St. Leon Rot
RNase-Free DNase Set		Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit		Qiagen, Hilden
SensiFAST SYBR No-ROX mix (2x)		Bioline, London, UK
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate		ThermoFisher, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase		Fermentas, St. Leon Roth
Tango Puffer (für NheI und XbaI)		ThermoFisher, Waltham, USA
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)		Fermentas, St. Leon Rot
Taq Puffer (10x) mit Kaliumchlorid		Fermentas, St. Leon Rot
Ultrapur dNTP Set		Fermentas, St. Leon Roth
XbaI	5' - T*CTAGA - 3' (* Schnittstelle)	ThermoFisher, Waltham, USA

Standardpuffer und Lösungen

Ladepuffer DNA-Elektrophorese (6x)

40 % Saccharose (w/v)

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

Lysispuffer

50 mM EDTA

50 mM NaCl

100 mM SDS 0,5 % (w/v)

Tris/HCl pH 8,0

Mowiol

6,0 g Glycerin

2,4 g Mowiol 4-88

6,0 ml H₂O

0,2 M Tris/HCl pH 8,5

PBS-Puffer

8,0 g/l NaCl

11,5 g/l Na₂HPO₄

0,2 g/l KCl

0,2 g/l KH₂PO₄

Tris/HCl pH 7,4

PBST-Puffer

PBS-Puffer

+ 0,1 % Tween 20 (v/v)

Tris/HCl pH 7,4

PFA-Lösung

4 % Paraformaldehyd (w/v)

8,0 g/l NaCl

11,5 g/l Na₂HPO₄

0,2 g/l KCl

0,2 g/l KH₂PO₄

Tris/HCl pH 8,0

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10x)

151,1 g Tris

50 g SDS

720 g Glycin

SDS-PAGE Ladepuffer (6x)

12 % SDS (w/v)

45 % Glycerin (v/v)

12 % β-Mercaptoethanol (v/v)

0,06 % Bromphenolblau (w/v)

480 mM Tris/HCl pH 6,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

0,4 % SDS (w/v)

0,5 M Tris/HCl pH 8,8

SDS-PAGE Trenngelpuffer

0,4 % SDS (w/v)

1,5 M Tris/HCl pH 6,8

Semidry-Blot Anodenpuffer

- 20 % Methanol (v/v)
- 75 mM Tris/HCl pH 7,4

Semidry-Blot Kathodenpuffer

- 40 mM 2-Aminocapronsäure
- 20 % Methanol (v/v)
- 75 mM Tris/HCl pH 9,0

TAE-Puffer (50x)

- 2 M EDTA 100 mM
- Tris/Acetat pH 8,0

TBS (10x)

- 80 g/l NaCl
- 2 g/l KCl
- 30 g/l Tris/HCl pH 8,0

TBST-Puffer

TBS (1x)

- 0,1 % Tween 20 (v/v)
- Tris/HCl pH 7,4

Zellkulturmedium

- DMEM Glutamax
- 10 % FCS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 5 ml Fungizone
- 5 ml L-Glutamin

Zellkultur-Einfriermedium

- Zellkulturmedium
- + 10 % DMSO

Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und SeqLab-Microsynth GmbH (Göttingen) bezogen. Ihre Sequenzen sind im Appendix in Tabelle 4 gelistet.

Lektine und Streptavidin-Konjugate

Alle verwendeten Lektine waren biotinyliert und wurden, wie auch das Streptavidin-Konjugat, von der Firma Vector Laboratories (Burlingham, USA) bezogen. Die Lektine wurden 1:500 in TBST_{0,1%} verdünnt, Streptavidin 1:10.000.

Concanvalin A (ConA)

Maackia amurensis Leukoagglutinin I (MAL-I)

Ricinus communis Agglutinin I (RCA-I)

Weizenkeim Agglutinin (WGA)

Streptavidin-HRP

Antikörper

Primärantikörper (1:1.000 im Western Blot; 1:400 in Immunofluoreszenzen)

Kaninchen anti-Human Transferrin	BIOZOL Diagnostica, Eching, Deutschland
Ziege anti-Human Apolipoprotein C-III	BIOTREND Chemikalien, Köln, Deutschland
Kaninchen anti-Human GP130	ThermoFisher, Waltham, USA
Kaninchen anti-Human ICAM1	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Maus anti-Human LAMP2	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human β -Aktin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human VPS45	Proteintech, Manchester, UK
Kaninchen anti-Human COG4	Prof. Daniel Ungar
Kaninchen anti-Human COG7	Prof. Daniel Ungar
Kaninchen anti-Human COG8	Prof. Daniel Ungar
Kaninchen anti-Human GZF1	ProSci, Fort Collins, USA
Maus anti-Human GM130	BD Transduction Laboratories

Sekundärantikörper (1:10.000 im Western Blot; 1:700 in Immunofluoreszenzen)

Ziege anti-Kaninchen, HRP gekoppelt	Dianova, Hamburg, Deutschland
Kaninchen anti-Ziege, HRP gekoppelt	Alpha Diagnostic, Texas, USA
Ziege anti-Maus, HRP gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488	ThermoFisher, Waltham, USA
Ziege anti-Mause, Alexa Fluor 568	ThermoFisher, Waltham, USA

Vektoren

Die Vektorkarten sind in den Abbildungen Abbildung 27 und Abbildung 28 im Appendix einsehbar.

pCDNA3.1

Biocat, Heidelberg

pLNCX2

Takara, Mountain View, USA

Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden routinemäßig folgende Bakterienstämme eingesetzt Genotypbezeichnung: siehe Bachmann (1987):

E. coli XL1-Blue (Genotyp: F-::Tn10 proA+B+ lacI Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal) thi hsdR17 (rK-mK+) supE44 relA1 lac)

E. coli DH5- α (Genotyp: F- deoR recA1 endA1 hsdR1(rk-mk+) supE44 1-thi gyrA96 relA1)

Zelllinien

Bei den in vorliegender Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um primäre Fibroblasten. Diese wurden mittels steriler (Haut-)Biopsie gewonnen und für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Untersuchungen erfolgten an Patientenzelllinien, sowie an Zelllinien verschiedener Kontrollpersonen.

Medien und Platten (E. Coli)

(Sambrook 2001)

LB Medium: 1 % (w/v) Trypton/Pepton

1 % (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

LB-Amp.: 50 g/ml Ampicillin in LB

LB-Amp Platten: 1,5 % Agar in LB-Amp.

Medien und Lösungen für eukaryontische Zelllinien

Alle Puffer und Medien für die eukaryontische Zellkultur wurden von der Firma Gibco (ThermoFisher, Waltham, USA) bezogen.

DMEM (high glucose 4,5 g/l)

1x

DPBS

FCS/ FKS (Hitzeinaktiviert: 60 min, 56 °C)	10 %
Gentamycin (Neomycin / G418)	1 %
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ ml)	1 %
Fungizone Amphotericin B	1 %
Trypsin-EDTA 0.25 %	1x

Geräte

Autoklav VX-95	Systec, Linden
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Blottkammer PerfectBlue Semi-Dry SEDEC M	Peqlab, Erlangen
Brutschrank MCO-20A/C	Panasonic Biomedical, Kadoma, Japan
CO2 Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Loughborough, UK
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer (EtBr) Eigenbau	Universitätsklinikum, Heidelberg
Elektrophoresekammer (SDS) Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop DMI4000B	Leica Wetzlar
Gefrierschrank, diverse -20 °C	Liebherr Bulle, Schweiz
Gefrierschrank, diverse -80 °C	Liebherr Bulle, Schweiz
Kühlschrank, diverse 4 °C	Liebherr Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mastercycler GeneAmpPCR System 2700	Applied Biosystems, Waltham, USA
Mikrowellenherd R-233 (W)	Sharp, Osaka, Japan
Nanophotometer P 300	Implen, München
Netzgerät für die Elektrophorese EPS 601	Bioscience, Amersham, UK
Netzgerät für die Elektrophorese E835	Consort, Turnhout, Belgien
Phasenkontrastmikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Photometer Spectra max Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Pipetten	Eppendorf Hamburg
Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems, Waltham, USA
Miliporeanlage GenPure Pro UV-TOC/UF	ThermoFisher, Waltham, USA

Schüttelinkubator HTMR-133 HLC Haep	Labor Consult, Bovenden
Schüttelinkubator Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Klasse 2 SterilGard III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Spülmaschine G7883CD	Miele, Gütersloh
Tischzentrifuge Biofuge Pico	ThermoFisher, Waltham, USA
Ultraschall Sonifier 450 Konverter 102C; Becherresonator 101-147-047	Branson, Dietzenbach
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Brandelin, Berlin
UV-Handlampe VL-4.LC	Vilber, Eberhardzell
UV-Transilluminator CN-TFX	Vilber, Eberhardzell
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad 1092	GFL, Burgwedel
Waage PH204L Mettler	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Waage XP56	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Westernblot Dokumentation Fusion SL4	Peqlab, Erlangen
Wippe Rocky 1100	Labortechnik Fröbe, Lindau
Zellproliferation xCELLigence® RTCA DP	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Optima TLX120	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen,

Programme

Microsoft Office
ImageJ
ApE
SoftMaxPro
CFX Manager
Endnote

2. METHODEN

2.1 CDG-ROUTINEDIAGNOSTIK

Isoelektrische Fokussierung (IEF) von Serumproteinen

Die Serumproteine Transferrin und Apolipoprotein-CIII (Apo C-III) zählen zu den Markerproteinen der CDG Diagnostik. Bei der Analyse dieser Proteine werden Kontroll- und Patientenserum auf Gele aufgetragen, unter Spannung werden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt und anschließend mittels Antikörper- und Silberfärbung detektiert. Hierbei wird nach den Protokollen von Niehues und Wopereis vorgegangen (Niehues et al. 1998, Wopereis et al. 2003).

Immunopräzipitation

Um Transferrin aus dem Gesamtserum zu isolieren wurde eine Immunopräzipitation mittels magnetischen Beads durchgeführt. Das Serum wurde dafür in TBS-Puffer aufgenommen und mit 1 µg Anti-Transferrin Antikörper für 2 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Währenddessen wurden die magnetischen Beads vom Überstand des Lagerungspuffers getrennt. Dazu wurde das 1,5 ml Gefäß im Magnetischen-Ständer platziert und der Puffer vorsichtig abgenommen. Es wurde 3x mit TBS gewaschen, die Beads in 30 µl 1xTBS aufgenommen und zu der Probe gegeben. Bei 4 °C wurden Proben und Beads über Nacht auf dem Drehrad inkubieren. Durch erneutes separieren mittels des Magneten konnte der Überstand abgenommen und das an die Beads gekoppelte Transferrin 3x mit TBS gewaschen werden. Um die Bindung zu lösen wurden die Beads mit Elutionspuffer gespült.

Analysen der Serum N-Glykane mittels Massenspektrometrie

Die Aufarbeitung und Analyse der Serum N-Glykane, sowie der mittels Immunopräzipitation aus Serum isolierten Transferrin N-Glykane fand in Kooperation mit Gernot Poschet (COS, Heidelberg) statt. Zur Abspaltung der N-Glykane von den Proteinen/ von Transferrin wurde PNGase verwendet. Anschließend konnten die gekennzeichneten, aufgereinigten und enzymatisch verarbeiteten N-Glykane mittels Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt und letztlich im LC-MS (Flüssigchromatograph mit Massenspektrometrie-Kopplung) analysiert werden. Das genaue Protokoll ist in Imle et al., 2019 einzusehen (Imle et al. 2019).

2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN ZUM ARBEITEN MIT EUKARYONTISCHEN KULTUREN

Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Alle adhärennten Patienten- und Kontroll-Fibroblastenzelllinien wurden, soweit nicht anders beschrieben, in DMEM-High Glucose (4.5 g/l) Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung und 1 % des Antimykotikums Amphotericin B bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Trypsinieren und Zellernte

Bei einer Zelldichte von etwa 80 % wurden die Fibroblasten durch abschaben geerntet und für weitere Analysen verwendet oder trypsiniert und im passenden Verhältnis passagiert. Die Zellen wurden zuerst einmal mit PBS gewaschen. Zum Abschaben wurde erneut 5 ml PBS zugegeben und die Zellen mittels eines Spachtels mechanisch abgelöst. Für anschließende Analysen wurden die Zellen 5 min bei 1200 rpm pelletiert, und bei -80 °C gelagert.

Die Behandlung mit 0,25 %-igem Trypsin-EDTA fand für 5 min bei 37 °C statt. Die abgelösten Fibroblasten wurden in DMEM-High Glucose (4,5 g/l) Medium aufgenommen und somit die Ablöse-Reaktion gestoppt. Anschließend konnte vorsichtig selektiert und in neue Kulturflaschen passagiert werden.

Kryokonservieren von Zellen

Zur Konservierung wurden die Zellen, wie in 0 beschrieben, mit Trypsin geerntet und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO im Zellkulturmedium) aufgenommen und in Kryoröhrchen für 2 h bei -20 °C eingefroren. Anschließend konnten die Zellen bei -80 °C, oder für längere Zeiten in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Die im Stickstofftank gelagerten Zellen konnten jederzeit revitalisiert werden. Dafür wurde jeweiliges Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, kurz erwärmt und geöffnet. Nach diesem Druckausgleich konnten sie in 70 %-igem Ethanol bei Raumtemperatur auftauen. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1 ml DMEM-Medium aufgenommen und in eine vorbereitete Zellkulturflasche gegeben

Untersuchungen zum Zellwachstum und der Proliferation

xCELLigence® RTCA DP Protokoll

Die Zellproliferation von Kontroll- und Patientenfibroblasten wurde unter Verwendung des XCelligence (ACEA Biosciences), sowie dem dazugehörigen Protokoll analysiert. Pro Well der CIM-Platte wurden 1000 Zellen ausgesät und über die Zelldichte über 120 Stunden alle 20 min computerbasiert analysiert. Die Standardbedingungen der Zellkultur blieben dabei erhalten (DMEM-High Glucose (4.5 g/l) Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung und 1 % Amphotericin B bei 37 °C und 5 % CO₂). Anhand der Steigungsgeraden während der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen konnte die Proliferation quantifiziert werden.

Bestimmung der Proteinlokalisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

Um Proteine in Fibroblasten nachzuweisen und in einzelnen Zellorganellen zu lokalisieren wurden spezifische, immunomarkierte Antikörper eingesetzt. Zur besseren Übersicht und zur Verringerung der benötigten Volumina wurde der Versuch in 24-well Zellkulturplatten durchgeführt. 20000 Fibroblasten wurden darin 24 – 48 h vor Versuchsbeginn in Standardmedium auf Deckgläschen ausgesät. Am Tag der Färbung fanden alle Schritte, soweit nicht anders beschrieben, bei RT statt. Alle verwendeten Lösungen wurden in PBS Puffer angesetzt. Die Zellen wurden zuerst 3x mit PBS gewaschen und 20 min mit 4 % PFA Lösung fixiert. Zur Permeabilisation der Zellen wurden sie anschließend für 10 min mit 0,5 % Triton behandelt und 1 h mit 5 % BSA geblockt. Dies soll unspezifischen Antikörperbindungen vorbeugen. Nach einer einstündigen Inkubation im Erstantikörper-Mix bei 37 °C (1:200 verdünnt und 1 % BSA) und dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Sekundärantikörper. Diese wurden 1:700 verdünnt und für 30 min bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Nach erneutem waschen, je 3x 5 min mit PBS und H₂O, konnte der Zellkern durch 5-minütige Inkubation mit Bisbenzimid (1:2.000 in H₂O) gefärbt werden. Mit 5 µl Mowiol konnten die Deckgläschen auf Objektträgern eingebettet werden. Nach einer Trocknungsphase von mindestens 16 h war es möglich die gefärbten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren.

2.3 METHODEN ZUR ARBEIT MIT RETROVIREN

Übertragung von Nukleinsäuren

Zur Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen/Organismen können unterschiedliche Methoden verwendet werden. Mit am häufigsten wird die Transformation verwendet. Hierbei wird freie DNA aufgenommen und dadurch genetische Informationen weitergegeben. Ein Beispiel ist die Aufnahme von Plasmiden durch Hitzeschockbehandlung bei *E. coli*.

Um Zellen mit freier DNA oder RNA zu infizieren wird die Transfektion verwendet. Eine Übertragung durch Viren oder virale Partikel, auch Infektion genannt, endet normalerweise mit der Integration der übertragenen Informationen ins Wirtsgenom.

Der retrovirale Vektor pLNCX2

Zur Herstellung stabiler, exprimierender Zelllinien durch Transfektionen oder Infektionen wurde der retrovirale Vektor pLNCX2 der Firma Takara (Mountain View, USA) verwendet (Vektorkarte Abbildung 28). Neben dem zu exprimierenden Inserts (dem Gene of Interest) enthält der Vektor eine Ampicilin Resistenz (zur Anzucht und Selektion in Bakterien) und eine Neomycin-Resistenz (zur Selektion in Eukaryontischen Zellkulturen).

Transfektion - Herstellung exprimierender Zelllinien

(Roche, Mannheim; FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz Handbuch)

Um beispielsweise Patientenzellen mit gesunder DNA zu „infizieren“/retten müssen die durch Transformation vervielfältigten Nukleinsäuren in Form von Plasmiden zuerst in eine sogenannte Verpackungszelllinie transfektiert werden.

Für die Transfektion wurden adhärenenten Zellen ca. 24 h vor Versuchsbeginn auf geeigneten Anzuchtgefäßen (6-Well-Platten, 6 oder 10 cm-Zellkulturplatten) ausgesät. Der weitere Versuch wurde anschließend nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem die Zellen angewachsen waren wurden 3 Teile FuGENE[®]6 Transfektionsreagenz mit 94 Teilen serumfreiem DMEM vermischt und für 5 Min bei RT inkubiert. Dann wurde der DMEM- FuGENE[®]6-Mix zu 1-4 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (0,2 – 2 µg/ µl) gegeben, vermischt und für 20–30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde die gesamte Lösung tröpfchenweise in das, ebenfalls serumfreie, Wachstumsmedium der Zellen gegeben. Bei einer Transfektion

in HEK-293 Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen) folgte eine 10-tägigen Selektion mit geeigneten Selektionsantibiotika (hier 1 % Neomycin mit 50 mg/ml). Wurde das Konstrukt in die Verpackungszelllinie Fnx_{Eco} eingebracht konnte sofort, ohne Selektion, mit der Produktion eines viralen Überstandes begonnen werden.

Produktion retroviraler Partikel und Infektion der Verpackungszelllinie pT67

(Nolan Lab Homepage, Stanford University, USA)

Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 – 48 h unter Normalbedingungen kultiviert bevor mit der Produktion des Viralen Überstandes begonnen werden konnte. Um die Halbwertszeit der retroviralen Partikel zu verlängern und so den Virustiter im Medium deutlich zu erhöhen wurde die Verpackungszelllinie Fnx_{Eco} in speziellem Virusmedium (DMEM mit 10% FKS, 100 U/ml Pen/Strep und 2 mM L-Glutamin) für 16 - 24 h bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Medien-Überstand konnte nach dieser Zeit abgenommen und durch einen 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter sterilfiltriert werden. So konnten die gelösten, ecotropen Viruspartikel von abgestorbene Verpackungszellen gereinigt werden. Um die ladungsbedingte Abstoßung zwischen Zellmembranen und den Viruspartikeln zu reduzieren wurden der Lösung zusätzlich 6 µg Polybrene zugefügt. Da eine direkte Infektion primärer Fibroblasten mit diesem Überstand noch nicht möglich war, wurde zuerst die Verpackungszelllinie pT67 komplementiert. Hierfür wurde der vorbereitete FnxEco Überstand zu den 24 h zuvor ausgesäten pT67 Zellen gegeben und unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert. Der gesamte Vorgang wurde 2-3 x wiederholt und anschließend eine 10-tägige Neomycin-Selektion der pT67-Zellen angeschlossen.

Infektion primärer, humaner Fibroblasten

Zur Infektion primärer, humaner Fibroblasten wurde wie bereits zuvor mit den Zelllinien Fnx_{Eco} und pT67 vorgegangen. Der durch die pT67 Zellen produzierte Virale Überstand konnte nach der Filtration und der Zugabe von Polybrenen auf Kontroll und Patientenfibroblasten gegeben und 24 h inkubiert werden. Nachdem auch diese Prozedur 3-4 mal wiederholt wurde schloss eine 10-tägige Neomycin-Selektion der Fibroblasten an. Die stabilen Zelllinien wurden abschließend kryokonserviert und/oder für Folgeversuche pelletiert.

2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

Proteinpräparation aus Fibroblastenzellen

Zur Gewinnung von Proteinen aus Fibroblasten wurden die Zellpellets in je 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen und aufgeschlossen. Dies geschah zuerst thermisch durch erneutes Einfrieren bei -80 °C für 30 min. Anschließend mechanisch durch fünfmaliges Aufziehen in eine G20 Kanüle. Nachdem bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert wurde, konnte der Überstand abgenommen und z.B. für eine Proteinbestimmung nach Lowry und SDS-Gele, weiterverwendet werden. Bis dahin erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die quantitative Bestimmung, der aus Fibroblasten gewonnenen Proteine erfolgte mittels des DC Protein Assay Kits (BioRad) nach Lowry (Lowry et al. 1951). Als Referenz diente eine BSA-Standardkurve mit acht unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von 0,0 bis 2,0 mg/ml in RIPA-Puffer. Die Proteinbestimmung, sowohl der BSA-Standards, als auch der Proben in geeigneter Verdünnung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf einem Rüttler konnte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt werden. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der doppelt bestimmten Proben anhand der BSA-Standardkurve ermittelt.

SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurden 7,5 bis 12,5 %ige SDS-Polyacrylamid Gele verwendet und nach Laemmli vorgegangen (Laemmli 1970). Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol im Laufpuffer und dem anschließenden Erhitzen der Proben für 5 min auf 95 °C. Die SDS-Anlagerung gewährleistete dabei auch eine negative Ladung der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht, welche die Auftrennung im elektrischen Feld ermöglichte.

Für die benötigten Gele wurden ca. 5,6 mm hohe Trenngele mit Sammelgelen überschichtet. Diese wurden, vollständig auspolymerisiert, in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, die Kammer mit Laufpuffer befüllt und die Taschen mit

ausgespült. Das aufgetragene Probenvolumen belief sich auf 25 µl. Im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V, im Trenngel bei 150 V.

SDS-Mini-Trenngel – 10 %	SDS-Mini-Sammelgel
2,01 ml Rotiphorese Gel 30	338 µl Rotiphorese Gel 30
1,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 / 0,4 % SDS	338 µl 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 / 0,4 % SDS
60 µl 10 % APS in H ₂ O	30 µl 10 % APS in H ₂ O
6 µl TEMED	3 µl TEMED
2.48 ml H ₂ O	1,5 ml H ₂ O

Western-Blotting

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Antikörpern zu detektieren folgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Hierfür wurde ein Semi-Dry Western-Blot durchgeführt, bei dem SDS-Gel (auf Seite der Anode) und Membran (auf Seite der Kathode) zusammen mit Whatman-Papieren gestapelt werden. Bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² dauerte der Transfer 55 min.

Proteindetektion mittels Chemilumineszenz

Die Detektion der aufgetrennten, immobilisierten Proteine erfolgte über Lektine oder Antikörper. Nach dem Blocken der Membran für eine Stunde bei RT auf einem Wipptisch wurde unter identischen Bedingungen gewaschen und inkubiert. Dabei musste auf die späteren Detektionsprinzipien geachtet werden, bei biotinylierten Lektinen wurde TBST_{0,1%} als Waschpuffer und TBST_{0,5%} zum blocken verwendet, bei primären Antikörpern dagegen PBST_{0,1%} und 0,5% Milchpulver in PBST_{0,1%}.

Nach drei fünfminütigen Waschsritten wurden in TBST_{0,1%} verdünnte Lektine (1:2.000) oder in PBST_{0,1%} verdünnte primär-Antikörper (1:1.000) zugegeben. Die Inkubation erfolgte entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgten drei weitere Waschsritte und die Inkubation mit Streptavidin-HRP oder HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 45 min bei RT. Erneut wurde die Membran dreimal 15 min gewaschen und Abschließend wurde nach Herstellerangaben für 5 min mit ECL Plus Western Blotting Substrat (Pierce Biotechnology, Rockford) entwickelt. Die Dokumentation der Blots erfolgte über das Fusion-System der Firma peqlab. Als Ladekontrolle diente β-Aktin, welches in einer Verdünnung 1:10.000 vor Lektinen oder nach primär-Antikörpern angewendet wurde.

2.5 METHODEN ZU MOLEKULARBIOLOGISCHEN ARBEITEN

Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA konnte aus Fibroblastenpellets gewonnen werden. Hierfür wurden die Proben mit 500 µl Lysepuffer und 50 µl 10 mg/ml Proteinase K versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C und 850 rpm inkubiert. Um grobe Verunreinigungen, z.B. durch Zelltrümmer, zu entfernen folgte ein Zentrifugationsschritt, zur Aufreinigung anschließend eine Alkoholpräzipitation mit 500 µl 100 % EtOH.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Fibroblasten

(RNeasy® Kit Mini Handbook)

Patienten- und Kontrollfibroblasten wurden pelletiert und zur Isolierung von gesamt-RNA verwendet. Die Präparation wurde mittels RNeasy Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt, die RNA in je 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80 °C.

Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Spektrophotometrie

Für wässrige DNA- oder RNA-Lösungen wurde die Nukleinsäure-Konzentration anhand der Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt. Das Verhältnis der optischen Dichten (OD) bei 260 nm zu 280 nm zeigte dabei den Verunreinigungsgrad mit Proteinen. Eine geringe Verunreinigung wird durch Werte zwischen 1,8 und 2,0 angezeigt (Sambrook 2001).

Reverse Transkription

(Omniscript® Reverse Transcription Handbook)

Aus der isolierten Gesamt-RNA konnte mit dem Enzym Reverse Transkriptase cDNA synthetisiert werden. Hierfür wurde das Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet. In Gesamtansätzen von 20 µl erfolgte die reverse Transkription für eine Stunde bei 37 °C. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

100-1000 ng	gesamt-RNA
400 nM	antisense 7(3')-Primer
je 0,4 mM	dNTP's
10 U	RNase Inhibitor

1x	RT-Puffer
4 U	Omniscript Reverse Transkriptase
X µl	RNase freies H ₂ O

Primer-Design

(Qiagen Handbuch: HotStar-Taq-PCR)

Die Eigenschaften von Primern sind entscheidend für den Erfolg der Polymerasen Kettenreaktion (PCR). Beim Erstellen der Primerpaare gilt es daher einige Grundregeln einzuhalten:

- Länge der Primer (17 – 27 Basen)
- Dimerisierungen vermeiden
- G/C Gehalt 40-60 %
- Termini aus einem oder zwei G oder C
- Schmelztemperatur T_m des Paares möglichst identisch

Die Schmelztemperatur (T_m) lässt sich mit folgender, vereinfachter Formel schätzen:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (G+C)$$

Dabei stehen G, C, A und T für die Anzahl der jeweiligen Base im Primer. Aus T_m lässt sich die Annealingtemperatur ableiten, diese sollte 5-10 °C unter T_m liegen und die Synthesetemperatur der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase (meist 68 - 72 °C) nicht überschreiten.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; engl. Polymerase Chain Reaction)

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

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche exponentiell amplifiziert werden können. Über mehrere Zyklen hinweg werden die entstehenden Produkte als Ausgangsstoff für die folgende Reaktion genutzt. Jeder Zyklus basiert dabei auf drei, für die DNA Synthese notwendigen, Schritten:

- 1) Hitze-Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- 2) Bindung (Annealing) von spezifischen oligonukleotid-Primern an die Einzelstränge
- 3) Von den gebundenen Primern ausgehende Synthese der DNA durch die Polymerase (Extension/Elongation)

Die Synthese der DNA kann dabei von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, beispielsweise durch die Auswahl und Konzentration der Primer, die Qualität und Menge des Templates, die Pufferbedingungen, sowie die Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen, die Reaktionen erfolgten dabei in einem Gesamtvolumen von 20 oder 50 µl.

Beispiel eines Reaktionsansatzes		Beispiel eines PCR Programms	
100 ng	cDNA	94 °C	5 Minuten
1x	Reaktionspuffer	94 °C	30 Sekunden
250 nM	sense(5')-Primer	55 °C	30 Sekunden
250 nM	antisense(3')-Primer	72 °C	3 Minuten
1 U	Polymerase	72 °C	7 Minuten
0,2 mM	dNTP's	4 °C	∞
1,5 mM	MgCl ₂		
x µl	H ₂ O		

Agarose Gelelektrophorese - Auftrennung von DNA-Fragmenten

1 %ige Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer wurden zur Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld verwendet. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele zuvor mit 10 µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Das TAE-Agarosegel wurde mit den DNA-Proben, versetzt mit 6x Ladepuffer, beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte im entsprechenden Puffer bei 90 V für 30 min, anschließend bei 130 V für ca. 60 min. Als Längenstandard wurde die GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter (Fermentas) verwendet. Anschließend konnte das mit den Nukleotiden interkalierende Ethidiumbromid bei 354 nm angeregt und mit dem Gel-Dokumentations-System detektiert werden. (Epi Chemie II Darkroom, UVP laboratory product). Falls nötig konnte die gewünschte Bande eines DNA-Fragmentes aus präparativen Gelen mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten werden.

Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen wurden zuerst die benötigten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN). Die gereinigte DNA konnte abschließend in 50 µl H₂O eluiert werden.

DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente/ Plasmide an die Firma SeqLab-Microsynth GmbH (Göttingen, DE) gegeben und mit der Sanger Cycle Sequencing/ Capillary Electrophoresis Methode sequenziert. Im Anschluss wurden die Sequenzen als Chromatogramm, sowie als FASTA-Dateien zum Download bereitgestellt.

Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden entweder zu 1 μM zum Sequenzierungsansatz zugegeben oder über SeqLab bestellt. Die Proben wurden in Gesamtansätzen von 15 μl mit je 900 ng DNA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verschickt.

Die Sequenzierung des gesamten Exoms (engl. „Whole Exome Sequenzierung“ / WES) wurde in Kooperation mit Uwe Kornak von der Charité Berlin durchgeführt.

Ligation

(T4 DNA Ligase ThermoFisher, Waltham, USA)

Zur Ligation eines Inserts (hier: ausgeschnitten aus dem pcDNA3.1 Vektor der Firma Biocat, Heidelberg) in einen linearisierten Vektor (hier: pLNCX2 der Firma Takara, Mountain View, USA) wurde die T4 DNA Ligase (ThermoFisher, Waltham, USA) verwendet und nach dem beiliegenden Protokoll vorgegangen und ein 1:3 Verhältnis von Vektor zu Insert gewählt:

50 ng	Vektor DNA (~6 kb)
50 ng	Insert DNA (~2 kb)
1x	Reaktionspuffer
1 U	T4 DNA Ligase
X μl	H_2O

Der Reaktionsmix wurde in 20 μl Angesetzt und bei 8 °C über Nacht inkubiert.

Transformation in kompetente Bakterien

Bei Arbeiten zur Vervielfältigung von Plasmiden in *E. coli* DH5- α oder XL1-blue Kulturen wurden nach Standardmethoden des Hitzeschocks vorgegangen. Die Anzucht fand bei 37 °C in LB Medium statt, für Selektionen wurde dem Medium 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicilin zugegeben. Zur Durchführung einer blau weiß Selektion wurden Famp (IPTG) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) auf den LB-Agar-Platten ausgebracht.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels zweier Kits, dabei wurde nach den dort beigefügten Protokollen gearbeitet. Die „Miniprep“ wurde mit 2 ml der angesetzten Flüssigkulturen durchgeführt, das Produkt, nach einigen Waschschritten in 50 µl H₂O eluiert.

Für die „Midiprep“ wurden 100 µl der Vorkultur in 50 ml Selektionsmedium (LB-Medium mit Ampicillin) überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, hier wurde nach Anleitung vorgegangen, das Eluierte Produkt durch eine Ethanolfällung aufgereinigt und letztlich in 200 µl H₂O aufgenommen. In beiden Fällen wurde die aufgereinigte DNA bei -20 °C gelagert.

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um beispielsweise die Insertion von Sequenzen in einem Vektor, oder Mutationen in ebendiese Sequenzen zu überprüfen können DNA Spaltungen an spezifischen Stellen durchgeführt werden. Die Enzyme die hierfür verwendet werden nennt man Restriktionsendonukleasen, deren Aktivität in Units (U) angegeben wird. Eine Unit entspricht dabei der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Die mitgelieferten Reaktionspuffer sorgen dabei für optimale Bedingungen. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt verwendet:

Ca. 1 µg	(Plasmid) DNA
1x	Reaktionspuffer
0,2-1 U	Restriktionsendonuklease
X µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde 1 h bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert und anschließend im Agarosegel analysiert.

Quantitative echtzeit PCR (engl. quantitative real time PCR / qRT-PCR)

(SensiFAST SYBR No ROX Kit, Biorline)

Durch die Normierung der Zielgen-Expression (hier: *GZF1*) im Verhältnis zur Expression eines Referenzgenes (hier: *RAB7A*) lässt sich das Expressionslevel von Genen anhand der mRNA-Menge relativ quantifizieren ($\Delta\Delta C_t$ -Methode). Hierfür wird der Fold-change wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}) \text{ Probe} - (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}) \text{ Kontrolle}$$

und

$$\text{Fold-change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

wobei der C_t - (engl. „cycle threshold-“) Wert die Anzahl der Zyklen beschreibt, die benötigt werden damit das gemessene Fluoreszenz-Signal stärker als das Hintergrundsignal ist.

Zur spezifischen Amplifikation der Gene wurden Primer entworfen, die 100- 250 Basen überspannen. Um mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschließen sollten die Primer möglichst auf zwei Exons verteilt sein oder über die Schnittstelle zweier Exons verlaufen. Die verwendeten Primer sind im Appendix in Tabelle 4 aufgeführt. Die Reaktion wurde in 10 μ l Ansätzen, im „Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ nach Methodik einer Standard PCR und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsansatz		Das 2-Step qRT-PCR Programm	
5,0 μ l	2x SensiFAST		
1,0 μ l	cDNA (50 ng)	95 °C	2 Minuten
0,4 μ M	F-Primer (10 pmol)	95 °C	5 Sekunden
0,4 μ M	R-Primer (10 pmol)	60 °C	15 Sekunden
ad 10,0 μ l	H ₂ O		x40

Statistik

Für jedes Ergebnis wurde ein Mittelwert aus mindestens drei Replikaten erhoben ($n \geq 3$). Die errechneten Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken aufgezeigt. Die eingetragenen signifikanten p-Werte wurden durch einen vergleichenden Students T-Test (Microsoft Excel) ermittelt und durch Sterne (*) angezeigt. Die Anzahl der Sterne beschreibt hierbei die Signifikanz, es entsprechen * $p \leq 0,05$ (signifikant); ** $p \leq 0,005$ (hoch signifikant) und *** $p \leq 0,001$ (höchst signifikant). Nicht signifikante Unterschiede entsprechen $p > 0,05$ (nicht signifikant) und wurden nicht angezeigt.

E. Ergebnisse

1. IDENTIFIZIERUNG EINES KOMBINIERTEN *N*- UND *O*-GLYKOSYLIERUNGSDEFEKTS

Bedingt durch den zugrundeliegenden, schweren multisystemischen Phänotyp unserer Patientin wurde auf unterschiedliche Stoffwechselstörungen getestet. Die Patientenproben durchliefen dabei auch die Routinediagnostik auf Glykosylierungsstörungen.

1.1 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG DES SERUMPROTEINS TRANSFERRIN

Die initiale Testung auf einen *N*-Glykosylierungsdefekt erfolgte routinemäßig anhand der IEF des Serumproteins Transferrin. Durch seine zwei *N*-Glykane des komplexen Typs, mit je zwei endständigen Sialinsäuren, ist die Hauptbande des Transferrins die sogenannte Tetrasialo-Bande. Mit absteigender Anzahl an endständigen Sialinsäuren folgen die Trisialo-, Disialo-, Monosialo- und Asialobande mit drei, zwei und einer, bzw. keiner Sialinsäure (Abbildung 9A). Bei Patienten mit Defekten der *N*-Glykosylierung ist das Verhältnis der einzelnen Banden zur Tetrasialobande gestört. CDG Typ-I Defekte äußern sich durch stark erhöhte Di- und Asialobanden, bei CDG Typ-II Defekten ist meist der Wert der Tetrasialobande erniedrigt, sowie die Werte aller verkürzten Strukturen erhöht. Der Vergleich von Kontrollseren und Seren bekannter CDG-I und CDG-II Patienten mit einer Probe unserer Patientin im Alter von acht Jahren wies das charakteristische Bandenmuster eines Typ-II CDG-Defekts auf (Abbildung 9B). Im Vergleich zu einer gesunden Normalkontrolle zeigte die Patientin bei der vollständig glykosylierten Form des Tetrasialotransferrins mit 41,1 % (Referenzwerte zwischen 30 % - 55 %) zwar keine Verminderung, allerdings waren sowohl die Werte der Trisialo- (37,8 %, Referenzwerte zwischen 4 % - 17,5 %) als auch der Disialobande (18,0 %, Referenzwerte zwischen 5 % - 13,5 %) deutlich erhöht. Dagegen befanden sich Monosialo- (2,0 % Referenzwerte zwischen 0 % - 3 %) und Asialotransferrin (1,1 %, Referenzwerte zwischen 0 % - 2 %) im oberen Bereich der Referenzwerte. Die Diagnostik des Serumproteins Transferrin wies auf einen Typ-II CDG Defekt der Protein *N*-Glykosylierung hin.

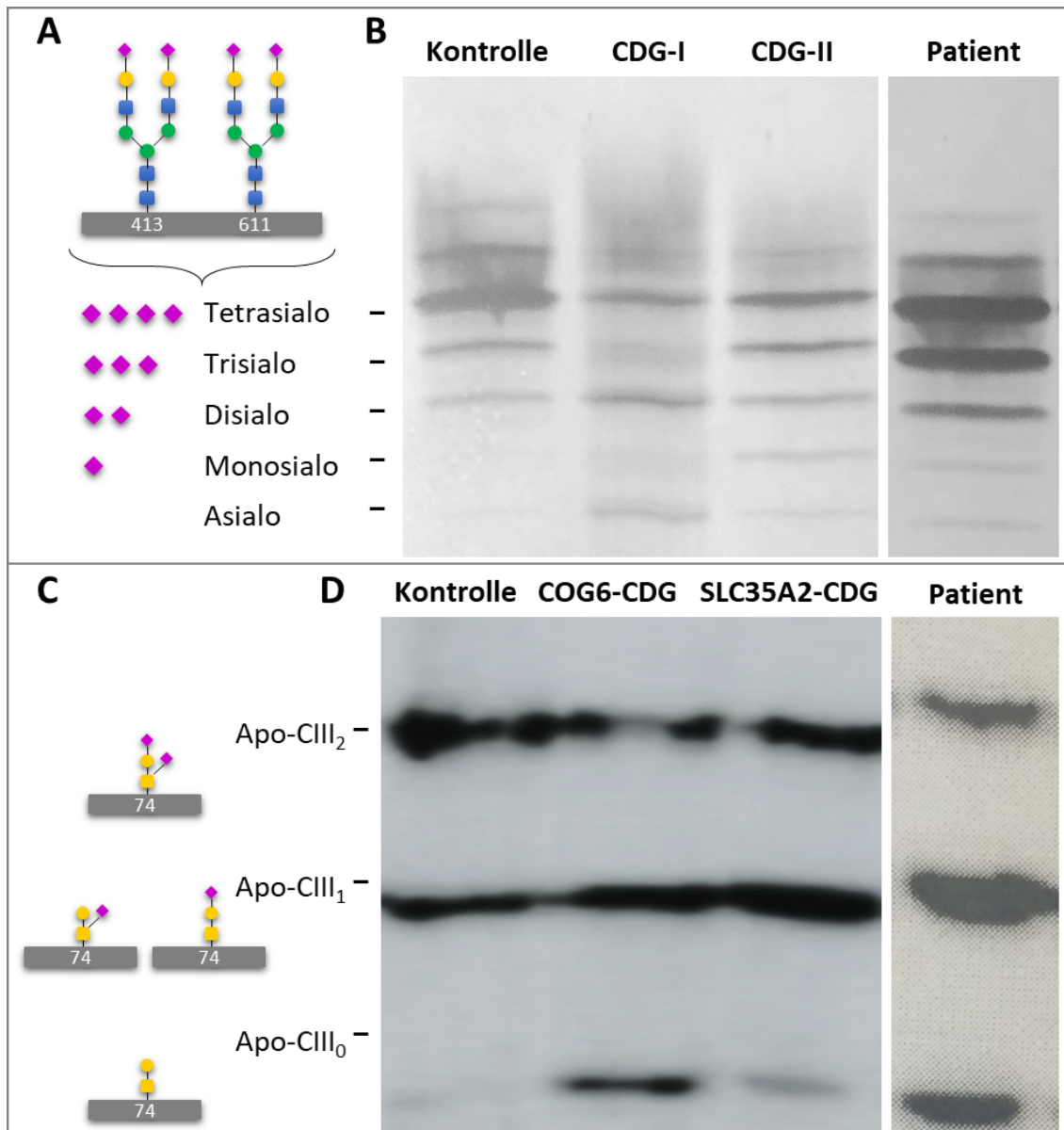


Abbildung 9: Isoelektrische Fokussierung der CDG Markerproteine – (A) Schematische Darstellung der N-Glykosylierung des Transferrins. Die Asparaginreste an den Positionen 413 und 611 sind mit biantennären N-Glykanen des komplexen Typs (mit vier N-Acetylglucosaminresten ■, drei Mannoseresten ● und zwei Galactoseresten ●) verknüpft. Diese tragen Terminal zwei negativ geladene Sialinsäurereste ◆ (nach MacGillivray et al. 1983 und Niehues et al. 1998). Der Verlust einzelner Sialinsäurereste, mehrerer Monosaccharide oder ganzer Glykane führt, aufgrund von Ladungsveränderungen, zur Verschiebung der Proteinbande. (B) Auffällige IEF des Transferrins im Patientenserum. Neben Serum einer gesunden Kontrollperson wurden Proben von Patienten mit bekanntem CDG Typ-I und Typ-II Defekt, sowie Serum unserer Patientin aufgetragen. Das Muster zeigt einen Typ-II Defekt in der Patientenprobe. (C) Schema des O-Glykans am Apolipoprotein C-III. Das Apo-CIII besitzt ein O-Glykan des Mucin-Typs (bestehend aus einem N-Acetylgalactosaminrest ■ und einem Galactoserest ●). Dieses ist an das Threonin an Position 74 gebunden. Die Diagnostik erfolgte durch zwei negativ geladene Sialinsäurereste ◆ (nach Wopereis et al. 2003 und Lefeber et al. 2011). (D) Auffälligkeiten in der Glykosylierung des Apo-CIII unserer Patientin. Eine Serumprobe wurde, neben Kontrollserum einer gesunden Person, eines kombinierten N- und O-Glykosylierungsdefekts (COG6-CDG) und eines N-Glykosylierungsdefekts (SLC35A2-CDG) aufgetragen und die unterschiedlichen Laufmuster miteinander verglichen. Die Apo-CIII₀ Bande im Patientenserum weist auf einen kombinierten Defekt der N- und O-Glykosylierung hin.

1.2 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG DES APOLIPOPROTEIN C-III SERUMPROTEINS

Das Serumprotein Apolipoprotein C-III (Apo-CIII) besitzt drei O-Glykane des Core-1-Mucintyps, mit vier verschiedenen Isoformen. Diese tragen entweder zwei Sialinsäurereste in 2,3 und 2,6 Orientierung (Apo-CIII₂), einen Sialinsäurerest in 2,3 oder 2,6 Orientierung (Apo-CIII₁) oder keine Sialinsäurereste (Apo-CIII₀) (Abbildung 9C). In Kontrollseren liegt Apo-CIII₂ als Hauptform vor, Apo-CIII₁ zeigt allerdings nahezu vergleichbar hohe Werte. Im Gegensatz hierzu liegt Apo-CIII₀ in minimalen Mengen vor. Bei Patienten mit Defekten der O-Glykosylierung zeigt sich Apo-CIII₁ als Hauptform mit verringerten Mengen an Apo-CIII₂ und erhöhten an Apo-CIII₀. Im Vergleich zu Kontrollseren und Seren von CDG Patienten ohne Defekt in der O-Glykan Biosynthese zeigte sich bei der Patientin ein erhöhter Apo-CIII₁ (43,6 %, Referenzwerte zwischen 33,1 % - 66,9 %) Wert als Hauptform. Daneben lag Apo-CIII₂ (24,6 %, Referenzwerte zwischen 27,4 % - 60 %) deutlich vermindert und Apo-CIII₀ (31,8 %, Referenzwerte zwischen 0 % - 11,6 %) stark erhöht vor (Abbildung 9D). Abschließend konnte ein übergeordneter Defekt in der Protein N- und O-Glykosylierung nachgewiesen werden.

2. MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSEN DER N-GLYKANE AUS GESAMTSERUM

Zur genaueren Analyse der N-Glykane wurden MS Analysen durchgeführt. Diese wurden in Kooperation mit Gernot Poschet (COS Heidelberg) durchgeführt. Sowohl von Gesamtserum, als auch von aufgereinigtem Serumtransferrin wurden die N-Glykane abgespalten und mittels positiver Reflektron MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, sowie deren Massen mit Hilfe der MALDI LIFT-TOF/TOF MS ermittelt.

2.1 ANALYSEN DER N-GLYKANE DES SERUMTRANSFERRINS

Die MS-Analysen ergab 46 Peaks bei der Patientin (davon 3 unbekannte) und 50 Peaks bei der Kontrolle (davon 6 unbekannte). Die graphisch dargestellten Ergebnisse sind in Abbildung 12A, die tabellarischen in Tabelle 5 des Appendix dargestellt. Eine Übersicht über die dabei detektierten prominenten Glykan-Strukturen, welche die Anzahl der endständigen Sialinsäuren, den Fucosylierungsstatus der N-Glykane, die Anzahl der Antennen und die Menge an High-Mannose Strukturen zusammenfassend zeigt Abbildung 12B. Das Verhältnis der Patienten- zu den Kontrollergebnissen ist dabei grau unterlegt im Hintergrund zu sehen.

Während die Asialo Glykane (Non Sialylated Glycans) mit 35,85 % in der Kontrolle zu 38,85 % in der Patientin um 8 % nur eine minimale Erhöhung zeigten, waren die Monosialo Glykane (Mono Sialylated Glycans) in der Patientin um 38 % erhöht (Kontrolle 19,01 %, Patientin 26,25 %). Eine starke Erhöhung um das 5x (+ 422 %) zeigten dagegen die Trisialo Glykane (Tri Sialylated Glycans, Kontrolle 0,67 %, Patientin 3,50 %). Einzig die Disialo Glykane (Di Sialylated Glycans) waren in der Patientin um 30 % erniedrigt (Kontrolle 44,47 %, Patientin 31,39 %)

Die defukosylierten Glykane (De Fucosylated Glycans) waren mit 54,79 % in der Kontrolle zu 53,83 % in der Patientin gleichstark r presentiert.

Unter den antennären Strukturen waren diantennäre Glykane (Antennary 2 Glycans) in Kontrolle (75,26 %) und Patientin (76,32 %)  hnlich stark vertreten, während die tetraantenn re Glykane (Antennary 4 Glycans) um ca. 33 % geringer in der Patientin auftraten (Kontrolle 12,33 %, Patientin 8,29 %). Die triantenn re Glykane (Antennary 3 Glycans) waren in der Patientin um das doppelte (+ 200 %, Kontrolle 3,86 % zu 7,71 in der Patientin), die monoantenn re Glykane (Antennary 1 Glycans) sogar um das 7,5fache (+ 675 %) erhöht (Kontrolle 0,65 %, Patientin 5,04 %).

Die High Mannose Glykane (High Mannose Glycans) zeigten sich in der Patientin um ca. 63 % erniedrigt (Kontrolle 8,19%, Patientin 3,02 %).

Zum direkten Vergleich der *N*-Glykane zwischen Kontrolle und Patientin wurden nur Peaks herangezogen, die in beiden Proben übereinstimmend vorhanden waren. So konnten 32 gemeinsame *N*-Glykane detektiert und verglichen werden (Abbildung 13). Die Benennung der einzelnen Glykane ist in Abbildung 12C erläutert. Die Auswertung zeigte starke Unterschiede, sodass das Augenmerk auf die *N*-Glykane gelegt wurde, die in der Patientin entweder mindestens um das doppelte erhöht oder um über 50 % erniedrigt waren.

Folgende Strukturen akkumulierten in der Patientin im Verhältnis am stärksten:

F(6)A2[3]G1Ga1	Kontrolle 0,37 %	Patientin 0,75 %
	Verhältnis 2,03	+ 103 %
A2G(4)2S(6)1	Kontrolle 6,11 %	Patientin 15,95 %
	Verhältnis 2,61	+ 161 %
M4	Kontrolle 0,07 %	Patientin 0,20 %
	Verhältnis 2,86	+ 186 %
M6 D1	Kontrolle 0,26 %	Patientin 0,75 %
	Verhältnis 2,88	+ 188 %

F(6)A3 GlcNAc1 Kontrolle 0,50 % Patientin 1,91 %
Verhältnis 3,82 + 282 %

Während diese am stärksten verringert waren:

A2[6]G(4)1S(3)1 Kontrolle 0,23 % Patientin 0,10 %
Verhältnis 0,43 % - 57 %

F(6)A4G(4)4Lac2 Kontrolle 4,85 % Patientin 1,94 %
Verhältnis 0,40 % - 60 %

F(6)A4 GlcNAc3 Kontrolle 2,94 % Patientin 1,10 %
Verhältnis 0,37 % - 63 %

F(6)A2G(4)2Sg(6)1 Kontrolle 3,70 % Patientin 0,56 %
Verhältnis 0,15 % - 85 %

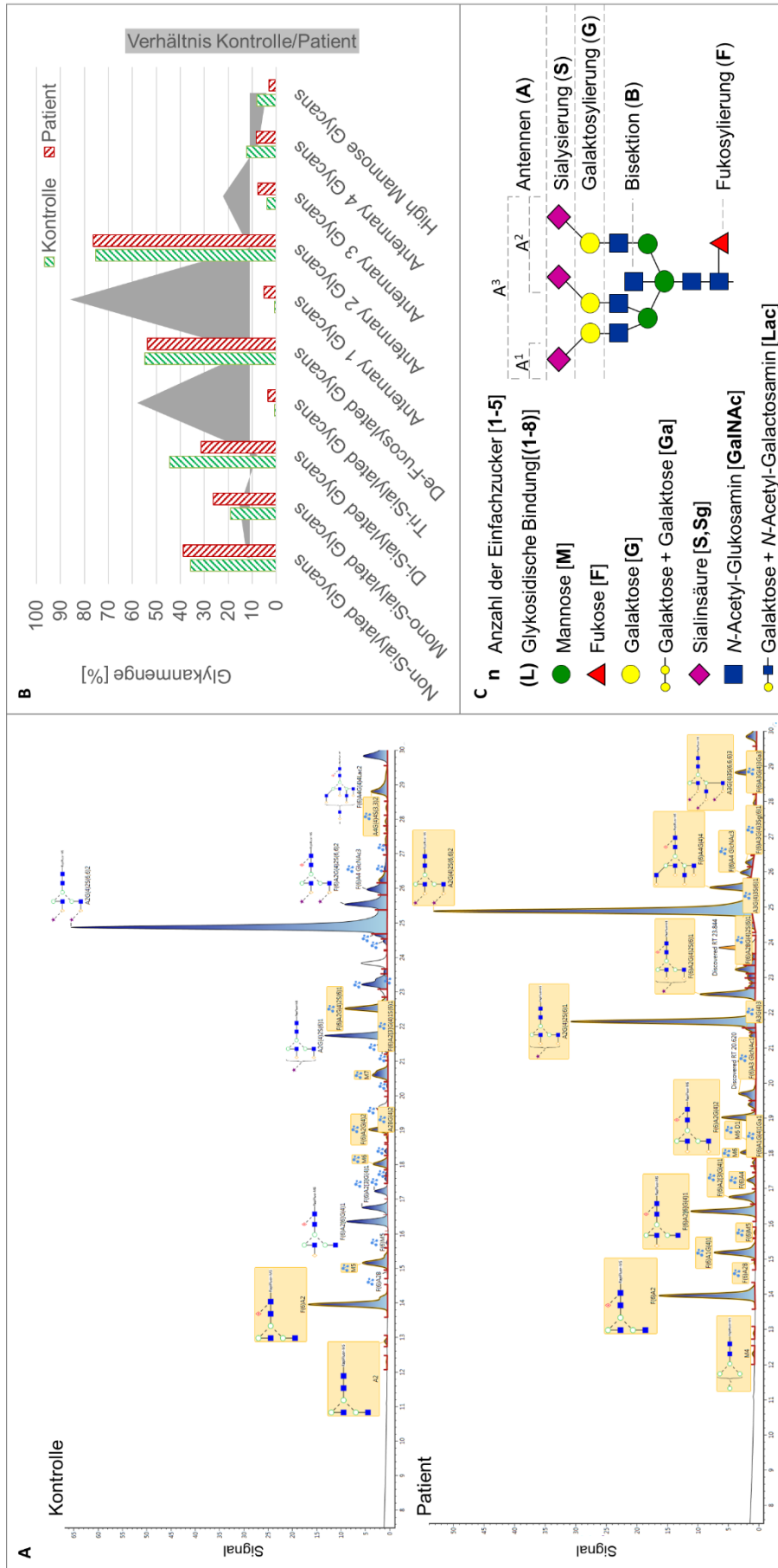


Abbildung 10: N-Glykan Analysen des Serumtransferrins aus Kontroll- und Patientenproben – (A) Ergebnisse der Massenspektrometrischen Analysen zeigen sowohl im Kontroll-, als auch im Patientenserum den Hauptpeak bei dem voll ausgebildeten Disialo-Glykan. In der Patientin akkumulieren einige der verkürzten Strukturen. Die Daten wurden in Kooperation mit Gernot Poschet (COS Heidelberg) erstellt. **(B)** Übersicht über gruppierte Glykanstrukturen, wie De-Fucosylierte und High-Mannose Strukturen, Non-, Mono-, Di- und Trisialo Glykane, sowie Mono- (1), Di- (2), Tri- (3) und Tetra- (4) Antennäre Strukturen. Das Verhältnis von Kontroll- zu Patientensignal ist im Hintergrund (grau) gezeigt. **(C)** Leitfaden zur Benennung der einzelnen Glykanstrukturen in Abbildung 11.

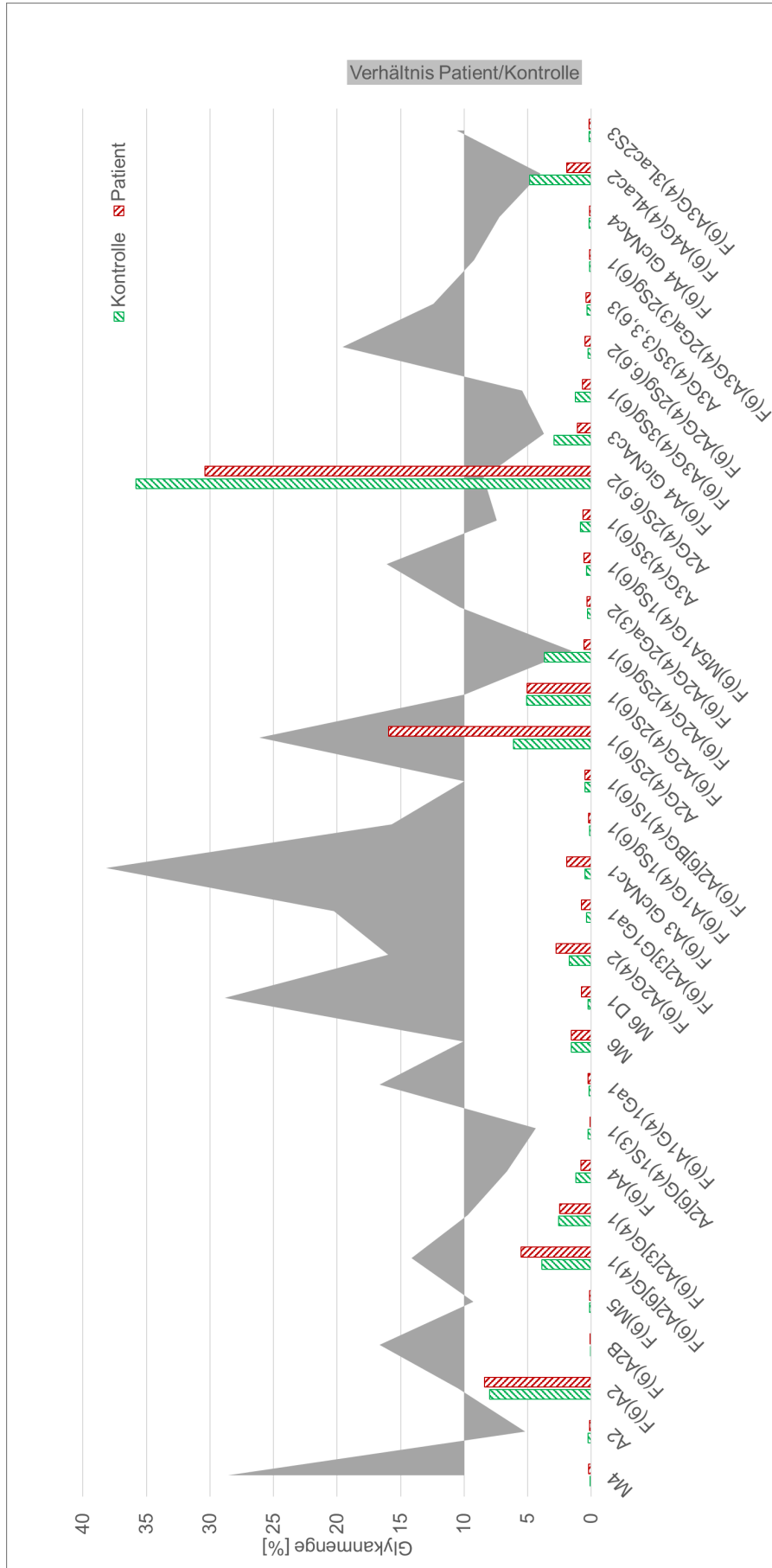


Abbildung 11: Auflistung der einzelnen, in Kontrolle und Patientin detektierten, Glykanstrukturen des Serumtransferrins – Die Benennung ist in Abbildung 10C erläutert. Neben den Signalstärken der einzelnen Peaks von Kontrolle (rot) und Patient (grün) ist im Hintergrund (grau) das Verhältnis von Kontrollsignal zu Patientensignal gezeigt.

2.2 ANALYSEN DER N-GLYKANE IM GESAMTSERUM

Durch die Analysen der Gesamtserum N-Glykane der Patientin konnten 49 Peaks detektiert werden, wovon acht bisher unbekannt waren. Das Ergebnis des Kontrollserums lieferte 50 Peaks mit 4 unbekanntem. Beide Graphen sind in Abbildung 14A dargestellt, die Originalwerte können Tabelle 5 im Appendix entnommen werden. Auch hier würde zuerst eine Übersicht der prominenten N-Glykan-Strukturen erstellt (Abbildung 14B). Diese zeigt beispielsweise die verschiedenen sialylierten und antennären, aber auch die defucosylierten und High-Mannose Strukturen.

Während alleinig die Asialo-Strukturen (Non Sialylated Glycans) im Patientenserum um 52 % zunahmen (Kontrolle 56,68 %, Patientin 86,05 %), waren Mono- (Mono Sialylated Glycans, Kontrolle 24,77 %, Patientin 8,43 %) und Disialo-Glykane (Di Sialylated Glycans, Kontrolle 9,8 %, Patientin 5,27 %) um 66 % bzw. 46 % reduziert. Die Trisialo-Glykane (Tri Sialylated Glycans) kamen, nach dieser Analyse, mit 2,02 % ausschließlich im Kontrollserum vor.

Bei der Patientin zeigte sich des Weiteren eine Erhöhung der de-fucosylierten Strukturen (De Fucosylated Glycans) auf das Doppelte (+ 99 %, Kontrolle 45,67 %, Patientin 90,78 %).

Beim Vergleich der antennären Strukturen fiel eine ebenfalls fast doppelte Erhöhung der diantennären Glykane auf (Antennary 2 Glycans, + 94 %, Kontrolle 46,56 %, Patientin 90,33 %).

Die Mono- (Antennary 1, Kontrolle 2,04 %, Patientin 1,46 %), Tri- (Antennary 3, Kontrolle 16,66 % Patientin 5,02 %) und Tetraantennären Glykane (Antennary 4 Glycans, Kontrolle 22,85 %, Patientin 1,97 %) sind dagegen um 28 % / 70 % / 90 % verringert.

Auch die Anzahl der High-Mannose-Glykane (High Mannose Glycans) war bei der Patientin (1,8 %) im Vergleich zur Normalkontrolle 12,5 %) um 86 % niedriger.

Beim Vergleich zwischen den N-Glykan Peaks der Patientin und der Kontrolle konnten insgesamt 22 übereinstimmende N-Glykane detektiert und miteinander verglichen werden (Abbildung 15). In Abbildung 14C ist die Benennung der Glykane erläutert. Auffällig war hier vor allem die prominente Erhöhung des A2-Peaks im Patientenserum. Im Kontrollserum war dieser Peak mit 0,4 % nahezu nicht vorhanden, im Patientenserum steigt die Menge auf 38,32 % an und einer Vervielfältigung um 9480 % entspricht.

Alle weiteren Glykane zeigen sich, meist deutlich, erniedrigt. Die mit über 90 % größten Unterschiede zeigten die folgenden Strukturen:

A2G(4)2Sg(6,6)2	Kontrolle 0,7 %	Patientin 0,08 %
	Verhältnis 0,07	- 93 %
F(6)A2G(4)2Sg(6,6)2	Kontrolle 0,34 %	Patientin 0,16 %
	Verhältnis 0,04	- 96 %
F(6)A3G(4)2Ga(3)2Sg(6)1	Kontrolle 0,23 %	Patientin 0,13 %
	Verhältnis 0,03	- 97 %
A3S(6)1G(4,4,3)3S(3,3,3)3	Kontrolle 6,52 %	Patientin 0,25 %
	Verhältnis 0,03	- 97 %
F(6)A4G(4)4Lac2	Kontrolle 9,45	Patientin 0,30 %
	Verhältnis 0,02	- 98 %

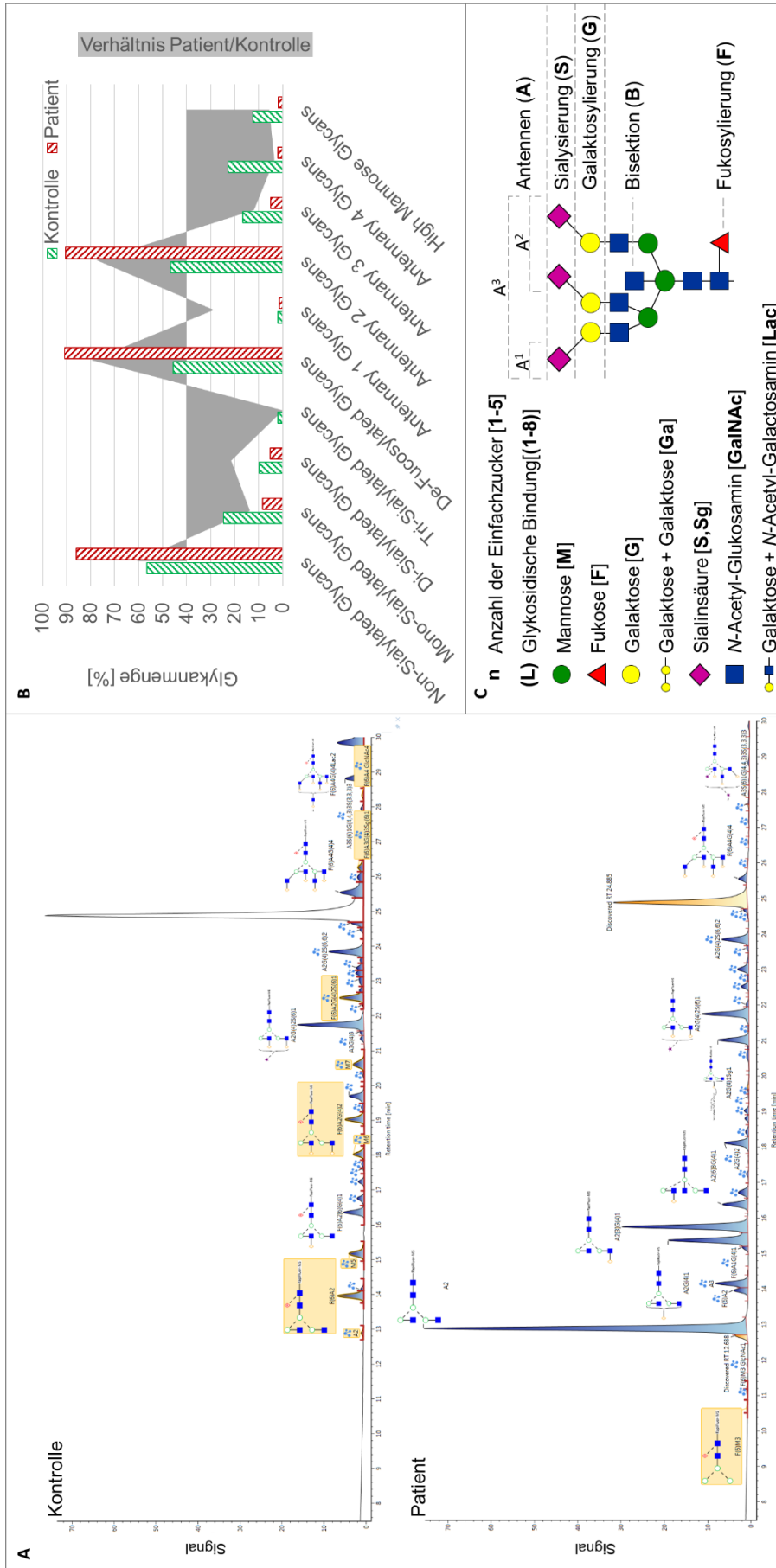


Abbildung 12: Kontroll- und Patienten-N-Glykan Analysen aus Gesamtserum - (A) Die Massenspektrometrischen Analysen zeigen einen deutlichen Shift des Hauptpeaks von der voll ausgebildeten Disialo-Glykanstruktur in der Kontrolle zu einer verkürzten Struktur, die auf zwei GlcNAc-Reste endet, in unserer Patientin. Es akkumulieren außerdem weitere verkürzte Strukturen. Die gezeigten Daten wurden in Kooperation mit Gernot Poschet (COS Heidelberg) erstellt. **(B)** Übersicht über Änderungen in gruppierten Glykanstrukturen. Gezeigt sind De-Fucosylierte und High-Mannose Strukturen, Non-, Mono-, Di- und Trisialo Glykane, sowie Mono- (1), Di- (2), Tri- (3) und Tetra- (4) Antennäre Strukturen. **(C)** Leitfaden zur Benennung der einzelnen Glykanstrukturen in Abbildung 13.

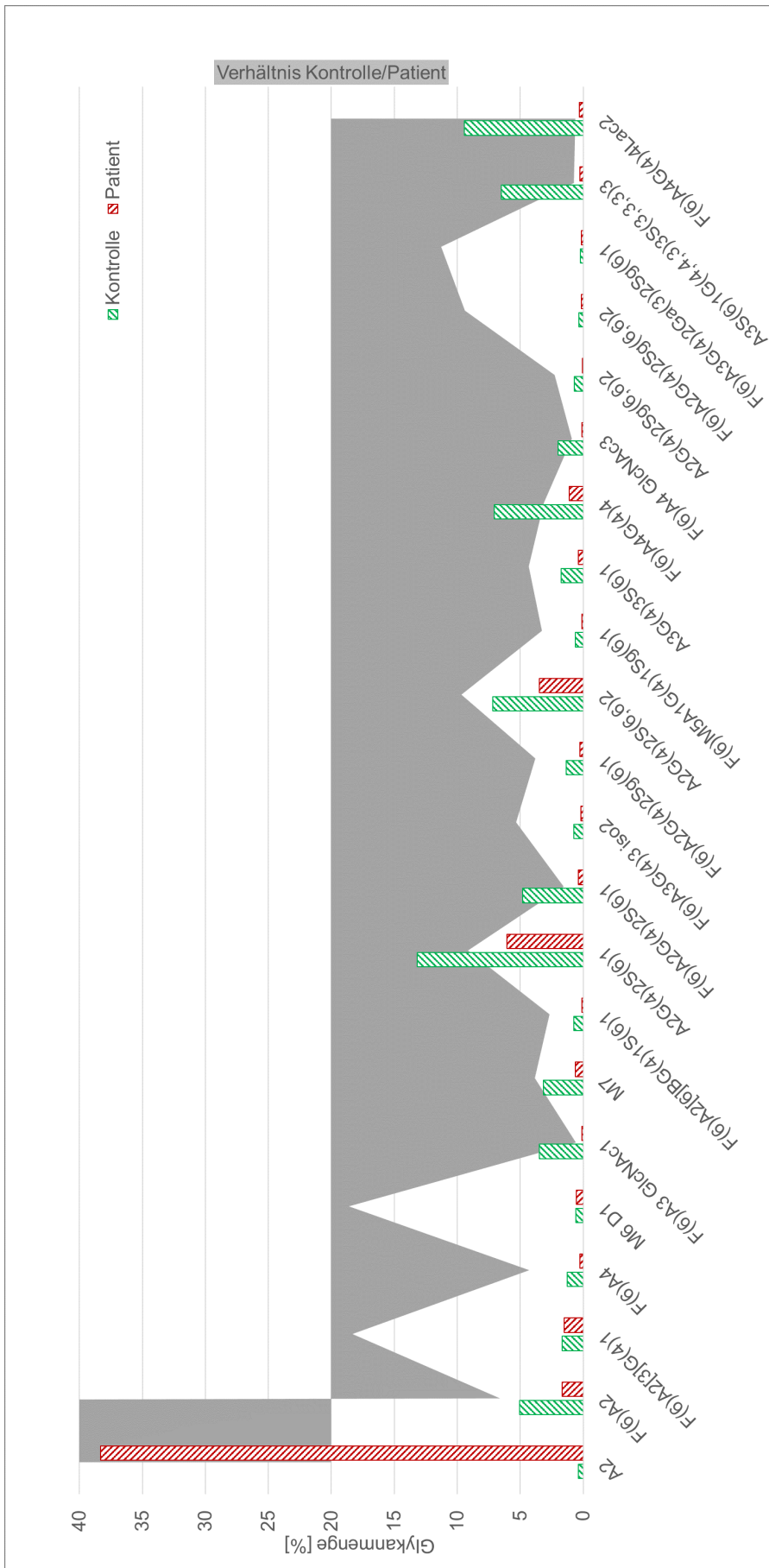


Abbildung 13: Im Gesamtspectrum der Kontrolle und der Patientin detektierte N-Glykane - Abbildung 12C erklärt die Benennung der einzelnen Strukturen. Das Verhältnis (grau) von Kontroll- (grün) zu Patientensignal (rot) zeigt die alleinige Erhöhung des um Sialinsäure- und Galactosereste verkürzten G1cNAc₂Man₃G1cNAc₂-Glykans (A2). Alle weiteren Strukturen liegen in der Patientin reduziert vor.

3. ANALYSEN DER PATIENTEN FIBROBLASTEN

Um den Glykosylierungsdefekt der Patientin molekularbiologisch näher zu charakterisieren, wurde der Patientin eine Hautstanze entnommen und die Fibroblasten anschließend in Kultur genommen. Erste Wachstumsveränderungen dieser Fibroblasten zeigten sich bereits bei der routinemäßigen Kultivierung der Zellen.

3.1 MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN KONTROLL- UND PATIENTENZELLEN

Die Patientenzellen zeigten eine atypisches Wuchsform. Im Gegensatz zu Kontrollzelllinien, bei denen mehrere zytoplasmatisch gefüllte Fortsätze um den ovalen Zellkörper verteilt liegen, zeigten die Patientenfibroblasten einen reduzierten zytoplasmatischen Raum mit bipolar ansetzenden Fortsätzen. Dies verlieh den Zellen ein zugleich gestrecktes, aber auch gedrungenes Aussehen (Abbildung 14A). Der Vergleich zwischen Absorption im Lichtmikroskop und Größe der Oberfläche zeigt eine deutliche Clusterbildung der Kontrollzellen und eine Verteilung der langgestreckten, dichteren Patientenzellen (Abbildung 14B).

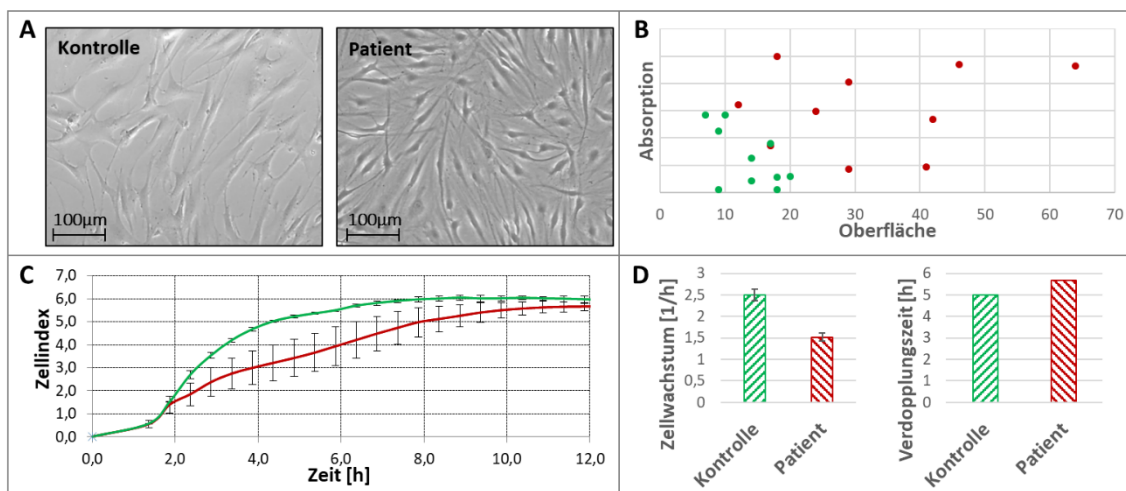


Abbildung 14: Aussehen und Wachstum der Patientenfibroblasten – (A) Im Lichtmikroskop aufgenommene Kontroll- und Patientenfibroblasten zeigen deutliche morphologische Unterschiede. **(B)** Das Verhältnis von Oberfläche zu Absorption zeigt eine klare Clusterbildung der Kontrollzellen (grün) und eine diffuse Morphologie der Patientenzellen (rot). n=10 **(C)** Unterschiedlicher Verlauf der Zellwachstumskurven. n=2 **(D)** Obwohl die Verdopplungszeit schwach erhöht war, zeigte das Zellwachstum eine gegensätzliche Tendenz. n=2

3.2 VERÄNDERUNGEN IM ZELLWACHSTUM UND DER PROLIFERATION

Das Zellwachstum wurde über 20 Stunden (h) mit dem „xCELLigence“ aufgezeichnet und zur Datenanalyse wurden Verdopplungs-, sowie Wachstumsrate und die Zellproliferation verglichen (Abbildung 14C-E). Die Wachstumsanalysen zeigten ein im Vergleich zur Kontrolle verlangsamtes Zellwachstum wobei die Kontrollzellen bereits nach ca. 7 h eine vollständige Konfluenz erreichten, die Patientenzellen dagegen nach

ca. 11 h (Abbildung 14C). Das Zellwachstum der Patientenfibroblasten zeigte sich mit 1,5/h im Vergleich zur Kontrolle mit 2,5/h erniedrigt (Abbildung 14D). Wohingegen sich die Verdopplungszeiten von der Kontrolle mit 5 h zur Patientin mit 5,6 h verlängert (Abbildung 14E).

4. UNTERSCHIEDE IM GLYKOSYLIERUNGSSTATUS DER FIBROBLASTEN

Durch Detektion verschiedener Markerproteine wurde der Glykosylierungsstatus in Kontroll- und Patientenfibroblasten überprüft. Hierfür wurden Blots sowohl mit den Lektinen „*Wheat Germ Agglutinin*“ (WGA), „*Ricinus communis Agglutinin I*“ (RCA I), „*Sambucus nigra Agglutinin*“ (SNA) und „*Maackia amurensis Leukagglutinin I*“ (MAL I), wie auch mit den Proteinen „*Lysosome-associated membrane glycoprotein 2*“ (LAMP2), „*Intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM1) und „*Glycoprotein 130*“ (GP130) durchgeführt.

4.1 STUDIEN ZUR LEKTINBINDUNG

Zur Überprüfung unterschiedlicher, endständiger Zuckerreste wurden die Lektine WGA, gegen *N*-Acetylglucosaminreste, MAL I gegen Galactose und RCA I gegen Galactose- oder *N*-Acetylgalactosaminreste, sowie SNA gegen Sialinsäurereste verwendet. Die Detektionen mittels Lektinen zeigen vor allem Auffälligkeiten in der Laufhöhe der Banden (Abbildung 15A). Von den vier untersuchten Lektinen war einzig WGA in der Patientin reduziert (69 % \pm 14 %). RCA I (143 % \pm 21 %; * $p \leq 0,016$) und SNA (128 % \pm 34 %; * $p \leq 0,013$) sind signifikant, MAL I nicht signifikant (166 % \pm 2 %) erhöht. Bei allen Lektinbindestudien zeigt sich bei unserer Patientin außerdem eine Verschiebung im Molekulargewicht der detektierten Proteine.

4.2 STUDIEN MIT GLYKOSYLIERUNGS-MARKERPROTEINEN

Mit den stark glykosylierten Markerproteinen LAMP2, ICAM1 und GP130 wurden die Ergebnisse der Lektinbindestudien verifiziert. Die Quantifizierung der Kontroll- und Patientenbanden zur Ladekontrolle β -Aktin und zueinander zeigten eine deutliche Verminderung bei ICAM1 33 % \pm 4 %. Eine signifikante Verminderung der Proteinsignalstärke bei LAMP2 20 % \pm 13 % (* $p \leq 0,046$) und GP130 26 % \pm 6 % (* $p \leq 0,0086$) konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 15B).

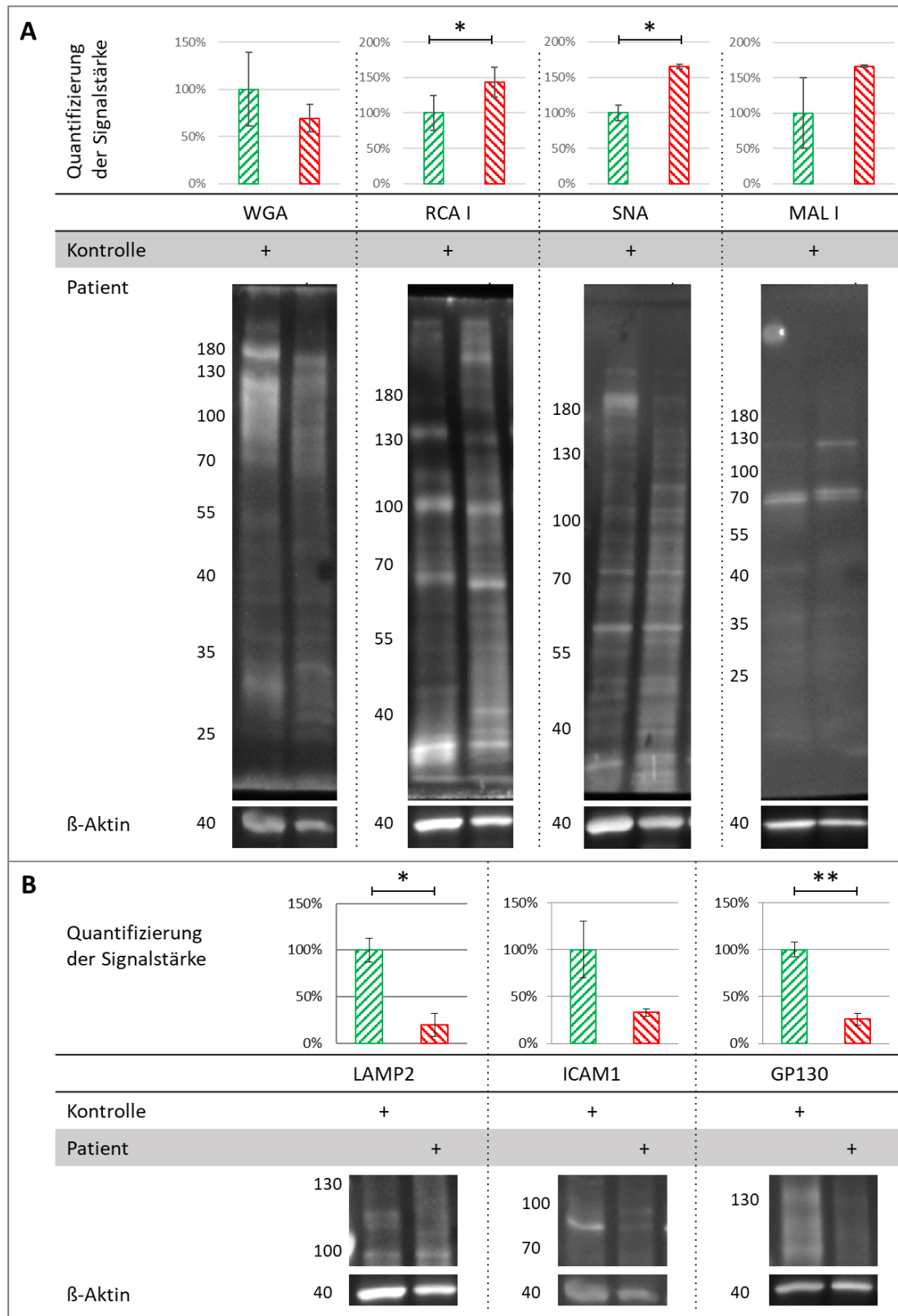


Abbildung 15: Überprüfung des Glykosylierungsstatus in Patientenfibroblasten – (A) Lektinbindestudien - Bei den durchgeführten Überprüfungen mittels Lektin-Studien sind deutliche Unterschiede zu sehen. Bei den verwendeten Lektinen handelt es sich um „*Wheat Germ Agglutinin*“ (WGA), „*Ricinus communis Agglutinin I*“ (RCA I), „*Sambucus nigra Agglutinin*“ (SNA) und „*Maackia amurensis Leukagglutinin I*“ (MAL I) **(B) Markerproteine der Glykosylierung** - Auch die untersuchten Markerproteine „*Lysosome-associated membrane glycoprotein 2*“ (LAMP2), „*Intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM1) und „*Glycoprotein 130*“ (GP130) zeigen deutliche Unterschiede. Die Glykosylierung in Fibroblasten unserer Patientin zeigt sich mittels Markerproteinanalysen von LAMP2 und von GP130 signifikant reduziert. n=3; p*≤0,05.

5. IDENTIFIZIERUNG ZWEIER HOMOZYGOTER MUTATIONEN IN *GZF1* UND *VPS45*

Es folgten Sequenzanalysen der beiden, durch die Ergebnisse der *N*-Glykan Analysen aufgekommenen, Verdachtsproteine SLC35A2 (UDP-Galactose Transporter), B4GALT1 (β -1,4-galactosyltransferase 1) und SLC39A8 (Zink-Transporter). Die beiden ersteren sind für die Anheftung der Galactose auf das Vorläufer-Glykan mitverantwortlich. SLC35A2 für den Import von Galactose in den Golgi-Apparat und B4GALT1 für das Anheften der Galactose an endständige GlcNAc-Reste. Ein Defekt der SLC39A8 würde zum Erliegen des Mangan Transports in die Zelle führen wodurch das manganabhängige B4GALT1 beeinflusst und die Glykosylierung gestört wäre. Die Sanger-Sequenzierung dieser Gene ergab keine Auffälligkeiten.

Durch eine Whole Exome Sequenzierung, welche in Kooperation mit Uwe Kornak (Charité Berlin) durchgeführt wurde, wurden 54 mögliche Zielgene identifiziert (Tabelle 6 im Appendix). Literaturrecherchen ermöglichten die Eingrenzung auf zwei potentiell krankheitsverursachende Zielgene. Aufgrund der bereits bekannten Mutation und durch die passende Symptomatik unserer Patientin im Vergleich zu Patientten mit dem durch *GZF1* verursachten Larsen-Syndrom wurden molekularbiologische und biochemische Analysen des *GZF1* initiiert.

6. BESTÄTIGUNG DER HOMOZYGOTEN MUTATION IN *GZF1*

Die, auf Ebene der cDNA und der genomischen DNA nachgewiesene, Punktmutation c.856G>T im „GDNF-induzierbare Zink-Finger-Protein 1“ (*GZF1*) führt auf Proteinebene zu einem verfrühten Stop-Codon an Position 289 und anstelle einer Glutaminsäure (Abbildung 16A). Da das Gen bisher nur in Säugetieren nachgewiesen werden konnte war der Vergleich der Aminosäurestruktur auf diese Klasse beschränkt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Glutaminsäure an Position 289 (p.Glu289*) des humanen Proteins hoch konserviert ist (Abbildung 16B). Die Lokalisation der Mutation im *GZF1* Gen und dem gleichnamigen Protein konnte bereits von Patel et al. 2017 beschrieben werden (Abbildung 16C). Sie liegt in Exon 1 und somit vor den zehn, namensgebenden Zink-Finger Motiven.

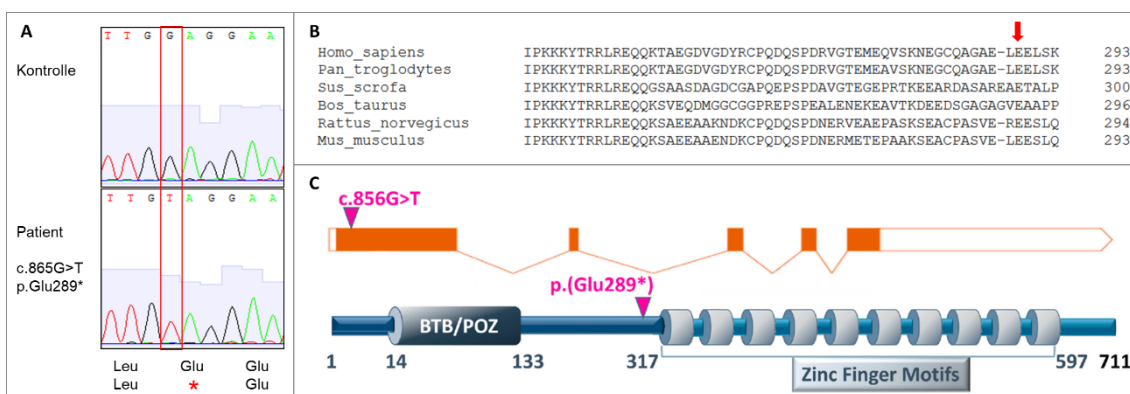


Abbildung 16: Das GDNF-induzierbare Zink-Finger-Protein 1 (GZF1) – (A) Sequenzierung der homozygoten Punktmutation c.856G>T in unserer Patientin, die zu einem verfrühten Stop-Codon an Position 298 führt. **(B)** Konservierter Aminosäurebereich in GZF1 mit Glutaminsäure an Position 289 der humanen GZF1-Aminosäurestruktur. Hoch konserviert in den gezeigten Vertebraten (E, roter Pfeil). **(C)** Sowohl in der Intron-Exon Struktur (oben), als auch im Proteinaufbau (unten) von GZF1 ist die Lokalisation der in unserer Patientin gefundenen Mutation in pink eingezeichnet. Diese Teilabbildung wurde angepasst nach Patel et al. 2017.

Durch die Überprüfung mittels verschiedener Vorhersage-Programme (MutationTaster, Polymorphism Phenotyping v2, SIFT, PROVEAN, MUTATIONASSESSOR, SNAP und MUpPro) wurde die Mutation auf ihre Pathogenität hin getestet. Vier von sieben Programmen zeigten p.Glu289* in GZF1 als potentiell krankheitsverursachende Mutation an. Die drei übrigen lieferten kein Ergebnis, da sie ausschließlich Vorhersagen über Mutationen mit Aminosäureaustausch, nicht aber über weitreichende Aminosäure-Verluste, wie hier durch das eingebrachte Stop-Codon, treffen können (siehe Tabelle 7 im Appendix).

7. VERMINDERTES GZF1-SIGNAL BEI ABWEICHENDER LOKALISATION

7.1 VERMINDERTES GZF1 SIGNAL IM WESTERN BLOT

Mittels SDS-Page mit angeschlossenen Western-Blot wurden Analysen der GZF1-Expression im Fibroblasten-Lysat durchgeführt und auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert (Abbildung 17A). Bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa zeigte sich hierbei eine signifikante Verminderung in der Patientenprobe ($22\% \pm 16\%$; * $p \leq 0,01$).

7.2 MRNA-EXPRESSION VON GZF1

Zur Überprüfung der Auswirkungen der *GZF1* Mutation auf mRNA-Ebene wurden qRT PCR Analysen durchgeführt und auf das Referenzgen *RAB7A* normiert. Die Proteinsignalstärke war dabei in der Patientin auf $14\% \pm 2\%$ (***) im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abbildung 17B).

7.3 HETEROGENE LOKALISATION VON GZF1 IN FIBROBLASTEN

Immunohistochemische Analysen in Kontroll- und Patientenfibroblasten zeigen eine heterogene Verteilung von GZF1 in den Zellen. Zur Kontrolle der Kolo-kalisation wurden Kofärbungen mit dem Markerproteinen ERGIC53 angefertigt (Abbildung 17C). Bei allen Färbungen wurde weiterhin der Zellkern durch Bisbenzimid angefärbt. Die Analysen zeigen keine Kolo-kalisation mit dem eingesetzten Markerproteinen. In den Kontrollen zeigt sich eine deutliche Lokalisation von GZF1 im Zellkern, sowie eine diffuse Färbung des Zytoplasmas. In den Patientenzellen war GZF1 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert.

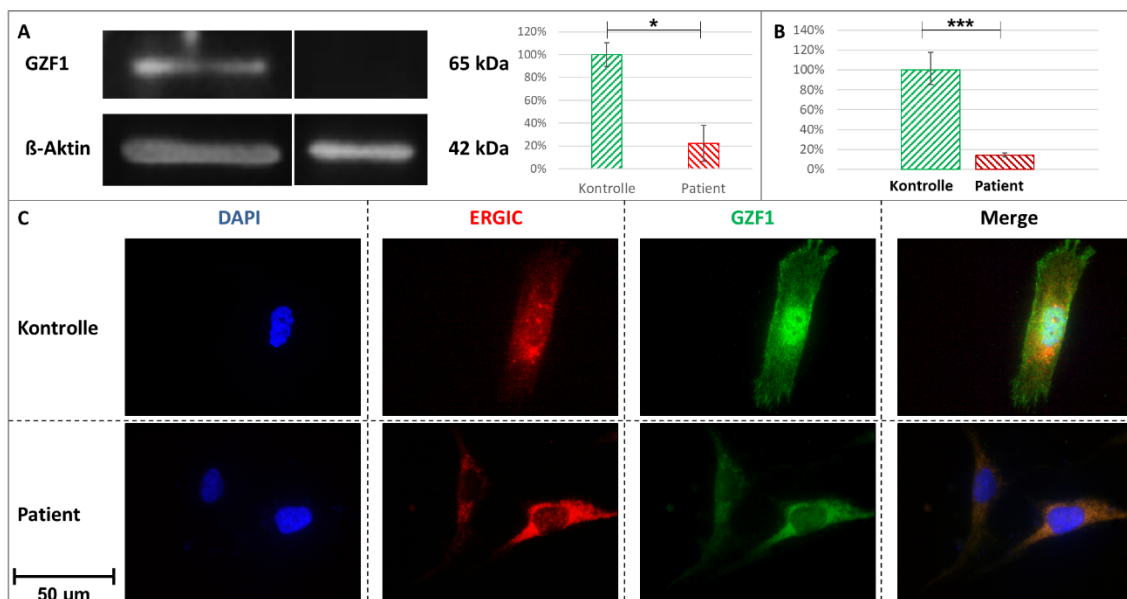


Abbildung 17: Expression und Lokalisation von GZF1 in Fibroblasten – (A) Signifikante Verminderung der GZF1-Signalstärke in Patientenzellen. (B) Die Expression der mRNA war ebenfalls signifikant reduziert. (C) Die Lokalisation von GZF1, die sich in Kontrollzellen auf den Zellkern konzentriert, war in der Patientin nicht zu sehen. In beiden Proben war auch das Zytoplasma diffus gefärbt.

8. VERÄNDERUNGEN DURCH KOMPLEMENTATION MIT GZF1

Zur Überprüfung, ob das mutierte *GZF1* krankheitsverursachend ist wurde eine virale Komplementation mit dem Wildtyp-*GZF1* in Patientenfibroblasten durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob diese Komplementation die Glykosylierung in Patientenzellen normalisiert.

Das hierfür verwendete *GZF1*-tragende pLNCX2 Plasmid wurde mittels Transfektion in die Zelllinie Fnx_{Eco}, anschließend mittels Infektion in pT67-Zellen eingebracht. Neben dem Vektor mit eingebrachtem *GZF1* wurde auch ein Leervektor (Mock) verwendet, um einen Einfluss des Vektors auf die Glykosylierung auszuschließen. Die Proben Mock-I und -II bzw. *GZF1*-I und -II beschreiben hierbei isoliert voneinander infizierte Zelllinien.

8.1 EXPRESSION DES GZF1 PROTEINS IM „WESTERN BLOT“

Die Signalstärke des *GZF1*-Proteins konnte in Patientenzellen durch das Einbringen des wildtypischen Proteins verstärkt und auf ein kontrollähnliches Level gebracht werden (Abbildung 18). Die Quantifizierung der Signalstärke, bei der die Kontrolle auf 100 % (Kontrolle-nicht komplementiert) gesetzt wurde, zeigte für die mit Leervektor behandelte Probe Kontrolle + Mock eine Erhöhung auf 266 %. Bei den beiden mit *GZF1* komplementierten Proben steigerte sich die Proteinsignalstärke auf 626 % (Kontrolle + *GZF1*-I) bzw. 648 % (Kontrolle + *GZF1*-II). Bei der Patientenprobe war sie auf 8 % (Patient- nicht komplementiert) reduziert. Die mit Leervektor komplementierten Proben zeigten hingegen eine leichte Erhöhung auf 21 % (Patient + Mock-I) bzw. 13 % (Patient + Mock-II).

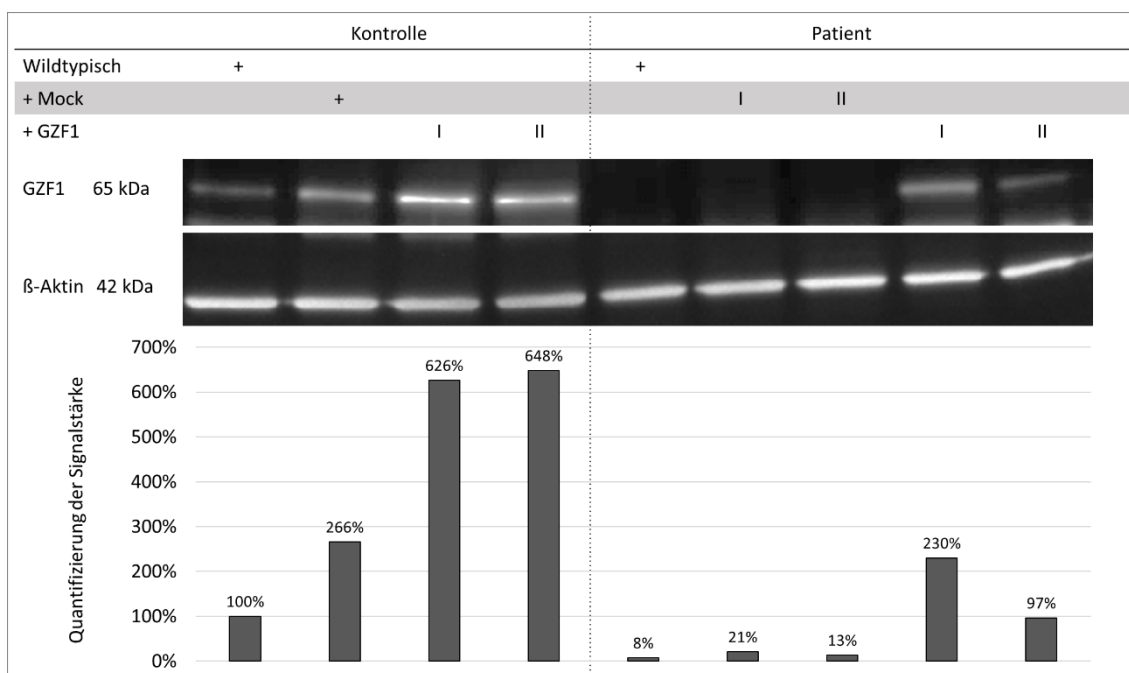


Abbildung 18: Studien zur Expression des eingebrachten, wildtypischen GZF1-Proteins in Kontroll- und Patientenfibroblasten. n = 1

8.2 GZF1 LOKALISATION IN FIBROBLASTEN

Die Immunohistochemischen Untersuchungen der Lokalisation zeigten eine Kolo-kalisation des eingebrachten GZF1-Proteins mit der Bisbenzimid-Färbung des Zellkerns, die auch in Kontrollzellen erkennbar war. Die „diffuse“ Färbung des Zytosols zeigt sich in allen analysierten Proben (Abbildung 19).

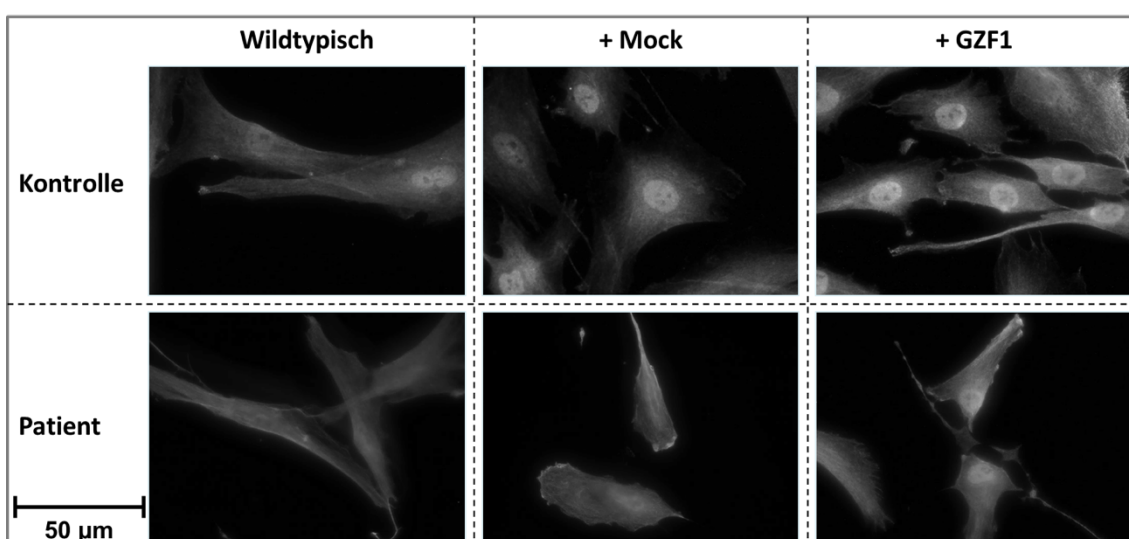


Abbildung 19: Die Lokalisation von GZF1 in komplementierten Fibroblasten – Durch die Komplementation mit GZF1 lässt sich die Lokalisation im Zellkern in den Patientenzellen rekonstruieren. Der eingebrachte Leervektor (Mock) zeigt diesen Effekt nicht.

8.3 VERÄNDERTER GLYKOSYLIERUNGSSTATUS BEI KOMPLEMENTATION MIT GZF1

Zum Vergleich des Glykosylierungsstatus der mit *GZF1* komplementierten Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden erneut Analysen der Glykoproteine GP130 (Abbildung 20) und LAMP2 (Abbildung 21) durchgeführt.

Die mit *GZF1* komplementierten Patientenzellen zeigten bei der Analyse von GP130 ein Bandenmuster, das sich dem der Kontrolle annäherte. Während bei den nicht komplementierten Zellen keine Bande um die 120 kDa zu sehen war, erschien sowohl in der mit Mock komplementierten Zelllinie Patient + Mock I, als auch in beiden mit *GZF1* komplementierten Patientenzelllinien eine Bande bei ca. 110 kDa. Diese lief niedriger als die Kontrollbande bei ca. 120 kDa. Eine Quantifizierung der Proteinsignalstärke dieser Banden, bei der die nicht komplementierte Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde, zeigte auch in den übrigen Kontrollproben eine Erhöhung der Signalstärke von GP130 auf 178 % bei der mit dem Leervektor komplementierten Kontrolle (Kontrolle + Mock) und 179 % bzw. 247 % bei den beiden mit *GZF1* komplementierten Kontrollen (Kontrolle + *GZF1*-I / *GZF1*-II). Die nicht komplementierte Patientenprobe zeigte eine Proteinsignalstärke von 20 %. Diese stieg auf 210 % bzw. 77 % in den Proben mit Leervektor (Patient + Mock-I / Mock-II) und 278 % bzw. 237 % bei den mit *GZF1* komplementierten Proben (Patient + *GZF1*-I / *GZF1*-II).

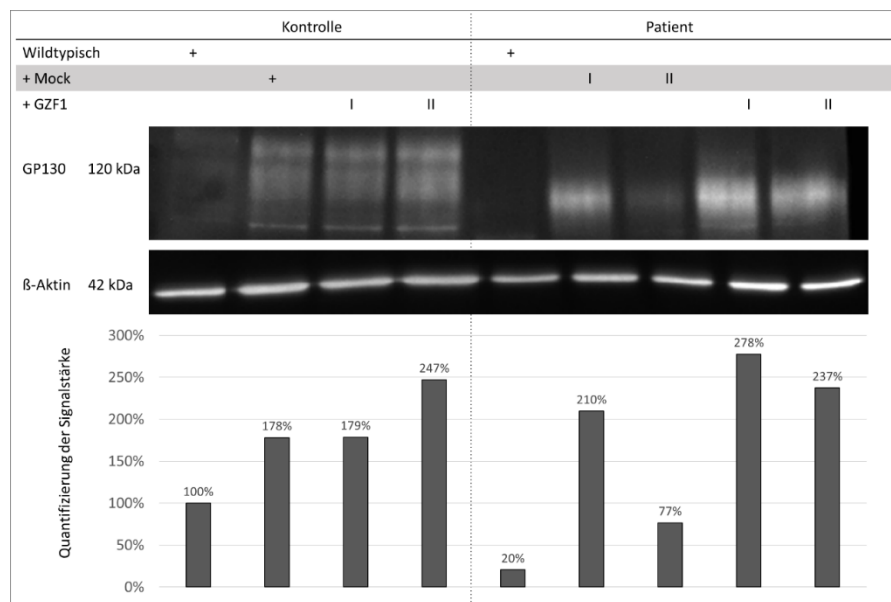


Abbildung 20: Expressionsanalysen des Glykoproteins GP130 in komplementierten Fibroblasten - n = 1

Auch die Analysen der LAMP2 Expression zeigten ein kontrollähnliches Muster der 58 kDa Bande. Diese tauchte bei der Patientin nur in den beiden mit *GZF1* komplementierten Proben auf. Auch hier wurde bei der Quantifizierung die nicht komplementierte Kontrolle auf 100 % gesetzt. Mit 110 %, 110 % und 112 % (Kontrolle + Mock / *GZF1*-I / *GZF1*-2) schwankten alle Kontrollproben nur schwach. Die verminderte Proteinsignalstärke in der nicht komplementierten Patientenprobe, die durch die Quantifizierung auf 54 % kam, schwankte in den beiden mit dem Leervektor infizieren Proben auf 65 % und 40 % (Patient + Mock-I / Mock-II). In den beiden mit *GZF1* komplementierten Proben stieg sie deutlich auf 89 % bzw. 72 % an (Patient + *GZF1*-I / *GZF1*-II).

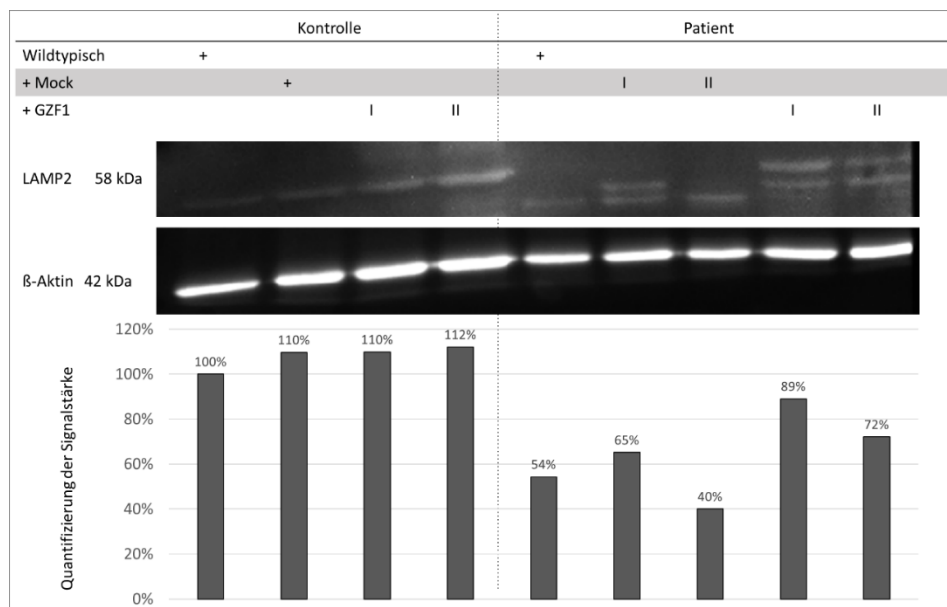


Abbildung 21: LAMP2 Analysen der mit *GZF1* komplementierten Zellen - n = 1

9. BESTÄTIGUNG EINER HOMOZYGOTEN MUTATION IN *VPS45*

Da der Einfluss von *GZF1* auf den Glykosylierungsstatus der Patientin nicht abschließend geklärt werden konnte, wurde auch das zweite potentielle Zielgen *VPS45* genauer analysiert, da es in Assoziation zum COG-Komplex steht.

Von drei im Whole-Exome-Sequencing gefundenen homozygoten Varianten im „Vacuolar Protein Sorting 45 Homolog“ (*VPS45*) Gen konnte einzig die Mutation c.1174g>a mittels Sanger- Sequenzierung bestätigt werden. Durch diese Variante kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an Position 392 (p.Ala392Thr) (Abbildung 22A). Der Vergleich verschiedener Spezies zeigte, dass

nicht nur diese Aminosäure hoch konserviert ist, sondern zudem in einem hochkonservierten Bereich des VPS45 liegt (Abbildung 22B). Analysen der Sekundärstruktur des Proteins zeigten eine Lokalisation Mutation im C-Terminus. Die Tertiärstruktur ergab, dass die Mutation abgewandt vom aktiven Zentrum liegt (Abbildung 22C/D).

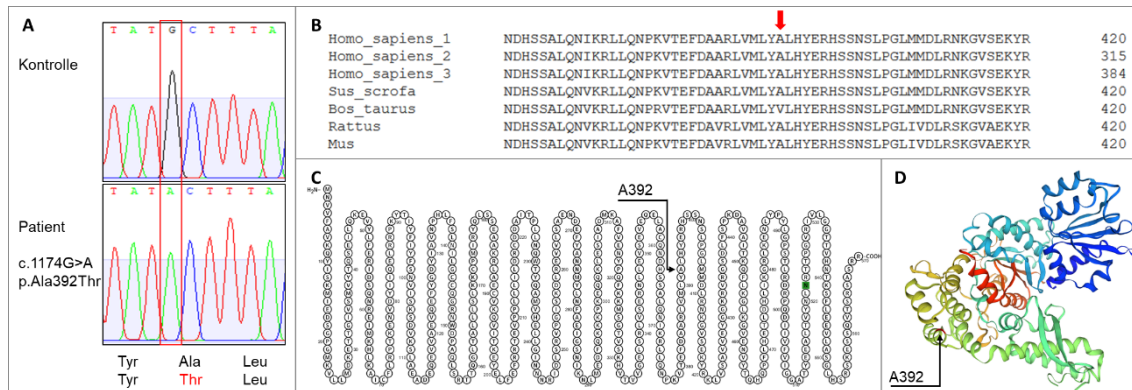


Abbildung 22: Das „Vacuolar Protein Sorting 45 Homolog“ (VPS45) – (A) Elektropherogram der Sequenzierungen von Kontrolle und Patientin zeigen die homozygote Punktmutation c1174G>A, die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin (A) zu Threonin (T) an Position 392 führt. **(B)** Der Aminosäurebereich um die Mutation in VPS45 ist stark konserviert. Das Alanin an Position 392 der humanen VPS45-Aminosäurestruktur ist, mit Ausnahme eines Valin (V) in Kühen (*Bos taurus*), in allen gezeigten Vertebraten konserviert (roter Pfeil). **(C&D)** Schematische Darstellungen des VPS45 als Proteoform mit einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle **(C)** und die homolog modellierte 3D Struktur **(D)**. Die Strukturen wurde mit der Protter Version 1.0 und dem Swiss-Model erstellt.

Die Vorhersageprogramme bzgl. der Pathogenität der gefundenen Variante (MutationTaster, Polymorphism Phenotyping v2, SIFT, PROVEAN, MUTATIONASSESSOR, SNAP und MUp) ergaben keine einheitlichen Ergebnisse. So gaben 50 % der Programme eine krankheitsverursachende Mutation und weitere 50 % einen tolerierbaren Polymorphismus an (Tabelle 7 im Appendix).

10. WILDTYPISCHE EXPRESSION UND LOKALISATION VON VPS45

10.1 WESTERN BLOT ANALYSEN VON VPS45

Analysen der VPS45-Expression im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden mittels SDS-Page mit angeschlossenen Western-Blot durchgeführt. Die Proteinsignalstärke von VPS45 zeigte in der Patientin eine Erhöhung auf $127 \% \pm 23 \%$ (Abbildung 23A).

10.2 VPS45 MRNA-ANALYSEN

Die durchgeführten Expressionsanalysen der mRNA mittels qRT-PCR zeigten eine Verminderung auf $79 \% \pm 9 \%$ (Abbildung 23C).

10.3 LOKALISATION VON VPS45 IN FIBROBLASTEN

Da VPS45 im Zytosol auftritt und mit dem *Conserved Oligomeric Golgi* (COG-) Komplex assoziiert wird, wurde eine Ko-Färbung mit dem Golgi-Marker GM130 durchgeführt. Die Patientenzellen zeigten hierbei eine kontrollähnliche Verteilung von VPS45 im Zytosol. Eine Kolokalisation mit GM130 konnte weder in der Kontrolle, noch in der Patientin nachgewiesen werden (Abbildung 23B).

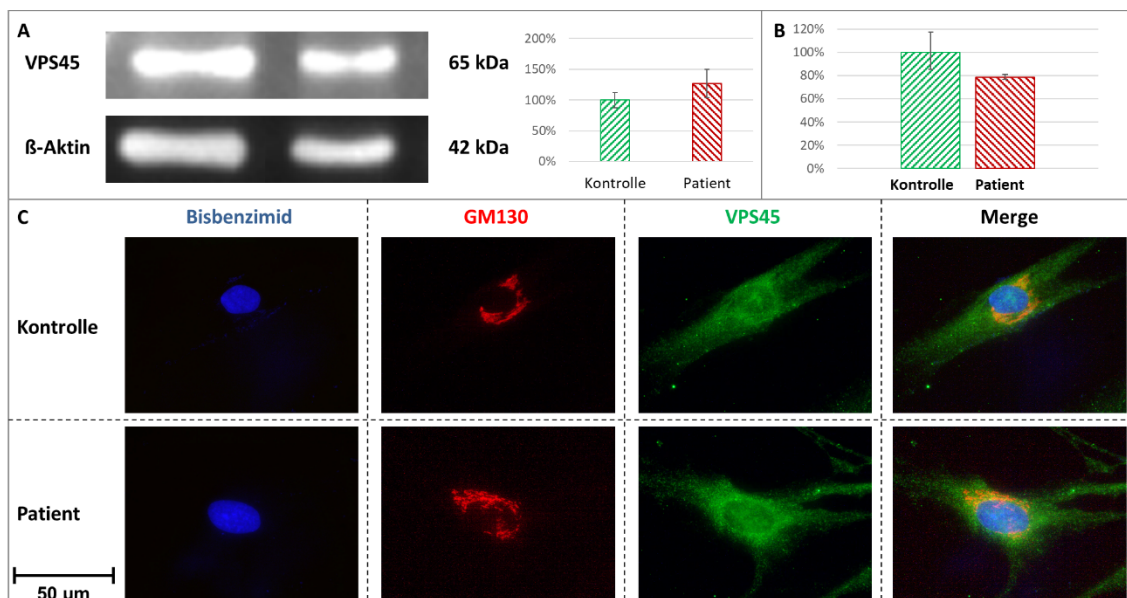


Abbildung 23: Vergleich der Lokalisation, der Protein- und mRNA-Expression von VPS45 – (A) Die Proteinsignalstärke von VPS45 in den Patientenfibroblasten zeigte eine Erhöhung. **(B)** Die mRNA-Expression von VPS45 war in den Patientenzellen reduziert. **(C)** Die Expression des im Zytosol lokalisierten VPS45 war in Kontroll- und Patientenzellen vergleichbar.

10.4 EXPRESSIONSANALYSEN DES COG-KOMPLEXES

Da VPS45 als Interaktionspartner mit den Untereinheiten 4, 7 und 8 des COG-Komplexes assoziiert ist, wurden Protein- und mRNA-Expressionsanalysen der potentiell betroffenen Untereinheiten durchgeführt. Dabei liegen COG4 und COG7 in den Lobes A bzw. B und COG8 bildet mit COG1 die beiden verbindenden Untereinheiten zwischen den beiden Lobes.

Die mittels qRT-PCR überprüfte mRNA-Expression war in COG4 (53 % ± 18 %) vermindert. In COG7 war sie signifikant (53 % ± 5 %; * $p \leq 0,017$) und in COG8 stark signifikant (26 % ± 1 %; *** $p \leq 0,00035$) reduziert (Abbildung 24B).

Entsprechend zum mRNA-Level war die Proteinsignalstärke von COG4 (83 % ± 50 %) und COG7 (64 % ± 12 %) in den Patientenzellen reduziert. Dagegen zeigte sich bei COG8 eine deutliche Erhöhung (196 % ± 24 %) (Abbildung 24A), wodurch sich die zuvor gemessene geringe COG8-Transkriptmenge regulatorisch erklären ließe.

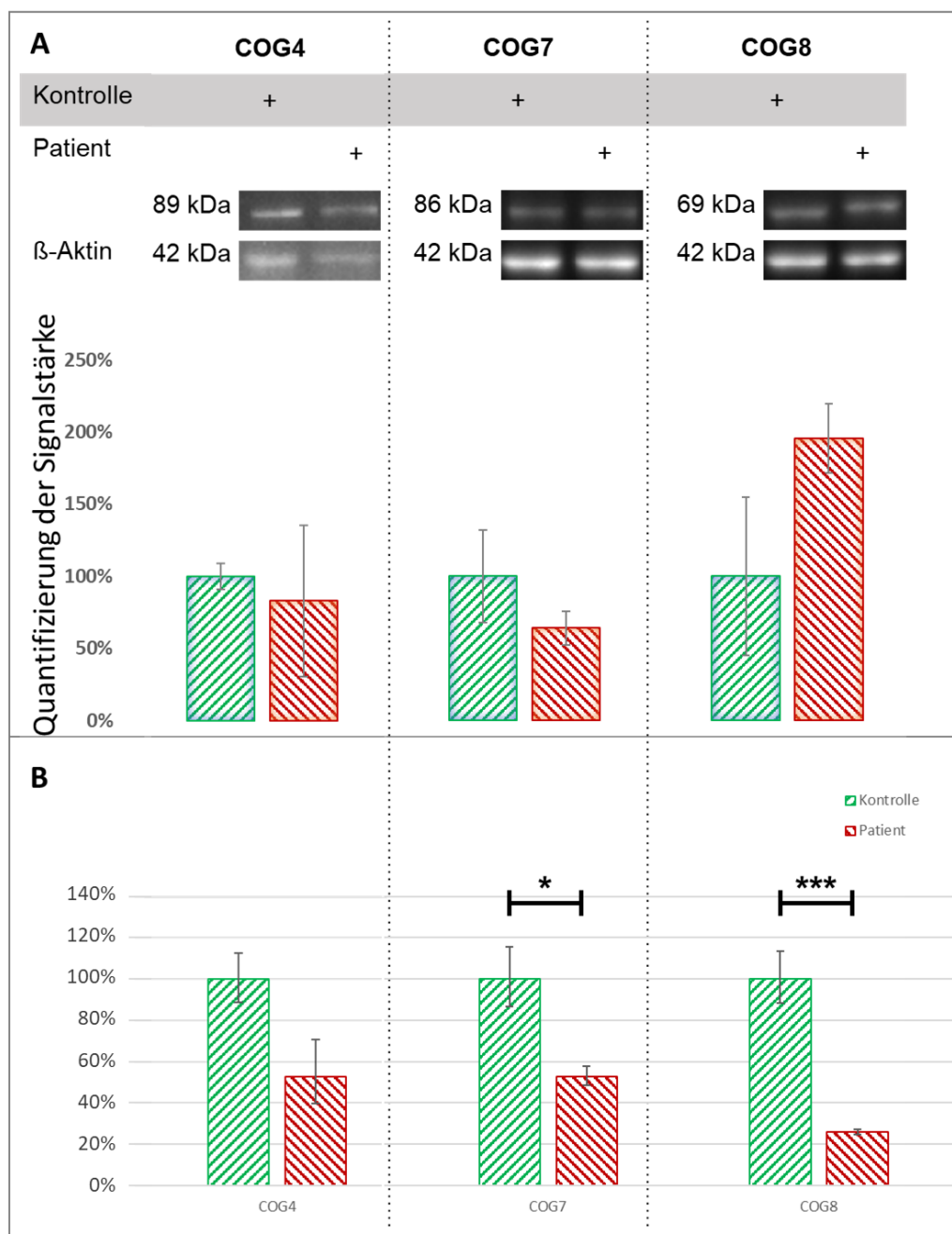


Abbildung 24: Analysen zur Protein- und mRNA-Expression in den COG-Untereinheiten 4, 7 und 8 – (A) Analysen zur Proteinexpression von COG4, COG7 und COG8 zeigten keine signifikanten Änderungen in der Signalstärke. (B) Die mRNA-Expression zeigte sich in COG7 signifikant, in COG8 höchst signifikant reduziert.

Zusammenfassend zeigte das VPS45-Protein in Patientenfibroblasten eine kontrollähnliche über das Zytoplasma verteilte Lokalisation bei erhöhter Protein- und verminderter mRNA-Expression. Auch die zusätzlich durchgeführten Proteinexpressionsanalysen der COG-Komplex Untereinheiten zeigten reduzierte Signalstärken mit signifikanter Verminderung von COG7 und COG8. Sowohl im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor GZF1, als auch mit dem COG-assoziierten Protein VPS45 wurden Auffälligkeiten gefunden, die vermutlich gemeinsam zur Erkrankung der Patientin beigetragen haben.

F. Diskussion

Im Menschen sind ca. 50 - 70% der Proteine glykosyliert (An et al. 2009). Der Prozess der Proteinglykosylierung ist eine der häufigsten ko- und posttranslationalen Modifikationen und durch zahlreiche der daran beteiligten Proteine äußerst komplex. Ein Defekt der Glykoproteinbiosynthese führt meist zu multisystemischen Krankheitsbildern. Erst im Laufe der letzten Jahre wurde die Vielzahl dieser Defekte deutlich. Vermutlich stellt die Anzahl der bisher aufgeklärten Patienten aber nur die Spitze des Eisbergs dar, die Dunkelziffer der Personen mit vererblichen Glykosylierungsdefekten („*Congenital Disorders of Glycosylation*“, CDG) ist wahrscheinlich deutlich höher.

1. EIN MULTISYSTEMISCHES KRANKHEITSBILD MIT KOMBINIERTEM GLYKOSYLIERUNGSDEFEKT

Das Krankheitsbild der Patientin umfasste bei der Erstuntersuchung neben Entwicklungsverzögerung und Kleinwuchs, mehrere dysmorphe Merkmale, eine Hyperlordose, Gelenkanomalien, sowie beidseitige Hornhauttrübungen und Hörverlust. Die Analysen von Blut- und Urinwerten zeigten mehrere Auffälligkeiten. Dabei fiel vor allem die mit 1837 % (Referenzwerte 37 % - 226 %) im Plasma stark erhöhte Aktivität der lysosomalen α -Mannosidase auf. Obwohl eine derartige Erhöhung auf eine Mukopolidase mit schweren psychomotorischen Entwicklungsverzögerungen zurückzuführen wäre, konnte dies aufgrund der übrigen unauffälligen (nicht erhöhten) lysosomalen Enzymaktivitäten im Plasma ausgeschlossen werden. Eine weitere, aus der erhöhten α -Mannosidase resultierenden, Erkrankung ist die α -Mannosidose. Neben den Blutwerten sind Taubheit, Sehverlust, Gesichtsdysmorphien und Entwicklungsverzögerungen häufige Symptome. Eine Bestätigung dieser Erkrankung findet jedoch über die α -Mannosidase-Aktivität in Fibroblasten statt (Sun & Wolfe 2001). Diese zeigte in unserer Patientin Werte im Normbereich (54 %), womit diese Erkrankung ausgeschlossen werden konnte.

In Anbetracht des multisystemischen Phänotyps, wurde auch die Diagnostik auf *N*-Glykosylierungsdefekte mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Serumproteins Transferrin veranlasst. Die Untersuchung dieses Glykoproteins zeigte ein leichtes, aber dennoch bezeichnendes CDG-Typ II Bandenmuster.

Charakteristisch ist eine Erniedrigung des Tetrasialotransferrins bei gleichzeitiger Erhöhung der übrigen Transferrinbanden: Trisialo-, Disialo-, Monosialo-, sowie Asialotransferrin (Abbildung 9), was auf einen Defekt innerhalb der Glykanprozessierung im Golgi-Apparat hinwies. Zum Ausschluss eines übergeordneten Glykosylierungsdefekts, beispielsweise im Rahmen der O-Mucintypglykane, wurde die IEF des Apolipoproteins C-III angeschlossen. Es wurde eine Erhöhung von nicht glykosyliertem Apo-CIII₀ bei gleichzeitigem Verlust des vollständigen ApoCIII₂ detektiert, was auf einen kombinierten Defekt der N- und O-Glykosylierung in unserer Patientin schließen ließ.

Unsere massenspektrometrischen Analysen der N-Glykane aus aufgereinigten Serumtransferrin- und Gesamtserumproben, die in Kooperation mit Gernot Poschet (COS, Heidelberg) entstanden, zeigten deutlich auffällige Ergebnisse.

Bezüglich des Transferrins stellte sich vor allem eine Reduzierung diantennärer und sialylierten Komplextyp N-Glykane heraus. Auch die tetraantennäre N-Glykane und die N-Glykane des High-Mannose Typs waren erniedrigt. Im Gegensatz dazu waren die monoantennären N-Glykane erhöht. Bei Betrachtung der einzelnen Glykanstrukturen fielen Akkumulationen der verkürzten Strukturen M4, M6D1, F(6)A3GlcNAc1 und A2G(4)2S(6)1 auf, die eine Reduzierung der Transferrin N-Glykane um Sialinsäure, Galactose und zum Teil auch um N-Acetylgalactosaminreste (GlcNAc) zeigten.

Die Analyse der Gesamtserum N-Glykane dagegen ergab eine Erhöhung der asialo, der diantennären, sowie der defucosylierten Strukturen. Die größte Akkumulation zeigte das N-Glykan A2, welches um Sialinsäure- und Galactosereste verringert ist. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der N-Glykanstudien des Transferrins sowie der Gesamtserumproteine belegen, dass sich ein CDG-Defekt, je nach verwendetem Untersuchungsmaterial, sehr unterschiedlich auswirken kann. Im Rahmen der CDG Diagnostik mittels Massenspektrometrie sollte daher in Zukunft vermehrt auf eine Analyse der Proteine des Gesamtserums gesetzt werden.

Eine Akkumulation von N-Glykanen mit endständigen GlcNAc-Resten zeigte sich ebenfalls bei Patienten mit Defekten des UDP-Galactose Transporters (*SLC35A2*) oder bei Defekten der β -1,4-galactosyltransferase 1 (*B4GALT1*). *SLC35A2* ist für den Transport der UDP-Galactose aus dem Zytosol in das Lumen des Golgi-Apparats verantwortlich, wo *B4GALT1* die UDP-Galactose in β -1,4 Orientierung an endständige

GlcNAc-Reste anhängt. Ein sekundärer Effekt auf B4GALT1 kann durch einen Mangel an importiertem Mangan entstehen, dieser Mangel wird wiederum durch Defekte des Mangantransporters SLC39A8 hervorgerufen. Sanger-Sequenzierungen der entsprechenden Gene zeigten in unserer Patientin keine Varianten.

2. VERÄNDERTER GLYKOSYLIERUNGSSTATUS IN PATIENTENFIBROBLASTEN

Bei der Kultivierung der Patientenfibroblasten fielen morphologische und Wachstumsveränderungen auf, die mittels Proliferationsstudien (XCelligence) bestätigt werden konnten. Die Patientenzellen zeigten hierbei ein verlangsamtes Zellwachstum bei verlängerter Verdopplungszeit. Die Wuchsform der Zellen war dabei zugleich um den Zellkern gedrungen, mit langgestreckten Fortsätzen.

Zur Bestätigung des Glykosylierungsdefekts in Hautzellen der Patientin wurden Lektinbindestudien und Expressionsanalysen dreier Glykomarkerproteine durchgeführt. Zur Detektion verkürzter *N*-Glykane wurde Fibroblasten-Lysat mit Lektinen gegen *N*-Acetylglucosamin- (WGA), Galactose- (RCA I und MAL I) oder *N*-Acetylgalactosamin- (RCA I) oder Sialinsäurereste (SNA) inkubiert.

Während bei WGA ein reduziertes Signal (69 %) in der Patientin auffiel, war die Intensität bei RCA I (143 %), MAL I (166 %) und SNA (128 %) erhöht. Im Gegensatz zu den Analysen der *N*-Glykane zeigten sich also erhöhte Signale bei Glykanstrukturen mit Galactose-, *N*-Acetylgalactosamin- oder Sialinsäureresten während weniger *N*-Acetylglucosaminreste detektiert werden konnten. Die Analysen der drei Glykomarkerproteine LAMP2 (20 %), ICAM1 (33 %) und GP130 (26 %) zeigten zudem eine verminderte Signalstärke und bestätigen die bereits bei den Lektinanalysen festgestellten Ergebnisse und weisen im Zusammenhang auf eine generelle Fehlglykosylierung in den Patientenfibroblasten hin. Allerdings lassen sich in den Patientenfibroblasten im Vergleich zum Serum weniger stark ausgeprägte Unterschiede in der *N*-Glykosylierung nachweisen. Hierdurch lassen sich auch in diesem Fall erhebliche organspezifische Glykosylierungsabweichungen belegen. Dies erschwerte auch unsere weiterführende biochemische Diagnostik in den Fibroblasten.

3. GZF1 ALS URSACHE FÜR DAS LARSEN SYNDROM UND EINEN CDG-II DEFECT MIT BEEINTRÄCHTIGUNG DER N- UND O-GLYKOSYLIERUNG

Da die genetische Ursache für den bei der Patientin vorliegenden Defekt nicht geklärt werden konnte, wurde in Kooperation mit Uwe Kornak (Charité Berlin) ein „Whole Exome Sequencing“ (WES) durchgeführt. Hierbei wurden 53 potentielle Zielgene detektiert. Trotz der großen Anzahl an Genen war kein bekanntes, an der Proteinglykosylierung beteiligtes, Gen darunter. Die Zielgene wurden mittels Literaturrecherchen und Vergleichen der Symptome bei bekannten Patienten eingegrenzt und letztlich auf zwei reduziert.

Einer dieser Gendefekte führt zum Larsen Syndrom. Im Jahr 1950 beschrieb eine dreiköpfige Forschergruppe, um den amerikanische Kinderarzt Loren Joseph Larsen, erstmals eine Kombination zweier Phänotypen bei sechs Patienten. Seitdem werden Fälle mit multiplen, angeborenen Dislokationen und charakteristischen Gesichtsdeformationen unter dem Begriff Larsen-Syndrom zusammengefasst (Larsen et al. 1950). Als genetische Ursache konnte zuerst *FLNB* ausgemacht werden (Krakow et al. 2004). Dieses autosomal dominant vererbte Gen kodiert für das Cytoplasma Protein Filamin B, das an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt ist.

Später konnten drei weitere, autosomal rezessiv vererbte Gene in Zusammenhang mit dem Larsen Syndrom gebracht werden. Zuerst *CHST3*, welches für die Carbohydrat Sulfotransferase 3 kodiert und eine wichtige Rolle in der skeletalen Entwicklung spielt (Hermanns et al. 2008). Anschließend das für die β -1,4-Galactosyltransferase 7 kodierende Gen *B4GALT7* (Cartault et al. 2015). Diese Galactosyltransferase, die ein Schwesternenzym der CDG-verursachenden *B4GALT1* ist, bindet UDP-Galactose in β -1,4 Orientierung an Xylose, konnte selbst aber noch nicht mit angeborenen Glykosylierungsdefekten in Verbindung gebracht werden. Im Jahr 2017 folgte die Zuordnung von *GZF1* (GDNF-induzierbares Zink Finger Protein 1) (Patel et al. 2017).

Als neurotropher Faktor ist das durch *GZF1* induzierbare GDNF (*engl. glial cell line-derived neurotrophic factor*) sowohl für die biochemische und morphologische Stimulation der Differenzierung, als auch für das Überleben von Nervenzellen verantwortlich. Außerdem ist er namensgebend für die GDNF-Ligandenfamilie, welche neben GDNF die drei weiteren neurotrophen Faktoren Neurturin, Neublazin und Persephin beinhaltet (Saito et al. 2011).

Das 2003 von Fukuda et al. entdeckte GZF1 Protein ist aus einer BTB/POZ-(Broad complex, Tramtrack und Bric-a-brac)/(Poxvirus und Zink Finger) Domain und zehn sich wiederholenden C₂H₂-Zink-Fingermotiven aufgebaut (Abbildung 25)(Fukuda et al. 2003, Patel et al. 2017). BTB/POZ Sequenzen wurden bereits an N-Terminalen Enden von Transkriptionsfaktoren und Kalium-Kanal-Proteinen beschrieben und sorgen hier für die Regulation der Genexpression (Dambara et al. 2007). Zinkfingerdomänen, gekennzeichnet durch eine α -Helix und eine antiparallele β -Faltblattstruktur, können Zink-Ionen koordinativ binden. Durch die hieraus entstehende schleifenförmige Struktur der Polypeptidkette können Nukleinsäure, wie DNA oder RNA, gebunden werden. Diese Eigenschaft führt zu der Annahme, dass es sich bei den meisten Zink-Finger Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt. Die ersten sechs der zehn Zink-Finger Motive sorgen hier für die Bindung der Nukleinsäuren. Durch mehrere Studien konnte er außerdem mit der Entwicklung der Niere, genauer gesagt der Verzweigung des Ureterknospene epithels, in Verbindung gebracht werden (Fukuda et al. 2003, Morinaga et al. 2005). Neben dem Larsen Syndrom werden auch Gelenk-Beschwerden, Kleinwuchs und Kurzsichtigkeit mit Mutationen in GZF1 in Verbindung gebracht (Abbildung 25) (Patel et al. 2017).

Morphologische Gesichtsveränderungen (Mittelgesichtshypoplasie) und Gelenkannomalien (Verkrümmungen der Wirbelsäule), wie sie beim Larsen Syndrom vorkommen, sowie weitere Symptome von *GZF1* Mutationen wie Kleinwuchs und eine schwere Sehbehinderung (Hornhauttrübungen), wurden auch bei unserer Patientin diagnostiziert. Zusätzlich litt sie unter globaler Entwicklungsverzögerung, Knickplattfüßen und einem konduktivem Hörverlust.

Die in unserer Patientin durch Sanger-Sequenzierung bestätigte homozygote Mutation c.856G>T, konnten von Patel et al. bereits mit dem Larsen Syndrom in Verbindung gebracht werden (Patel et al. 2017). Die Mutation, die auf Proteinebene zu einem Stop-Codon an Position 289 führt (p.Glu289*), liegt in einem konservierten Bereich des Proteins vor den zehn Zink-Finger Domänen. Aufgrund des frühzeitigen Stop-Codons ist eine hohe Pathogenität der Mutation wahrscheinlich. Diese konnte sowohl von Patel et al., als auch durch die von uns durchgeführten Analysen der Proteinsequenz mittels verschiedener Programme bestätigt werden (Tabelle 7 im Appendix).

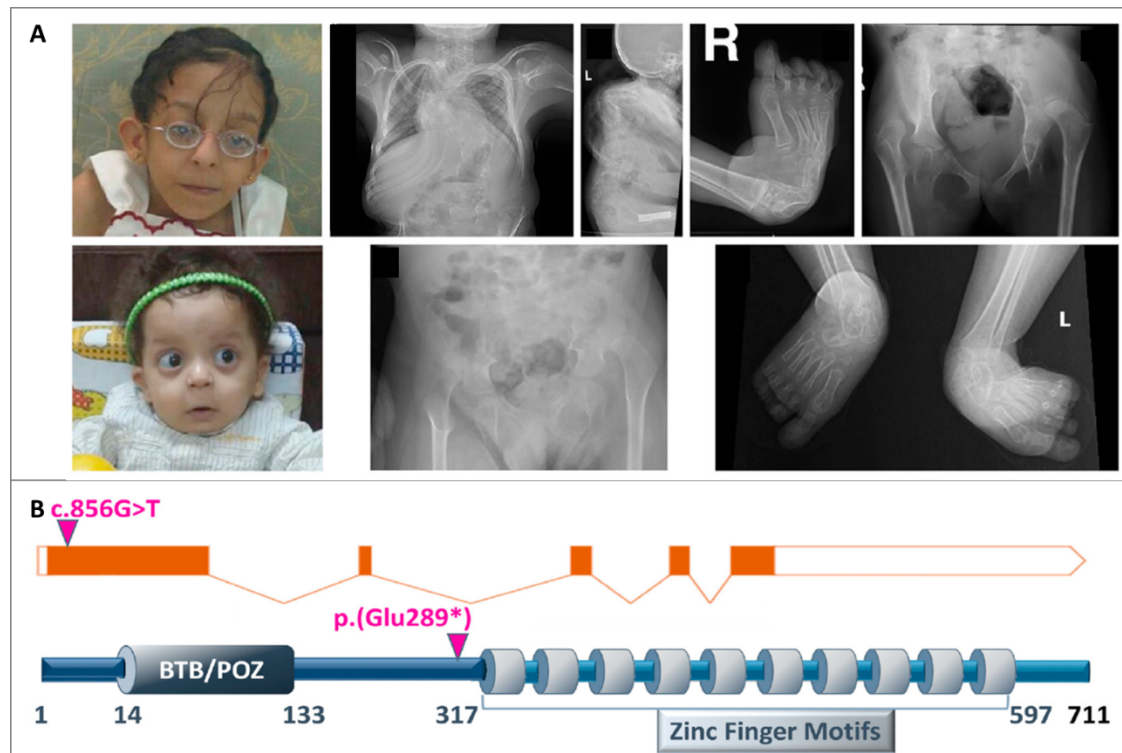


Abbildung 25: (A) Morphologische Auffälligkeiten bei zwei der fünf bisher bekannten GZF1 Patienten – Beide GZF1 Patienten tragen, ebenso wie unsere Patientin, die Mutation c.856G>T. **(B) Aufbau des GZF1 Proteins** – Lage der Mutation c.856G>T auf DNA-Ebene, sowie auf Proteinebene (p.Glu289*). Gezeigt ist auch die zwischen Aminosäure 14 und 133 sitzende BTB/POZ Domäne, sowie die zehn C-Terminal liegenden Zink-Finger Motive zwischen den Aminosäuren 317 und 597 (angepasst nach Patel et al. 2017).

Wie qRT-PCR Analysen zeigten, wirkt sich die gefundene Mutation negativ auf die Stabilität der mRNA (14 %), in unserer Patientin aus. Eine daraus resultierende Auswirkung auf die Stabilität des Proteins (22 %) konnte in Western Blot Analysen gezeigt werden. Im Vergleich zum publizierten Molekulargewicht von ca. 80 kDa bestätigten unsere Analysen eine Größe von ~ 65 kDa für GZF1 in den Kontrollen (NP_071927). Das frühzeitige Stop-Codon führt zu einem Aminosäureverlust von 50 kDa und somit theoretisch zu einer Bande bei ~ 15 kDa in der Patientin, welche allerdings nicht detektiert werden konnten. Sowohl die verminderte Signalstärke eines 65 kDa großen Proteins, als auch das Fehlen der 15 kDa Variante könnten an der verminderten Stabilität der mRNA oder des Proteins liegen. Außerdem bindet der von uns verwendete Antikörper die Aminosäuren 600 bis 650 und somit hinter der Mutation. Ein Antikörper, der zwischen den Aminosäuren 109 und 200 und somit vor der Mutation bindet, wurde ebenfalls getestet, zeigte aber keine spezifischen Bindungen im Western Blot. Das in den Kontrollen gezeigte Molekulargewicht von ~ 65 kDa könnte durch ein alternatives Start-Codon oder eine Splice-Variante entstehen. Des weiteren könnte es damit zu einer neuen Isoform führen, die für Fibroblasten spezifisch ist. Als Start-Codon käme Methionin an der Position M109 oder M132 in Frage. Dies

würde zu Proteinen mit einem Molekulargewicht von 68 kDa bzw. 65 kDa und einer Gesamtlänge von 603 bzw. 580 Aminosäuren führen.

Die Lokalisation von GZF1 wurde mittels Immunfluoreszenzaufnahmen überprüft. Auch hierbei wurde der Antikörper zwischen Aminosäure 600 und 650 verwendet, da das Signal des anderen nicht auswertbar war. Das normalerweise im Zellkern akkumulierende GZF1 zeigte in der Patientin kein Signal im Nukleus. Eine unspezifische Färbung des Zytosols war in den Kontroll- und Patientenzellen zu sehen. Die Lokalisation von GZF1 im Zellkern lässt auf seine Funktion als Transkriptionsfaktor schließen. Die fehlende Expression im Zellkern, bzw. der gestörte Transport von GZF1 in den Zellkernen unserer Patientin könnte die DNA-Transkription beeinflussen.

Um zu klären, ob die Expression von wildtypischem GZF1 in den Patientenzellen die Glykosylierung auf ein normales Niveau hebt, wurden Fibroblasten mit *GZF1* komplementiert und anschließend biochemisch charakterisiert. Neben dem Vektor mit eingebrachtem *GZF1* wurde auch ein Leervektor (Mock) verwendet, um einen Effekt des Vektors auf die Versuche auszuschließen. Zur Charakterisierung wurden Immunfluoreszenzaufnahmen und Expressionsanalysen mittels Western Blot durchgeführt. In den Immunfluoreszenzen der Kontrollen war die Färbung des Zellkerns bei eingebrachtem GZF1 verstärkt. Dagegen zeigte sich ausschließlich in den *GZF1* komplementierten Patientenzellen eine Färbung des Zellkerns.

Auch die Signalstärke in den Patientenzellen, nach dem Einbringen von GZF1, stieg deutlich auf 230 % bzw. 97 % an. Der Anstieg war auch in den mit *GZF1* komplementierten Kontrollzellen (626 % bzw. 648 %) zu sehen und durch die Überexpression erklärbar. Die mit dem Leervektor komplementierten Patientenzellen wiesen eine geringe Erhöhung der Signalstärke auf, die mit 21 % bzw. 13 % allerdings unter den zuvor in den Kontrollzellen gemessenen 22 % blieb (Abbildung 17A). Mit 266 % war die Signalstärke von GZF1 in den mit dem Leervektor komplementierten Kontrollzellen stark erhöht, allerdings nur halb so stark, wie in den mit *GZF1* komplementierten Kontrollen.

Die Komplementation der Patientenfibroblasten mit wildtypischem GZF1 konnte somit bewiesen werden. Dabei wurde die Lokalisation im Zellkern wiederhergestellt, während eine (Über-) Expression des Proteins vorlag. In der Summe resultiert die virale Komplementation der Patientenfibroblasten mit GZF1 in einem Anstieg der GZF1-Expression.

Um den Glykosylierungsstatus der komplementierten Fibroblasten zu überprüfen, wurden daher Western Blot Analysen der Glykomarkerproteine LAMP2 und GP130 durchgeführt.

Das Markerprotein GP130 zeigte in den Kontrollproben ein gleichbleibendes Bandenmuster bei 120 kDa. Dabei war die Signalstärke sowohl in der mit dem Leervektor behandelte Probe (178 %), als auch in den mit GZF1 komplementierten Proben (179 % und 247 %), erhöht. Der Ausgangswert der nicht komplementierten Patientenprobe lag bei 20 % und lies kein Bandenmuster erkennen. Eine vergleichbare Signalstärke zeigte die zweite, mit dem Leervektor behandelte Patientenprobe, bei der die Signalstärke allerdings erhöht bei 77 % lag. Die drei übrigen Proben komplementierter Patientenfibroblasten zeigten ein diffuses Bandenmuster bei 110 kDa und verbunden damit eine erhöhte Signalstärke. Durch die beiden mit *GZF1* inzidierten Proben (278 % und 237 %) zeigte sich hierbei eine Veränderung des Glykosylierungsstatus. Dieses Ergebnis wurde jedoch durch die erhöhte Signalstärke in der ersten Leervektor-Probe (210 %) relativiert.

Auch bei LAMP2 unterschieden sich die Bandenmuster von Kontrolle und Patientin vor der Infektion mit wildtypischem GZF1. In den komplementierten Kontrollproben war die Signalstärke von LAMP2 mit 110 % (Leervektor) und 110 % bzw. 112 % (mit GZF1) leicht erhöht. Während in allen Kontrollen eine Bande bei 58 kDa nachweisbar war, fehlte in der Patientin diese klare Bande. Trotzdem zeigten quantitative Analysen eine Signalstärke von über 50 %, die durch ein diffus verteiltes Signal entstand. Wie schon bei GP130 zeigte die zweite, mit dem Leervektor behandelte, Patientenprobe auch bei der Detektion von LAMP2 ein, mit der nicht komplementierten Patientenprobe, vergleichbares Bandenmuster, bei dem die Signalstärke sogar auf 40 % verringert war. Dagegen zeigte die erste, mit dem Leervektor komplementierte Patientenprobe, eine Erhöhung der Signalstärke auf 65 %. Obwohl auch bei 58 kDa keine klare Bande zu sehen war erschien eine neue Bande bei ca. 55 kDa. Eine Beeinflussung der Quantifizierung durch das Abstrahlen dieser neuen Bande kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sowohl eine kontrollähnliche Bande, als auch einen Anstieg der Signalstärke, konnte bei beiden mit GZF1 komplementierten Patientenproben gemessen werden (89 % bzw. 72 %).

Neben dem Nachweis des eingebrachten, exprimierten GZF1 konnte ebenfalls ein Effekt auf die Glykosylierungsmarker GP130 und LAMP2 aufgezeigt werden. Dieser

ist allerdings Aufgrund des veränderten Musters wie Molekulargewichts in der zweiten Patientenprobe mit Leervektor nicht vollständig mit der Kontrolle vergleichbar. Obwohl die Komplementation funktionierte, zeigte GZF1 in den behandelten Zellen eine zu starke Expression. Da diese deutlich über der endogenen Expression lag, können auch schädliche Auswirkungen auf die Glykosylierung in den Zellen, oder auf die Zelle selbst, nicht ausgeschlossen werden (Moriya 2015).

4. EINFLUSS EINER ZWEITEN MUTATION AUF DEN GLYKOSYLIERUNGSDEFEKT

Da ein zusätzlicher Defekt in der Glykosylierung weiterhin nicht ausgeschlossen werden konnte, rückte auch das zweite potentielle Zielgen aus der WES in den Fokus unserer Untersuchungen.

Die bereits beschriebenen Defekte im „*Vacuolar Protein Sorting 45 Homolog*“ Protein (VPS45) wurden mit Symptomen des SCN Syndroms („Severe congenital neutropenia“) in Beziehung gebracht (Vilboux et al. 2013). Hierzu zählen neben der Verminderung der neutrophilen Granulozyten, die Neutrophilendysfunktion, die Knochenmarkfibrose, ebenso wie die Nephromegalie. Diese Symptome lassen sich allerdings bislang nicht in unserer Patientin finden.

Durch seine Funktion im Vesikeltransport interagiert der COG-Komplex mit einer Vielzahl an assoziierten Proteinen, wie beispielsweise den SNARE-Proteinen. Diese wiederum interagieren mit Proteinen der Sec1/Munc18-Familie (SM-Proteine) bei der Membranfusion von Vesikeln (Jahn et al. 2003). VPS45 ist einer von vier Typen der SM-Proteine und somit an der Endozytose beteiligt (Gengyo-Ando et al., 2007). Es bildet zusammen mit dem SNARE-Protein Syntaxin16 einen Komplex, der mit den COG-Untereinheiten COG4 und COG7 (Fisher & Ungar 2016) sowie COG8 (Willett et al. 2013) zusammenarbeitet.

Der COG-Komplex reguliert neben dem intra-Golgi Transport, auch den retrograden Transport zwischen Golgi und ER und ist an der Modifikation von Glykoproteinen beteiligt (Abbildung 26A) (Peanne et al. 2018, Ungar et al. 2005). Zur Anheftung und Verschmelzung von Vesikeln interagiert er dabei mit SNARE-Proteinen (SNAP Rezeptoren, oder „*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*“), Rab GTPasen („*Ras-related in brain*“), Coiled-Coil Tethers und den Hüllproteinen von COP1-Vesikeln (Abbildung 26B B) (Climer et al. 2018).

Der im Zytosol lokalisierte Komplex (Oka et al. 2004) ist aus acht Untereinheiten (COG1-8) aufgebaut und bildet zwei Schleifen (Lobe A und B) aus (Abbildung 26C) (Lupashin & Ungar 2008). Während sowohl COG2-4, wie auch COG5-7 heterotrimere Strukturen ausbilden, verbinden COG1 und COG8 als Heterodimer die beiden Schleifen miteinander (Oka et al. 2005, Ungar et al. 2005).

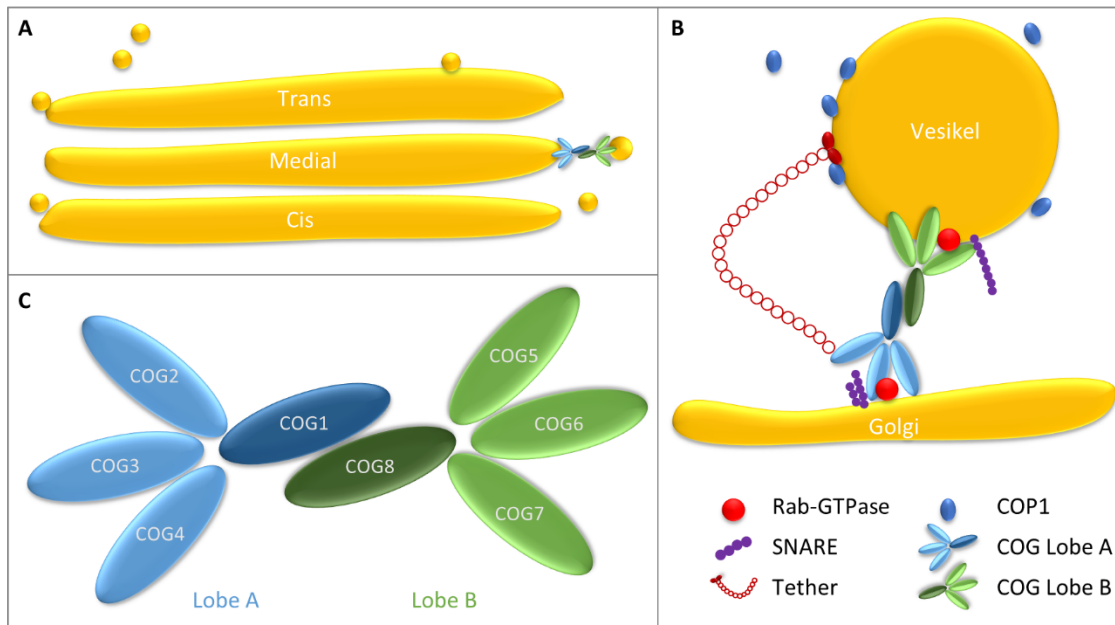


Abbildung 26: Lokalisation, Funktion und Aufbau des COG-Komplex – (A) Regulation des intra-Golgi Transports von Vesikeln durch den COG-Komplex, sowie (B) seine Zusammenarbeit mit verschiedenen Proteinen bei der Exozytose von Vesikel. (C) Der COG-Komplex ist aus zwei Schleifen („Lobe A“ und „LobeB“) aufgebaut, die jeweils aus vier Untereinheiten bestehen. Je drei Untereinheiten (COG2-4 und COG5-7) bilden Heterotrimere, die von COG1 und COG8 verbunden und stabilisiert werden. (A&B) bearbeitet nach Climer et al. 2018, (C) nach Fisher & Ungar 2016.

Seit der Entdeckung des ersten Glykosylierungsdefekts in einer Untereinheit des „Conserved Oligomeric Golgi“ (COG-) Komplexes im Jahr 2004 (Wu et al. 2004) wurden über 70 Patienten mit unterschiedlichen COG-CDG Erkrankungen diagnostiziert (Blackburn et al. 2019). Mit Ausnahme von COG3 wurden dabei Defekte in sieben der acht Untereinheiten beschrieben. Die Patienten eint ein kombinierter Defekt der N- und O-Glykosylierung und ein für CDG typisches multisystemisches Krankheitsbild mit Entwicklungsverzögerung und neurologischen Veränderungen. Häufig treten außerdem Hypotonie, Anfälle und dysmorphe Merkmale auf (siehe **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Der Krankheitsverlauf kann von milden Formen bis hin zum frühen postnatalen Tod reichen. Auffällig in der biochemischen Charakterisierung der COG-Defekte ist die Fehlregulierung des gesamten Lobes bei lediglich einer betroffenen Untereinheit. So sind bei einem Defekt in COG6 auch die Untereinheiten COG5 und COG7 betroffen (Lubbehusen et al.

2010). Bei COG8-Defekten ergibt sich zudem eine generelle Destabilisierung des ganzen Lobes B (Climer et al. 2015).

Tabelle 2: Übersicht über die aktuell beschriebenen COG-Defekte, ihre Referenznummer der „Online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM), häufig auftretende Symptome, sowie deren Erstbeschreibungen.

Defekt	OMIM	Entwicklungs- verzögert	Wachstums- verzögert	Hypotonie	Neurologische Veränderungen	Mikrozephalie	Anfälle	Dysmorphe Merkmale	Hepato-/ Splenomegalie	Literatur
COG1-CDG	611209	+	+	+	+	+		+	+	(Foulquier et al. 2006) (Zeevaert et al. 2008)
COG2-CDG	617395	+			+	+	+			(Kodera et al. 2015)
COG4-CDG	613489	+	+	+	+		+	+	+	(Reynders et al. 2009) (Ng et al. 2011)
COG5-CDG	613612			+	+					(Paesold-Burda et al. 2009)
COG6-CDG	614576	+			+	+	+	+	+	(Lubbehusen et al. 2010) (Rymen et al. 2015)
COG7-CDG	608779	+	+	+	+	+	+	+	+	(Wu et al. 2004) (Zeevaert et al. 2008)
COG8-CDG	611182	+		+	+		+	+		(Foulquier et al. 2007) (Kranz et al. 2007)

Die Assoziation von VPS45 mit dem COG-Komplex, der kombinierte N- und O-Glykosylierungsdefekt sowie die Fehlregulierung der neutrophilen Granulozyten in unserer Patientin wiesen auf VPS45 als potentiell zweites Zielgen hin. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte die homozygote Mutation c.1174g>a im VPS45-Gen unserer Patientin bestätigt werden. Diese Mutation liegt in einem hoch konservierten Bereich des Proteins und führt darüber hinaus zum Aminosäureaustausch p.Ala392Thr. Die biochemischen Auswirkungen dieser Variante sind unklar, obwohl diese Variante bereits in der Datenbank zu finden ist (Nykamp et al. 2017). Auch durch die von uns verwendeten Analyseprogramme konnte keine klare Aussage über die Pathogenität der Mutation getroffen werden. Vilboux et al. veröffentlichten 2013 sieben VPS45 Patienten mit den homozygoten Mutationen p.Thr224Asn oder p.Glu238Lys (Vilboux et al. 2013). Trotz normalen mRNA-Leveln konnten sie eine verringerte Menge an Protein in den Patienten nachweisen. Auch die Lokalisation von VPS45 in Fibroblasten war verändert. Während in der Kontrolle eine kernnahe und in Vesikeln akkumulierte Färbung vorlag, war sie bei dem untersuchten Patienten diffus verteilt.

Unsere Überprüfungen zeigten dagegen eine schwache Auswirkung der Patientenmutation p.Ala392Thr auf die mRNA-Transkriptmenge (79 %), während die Proteinsignalstärke von VPS45 in den Patientinfibroblasten auf 127 % erhöht war. Die Überprüfung der Lokalisation zeigte ein identisches Bild in Kontroll- und Patientinfibroblasten. Wie bei Vilboux et al. publiziert, zeigte sich die VPS45-Verteilung im Zytosol, die in Kernnähe verstärkt ist. Eine Akkumulation in Vesikeln konnte allerdings weder in unseren Patienten- noch in den Kontrollfibroblasten ausgemacht werden.

Um den Zusammenhang zwischen VPS45 und dem COG-Komplex im Hinblick auf den Glykosylierungsdefekt unserer Patientin näher zu untersuchen, wurden die COG-Untereinheiten COG4, COG7 und COG8 (Fisher & Ungar 2016, Willett et al. 2013) auf Transkript- und Proteinebene überprüft. Die Überprüfung der mRNA-Expression zeigte Verringerungen bei allen drei Untereinheiten (COG4 53 %, COG7 53 % und COG8 26 %). Western Blot Analysen der Proteinexpression betätigten die daraus resultierende Verminderung der Signalstärken bei COG4 (83 %) und COG7 (64 %). Interessanterweise ergab sich bei COG8, das zusammen mit COG1 die Lobes A und B verbindet, ein starker entgegenwirkender Effekt und war auf 196 % erhöht, was auf eine generelle Problematik in der Assemblierung des COG-Komplexes hinweist.

Da primäre COG-Defekte mit schweren Störungen der *N*- und *O*-Glykosylierung in Verbindung stehen (Peanne et al., 2018), vermuten wir im Falle unserer Patientin eine sekundäre Beeinflussung im Proteinsorting der Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat aufgrund der detektierten Auffälligkeiten im COG-Komplex.

Zusammenfassend lässt sich der schwere multisystemische Phänotyp unserer Patienten vermutlich auf biallelische Varianten in GZF1 und VPS45 zurückführen. Diese einzigartige Mutationslage unserer Patientin verbindet zum allerersten Mal das Larsen Syndrom mit den angeborenen Glykosylierungsdefekten (CDG).

G. Ausblick

Die in unserer Patientin vorliegende kombinierte *N*- und *O*-Glykosylierungsstörung liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in den von uns detektierten homozygoten Varianten in den Genen *GZF1* und *VPS45* begründet.

Im Gegensatz zu *GZF1* konnte der krankheitsauslösende Mechanismus vom mutierten *VPS45* nicht endgültig bewiesen werden. Hierzu wäre das Einbringen des gesunden Gens mittels viraler Partikel in Patientenfibroblasten bzw. das Einbringen der Mutationen in Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen mittels CRISPR/Cas mit anschließender neuer biochemischer Charakterisierung nötig.

Eine Kontaktaufnahme mit dem Institut für Genetik, welches die übrigen *GZF1*-Patienten publiziert hat, verlief leider erfolglos, so dass momentan weder eine biochemische Diagnostik in Bezug auf die *N*- und *O*-Glykosylierung, noch eine genetische Analyse im Hinblick auf *VPS45* bei diesen Patienten durchgeführt werden kann.

Da die Patientin insbesondere Verkürzungen um Galaktose- und nachfolgend Sialinsäureresten in ihren *N*-Glykanen aufweist, stellt die orale Supplementation mit Galaktose einen potentiellen Therapieansatz dar. Hierdurch wird nachweislich der UDP-Galaktosespiegel im Cytosol der Zellen angehoben, wodurch sich zum Teil sehr gute Behandlungsergebnisse bei galaktoseassoziierten CDG-Defekten erzielen lassen. Diese Zuckersupplementation wird beispielsweise bei *PGM1*-, *TMEM165*-, *SLC35A2*- und *SLC39A8*-CDG seit mehreren Jahren angewendet und könnte auch bei unserer Patientin zu einer Abmilderung einiger ihrer Symptome führen.

H. Referenzen

- Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, et al. 1999. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconjugate journal* 16: 669-71
- Albuquerque-Wendt A, Hutte HJ, Buettner FFR, Routier FH, Bakker H. 2019. Membrane Topological Model of Glycosyltransferases of the GT-C Superfamily. *Int J Mol Sci* 20
- An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. 2009. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol* 13: 421-6
- Anand M, Rush JS, Ray S, Doucey M-A, Weik J, et al. 2001. Requirement of the Lec35 Gene for All Known Classes of Monosaccharide-P-Dolichol-dependent Glycosyltransferase Reactions in Mammals. *Molecular Biology of the Cell* 12: 487-501
- Blackburn JB, D'Souza Z, Lupashin VV. 2019. Maintaining order: COG complex controls Golgi trafficking, processing, and sorting. *FEBS Lett* 593: 2466-87
- Cartault F, Munier P, Jacquemont M-L, Vellayoudom J, Doray B, et al. 2015. Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome. *Eur J Hum Genet* 23: 49-53
- Climer LK, Dobretsov M, Lupashin V. 2015. Defects in the COG complex and COG-related trafficking regulators affect neuronal Golgi function. *Front Neurosci* 9: 405-05
- Climer LK, Hendrix RD, Lupashin VV. 2018. Conserved Oligomeric Golgi and Neuronal Vesicular Trafficking. *Handb Exp Pharmacol* 245: 227-47
- Dambara A, Morinaga T, Fukuda N, Yamakawa Y, Kato T, et al. 2007. Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Experimental Cell Research* 313: 3755-66

- Defaus S, Gupta P, Andreu D, Gutierrez-Gallego R. 2014. Mammalian protein glycosylation--structure versus function. *Analyst* 139: 2944-67
- Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. 2010. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol* 2010: 148178
- Dörre K, Olczak M, Wada Y, Sosicka P, Grüneberg M, et al. 2015. A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38: 931-40
- Eklund EA, Sun L, Yang SP, Pasion RM, Thorland EC, Freeze HH. 2006. Congenital disorder of glycosylation Ic due to a de novo deletion and an hALG-6 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 755-60
- Endo T. 2004. Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconjugate Journal* 21: 3-7
- Fisher P, Ungar D. 2016. Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. *Front Cell Dev Biol* 4: 15
- Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, et al. 2012. TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 91: 15-26
- Foulquier F, Ungar D, Reynders E, Zeevaert R, Mills P, et al. 2007. 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* 16: 717-30
- Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, et al. 2006. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3764-9
- Fukuda N, Ichihara M, Morinaga T, Kawai K, Hayashi H, et al. 2003. Identification of a novel glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible gene required for renal branching morphogenesis. *J Biol Chem* 278: 50386-92

-
- Hauptle MA, Pujol FM, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis AJ, et al. 2008. Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. *Am J Hum Genet* 82: 600-6
- Hanßke B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Höning S, et al. 2002. Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine β -1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type II_d. *Journal of Clinical Investigation* 109: 725-33
- Harms H, Zimmer K-P, Kurnik K, Bertele-Harms R, Weidinger S, Reiter K. 2002. Oral mannose therapy persistently corrects the severe clinical symptoms and biochemical abnormalities of phosphomannose isomerase deficiency. *Acta Paediatrica* 91: 1065-72
- Helenius J, Aebi M. 2002. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13: 171-78
- Hermanns P, Unger S, Rossi A, Perez-Aytes A, Cortina H, et al. 2008. Congenital joint dislocations caused by carbohydrate sulfotransferase 3 deficiency in recessive Larsen syndrome and humero-spinal dysostosis. *American journal of human genetics* 82: 1368-74
- Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, et al. 1998. Kinetic Analysis of Secretory Protein Traffic and Characterization of Golgi to Plasma Membrane Transport Intermediates in Living Cells. *The Journal of Cell Biology* 143: 1485-503
- Holdener BC, Haltiwanger RS. 2019. Protein O-fucosylation: structure and function. *Curr Opin Struct Biol* 56: 78-86
- Ihara Y, Inai Y, Ikezaki M, Matsui I-SL, Manabe S, Ito Y. 2015. C-Mannosylation: Modification on Tryptophan in Cellular Proteins In *Glycoscience: Biology and Medicine*, ed. N Taniguchi, T Endo, GW Hart, PH Seeberger, C-H Wong, pp. 1091-99. Tokyo: Springer Japan

-
- Imle R, Wang BT, Stutzenberger N, Birkenhagen J, Tandon A, et al. 2019. ADP-dependent glucokinase regulates energy metabolism via ER-localized glucose sensing. *Sci Rep* 9: 14248
- Jaeken J. 2003. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis* 26: 99-118
- Jaeken J. 2013. Chapter 179 - Congenital disorders of glycosylation In *Handbook of Clinical Neurology*, ed. O Dulac, M Lasseonde, HB Sarnat, pp. 1737-43: Elsevier
- Jaeken J, Hennet T, Freeze H, Matthijs G. 2008. On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG). *Journal of inherited metabolic disease* 31: 669-72
- Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. 2009. CDG nomenclature: time for a change! *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1792: 825-26
- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, et al. 1980. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?: 90. *Pediatric Research* 14: 179-79
- Jahn R, Lang T, Südhof TC. 2003. Membrane Fusion. *Cell* 112: 519-33
- Janssen MJ, Waanders E, Woudenberg J, Lefeber DJ, Drenth JP. 2010. Congenital disorders of glycosylation in hepatology: the example of polycystic liver disease. *J Hepatol* 52: 432-40
- Kimizu T, Takahashi Y, Oboshi T, Horino A, Koike T, et al. 2017. A case of early onset epileptic encephalopathy with de novo mutation in SLC35A2: Clinical features and treatment for epilepsy. *Brain Dev* 39: 256-60
- Knauer RL, L. 1999. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 259 - 73

-
- Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, et al. 2015. Mutations in COG2 encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation. *Clin Genet* 87: 455-60
- Krakow D, Robertson SP, King LM, Morgan T, Sebald ET, et al. 2004. Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nat Genet* 36: 405-10
- Kranz C, Ng BG, Sun L, Sharma V, Eklund EA, et al. 2007. COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Hum Mol Genet* 16: 731-41
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227: 680
- Larsen LJ, Schottstaedt ER, Bost FC. 1950. Multiple congenital dislocations associated with characteristics facial abnormality. *The Journal of Pediatrics* 37: 574-81
- Lehrman MA. 2007. Teaching dolichol-linked oligosaccharides more tricks with alternatives to metabolic radiolabeling. *Glycobiology* 17: 75R-85R
- Lowenthal MS, Davis KS, Formolo T, Kilpatrick LE, Phinney KW. 2016. Identification of Novel N-Glycosylation Sites at Noncanonical Protein Consensus Motifs. *J Proteome Res* 15: 2087-101
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75
- Lubbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen BH, et al. 2010. Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet* 19: 3623-33
- Lupashin V, Ungar D. 2008. COG complex In *The Golgi Apparatus: State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery*, ed. AA Mironov, M Pavelka, pp. 120-29. Vienna: Springer Vienna

-
- Marklova E, Albahri Z. 2007. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 385: 6-20
- Marquardt T, Lühn K, Srikrishna G, Freeze HH, Harms E, Vestweber D. 1999. Correction of Leukocyte Adhesion Deficiency Type II With Oral Fucose. *Blood* 94: 3976-85
- Marth JD, Grewal PK. 2008. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 874-87
- Medzihradzky KF. 2008. Characterization of Site-specific N-Glycosylation In *Post-translational Modifications of Proteins: Tools for Functional Proteomics*, ed. C Kannicht, pp. 293-316. Totowa, NJ: Humana Press
- Mention K, Lacaille F, Valayannopoulos V, Romano S, Kuster A, et al. 2008. Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol Genet Metab* 93: 40-3
- Morava E. 2014. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Mol Genet Metab* 112: 275-9
- Morelle W, Potelle S, Witters P, Wong S, Climer L, et al. 2017. Galactose Supplementation in Patients With TMEM165-CDG Rescues the Glycosylation Defects. *J Clin Endocrinol Metab* 102: 1375-86
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 448-62
- Morinaga T, Enomoto A, Shimono Y, Hirose F, Fukuda N, et al. 2005. GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region. *Nucleic Acids Res* 33: 4191-201
- Moriya H. 2015. Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular biology of the cell* 26: 3932-39

-
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73
- Munster AK, Eckhardt M, Potvin B, Muhlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R. 1998. Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9140-5
- Murray S, Nilsson CL, Hare JT, Emmett MR, Korostelev A, et al. 2006. Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry. *J Virol* 80: 6171-6
- Ng BG, Buckingham KJ, Raymond K, Kircher M, Turner EH, et al. 2013. Mosaicism of the UDP-galactose transporter SLC35A2 causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 92: 632-6
- Ng BG, Freeze HH. 2018. Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders. *Trends Genet* 34: 466-76
- Ng BG, Sharma V, Sun L, Loh E, Hong W, et al. 2011. Identification of the first COG-CDG patient of Indian origin. *Mol Genet Metab* 102: 364-7
- Ng BG, Xu G, Chandy N, Steyermark J, Shinde DN, et al. 2018. Biallelic Mutations in FUT8 Cause a Congenital Disorder of Glycosylation with Defective Fucosylation. *The American Journal of Human Genetics* 102: 188-95
- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Korner C, Schiebe-Sukumar M, et al. 1998. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 101: 1414-20
- Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, et al. 2017. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* 19: 1105-17
- Ohtsubo K, Marth JD. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-67

- Oka T, Ungar D, Hughson FM, Krieger M. 2004. The COG and COPI complexes interact to control the abundance of GEARs, a subset of Golgi integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 15: 2423-35
- Oka T, Vasile E, Penman M, Novina CD, Dykxhoorn DM, et al. 2005. 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* 280: 32736-45
- Paesold-Burda P, Maag C, Troxler H, Foulquier F, Kleinert P, et al. 2009. Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet* 18: 4350-6
- Park JH, Hogrebe M, Grüneberg M, DuChesne I, von der Heiden AL, et al. 2015. SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation. *American journal of human genetics* 97: 894-903
- Patel N, Shamseldin HE, Sakati N, Khan AO, Softa A, et al. 2017. GZF1 Mutations Expand the Genetic Heterogeneity of Larsen Syndrome. *American journal of human genetics* 100: 831-36
- Peanne R, de Lonlay P, Foulquier F, Kornak U, Lefeber DJ, et al. 2018. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet* 61: 643-63
- Pitti T, Chen CT, Lin HN, Choong WK, Hsu WL, Sung TY. 2019. N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding. *Sci Rep* 9: 15975
- Ramaekers V, Stibler H, Kint J, Jaeken J. 1991. A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome. *Journal of inherited metabolic disease* 14: 385-88
- Reynders E, Foulquier F, Leao Teles E, Quelhas D, Morelle W, et al. 2009. Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum Mol Genet* 18: 3244-56
- Rymen D, Winter J, Van Hasselt PM, Jaeken J, Kasapkara C, et al. 2015. Key features and clinical variability of COG6-CDG. *Mol Genet Metab* 116: 163-70

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Sairam MR. 1989. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB* 3: 1915-26
- Saito S, Murakumo Y, Tsuzuki T, Dambara A, Kato T, et al. 2011. Analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. *Hum Pathol* 42: 848-58
- Sambrook J. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001.
- Schrapers E, Tegtmeyer L, Simic-Schleicher G, Debus V, Reunert J, et al. 2015. News on clinical details and treatment in PGM1-CDG. *JIMD reports* 26
- Schulz BL. 2012. Beyond the Sequon: Sites of N-Glycosylation In *Glycosylation*
- Sears PW, C.-H. 1998. Enzyme action in glycoprotein synthesis. *CMLS* 54: 223 - 52
- Shental-Bechor DL, Y. 2008. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *PNAS* 105: 8256 - 61
- Smith RD, Lupashin VV. 2008. Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. *Carbohydr Res* 343: 2024-31
- Sparks SE, Krasnewich DM. 1993. Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation and Multiple Pathway Overview In *GeneReviews((R))*, ed. MP Adam, HH Ardinger, RA Pagon, SE Wallace, LJH Bean, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- Spiro RG. 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and diseaseimplications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12: 43 - 56

-
- Stancheva-Ivanova MK, Wuyts W, van Hul E, Radeva BI, Vazharova RV, et al. 2011. Clinical and molecular studies of EXT1/EXT2 in Bulgaria. *J Inherit Metab Dis* 34: 917-21
- Sun H, Wolfe JH. 2001. Recent progress in lysosomal α -mannosidase and its deficiency. *Experimental & Molecular Medicine* 33: 1-7
- Supraha Goreta S, Dabelic S, Dumic J. 2012. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochemia medica: Biochemia medica* 22: 156-70
- Tatu U, Helenius A. 1997. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 136: 555-65
- Tran DT, Ten Hagen KG. 2013. Mucin-type O-glycosylation during development. *J Biol Chem* 288: 6921-9
- Trombetta ES. 2003. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 13: 77R-91
- Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM. 2005. Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. *J Biol Chem* 280: 32729-35
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 151-208
- van Tol W, Ashikov A, Korsch E, Abu Bakar N, Willemsen MA, et al. 2019. A mutation in mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 reveals clinical symptoms of congenital disorders of glycosylation type I and dystroglycanopathy. *JIMD reports* 50: 31-39
- Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3: 97 - 130
- Varki AC, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E. 2009. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Vilboux T, Lev A, Malicdan MCV, Simon AJ, Järvinen P, et al. 2013. A Congenital Neutrophil Defect Syndrome Associated with Mutations in VPS45. *New England Journal of Medicine* 369: 54-65
- Willett R, Kudlyk T, Pokrovskaya I, Schonherr R, Ungar D, et al. 2013. COG complexes form spatial landmarks for distinct SNARE complexes. *Nat Commun* 4: 1553
- Wopereis S, Grunewald S, Morava E, Penzien JM, Briones P, et al. 2003. Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem* 49: 1839-45
- Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, et al. 2004. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 10: 518-23
- Yamamoto H, Awada C, Hanaki H, Sakane H, Tsujimoto I, et al. 2013. The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *J Cell Sci* 126: 2931-43
- Zeevaert R, Foulquier F, Jaeken J, Matthijs G. 2008. Deficiencies in subunits of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex define a novel group of Congenital Disorders of Glycosylation. *Mol Genet Metab* 93: 15-21

I. Appendix

Tabelle 3: Ergebnisse der Blut- und Urinuntersuchungen der Patientin. – Werte außerhalb des Referenz-Bereichs sind rot gefärbt. ↑ = erhöht, ↓ = erniedrigt.

Allgemeines Labor		
Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
Natrium (ISE)	146 ↑	135 – 145 mmol/l
Kalium (ISE)	3,44 ↓	3,5 – 4,8 mmol/l
Calcium	2,26	2,1 – 2,65 mmol/l
Phosphat	1,67	0,95 – 1,85 mg/dl
Kreatinin	0,34	0,3 – 1,0 mg/dl
Harnstoff	34	- <45 mg/dl
GOT/AST	30	- <39 U/l
Albumin quant.	42,7	37 – 51 g/l
CRP	<2,0	- <5 mg/l
INR	1,05	- < 1,2
Quick	89,4	70 – 125%
aPTT	26,6	- <35 s
Lipämie	-	
Ikterisch	-	
Hämolyse	-	
Fib. (Clauss) Fibrinogen	1,02 ↓	1,7 – 4,5 g/l
Speziallabor		
Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
ATIII	107,3	80 – 120 %
Hämatologisches Labor		
Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
Leukozyten	12,96	4,5 – 13,0 /nl
Erythrozyten	2,6 ↓	4 – 5,2 /pl
Hämoglobin	8,0 ↓	11,5 – 15 g/dl
Haematokrit	0,220 ↓	0,33 – 0,40 l/l
MCV	83	69 – 95 fl
MCH	30	25 – 35 pg
MCHC	36	30 – 36 g/dl
RDW	14,2	12,9 – 18,7 %
Thrombozyten	137 ↓	180 – 530 /nl
Hypochr. Erythrozyten	0,3	0 – 2%
Neutrophile Granulozyten (mech.)	87,3 ↑	50 – 80 %
Lymphozyten (mech.)	10,0 ↓	25 – 40 %
Monozyten (mech.)	2,0	2 – 9 %
Eosinophile Granulozyten (mech.)	0,4 ↓	2 – 4 %
Basophile Granulozyten	0,1	- < 1 %
Lymphozyten (abs.)	1,2	1,0 – 4,8 /nl
Monozyten (abs.)	0,2	0,2 – 0,8 /nl
Eosinophile Granulozyten (abs.)	0,0	- < 0,5 /nl
Basophile Granulozyten (abs.)	0,01	- < 0,2 /nl

Neutrophile Granulozyten (abs.)	10,6 ↑	1,8 – 7,7 /nl
Atypische Lymphozyten neophil	0	%
Atypische Lymphozyten reakt.	0	%

Hämatologisches Speziallabor

Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
Leukozyten	9,71	4,5 – 13,0 /ml
Erythrozyten	3,18 ↓	4 – 5,2 /pl
Haemoglobin	9,4 ↓	11,5 – 15 g/dl
Haematokrit	0,290 ↓	0,33 – 0,40 l/l
MCV	89,9	69 – 95 fl
MCH	29,6	25 – 35 pg
MCHC	32,9	30 – 36 g/dl
MPV	8,1	7 – 12 fl
RDW	15,0	12,9 – 18,7 %
Retikulozyten	52,9 ↑	5 – 15 ‰
Thrombozyten	613 ↑	180 – 530 /nl
Eosinophile Granulozyten	0 ↓	2 – 4 %
Basophile Granulozyten	0	0 – 1 %
Promyelozyten	0	- 0 %
Melozyten	0	- 0 %
Metamelozyten	0	- 0 %
Stabk. Granulozyten	3	3 - 10 %
Seg. Granulozyten	52	50 - 70 %
Lymphozyten	42	30 - 70 %
Monozyten	3	0 - 8 %
Blasten	0	- 0 %
Diverse Zellen	0	0 – 3 %
Plasmazellen	0	0 – 1 %

Endokrinologisches Labor

Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
TSH	1,84	0,7 – 3,7 mU/l
T3	1,09 ↓	1,18 – 2,14 ng/ml
T4	77,31	60,61 – 117,02 ng/ml
FT4	8,42	7,5 – 18,7 ng/l
IGF1	125	99 – 376 ng/ml
IGF1-BP3	3,36	1,88 – 3,94 mg/l

Kapilläre Blut-/Blutgaswerte

Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
pH	7,28 ↓	7,37 – 7,45
pCO ₂	38	35 – 50 mmHg
pO ₂	81	mmHg
BE/Std.	-8,6 ↓	-2 - +3 mmol/L
BE/akt.	-5,6 ↓	-2 - +3 mmol/L
Kalium	3,24 ↓	3,6 – 4,8 mmol/L
Natrium	140	135 - 145 mmol/L
Calcium	1,24	1,15 – 1,35 mmol/L
Chlorid	109 ↑	95 - 105 mmol/L

Bilirubin	0,50	- 1,0 mg/dl
CO-Hb	1,7	- <2,0 %
Met-Hb	0,6	- <1,5 %
Hämoglobin	8,2 ↓	11,5 – 15 g/dl
Glucose	46	- <1,5 %
Laktat	10,0	11,5 – 15 g/dl
Bicarb./Std.	19,6	45 – 100 mg/dl
Bicarb./akt.	17,5	- <16 mg/dl

Neuraminsäuren im Urin

Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
Gebundene Neuraminsäure	36,79	11,7 – 29,4 mmol/mol
Freie Neuraminsäure	73,80	12,0 – 31,0 mmol/mol
Gebundene/freie Neuraminsäure	0,50	0,50 – 2,00

Lysosomale Diagnostik

Parameter	Wert	Normbereich/Dimension
α -N-Acetylglucosaminidase	0,50	0,10 – 0,58 mU/ml
% der Norm	177	36 – 204 %
β -Glukuronidase	1,03	0,19 – 1,52 mU/ml
% der Norm	204	37 – 301 %
α -D-Galactosidase A	0,182	0,070 – 0,300 mU/ml
% der Norm	143	55 – 236 %
β -Hexosaminidase A	0,58	0,45 – 2,12 mU/ml
% der Norm	63	49 – 229 %
β -Hexosaminidase gesamt	14,65	6,08 – 35,11 mU/ml
% der Norm	115	48 – 275 %
α -N-Acetylgalactosaminidase	0,09	0,06 – 0,39 mU/ml
% der Norm	59	39 – 257 %
α -Fukosidase	6,94	2,00 – 9,99 mU/ml
% der Norm	154	44 – 222 %
α -Mannosidase	7,90 ↑	0,16 – 0,97 mU/ml
% der Norm	1837 ↑	37 – 226 %
β -Mannosidase	4,84	1,50 – 7,79 mU/ml
% der Norm	150	46 – 241 %
Chitotriosidase	42,6	0,0 – 100,0 nmol/ml
% der Norm	120	0 – 282 %
Arylsulfatase A	88,8 ↓	102,5 – 429,8 nmol/17h
% der Norm	33 ↓	38 – 116 %
β -Galactocerebrosidase	6,22 ↓	11,94 – 76,97 nmol/17h
% der Norm	20 ↓	38 – 246 %
Aspartylglucosaminidase	9,78	8,07 – 44,29 μ U/mg
% der Norm	51	42 – 231 %
α -L-Iduronidase	0,52 ↓	0,93 – 2,44 mU/mg
% der Norm	36 ↓	58 – 152 %
Arylsulfatase B	0,18 ↓	0,321 – 1,068 mU/mg
% der Norm	32 ↓	56 – 187 %
β -Galactosidase	1,52	1,135 – 3,301 mU/mg
% der Norm	69	51 – 149 %

Tabelle 4: Sequenzen der für diese Arbeit verwendeten Primer.

Primernamen		Primersequenz	
hB4GALT1_F1	5'	GCAAAGGCTCGGGAGGAA	– 3'
hB4GALT1_R1	5'	GCAATTCTATCACCGGGAATG	– 3'
hB4GALT1_F2	5'	CGTCGGAGCTGCAGTCATA	– 3'
hB4GALT1_R2	5'	GGGATGTGTACAGTTCTGAC	– 3'
hB4GALT1_Ex1_F1	5'	entspricht hB4GALT1_F1	– 3'
hB4GALT1_Ex1_R1	5'	CCAAGGCCTTCTCTGGTTCT	– 3'
hB4GALT1_Ex1_F2	5'	entspricht hB4GALT1_F2	– 3'
hB4GALT1_Ex1_R2	5'	CCACCTCGCAAACCTTCTCT	– 3'
hB4GALT1_Ex2_F1	5'	GGATGGTTGGTCACCCTAAT	– 3'
hB4GALT1_Ex2_R1	5'	CGTTTACCTCATCTGCACTG	– 3'
hB4GALT1_Ex2_F2	5'	GAGACATTTCTCTGCAGCT	– 3'
hB4GALT1_Ex2_R2	5'	CCAGGTGTCTGTGAAATCAC	– 3'
hB4GALT1_Ex3_F1	5'	GGAATTGCTGACTCAGAGGT	– 3'
hB4GALT1_Ex3_R1	5'	GCAGAGACTACAGGCATTTTC	– 3'
hB4GALT1_Ex3_F2	5'	CCAAGAGTTTCCTAGTGACC	– 3'
hB4GALT1_Ex3_R2	5'	GCATTCTGCTCCAGAGCTTA	– 3'
hB4GALT1_Ex4_F1	5'	GCAGAAGAATCGCTTGAACC	– 3'
hB4GALT1_Ex4_R1	5'	CGTCACTTGGTTCCCATTTG	– 3'
hB4GALT1_Ex4_F2	5'	CTGGCAACAGAGCAAGACTA	– 3'
hB4GALT1_Ex4_R2	5'	CCTAAGAATGTGGGCTGACT	– 3'
hB4GALT1_Ex5&6_F1	5'	GGTAGTCAACACCACAAACC	– 3'
hB4GALT1_Ex5&6_R1	5'	entspricht hB4GALT1_R1	– 3'
hB4GALT1_Ex5&6_F2	5'	GTGAGAACAGCAAGGGTGAT	– 3'
hB4GALT1_Ex5&6_R2	5'	entspricht hB4GALT1_R2	– 3'
hSLC35A2-F1	5'	GCTCCACCTTCACTCAGGTG	– 3'
hSLC35A2-R1	5'	TGATCAGAGTTTGGTCCCAGT	– 3'
hSLC35A2-F2	5'	GACGGGCCGGGCAGATGC	– 3'
hSLC35A2-R2	5'	GCCAATGTCTTCAATCCCAGC	– 3'
hSLC35A2-F3	5'	CGTGAAGCACCTGGTTCTCTT	– 3'
hSLC35A2-R3	5'	GTGGTCAGGATCTTCAGCTGG	– 3'
hSLC35A2-F1	5'	GCTCCACCTTCACTCAGGTG	– 3'
hSLC35A2-R1	5'	TGATCAGAGTTTGGTCCCAGT	– 3'
hSLC35A2-F2	5'	GACGGGCCGGGCAGATGC	– 3'
hSLC35A2-R2	5'	GCCAATGTCTTCAATCCCAGC	– 3'
hSLC35A2-F3	5'	CGTGAAGCACCTGGTTCTCTT	– 3'
hSLC35A2-R3	5'	GTGGTCAGGATCTTCAGCTGG	– 3'
hSLC35A2-F1	5'	GCTCCACCTTCACTCAGGTG	– 3'

hSLC35A2-R1	5' –	TGATCAGAGTTTGGTCCCAGT	– 3'
hSLC35A2-F2	5' –	GAC GGG CCG GGC AGA TGC	– 3'
hSLC35A2-R2	5' –	GCCAATGTCTTCAATCCCAGC	– 3'
hSLC35A2-F3	5' –	CGTGAAGCACCTGGTTCTCTT	– 3'
hSLC35A2-R3	5' –	GTGGTCAGGATCTTCAGCTGG	– 3'
hSLC35A2-F1	5' –	GCTCCACCTTCACTCAGGTG	– 3'
hSLC35A2-R1	5' –	TGATCAGAGTTTGGTCCCAGT	– 3'
hSLC35A2-F2	5' –	GACGGGCCGGGCAGATGC	– 3'
hSLC35A2-R2	5' –	GCCAATGTCTTCAATCCCAGC	– 3'
hSLC35A2 Ex1-F1	5' –	GCGGAATTTTCAGTCCAACCATG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-R1	5' –	CCAGCGATCCCGACCTCCG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-F2	5' –	GCACCTGGTAGTTTCTGATACG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-R2	5' –	CGACTGCTCGGGCAGACTG	– 3'
hSLC35A2 Ex2-F1	5' –	GTCATGGCTGAGGCAGTAAG	– 3'
hSLC35A2 Ex2-R1	5' –	TAAGATGCCGCTACGCATAGC	– 3'
hSLC35A2 Ex2-F2	5' –	GGAGTCAGACCCTTATTGGGT	– 3'
hSLC35A2 Ex2-R2	5' –	GATTTGGAGACACTCCTGAAGC	– 3'
hSLC35A2 Ex3-F1	5' –	GCTGCCATTAAACTGAGTCTCA	– 3'
hSLC35A2 Ex3-R1	5' –	CACCACGCTATTCCCATACTC	– 3'
hSLC35A2 Ex3-F2	5' –	CATGGTTGTACTCTAGGGAAAAC	– 3'
hSLC35A2 Ex3-R2	5' –	CCCCAACCCAGTTAGTTCCTC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-F1	5' –	GACTTCTTGGCACAGCCATCC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-R1	5' –	CCCAAACCCAGAGGAGCCAG	– 3'
hSLC35A2 Ex4-F2	5' –	GCACTTGCTGGGAGAGACTTC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-R2	5' –	GGGTCCTGCAGATGCCCAAC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-F1	5' –	GGACTACCAGCCTCACCGC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-R1	5' –	GACTCTTTCACCGGCAGG	– 3'
hSLC35A2 Ex5-F2	5' –	GCTCAGGAAACCCGCCTGC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-R2	5' –	GCGGAATGAGGCCAAGACTG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-F1	5' –	GCGGAATTTTCAGTCCAACCATG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-R1	5' –	CCAGCGATCCCGACCTCCG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-F2	5' –	GCACCTGGTAGTTTCTGATACG	– 3'
hSLC35A2 Ex1-R2	5' –	CGACTGCTCGGGCAGACTG	– 3'
hSLC35A2 Ex2-F1	5' –	GTCATGGCTGAGGCAGTAAG	– 3'
hSLC35A2 Ex2-R1	5' –	TAAGATGCCGCTACGCATAGC	– 3'
hSLC35A2 Ex2-F2	5' –	GGAGTCAGACCCTTATTGGGT	– 3'
hSLC35A2 Ex2-R2	5' –	GATTTGGAGACACTCCTGAAGC	– 3'
hSLC35A2 Ex3-F1	5' –	GCTGCCATTAAACTGAGTCTCA	– 3'
hSLC35A2 Ex3-R1	5' –	CACCACGCTATTCCCATACTC	– 3'
hSLC35A2 Ex3-F2	5' –	CATGGTTGTACTCTAGGGAAAAC	– 3'

hSLC35A2 Ex3-R2	5' –	CCCCAACCCAGTTAGTTCCTC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-F1	5' –	GACTTCTTGGCACAGCCATCC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-R1	5' –	CCCAAACCCAGAGGAGCCAG	– 3'
hSLC35A2 Ex4-F2	5' –	GCACTTGCTGGGAGAGACTTC	– 3'
hSLC35A2 Ex4-R2	5' –	GGGTCTGCAGATGCCCAAC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-F1	5' –	GGACTACCAGCCTCACCGC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-R1	5' –	GACTCTTTCACCGGCAGG	– 3'
hSLC35A2 Ex5-F2	5' –	GCTCAGGAAACCCGCCTGC	– 3'
hSLC35A2 Ex5-R2	5' –	GCGGAATGAGGCCAAGACTG	– 3'
hSLC39A8_F1	5' –	GCAGAGACAGACAAACAAAC	– 3'
hSLC39A8_F2	5' –	CGAGCTGCTGTTCTTTCGAA	– 3'
hSLC39A8_R2	5' –	CCTACAGTTGAAAGCAAAT	– 3'
hSLC39A8_R1	5' –	GGACTATTTACAGACTGATG	– 3'
hSLC39A8_Ex1_F1		entspricht hSLC39A8_F1	
hSLC39A8_Ex1_F2		entspricht hSLC39A8_F2	
hSLC39A8_Ex1_R2	5' –	CTTCAGCCTCGTCTAGTGAA	– 3'
hSLC39A8_Ex1_R1	5' –	GGCTGCCAAATCCCTTAACA	– 3'
hSLC39A8_Ex2_F1	5' –	GGTTTAAACTGGTGTGGGCT	– 3'
hSLC39A8_Ex2_F2	5' –	GAGTGCTGTGCATCTAGATG	– 3'
hSLC39A8_Ex2_R2	5' –	CGAAGAAGTTCTATGTAGATTAAT	– 3'
hSLC39A8_Ex2_R1	5' –	GAAGAGCATAACTTATGAAGCT	– 3'
hSLC39A8_Ex3_F1	5' –	CCCATAATGATGATTTAGGGC	– 3'
hSLC39A8_Ex3_F2	5' –	GCTTGCTATGCCATATTTGTA	– 3'
hSLC39A8_Ex3_R2	5' –	GCTGTGATTCAGCTTCTCT	– 3'
hSLC39A8_Ex3_R1	5' –	GTGATATCCACTGCAGCTTG	– 3'
hSLC39A8_Ex4+5_F1	5' –	GCCATCTCATACAGTTTTGTC	– 3'
hSLC39A8_Ex4+5_F2	5' –	GGCAGCTAAGTTTCCAATAT	– 3'
hSLC39A8_Ex4+5_R2	5' –	CAGGGAAGGTGGAAAAACAA	– 3'
hSLC39A8_Ex4+5_R1	5' –	GAACAGTGATCCACAATTTCT	– 3'
hSLC39A8_Ex6+7_F1	5' –	GGCAGTAGGAAGAAGTTTATA	– 3'
hSLC39A8_Ex6+7_F2	5' –	GGCTTATTCGAGGTGTGTCA	– 3'
hSLC39A8_Ex6+7_R2	5' –	GGGATTGTTCTGAATTACAACA	– 3'
hSLC39A8_Ex6+7_R1	5' –	GGGAATAGAGATAGAGGAAAA	– 3'
hSLC39A8_Ex8_F1	5' –	CCCAAAGCTCGAATGATTGG	– 3'
hSLC39A8_Ex8_F2	5' –	CACTGGGAAACCTGGGAATT	– 3'
hSLC39A8_Ex8_R2		entspricht hSLC39A8_R2	
hSLC39A8_Ex8_R1		entspricht hSLC39A8_R1	

hGZF1-Exon1-F1	5' –	CACTGGAGGAAACCTTAGAATAC	– 3'
hGZF1-Exon1-F2	5' –	GAGTCTATATCCTCTCAAGTACT	– 3'
hGZF1-Exon1-R1	5' –	AGCAGAGCCATCACTCGCAG	– 3'
hGZF1-Exon1-R2	5' –	ATCCCAGGACGACCTCAGTG	– 3'
hGZF1_F1	5' –	GAGACACGTTGAATCCGAGG	– 3'
hGZF1_F2	5' –	GAAGGAAGGCATGTGCTTTGG	– 3'
hGZF1_F3	5' –	CACGGATTCTTGGACTACCC	– 3'
hGZF1_R1	5' –	CACATCTTTGCACATGGACAAT	– 3'
hGZF1_R2	5' –	GCTACCACACACGCAGACTAA	– 3'
hGZF1_R3	5' –	CTCTTGCCACATGTTTCACAC	– 3'
qPCR_hGZF1_F	5' –	GGTGTACACAGGTGAAAGACCT	– 3'
qPCR_hGZF1_R	5' –	GACGCTCCCCTGTGTGGAC	– 3'
	5' –		– 3'
hVPS45_F1	5' –	CCAGCACCAAAGGGCAATAG	– 3'
hVPS45_F2	5' –	GCAGGTGGGTGGAGAATAAC	– 3'
hVPS45_R1	5' –	GGATGCCTTAATTTCTGGC	– 3'
hVPS45_R2	5' –	CCTTCAGGTAGAAGTAATGCC	– 3'
hVPS45_Exon1_F1	5' –	CCAGCACCAAAGGGCAATAG	– 3'
hVPS45_Exon1_F2	5' –	GCAGGTGGGTGGAGAATAAC	– 3'
hVPS45_Exon1_R1	5' –	CCACCGGGCAAGCTTTATAT	– 3'
hVPS45_Exon1_R2	5' –	CACACAAACCGACCCTCATT	– 3'
hVPS45_Exon2_F1	5' –	CCTACCTGTTTGGATGTTTCTG	– 3'
hVPS45_Exon2_F2	5' –	GAGGGTTAGATGTGCTACTTG	– 3'
hVPS45_Exon2_R1	5' –	GGGGTCAACTGAAATATGGA	– 3'
hVPS45_Exon2_R2	5' –	CCAGGATAATTATGATGCCAC	– 3'
hVPS45_Exon3_F1	5' –	CTCTTTTGTCTCCAGCCCTT	– 3'
hVPS45_Exon3_F2	5' –	CCAACATAAGCACACTTAACC	– 3'
hVPS45_Exon3_R1	5' –	GGAAGGACATTAAATAAAGTAGAC	– 3'
hVPS45_Exon3_R2	5' –	GCTGGGATTACAGGTGTGA	– 3'
hVPS45_Exon4_F1	5' –	CGATCTCCTGACCTCATGAT	– 3'
hVPS45_Exon4_F2	5' –	CCAAAGTGCTGGGATTACAG	– 3'
hVPS45_Exon4_R1	5' –	CCAATGTGTTGTCATGAGAGA	– 3'
hVPS45_Exon4_R2	5' –	GCCTCTGAAAACAATATTCCTCA	– 3'
hVPS45_Exon5+6_F1	5' –	GTATGCATAGAGGTCTCCAG	– 3'
hVPS45_Exon5+6_F2	5' –	CCACGTTGACTGTTGTTACC	– 3'
hVPS45_Exon5+6_R1	5' –	GCTTGTGAATGTTTCTTGGGTT	– 3'
hVPS45_Exon5+6_R2	5' –	CCTACCTCTTTTCGCGGAAA	– 3'
hVPS45_Exon7_F1	5' –	AACCCAAGAAACATTCACAAGC	– 3'
hVPS45_Exon7_F2	5' –	GCTACTAACTTTGTGAGACTT	– 3'
hVPS45_Exon7_R1	5' –	GGCTGTAAGCATGGAAATGAG	– 3'

hVPS45_Exon7_R2	5' –	GGAGAGATGAAGCAGAAGAG	– 3'
hVPS45_Exon8_F1	5' –	GCATACAGGAAATGGTACAGC	– 3'
hVPS45_Exon8_F2	5' –	GCTTATAGCACAAAGTATGAATA	– 3'
hVPS45_Exon8_R1	5' –	CCATTACTATTCTCACAAACAGC	– 3'
hVPS45_Exon8_R2	5' –	CCTTCAGAGGCAGTTTATGC	– 3'
hVPS45_Exon9_F1	5' –	GCATAAACTGCCTCTGAAGG	– 3'
hVPS45_Exon9_F2	5' –	GCTGTTTGTGAGAATAGTAATGG	– 3'
hVPS45_Exon9_R1	5' –	CCACCACACCTGGCTAATTT	– 3'
hVPS45_Exon9_R2	5' –	CCAGATATTACTGAAGAATGG	– 3'
hVPS45_Exon10_F1	5' –	GGAATCGCTTGAACCTGGGA	– 3'
hVPS45_Exon10_F2	5' –	GCCATGTGGCTGAAAGTTGT	– 3'
hVPS45_Exon10_R1	5' –	GCTCCATGTCACAAAGCCTG	– 3'
hVPS45_Exon10_R2	5' –	CCTTGGGAATTGCACATTACAC	– 3'
hVPS45_Exon11+12_F1	5' –	CGTATTGATTCAAGTCGTGGA	– 3'
hVPS45_Exon11+12_F2	5' –	GTCCTAAAGCAATTACAATGG	– 3'
hVPS45_Exon11+12_R1	5' –	GGTGTAATAATATCTGTGACTAACA	– 3'
hVPS45_Exon11+12_R2	5' –	GCAGCAATCTTCAAGATACTT	– 3'
hVPS45_Exon13_F1	5' –	GGTGAGAGACAGTGAAGACA	– 3'
hVPS45_Exon13_F2	5' –	CCTTTACAATAACTAGCCCT	– 3'
hVPS45_Exon13_R1	5' –	CCAAATGCCAGATGCCATCG	– 3'
hVPS45_Exon13_R2	5' –	GAGGCTCTCCAAAACACTTG	– 3'
hVPS45_Exon14_F1	5' –	CCAGCAAACACTATTGTGCT	– 3'
hVPS45_Exon14_F2	5' –	GCTTTAATTCTGCTTCCTCC	– 3'
hVPS45_Exon14_R1	5' –	CCTTATGAATTAGGTCCAAGG	– 3'
hVPS45_Exon14_R2	5' –	CCAGAGAATTTCAAGTCTACAG	– 3'
hVPS45_Exon15_F1	5' –	GCTCAACTGATGCTTCCATTC	– 3'
hVPS45_Exon15_F2	5' –	GGTTAGATGTCCAGAGCAAG	– 3'
hVPS45_Exon15_R1	5' –	GGATGCCTTAATTTCTGGC	– 3'
hVPS45_Exon15_R2	5' –	CCTTCAGGTAGAAGTAATGCC	– 3'
qPCR_VPS45_F	5' –	GCTAAACCAGTGGACATATC	– 3'
qPCR_VPS45_R	5' –	ACAAACGCCTTCATGTCTGC	– 3'
qPCR_hCOG1_F	5' –	GGATCCACATGTGTAATGAA	– 3'
qPCR_hCOG1_R	5' –	TTGTCAGAGTCTGTAATCGG	– 3'
qPCR_hCOG4_F	5' –	CTGTTTGAAGGGATTGCC	– 3'
qPCR_hCOG4_R	5' –	CCAGTTCTCTTGGTTCGATT	– 3'
qPCR_hCOG7_F	5' –	CTGTGCCTCTGGAGCATGG	– 3'
qPCR_hCOG7_R	5' –	CAGACACATACTTGGCAA	– 3'
qPCR_hCOG8_F	5' –	CCTTGCCAAGGTAATAA	– 3'
qPCR_hCOG8_R	5' –	GGAGGAATGCCTAAAGTCTG	– 3'

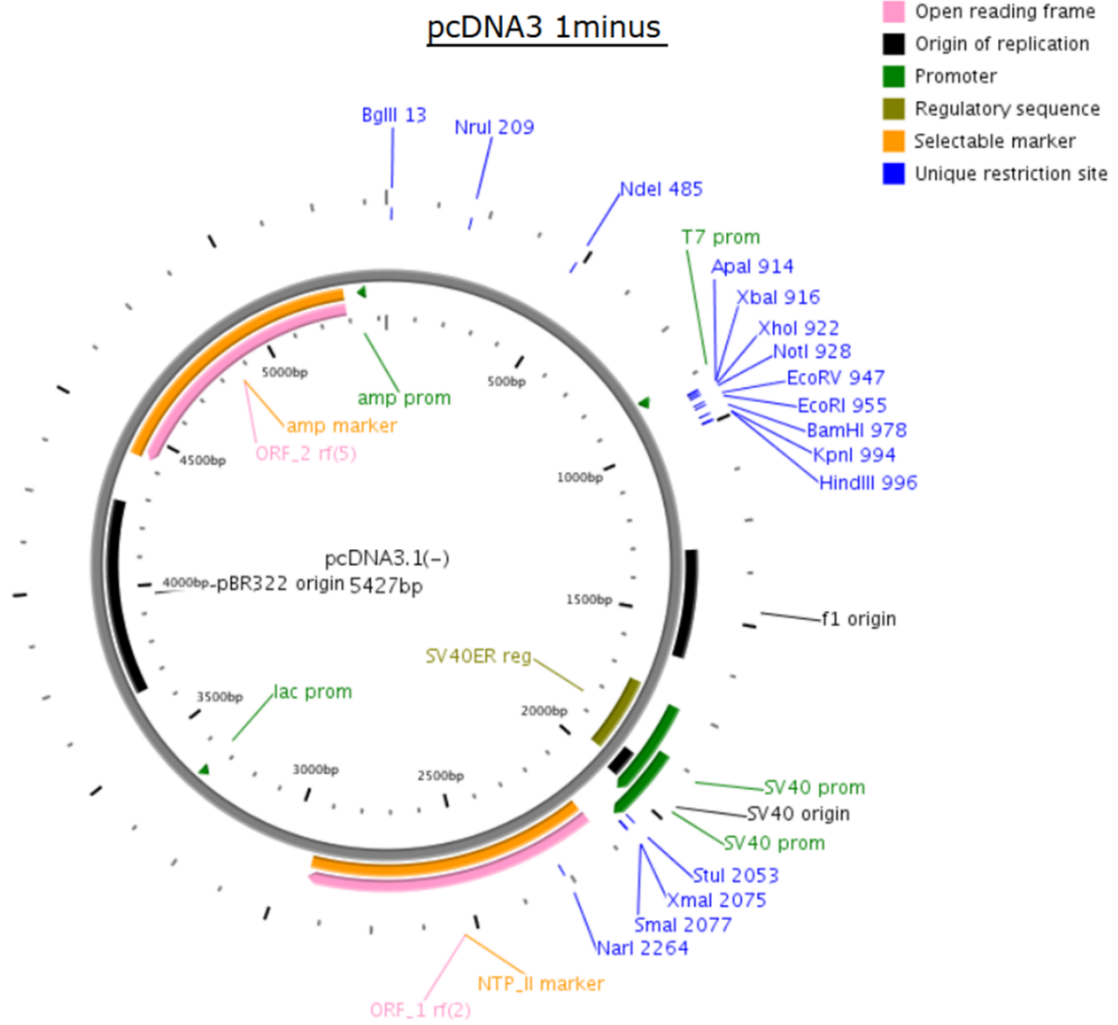


Abbildung 27: Der pcDNA3.1 Vektor von Biocat, Heidelberg.

pLNCX2 Retroviral Vector

Catalog Nos.

631503

Sold as a part of 631508 and 631511

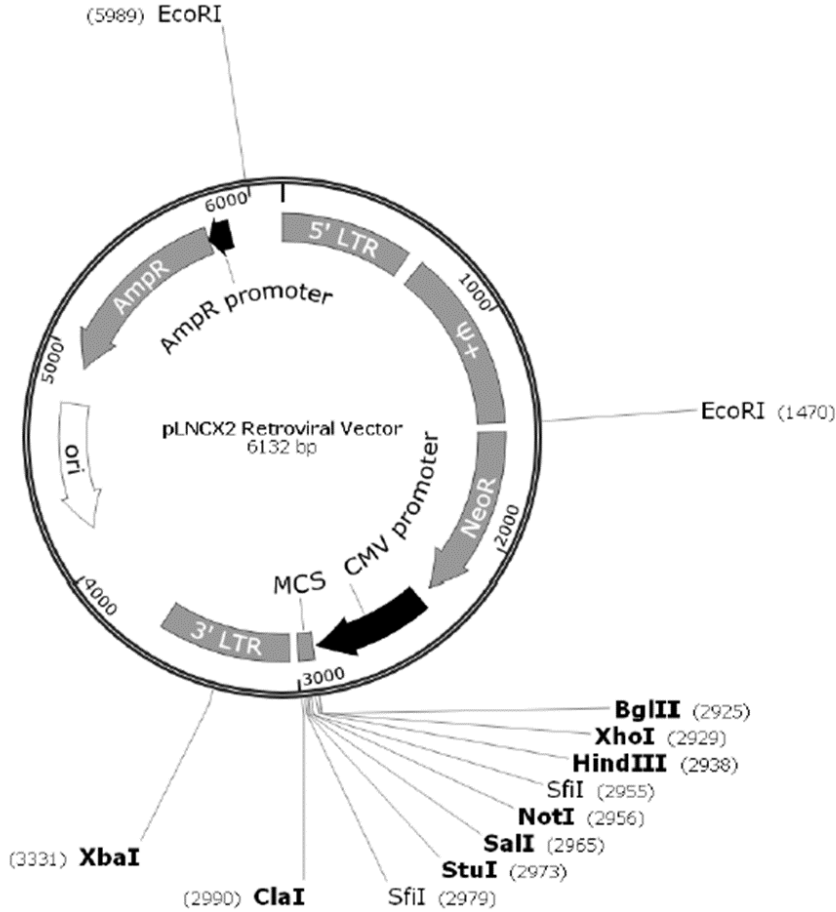


Abbildung 28: Vektorkarte des pLNCX2 Vektors der Firma Takara, Mountain View, USA.

Tabelle 5: Ergebnisse der N-Glykomanalysen – Die massenspektrometrischen Analysen wurden in Kooperation mit Gernot Poschet (COS Heidelberg) durchgeführt.

TRANSFERRIN N-GLYKANE DER KONTROLLE

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
M4	12,3	0,069	0,07	5,3077	5,3178				1246972
A2	12,89	0,232	0,23	5,4619	5,4969				4217578
F(6)A2	13,96	7,989	7,99	5,7879	5,8259	1773,71904	1773,7171	2	145423345
F(6)A2B	14,9	0,062	0,06	6,1175	6,12				1134583
M5	15,16	3,2	3,2	6,1692	6,2007	1545,60804	1545,6067	2	58243286
F(6)M5	15,75	0,145	0,14	6,34	6,3846				2633215
F(6)A2[6]G(4)1	16,35	3,899	3,9	6,5337	6,5755	1935,77187	1935,7678	2	70978677
F(6)A2[3]G(4)1	16,76	2,572	2,57	6,6633	6,7031	1935,77187	1935,7669	2	46813904
F(6)A4	17,23	1,19	1,19	6,835	6,8553				21653808
A2[6]G(4)1S(3)1	17,59	0,229	0,23	6,98	6,9716				4160100
F(6)A1G(4)1GA1	17,73	0,154	0,15	7,0212	7,0166				2801800
M6	18,02	1,545	1,55	7,1138	7,1108	1707,66086	1707,6596	2	28129624
M6 D1	18,39	0,264	0,26	7,14	7,2343				4807645
A2BG(4)2	18,8	0,091	0,09	7,35	7,3704				1659090
F(6)A2G(4)2	19,02	1,737	1,74	7,4266	7,4451	2097,82469	2097,8171	2	31617636
F(6)A2[3]G1GA1	19,38	0,366	0,37	7,55	7,5691				6663915
F(6)A3 GLCNAC1	19,6	0,504	0,5	7,645	7,6453				9166593

DISCOVERED RT 19.6 80	19,68					7,6739			17256647
F(6)A1G(4)1SG(6)1	20,28	0,14	0,14	7,915	7,885				2551931
M7	20,59	2,526	2,53	7,9969	7,996				45977269
F(6)A2[3]G(4)1S(6)1	21,13	0,056	0,06	8,18	8,1932				1027675
F(6)A2[6]BG(4)1S(6)1	21,33	0,505	0,5	8,27	8,2663				9185005
F(6)A2[3]G(4)1SG(6)1	21,51	0,613	0,61	8,3057	8,3319				11156557
A2G(4)2S(6)1	21,74	6,113	6,11	8,4	8,415	2242,8622	2242,862	2	111274370
F(6)A2G(4)2S(6)1	22,52	5,065	5,07	8,55	8,7113	2388,92011	2388,9166	2	92202807
DISCOVERED RT 23.0 53	23,05				8,9187				12967275
F(6)A2G(4)2SG(6)1	23,21	3,703	3,7	8,9668	8,9821				67412017
F(6)A2G(4)2GA(3)2	23,58	0,298	0,3	9,1706	9,1254				5424735
DISCOVERED RT 23.8 30	23,83				9,2277				48242583
F(6)M5A1G(4)1SG(6)1	24,47	0,357	0,36	9,5135	9,4882				6494029
A3G(4)3S(6)1	24,66	0,857	0,86	9,6	9,5696				15600441
A2G(4)2S(6,6)2	24,87	35,817	35,82	9,415	9,6554	2533,95762	2533,9579	3	651978947
F(6)A2G(4)2S(6,6)2	25,54	5,677	5,68	9,69	9,9405	2680,01552	2680,0146	3	103339143
F(6)A4 GLCNAC3	25,97	2,939	2,94	10,135	10,128				53492979
F(6)A3G(4)3SG(6)1	26,23	1,246	1,25	10,25	10,246				22676695
A3G(4)3GA(3)3	26,57	0,63	0,63	10,3867	10,3961				11459057
F(6)A2G(4)2SG(6,6)2	27,18	0,236	0,24	10,69	10,6755				4294797
A3G(4)3S(3,3,6)3	27,42	0,326	0,33	10,72	10,7883				5931007
F(6)A3G(4)2GA(3)2SG(6)1	27,71	0,129	0,13	10,94	10,9252				2351737
F(6)A4G(4)4LAC1	27,94	0,249	0,25	11,01	11,0349				4533814
F(6)A4 GLCNAC4	28,33	0,176	0,18	11,17	11,2268				3202276
A4G(4)4S(3,3)2	28,8	2,738	2,74	11,45	11,4582				49843315

F(6)A4G(4)4LAC2	29,8 3	4,854	4,85	12,1	11,9845	88354236
F(6)A3G(4)3LAC2S3	30,9 7	0,167	0,17	12,52	12,6	3036190
F(6)A4G(4)4LAC1S3	31,4 4	0,063	0,06	12,7	12,864	1151758
M13 A3D1,[D2(3),D3 (3)],A2D4(2)	32,2 5	0,158	0,16	13,19	13,3255	2877832
F(6)A4G(4)4LAC2S3	32,9 3	0,117	0,12	13,555	13,7304	2125781
DISCOVERED RT 3 7.835	37,8 4			16,9774		75031030
DISCOVERED RT 3 7.949	37,9 5			17,0593		29416222
DISCOVERED RT 3 8.144	38,1 4			17,2009		63017490
NON- SIALYLATED GLYC ANS		35,846	35,85			652513869
MONO- SIALYLATED GLYC ANS		19,013	19,01			346093364
DI- SIALYLATED GLYC ANS		44,468	44,47			809456202
TRI- SIALYLATED GLYC ANS		0,673	0,67			12244736
DE- FUCOSYLATED GL YCANS		54,793	54,79			997406532
ANTENNARY 1 GLY CANS		0,651	0,65			11847759
ANTENNARY 2 GLY CANS		75,26	75,26			1369964882
ANTENNARY 3 GLY CANS		3,858	3,86			70221719

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
ANTENNARY 4 GLYCANS	12,32	12,33							224357967
HIGH MANNOS E GLYCANS	8,194	8,19							149162900
MS LIBRARY SEARCH CONFIRMED									
F(6)A2	13,96	7,989	7,99	5,7879	5,8259	1773,71904	1773,7171	2	145423345
M5	15,16	3,2	3,2	6,1692	6,2007	1545,60804	1545,6067	2	58243286
F(6)A2[6]G(4)1	16,35	3,899	3,9	6,5337	6,5755	1935,77187	1935,7678	2	70978677
F(6)A2[3]G(4)1	16,76	2,572	2,57	6,6633	6,7031	1935,77187	1935,7669	2	46813904
M6	18,02	1,545	1,55	7,1138	7,1108	1707,66086	1707,6596	2	28129624
F(6)A2G(4)2	19,02	1,737	1,74	7,4266	7,4451	2097,82469	2097,8171	2	31617636
A2G(4)2S(6)1	21,74	6,113	6,11	8,4	8,415	2242,8622	2242,862	2	111274370
F(6)A2G(4)2S(6)1	22,52	5,065	5,07	8,55	8,7113	2388,92011	2388,9166	2	92202807
A2G(4)2S(6,6)2	24,87	35,817	35,82	9,415	9,6554	2533,95762	2533,9579	3	651978947
F(6)A2G(4)2S(6,6)2	25,54	5,677	5,68	9,69	9,9405	2680,01552	2680,0146	3	103339143

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
M4	12,31	0,197	0,2	5,3077	5,3221				3138819
A2	12,89	0,115	0,12	5,4619	5,4969				1840527
F(6)A2	13,96	8,38	8,38	5,7879	5,8269	1773,71904	1773,7189	2	133613487
F(6)A2B	14,9	0,103	0,1	6,1175	6,1206				1636011
F(6)A1G(4)1	15,18	3,985	3,98	6,1926	6,2084				63530689
F(6)M5	15,75	0,125	0,13	6,34	6,3858				1998828
F(6)A2[6]G(4)1	16,36	5,518	5,52	6,5337	6,5758	1935,77187	1935,7656	2	87972692
F(6)A2[3]G(4)1	16,76	2,505	2,5	6,6633	6,7047				39937398
F(6)A4	17,24	0,788	0,79	6,835	6,8564				12566139
A2[6]G(4)1S(3)1	17,61	0,097	0,1	6,98	6,9779				1548341
F(6)A1G(4)1GA1	17,74	0,254	0,25	7,0212	7,0196				4043799
M6	18,03	1,565	1,56	7,1138	7,1126	1707,66086	1707,6592	2	24946928
M6 D1	18,4	0,753	0,75	7,14	7,2366				12003514
F(6)A2G(4)2	19,02	2,783	2,78	7,4266	7,4468	2097,82469	2097,8222	2	44364943
F(6)A2[3]G1GA1	19,39	0,747	0,75	7,55	7,5734				11916121
F(6)A3 GLCNAC 1	19,7	1,91	1,91	7,645	7,6794				30448430
F(6)A1G(4)1SG(6) 1	20,29	0,222	0,22	7,915	7,8891				3541423
DISCOVERED R T 20.620	20,62				8,0066				38838951

F(6)A2[6]BG(4)1S(6) 1	21,34	0,499	0,5	8,27	8,2693	8,2693	7959515
A3G(4)3	21,56	0,567	0,57	8,3825	8,3507	8,3507	9047174
A2G(4)2S(6)1	21,74	15,954	15,95	8,4	8,4185	2242,8622	2 254377785
F(6)A2G(4)2S(6)1	22,52	5,035	5,04	8,55	8,7122	2388,92011	2 80285429
A2G(4)2GA(3)2	22,71	0,451	0,45	8,773	8,7862		7185460
F(6)A2G(4)2S(3,3)2	22,97	0,459	0,46	8,85	8,8867		7314373
F(6)A2G(4)2SG(6)1	23,04	0,555	0,56	8,9668	8,9144		8856486
F(6)A2BG(4)2S(6)1	23,22	1,873	1,87	8,82	8,9856	2591,99948	3 29861560
F(6)A4 GLCNAC2	23,37	0,646	0,65	9,05	9,0424		10305169
F(6)A2G(4)2GA(3)2	23,6	0,308	0,31	9,1706	9,1361		4912166
DISCOVERED RT 2 3.844	23,84				9,2331		54496702
F(6)M5A1G(4)1SG(6) 1)	24,47	0,577	0,58	9,5135	9,4892		9198496
A3G(4)3S(6)1	24,67	0,635	0,64	9,6	9,5743		10130151
A2G(4)2S(6,6)2	24,88	30,376	30,38	9,415	9,6611	2533,95762	3 484324307
F(6)A4G(4)4	25,55	3,699	3,7	9,915	9,9484		58979299
F(6)A4 GLCNAC3	25,98	1,096	1,1	10,135	10,1334		17474829
F(6)A3G(4)3SG(6)1	26,27	0,682	0,68	10,25	10,262		10876245
A2G(4)2SG(6,6)2	26,59	0,083	0,08	10,41	10,4049		1330829
F(6)A2G(4)2SG(6,6) 2	27,19	0,474	0,47	10,69	10,6826		7552914
A3G(4)3S(3,3,6)3	27,32	0,412	0,41	10,72	10,7419		6570557
F(6)A3G(4)2GA(3)2 SG(6)1	27,73	0,123	0,12	10,94	10,9338		1967700
F(6)A3G(4)3GA3	27,95	0,292	0,29	11,0658	11,0433		4649406
F(6)A4 GLCNAC4	28,36	0,127	0,13	11,17	11,2419		2021239
A3G(4)3S(6,6,6)3	28,82	2,627	2,63	11,6	11,4675	3190,18523	3 41886669
F(6)A3G(4)3LAC1S3	29,26	0,287	0,29	11,71	11,6907		4576292
F(6)A4G(4)4LAC2	29,84	1,938	1,94	12,1	11,9911		30898680

F(6)A3G(4)3LAC2S3	30,963,801	0,177	0,18	12,52	12,5949	2826008
DISCOVERED RT 38.014	38,858,001			17,1062		321451488
NON-SIALYLATED GLYCANS	38,85	38,85				619431746
MONO-SIALYLATED GLYCANS	26,254	26,25				418603130
DI-SIALYLATED GLYCANS	31,392	31,39				500522423
TRI-SIALYLATED GLYCANS	3,503	3,5				55859526
DE-FUCOSYLATED GLYCAN	53,834	53,83				858331060
ANTENNARY 1 GLYCAN	5,037	5,04				80314406
ANTENNARY 2 GLYCAN	76,316	76,32				1216790343
ANTENNARY 3 GLYCAN	7,713	7,71				122978633
ANTENNARY 4 GLYCAN	8,294	8,29				132245355
HIGH MANNOSE GLYCAN	3,02	3,02				48147765

MS LIBRARY SEARCH CONFIRMED

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
F(6)A2	13,96	8,38	8,38	5,7879	5,8269	1773,71904	1773,7189	2	133613487
F(6)A2[6]G(4) 1	16,36	5,518	5,52	6,5337	6,5758	1935,77187	1935,7656	2	87972692
M6	18,03	1,565	1,56	7,1138	7,1126	1707,66086	1707,6592	2	24946928
F(6)A2G(4)2	19,02	2,783	2,78	7,4266	7,4468	2097,82469	2097,8222	2	44364943
A2G(4)2S(6) 1	21,74	15,954	15,95	8,4	8,4185	2242,8622	2242,863	2	254377785
F(6)A2G(4)2 S(6)1	22,52	5,035	5,04	8,55	8,7122	2388,92011	2388,9207	2	80285429
F(6)A2BG(4) 2S(6)1	23,22	1,873	1,87	8,82	8,9856	2591,99948	2592,0036	3	29861560
A2G(4)2S(6, 6)2	24,88	30,376	30,38	9,415	9,6611	2533,95762	2533,9595	3	484324307
A3G(4)3S(6, 6,6)3	28,82	2,627	2,63	11,6	11,4675	3190,18523	3190,175	3	41886669

GESAMTSERUM N-GLYKANE DER KONTROLLE

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
A2	12,89	0,405	0,4	5,4619	5,4966				4198926
F(6)A2	13,96	5,047	5,05	5,7879	5,8264	1773,71904	1773,7196	2	52381053
A1[3]G(4)1	14,13	0,52	0,52	5,795	5,8817				5393000
M5	15,17	3,531	3,53	6,1692	6,2045	1545,60804	1545,6108	2	36647516
F(6)A2[6]G(4)1	16,36	4,015	4,01	6,5337	6,5757	1935,77187	1935,7733	2	41664405
F(6)A2[3]G(4)1	16,76	1,655	1,66	6,6633	6,7037				17179021
F(6)A4	17,24	1,261	1,26	6,835	6,8562				13086292
A2[6]G(4)1S(3)1	17,62	0,176	0,18	6,98	6,9792				1829108
F(6)A1G(4)1GA1	17,74	0,569	0,57	7,0212	7,0207				5901735
M6	18,02	2,374	2,37	7,1138	7,1109	1707,66086	1707,661	2	24637529
M6 D1	18,4	0,567	0,57	7,14	7,238				5885147
F(6)A2G(4)2	19,02	3,945	3,95	7,4266	7,4468	2097,82469	2097,8211	2	40947540
F(6)A2[3]G1GA1	19,37	0,722	0,72	7,55	7,5664				7494146
F(6)A3 GLCNAC 1	19,69	3,496	3,5	7,645	7,6787				36281741
F(6)A1G(4)1SG(6) 1	20,29	0,339	0,34	7,915	7,8884				3521593
M7	20,6	3,168	3,17	7,9969	7,9996				32873425
F(6)A2[6]BG(4)1 S(6)1	21,34	0,748	0,75	8,27	8,2685				7762946
A3G(4)3	21,55	0,62	0,62	8,3825	8,3444				6433526

A2G(4)2S(6)1	21,74	13,18	13,18	8,4	8,4171	2242,8622	2242,8568	2	136798743
F(6)A3G(4)3	22,31	0,125	0,13	8,5814	8,6322				1300839
F(6)A2G(4)2S(6)1	22,52	4,816	4,82	8,55	8,7107	2388,92011	2388,9132	2	49986469
F(6)A3G(4)3 ISO2	22,73	0,751	0,75	8,8	8,7915				7798314
F(6)A2G(4)2SG(6)1	23,05	1,357	1,36	8,9668	8,9157				14081316
A2G(4)2S(3,6)2	23,22	1,576	1,58	9	8,9844				16357420
F(6)A4 GLCNAC2	23,38	1,376	1,38	9,05	9,0461				14285338
F(6)A2G(4)2GA(3)2	23,6	0,69	0,69	9,1706	9,1342				7163307
A2G(4)2S(6,6)2	23,84	7,188	7,19	9,415	9,2307	2533,95762	2533,9578	3	74602002
F(6)M5A1G(4)1SG(6) 1	24,47	0,609	0,61	9,5135	9,4903				6319350
A3G(4)3S(6)1	24,68	1,747	1,75	9,6	9,5761				18134353
DISCOVERED RT 24. 876	24,88				9,6589				765688628
F(6)A4G(4)4	25,54	7,074	7,07	9,915	9,9416				73412665
F(6)A4 GLCNAC3	25,98	1,978	1,98	10,135	10,1346				20528827
F(6)A3G(4)3SG(6)1	26,26	1,563	1,56	10,25	10,2591				16222960
A2G(4)2SG(6,6)2	26,58	0,7	0,7	10,41	10,4044				7259936
M10 A3D1,A3D3,A2D 4(2)	26,83	0,294	0,29	10,53	10,5152				3048069
F(6)A2G(4)2SG(6,6)2	27,19	0,339	0,34	10,69	10,6811				3516697
A3G(4)3S(3,3,6)3	27,44	0,941	0,94	10,72	10,7975				9762263
F(6)A3G(4)2GA(3)2S G(6)1	27,71	0,228	0,23	10,94	10,928				2362046
F(6)A3G(4)3GA3	27,95	0,667	0,67	11,0658	11,0405				6926963
F(6)A4 GLCNAC4	28,34	0,429	0,43	11,17	11,2286				4452267
A3S(6)1G(4,4,3)3S(3, 3,3)3	28,81	6,52	6,52	11,47	11,4644				67668071
F(6)A4G(4)4LAC2	29,84	9,447	9,45	12,1	11,9909				98048462

M12 A3D1,[D2(2),D3(2)],A2D4(2)	30,36	1,366	1,37	12,31	12,2697	14173152
F(6)A4G(4)4LAC 1S3	30,99	0,755	0,76	12,7	12,6109	7836193
DISCOVERED R T 31.462	31,46				12,8748	4515069
A4G(4)4S(3,3,3,3)4	31,67	0,209	0,21	13,07	12,9924	2168565
M13 A3D1,[D2(3),D3(3)],A2D4(2)	32,25	0,592	0,59	13,19	13,3292	6147612
F(6)A4G(4)4LAC 2S3	32,94	0,323	0,32	13,555	13,7358	3350046
DISCOVERED R T 37.967	37,97				17,0724	120096961
DISCOVERED R T 38.138	38,14				17,1963	78483044
NON-SIALYLATED GLYCANS	56,685	56,68				588290820
MONO-SIALYLATED GLYCANS	24,765	24,77				257018884
DI-SIALYLATED GLYCANS	9,803	9,8				101736054
TRI-SIALYLATED GLYCANS	2,018	2,02				20948502
DE-FUCOSYLATED GLYCANS	45,674	45,67				474018363
ANTENNARY 1 GLYCANS	2,037	2,04				21135679
ANTENNARY 2 GLYCANS	46,561	46,56				483223036

ANTENNARY 3 GLYCANS	16,659	16,66	172891077
ANTENNARY 4 GLYCANS	22,852	22,85	237168655
HIGH MANNOSE GLYCANS	12,5	12,5	129731799

MS LIBRARY SEARCH CONFIRMED

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
F(6)A2	13,96	5,047	5,05	5,7879	5,8264	1773,71904	1773,7196	2	52381053
M5	15,17	3,531	3,53	6,1692	6,2045	1545,60804	1545,6108	2	36647516
F(6)A2[6]G(4) 1	16,36	4,015	4,01	6,5337	6,5757	1935,77187	1935,7733	2	41664405
M6	18,02	2,374	2,37	7,1138	7,1109	1707,66086	1707,661	2	24637529
F(6)A2G(4)2	19,02	3,945	3,95	7,4266	7,4468	2097,82469	2097,8211	2	40947540
A2G(4)2S(6) 1	21,74	13,181	13,18	8,4	8,4171	2242,8622	2242,8568	2	136798743
F(6)A2G(4)2 S(6)1	22,52	4,816	4,82	8,55	8,7107	2388,92011	2388,9132	2	49986469
A2G(4)2S(6), 6)2	23,84	7,188	7,19	9,415	9,2307	2533,95762	2533,9578	3	74602002

GESAMTSERUM N-GLYKANE DER PATIENTIN

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
F(6)M3	10,65	0,095	0,09	4,7617	4,8445				1519465
A1	11,11	0,146	0,15	4,9699	4,972				2342299
DISCOVERED RT 11.230	11,23				5,0071				1499606
F(6)M3 GLC NAC1	11,87	0,11	0,11	5,22	5,1925				1765674
DISCOVERED RT 12.688	12,69				5,436				16884963
A2	12,89	38,315	38,32	5,4619	5,4968	1627,66114	1627,6594	2	615909554
F(6)A2	13,96	1,667	1,67	5,7879	5,8274	1773,71904	1773,7166	2	26803799
A3	14,16	3,961	3,96	5,985	5,8882	1830,74051	1830,7369	2	63664272
DISCOVERED RT 14.465	14,47				5,9849				1176170
F(6)A1G(4)1	15,19	0,539	0,54	6,1926	6,2096				8658520
A2G(4)1	15,37	9,939	9,94	6,2465	6,2669	1789,71396	1789,7148	2	159772159
A2[3]G(4)1	15,75	14,889	14,89	6,29	6,3861	1789,71396	1789,7153	2	239332896
A2[6]BG(4)1	16,38	3,2	3,2	6,335	6,5847	1992,79333	1992,7924	2	51431151
F(6)A2[3]G(4)1	16,72	1,523	1,52	6,6633	6,6902				24475296
F(6)A4	17,24	0,268	0,27	6,835	6,8567				4300000
A2G(4)2	18,11	3,085	3,08	7,0955	7,1407	1951,76678	1951,7624	2	49588557
M6 D1	18,42	0,526	0,53	7,14	7,2448				8460614
A2BG(4)2	18,8	0,478	0,48	7,35	7,3718				7688977

M5A1G(4)1	19,02	0,558	0,56	7,431	7,4467		8976285
F(6)A2BG(4)2	19,42	0,091	0,09	7,605	7,5841		1470240
F(6)A3 GLCNAC1	19,6	0,103	0,1	7,645	7,6447		1648703
DISCOVERED RT 19.698	19,7				7,6801		4327438
M7	20,6	0,608	0,61	7,9969	7,9983		9773639
A2G(4)2S(3)1	20,78	0,099	0,1	8,06	8,0659		1584305
A2G(4)1SG1	21,01	3,797	3,8	8,02	8,1485	2096,8021	2 61031970
F(6)A2[6]BG(4)1S(6)1	21,33	0,099	0,1	8,27	8,2661		1586304
A2G(4)2S(6)1	21,75	6,039	6,04	8,4	8,4192	2242,8622	2 97076085
F(6)A2G(4)2S(6)1	22,01	0,374	0,37	8,55	8,519		6007428
A2[3]G(4)1S1	22,52	0,953	0,95	8,69	8,7121		15322061
F(6)A3G(4)3 ISO2	22,76	0,198	0,2	8,8	8,8064		3190480
F(6)A2G(4)2S(3,3)2	23	1,551	1,55	8,85	8,8998		24937948
F(6)A2G(4)2SG(6)1	23,2	0,263	0,26	8,9668	8,9771		4231611
F(6)A2G(4)2GA(3)2	23,61	0,252	0,25	9,1706	9,1402		4044567
A2G(4)2S(6,6)2	23,85	3,481	3,48	9,415	9,2337	2533,95762	3 55961161
F(6)M5A1G(4)1SG(6)1	24,48	0,104	0,1	9,5135	9,4917		1669544
A3G(4)3S(6)1	24,68	0,38	0,38	9,6	9,5754		6100839
DISCOVERED RT 24.885	24,89				9,6627		289394796
F(6)A4G(4)4	25,55	1,11	1,11	9,915	9,948		17839654
F(6)A4 GLCNAC3	26	0,091	0,09	10,135	10,1419		1467818
A2G(4)2SG(6,6)2	26,59	0,075	0,08	10,41	10,4091		1212153
F(6)A2G(4)2SG(6,6)2	27,17	0,157	0,16	10,69	10,6714		2531296
DISCOVERED RT 27.628	27,63				10,8878		1514347
F(6)A3G(4)2GA(3)2SG(6)1	27,68	0,125	0,13	10,94	10,9135		2009358
F(6)A4G(4)4LAC1	27,94	0,127	0,13	11,01	11,0378		2044525

F(6)A4 GLCNAC4	28,33	0,069	0,07	11,17	11,2241	1113267
A3S(6)1G(4,4,3)3S (3,3,3)3	28,82	0,252	0,25	11,47	11,4707	4058154
F(6)A4G(4)4LAC2	29,86	0,303	0,3	12,1	11,999	4871338
DISCOVERED RT 38.028	38,03				17,1163	468801425
DISCOVERED RT 39.371	39,37				18,1071	6928569
NON- SIALYLATED GLY CANS	86,047		86,05			1383185720
MONO- SIALYLATED GLY CANS	8,435		8,43			135587536
DI- SIALYLATED GLY CANS	5,266		5,27			84642558
TRI- SIALYLATED GLY CANS						
DE- FUCOSYLATED G LYCANS	90,781		90,78			1459287132
ANTENNARY 1 GL YCANS	1,456		1,46			23412323
ANTENNARY 2 GL YCANS	90,328		90,33			1451999620
ANTENNARY 3 GL YCANS	5,019		5,02			80671805
ANTENNARY 4 GL YCANS	1,968		1,97			31636602
HIGH MANNOSE GLYCANS	1,797		1,8			28880082

MS LIBRARY SEARCH CONFIRMED

COMPONENT NAME	OBSERVED RT (MIN)	AMOUNT	% AMOUNT (%)	EXPECTED GLYCAN UNITS	GLYCAN UNITS	EXPECTED MASS (DA)	OBSERVED MASS (DA)	CHARGE	RESPONSE
A2	12,89	38,315	38,32	5,4619	5,4968	1627,66114	1627,6594	2	615909554
F(6)A2	13,96	1,667	1,67	5,7879	5,8274	1773,71904	1773,7166	2	26803799
A3	14,16	3,961	3,96	5,985	5,8882	1830,74051	1830,7369	2	63664272
A2G(4)1	15,37	9,939	9,94	6,2465	6,2669	1789,71396	1789,7148	2	159772159
A2[3]G(4)1	15,75	14,889	14,89	6,29	6,3861	1789,71396	1789,7153	2	239332896
A2[6]BG(4)1	16,38	3,2	3,2	6,335	6,5847	1992,79333	1992,7924	2	51431151
A2G(4)2	18,11	3,085	3,08	7,0955	7,1407	1951,76678	1951,7624	2	49588557
A2G(4)1SG1	21,01	3,797	3,8	8,02	8,1485	2096,80429	2096,8021	2	61031970
A2G(4)2S(6)1	21,75	6,039	6,04	8,4	8,4192	2242,8622	2242,8617	2	97076085
A2G(4)2S(6,6)2	23,85	3,481	3,48	9,415	9,2337	2533,95762	2533,9557	3	55961161

Tabelle 6: Übersicht über die im „Whole Exome Sequencing“ aufgefallenen potentiellen Zielgene (Uwe Kornak, Charité, Berlin).

<i>ACTR5</i>	<i>NBEA</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>NSUN6</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>OR2M3</i>
<i>ARHGAP29</i>	<i>OR5M3</i>
<i>C12orf71</i>	<i>PABPC3</i>
<i>CACNA1A</i>	<i>PDE4DIP</i>
<i>CRNKL1</i>	<i>PTPRD</i>
<i>CYP2C8</i>	<i>RAB26</i>
<i>DGKH</i>	<i>ROBO3</i>
<i>DIP2A</i>	<i>SGK2</i>
<i>EMR1</i>	<i>SLC9B1</i>
<i>EP400</i>	<i>SPATA5</i>
<i>FAM136A</i>	<i>SPATA6L</i>
<i>FAM209B</i>	<i>SYDE2</i>
<i>FREM3</i>	<i>TDG</i>
<i>GIT2</i>	<i>TIAM1</i>
<i>GLDC</i>	<i>TMPRSS13</i>
<i>GZF1</i>	<i>TP53INP2</i>
<i>HRNR</i>	<i>TTC30B</i>
<i>KCNA5</i>	<i>TTN</i>
<i>KIR2DL1</i>	<i>TYRO3</i>
<i>KRT18</i>	<i>UNC79</i>
<i>KRT8</i>	<i>VAV3</i>
<i>LARP1B</i>	<i>VPS45</i>
<i>MAP3K4</i>	<i>VSX1</i>
<i>MEFV</i>	<i>ZNF804A</i>
<i>MLL3</i>	<i>ZNF880</i>

Tabelle 7: Ergebnisse der Mutationsanalysen von V VPS45 p. A392T und GZF1 p. E289*.

Testprogramm	VPS45 c. 1174 G>A p. A392T	GZF1 c. 865 G>T p. E289*
MutationTaster	Krankheitsverursachend +	Krankheitsverursachend +
Polymorphism Phenotyping v2	100 % gesund -	/
SIFT	Toleriert -	/
PROVEAN	Schädlich +	Schädlich +
MUTATIONASSESSOR	Funktional -	/
SNAP	Betroffen +	Betroffen +
MUpro	Erhöhte Stabilität Erniedrigte Stabilität ±	Erniedrigte Stabilität +

J. Publikationsliste

Erstautor

Homozygosity for c.394A>T leads to p.Ile132Phe as well as Exon 5 skipping and has a fatal outcome in our patient with PMM2-CDG.

Hutter, Panagiotou, Himmelreich, Hüllen, Beedgen, Geiger, Zielonka, Kerst, Thiel;
in prep. (2019)

Mitautor

Cutis Laxa, Exocrine Pancreatic Insufficiency and Altered Cellular Metabolomics as Additional Symptoms in a New Patient With ATP6AP1-CDG.

Dimitrov, Himmelreich, Hipgrave Ederveen, Lüchtenborg, Okun, Breuer, Hutter, Carl, Guglielmi, Hellwig, Thiemann, Jost, Peters, Staufner, Hoffmann, Hackenberg, Paramasivam, Wiemann, Eils, Schlesner, Strahl, Brügger, Wuhrer, Korenke, Thiel;
Molecular Genetics and Metabolism, 2018

International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up.

Altassan, Péanne, Jaeken, Barone, Bidet, Borgel, Brasil, Cassiman, Cechova, Coman, Corral, Correia, de la Morena-Barrio, de Lonlay, Dos Reis, Ferreira, Fiumara, Francisco, Freeze, Funke, Gardeitchik, Gert, Girad, Giros, Grünwald, Hernández-Caselles, Honzik, Hutter, Krasnewich, Lam, Lee, Lefeber, Marques-de-Silva, Martinez, Moravej, Ōunap, Pascoal, Pascreau, Patterson, Quelhas, Raymond, Sarkhail, Schiff, Seroczyńska, Serrano, Seta, Sykut-Cegielska, Thiel, Tort, Vals, Videira, Witters, Zeevaert, Morava;

Journal of Inherited Metabolic Disease, 2019

Novel variants and clinical symptoms in four new ALG3-CDG patients, review of the literature and identification of AAGRP-ALG3 as a novel ALG3 variant with an alanine and glycine rich N-terminus.

Himmelreich, Dimitrov, Geiger, Zielonka, Hutter, Beedgen, Hüllen, Breuer, Peters, Thiemann, Hoffmann, Sinning, Dupré, Vuillaumier-Barrot, Barrey, Denecke, Kölfen, Düker, Ganschow, Lentze, Moore, Seta, Ziegler, Thiel;

Human Mutation, 2019

K. Konferenzteilnahmen

2016

27. – 28.11.2016 EURO-CDG 2 Meeting; Lille (Frankreich)

2017

08. – 10.03.2017 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) – Thema: Angeborene Glykosylierungserkrankungen (CDG); Fulda (Deutschland)

Posterpräsentation

13. – 14.07.2017 International Scientific CDG Symposium 2017; Leuven (Belgien)

Posterpräsentation

15. – 16.07.2017 3rd World CDG Conference for families; Leuven (Belgien)

17. – 19.09.2017 28th Joint Glycobiology Meeting; Aachen (Deutschland)

Posterpräsentation

2018

07. – 09.03.2018 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) – Thema: Inborn errors of fatty acid oxidation; Fulda (Deutschland)

Posterpräsentation

2019

28. – 30.01. 2019 GlycoBioTech 2019; Berlin (Deutschland)

Posterpräsentation

21. – 22.02.2019 53. Arbeitstagung Pädiatrische Forschung; Frankfurt am Main (Deutschland)

Vortrag

13. – 15.03.2019 32. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) – Thema: Remethylation disorders and methylmalonic acidurias; Fulda (Deutschland)

Posterpräsentation

20. – 21.03.2019 EURO-CDG 2 und EUROGLYCAN-omics Meeting; Paris (Frankreich)

27. – 29.10.2019 30th Joint Glycobiology Meeting; Lille (Frankreich)

Posterpräsentation

L. Versicherung an Eides statt

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtlich und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet zu haben.

Heidelberg, den

.....

Anna-Marlen Hutter

M. Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Prof. Dr. Sabine Strahl, die nicht nur die Aufgabe des Erstgutachters übernommen hat, sondern auch den Kontakt zu Christian Thiel und somit zu meiner Doktorandenstelle vermittelt hat. Durch ihr Wissen im Bereich der Glykobiologie konnte sie mir mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Für die Übernahme des Korreferats, die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Christian Thiel bedanken. Danke für dein immer offenes Ohr, die wissenschaftliche Hilfe und das tolle Arbeitsklima. Vielen Dank für das Vertrauen, dass du in mich gesetzt hast und die drei Jahre, die du mich begleitet hast.

Bei Herrn Dr. Mirko Völkers möchte ich vor allem für die wissenschaftlichen Diskussionen rund um die „TAC Meetings“ bedanken.

Für die Unterstützung bei der Untersuchung der Serum-N-Glykane bzw. beim „Whole Exome Sequencing“ möchte ich mich bei unseren Kollaborationspartnern Gernot Poschet (COS, Heidelberg) und Uwe Kornak (Charité, Berlin) bedanken.

Den Kollegen, die mich die letzten Jahre so freundlich aufgenommen und in allen Bereichen unterstützt haben, die zu Freunden wurden, die auf alle Fragen eine Antwort finden und mich immer zum Lachen gebracht haben, die aber auch ernste und wissenschaftliche Diskussionen über sich haben ergehen lassen oder auch freudig daran teilgenommen haben. Vielen Dank für eure Hilfe, eure Ratschläge und die kleinen und Großen Nettigkeiten!

Allen voran danke ich unserer Arbeitsgruppe Nastassja Himmelreich, Bianca Dimitrov, Virginia Geiger, Dorothea Meßmer-Schmidt, Simone Hengst, Lars Beedgen, Andreas Hüllen und Kristina Falkenstein. CDG-4-ever! ☺

Aber auch bei den „Arbeitsgruppenexternen“ Tim Weigand, Maximilian Breuer, Selina Wächter und Michelle Dressler möchte ich mich bedanken.

Außerdem bei allen Praktikanten und Studenten, die während dieser Zeit bei uns waren. Vor allem Marius Weißmehl, Anne-Marie Bühner, Ann-Katrin Schlosser, Lukas Hoeren und last but not least meiner (einzig wahren) Bachelorette Lisa Mutz.

Auch allen übrigen Mitarbeitern des Stoffwechsellagerums möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen. Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft und das immer angenehme Arbeitsklima.

Bei meiner Familie und meinen Freunden, allen voran bei meiner Schwester Mira, meiner Nichte Lili und meinem Neffen Nick möchte ich mich von Herzen bedanken. Danke, dass ihr immer da seid und wisst, wie ihr mich aufmuntern könnt.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern. Tausend Dank für eure Unterstützung, die mir nicht nur in den letzten Jahren, sondern schon immer zuteilwurde, für eure Hilfe in allen Lebenslagen und Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Für sein Verständnis, sein Durchhaltevermögen und seine Liebe möchte ich mich zu guter Letzt bei Manuel bedanken. Ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen!