

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.) - Andreas Jürgen Hüllen

aus: Heidelberg (Baden-Württemberg)

Tag der mündlichen Prüfung: 03. August 2021

# GFUS-CDG

## IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN UND BEHANDELBAREN DEFEKTS IN DER GDP-L-FUCOSE SYNTHASE

Gutachter:

Prof. Dr. Britta Brügger

PD. Dr. Christian Thiel

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	2
3	Theorie	3
3.1	Glykosylierung	3
3.2	Proteinglykosylierung	3
3.3	Biosynthese von Glykoproteinen	4
3.4	Fucose	14
3.5	Zielsetzung	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Patientenanamnese	23
4.2	Identifizierung eines Glykosylierungsdefekts	25
4.3	Molekularbiologische Untersuchungen der genetischen Mutation der CDG-Patientin	31
4.4	Western Blot-Analyse zeigt reduzierte GFUS-Proteinmenge	36
4.5	Verminderte Expression des kurzen <i>GFUS</i> Transkripts	37
4.6	Immunfluoreszenzen ergeben eine zytosolische Lokalisation von GFUS	37
4.7	Defucosylierte Proteine in der Patientin	38
4.8	Komplementation der Patientenfibroblasten	41
4.9	<i>In vitro</i> Umsetzung von [ <sup>14</sup> C]GDP-D-Mannose in [ <sup>14</sup> C]GDP-L-Fucose	44
4.10	GFUS-Defizienz führt zu weitreichenden Sekundäreffekten	45
4.11	Genexpression der Proteine des Fucosestoffwechsels	47
4.12	Metabolite	51
5	Diskussion	54
5.1	Eine Krankheitsverursachende Mutation in <i>GFUS</i>	54
5.2	Vergleich von GFUS-CDG mit bereits bekannten Fucosylierungsdefekten	61

5.3	Ein Therapieansatz durch Supplementierung mit L-Fucose	65
5.4	Ausblick	66
6	Material	68
6.1	Patientenmaterial	68
6.2	Chemikalien	68
6.3	Enzyme, Kits und Standards	69
6.4	Verbrauchsmaterialien	70
6.5	Geräte	72
6.6	Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	74
6.7	Oligonukleotide	78
6.8	Software, Datenbanken und rechnergestützte Ressourcen	78
6.9	Antikörper, Lektine und Streptavidin-Konjugate	79
6.10	Vektoren und Bakterienstämme	81
6.11	Medien und Platten ( <i>E. Coli</i> )	81
6.12	Medien für die Kultivierung von Säugerzellen	82
6.13	Zelllinien	82
7	Methoden	83
7.1	CDG-Routinediagnostik	83
7.2	Zellbiologische Methoden	84
7.3	Methoden zur Arbeit mit Retroviren	86
7.4	Proteinbiochemische Methoden	87
8	Literaturverzeichnis	98
9	Anhang	I
9.1	Abbildungsverzeichnis	I
9.2	Tabellenverzeichnis	II
9.3	Appendix	III
9.4	Danksagung	XV

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	$p \leq 0,05$ (signifikant)
**	$p \leq 0,01$ (sehr signifikant)
***	$p \leq 0,001$ (hoch signifikant)
~	Circa
<	Kleiner
>	Größer
±	Plus / Minus
°C	Grad Celsius
∞	unendlich
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp.	Ampicillin
ApoCIII	Apolipoprotein-CIII
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches AMP
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CDG-I	frühe Glykosylierungsdefekte
CDG-II	späte Glykosylierungsdefekte
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COG	Conserved Oligomeric Golgi Komplex
COS	Centre for Organismal Studies Heidelberg
C <sub>t</sub>	„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
Dr.	Doktor
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
et al.	„et alii“ / und andere
F	Forward Primer
FCS / FKS	Fetales Kälberserum
FUT 1-11	Fucosyltransferase 1-11
G	„Gauge“ / Kanüledurchmesser
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GDP	Guanosindiphosphat
GP130	Glykoprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Human
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IgA	Immunoglobulin A

IgG	Immunglobulin G
in prep.	in Vorbereitung
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo- ( $10^3$ )
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
L-	Levo-Form, linksdrehende Enantiomere
LB	Lysogeny Broth Nährmedium
LLO	Lipid Linked Oligosaccharide
m	Meter
m	Milli- ( $10^{-3}$ )
M	Molar (mol pro Liter)
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MPI	Mannose-6-Phosphate Isomerase
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n	Nano- ( $10^{-9}$ )
n	Stoffmenge
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing

nm	Nanometer
nmol	Nanomol
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
pH	Potentia Hydrogenii
PIG	Phosphatidylinositolglykan
PLO	Protein Linked Oligosaccharide
PMM2	Phosphomannomutase 2
pmol	Pikomol
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
POFUT1-2	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 1-2
QC	Quality Control
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit PCR
R	Reverse Primer
RAB7A	Ras-Associated Protein RAB7
RefSeq	Reference Sequence
RIPA	Engl. Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SD	„standard deviation“ / Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLC35C1	Solute Carrier Family 35 Member C1
Strep	Streptomycin

TAE	Tris Aceton EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	TBS mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TOF	Time of Flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter Anderem
U	Units
UDP	Uridindiphosphat
UK	United Kingdom
UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WES	Whole Exome Sequencing
WT	Wildtyp
X	X-Chromosom
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro- (10 <sup>-6</sup> )
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

### Abkürzungen der Nukleinbasen:

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	beliebige Base

### Aminosäuren im Drei-, sowie Einbuchstabencode:

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

### Legende 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

### Nomenklatur der N-Glykane:

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

# 1 Zusammenfassung

Angeborene Störungen der Glykosylierung (CDG) sind eine heterogene Familie von Krankheiten, die eine fehlerhafte co- und posttranslationale Anheftung von Zuckerstrukturen auf Proteine und Lipide verursachen. Therapiemöglichkeiten im CDG-Feld sind rar und zumeist auf diätetische Behandlungen beschränkt. Erfolge ließen sich dabei z.B. mit Mannose (MPI-CDG), Fucose (SLC35C1-CDG) oder Galactose (PGM1-CDG, SLC35A2-CDG) bei einzelnen Patienten erzielen.

Die hier vorgestellte Patientin zeigte einige CDG-typische Charakteristika, die u.a. grobe Gesichtszüge, eine Abneigung gegen das Füttern, rezidivierendes Erbrechen bei Sondenernährung und ein stockendes Wachstum beinhalteten. Zudem wies sie globale Entwicklungsverzögerungen mit einhergehender signifikant beeinträchtigter Sprachentwicklung auf. Eine Exomsequenzierung zeigte biallelische Varianten in *GFUS*, das für die GDP-L-Fucosesynthase kodiert. *GFUS* katalysiert die Umwandlung von GDP-D-Mannose zu GDP-L-Fucose. GDP-L-Fucose ist für die Fucosylierung von N-Glykanen sowie für die O-Fucosylierung von Glykoproteinen erforderlich. Die stark reduzierte *GFUS*-Aktivität führte zu einer allgemeinen Hypofucosylierung von Proteinen im Serum und in Fibroblasten der Patientin. Mittels biochemischer Methoden wie N-Glykananalysen, Lektinblots, Western Blots, Immunfluoreszenzstudien, Metabolitmessungen, *in silico* Analysen sowie einer detaillierten genetischen Beschreibung der Mutation wurde der neue Defekt charakterisiert.

Basierend auf den ermutigenden Ergebnissen aus der Zellkultur wurde in Zusammenarbeit mit der Kinderklinik in Salzburg eine orale Supplementation der Patientin mit L-Fucose eingeleitet, die innerhalb von vier Wochen zu einer Normalisierung der Fucosylierung von Glykoproteinen im Patientenserum führte. In der anschließenden Beobachtungszeit von 19 Monaten zeigte sich eine moderate Verbesserung der anthropometrischen Daten. Anhand des Kaufmann-ABCs konnte hingegen eine deutliche Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten detektiert werden, so dass die Patientin den Sprachgebrauch erlernt hat. *GFUS*-CDG stellt einen neuen Glykosylierungsdefekt im Bereich der Proteinfucosylierung dar, für den eine orale L-Fucose-Supplementierung einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellt.

## 2 Abstract

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a heterogeneous family of diseases involving the co- and post-translational modification of proteins or the incorrect attachment of sugar structures to lipids. Therapeutic options in the CDG field are rare and mostly limited to dietary treatments. Successes could be achieved with e.g., mannose (MPI-CDG), fucose (SLC35C1-CDG) or galactose (among others PGM1-CDG, SLC35A2-CDG) in individual patients.

The patient presented here showed some CDG-typical characteristics, which included coarse facial features, aversion to feeding, recurrent vomiting on tube feeding, and stunted growth. She also exhibited global developmental delays with associated significantly impaired language development. Exome sequencing revealed biallelic variants in *GFUS*, which encodes GDP-L-fucose synthase. *GFUS* catalyzes the conversion of GDP-D-mannose to GDP-L-fucose. GDP-L-fucose is required for fucosylation of N-glycans as well as for O-fucosylation of glycoproteins. The severely reduced *GFUS* activity resulted in a general hypofucosylation of proteins in the patient's serum and fibroblasts. Biochemical methods such as N-glycan analyses, lectin blots, Western blots, immunofluorescence studies, metabolite measurements, in silico analyses, and a detailed genetic description of the mutation were used to characterize the new defect.

Based on the encouraging results from cell culture, an oral supplementation of the patient with L-fucose was initiated in collaboration with the Children's Hospital in Salzburg, which resulted in a normalization of fucosylation of glycoproteins in the patient's serum within four weeks. The subsequent observation period of 19 months showed a moderate improvement in anthropometric data. However, using the Kaufmann ABC, a significant improvement in cognitive abilities was detected, such that the patient learned the use of language. *GFUS*-CDG represents a novel glycosylation defect in protein fucosylation for which oral L-fucose supplementation is a promising therapeutic approach.

## 3 Theorie

### 3.1 Glykosylierung

Das Gebiet der Glykobiologie umfasst die vielfältigen Funktionen von Zuckern, die an Proteine und Lipide gebunden sind. Allgemein bekannt ist allerdings vor allem der Zusammenhang von Kohlenhydraten mit dem Energiestoffwechsel der Zelle: Die Energiegewinnung durch den Abbau von Glucose und Glykogen wird schon in Schulen gelehrt. Diese Funktion der Zuckermoleküle, die sich auf die Speicher- und Transportform im Energiestoffwechsel bezieht, wird jedoch als außerhalb des Bereichs der Glykobiologie liegend betrachtet. Da innerhalb eines Glykogenmoleküls die ersten Glukoseeinheiten an das Protein Glykogenin geknüpft werden, stellt Glykogen aber strenggenommen auch ein Glykoprotein dar [2].

Die Glykosylierung beschreibt proteingesteuerte Vorgänge, bei denen verschiedene Kohlenhydrate an Lipide oder Proteine verknüpft werden. Die Zuckerstrukturen der gebildeten Glykokonjugate werden Glykane genannt. Glykane unterscheiden sich in ihrer Länge, der Art der verwendeten Monomere, aber auch in der Art ihrer Verknüpfung.

### 3.2 Proteinglykosylierung

Im Falle der Proteine spricht man von Proteinglykosylierung, die in allen eukaryontischen Zellen auftritt [3]. Die eukaryontische Glykosylierung wurde bereits in den 1930er Jahren beschrieben, es dauerte aber noch 40 Jahre bis auch archaische Glykoproteine auf den S-Schichten des *Halobacterium salinarium*, identifiziert wurden [4, 5]. Ebenfalls in den 1970er Jahren wurden die ersten Glykoproteine auf der Oberfläche von *Clostridium thermosaccharolyticum* gefunden, was belegte, dass die Glykosylierung in allen der drei Domänen des zellulären Lebens vorkommt [6, 7]. Die Glykosylierung kann die Eigenschaften von einzelnen Proteinen entscheidend verändern, so dass hiermit beispielsweise die funktionelle Diversität steigt. Besonders wichtig ist die Proteinglykosylierung für die Proteinstabilität und -faltung [8]. Etwa 50 % der eukaryontischen Proteine weisen verschiedene Formen von Glykosylierung auf. Zusätzlich sind schätzungsweise 20 – 50 % aller Proteine der Swiss-Prot Datenbank, die nicht

nur eukaryontische Proteine führt, ebenfalls glykosyliert [9-11]. Zu den glykosylierten Proteinen zählen u.a. Hormone, Enzyme, Rezeptoren, Membran- und Matrixproteine. Glykoproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion, Signalübertragung und Immunantwort [12, 13].

### 3.3 Biosynthese von Glykoproteinen

Die Glykosylierung von Proteinen ist vielfältig und wird neben den GPI-Anker-gebundenen Protein, den Proteoglykanen und Glycosaminoglykanen vor allem in N- und O-Glykosylierung, sowie in C-Mannosylierung unterteilt. Kennzeichnend für die Letztgenannten ist die Unterteilung sind die chemischen Elemente Stickstoff (N), Sauerstoff (O) und Kohlenstoff (C), an welche die glykosidische Bindung erfolgt [14, 15]. An der Biosynthese sind zahlreiche Proteine wie Glykosyltransferasen, Glykosidasen, Transporter und eine Vielzahl an beigeschalteten Proteinen beteiligt, die gemeinsam einen hoch konservierten Mechanismus bilden [16]. Die N-Glykosylierung stellt die häufigste Form der Modifikation von membrangebundenen- und sekretierten Proteinen dar und ist bisher am besten verstanden.

#### 3.3.1 N-Glykosylierung

N-Glykane sind an das Stickstoffatom der Amidgruppe von Asparaginseitenketten gebunden. In tierischen Zellen ist der nachfolgende Zucker, der an Asparagin (Asn) verknüpft wird, N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Die Verknüpfung erfolgt stets in  $\beta$ -Konformation und wird als GlcNAc $\beta$ 1-Asn annotiert. Die kovalente Bindung der Zuckerreste an Asparagin folgt einer Erkennungssequenz aus drei Aminosäuren. Einem glykosylierten Asparagin (N) reiht sich eine beliebige Aminosäure (X) an, welche aber nicht Prolin, Threonin oder Serin sein kann und zuletzt ein Serin (S) oder Threonin (T). Dieses Glykosylierungsmotiv kann vereinfacht als N-X-S/T ( $X \neq P/S/T$ ) dargestellt werden [17]. Eine weitere Aminosäurekombination, die selten zu einer Glykosylierung von Asparagin führen kann ist N-X-C, bei der auf eine beliebige Aminosäure ein Cystein (C) folgt [18]. Nur bei etwa jeder Dritten Erkennungssequenz erfolgt auch tatsächlich die Anheftung eines N-Glykans [19, 20]. Für eine erfolgreiche Glykosylierung muss sich das Protein dreidimensional in einer geeigneten Position sowie im korrekten Zellkompartiment befinden.

Obwohl sich N-Glykane in ihrer terminalen Ausarbeitung stark unterscheiden, haben sie eine gemeinsame Grundstruktur aus fünf verknüpften Monosacchariden. An die innerste GlcNAc-Einheit am Asparaginrest wird ein weiteres GlcNAc-Molekül angehängt. Anschließend folgen drei Mannose (Man) Bausteine, die in einer Verzweigung münden. Die beiden äußeren Mannosereste sind 1,3 bzw. 1,6 glykosidisch verknüpft und daher bezeichnend für den 1,3 bzw. 1,6 Arm des Oligosaccharids [21]. Die Synthese des N-Glykans wird in drei Schritte unterteilt: (1) Bildung eines lipid-gebundenen Oligosaccharid-Vorläufers; (2) *en bloc* Übertragung des Vorläufers auf das Polypeptid mit ersten Modifikationsschritten und (3) weitere Modifikationen und Prozessierung des N-Glykans im Golgi-Apparat. Die Lipid-verknüpften Oligosaccharide, der *en bloc* Transfer und erste Trimmingprozesse finden im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, während die weitere Prozessierung des naszierenden Proteins beim Migrieren durch den Golgi-Apparat geschieht. Eine detaillierte Ausführung der N-Glykosylierung ist in Abbildung 1 dargestellt.

#### **Synthese der Lipid-gebundenen Oligosaccharide**

Der Glykanvorläufer, welcher auf das Polypeptid übertragen wird, ist eine  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur. Vor der Übertragung ist die wachsende Oligosaccharidstruktur durch eine Pyrophosphatbindung an das Lipid Dolichol gebunden. Dolichol entsteht durch Verkettung von 17 - 20 Isopreneinheiten, die zu dem hydrophoben Charakter des Lipids beitragen [22]. Diese verlängerte, hydrophobe Isoprenkette wird in die Lipiddoppelschicht des Endoplasmatischen Retikulums integriert. Die ersten Schritte der Lipid-gebundenen Oligosaccharid (LLO) Synthese finden an der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran statt. Die Enzyme, die die Anheftung der zwei GlcNAc- und fünf Mannosereste katalysieren, nutzen die Nukleotidzucker-Donatoren Uridindiphosphat (UDP)-GlcNAc und Guanosindiphosphat (GDP)-Man. Das LLO wird nun durch die Membran geflippt und wird so für die zytoplasmatischen Enzyme unzugänglich. Sobald die wachsende Oligosaccharidstruktur auf der luminalen Seite des ER freigelegt ist, werden weitere Zucker angehängt. Die Zuckerdonatoren für die finalen vier Mannose- und drei Glukoseeinheiten innerhalb des ER sind die Dolichol-verknüpfte Zucker Dol-P-Man und Dol-P-Glc. Der Transfer des vollständigen Vorläuferglykans findet ebenfalls auf der luminalen Seite des ER statt. Die Energie für die Übertragung der Zucker sowie

für die Synthese der GlcNAc-Asparagin Bindung wird durch die Spaltung der Glykan-Phosphat Bindung bereitgestellt [23, 24].

#### ***En-bloc* Transfer der Glykanstrukturen an das naszierende Protein**

Für den Transfer des Glykans ist ein Membranproteinkomplex verantwortlich, der als Oligosaccharyltransferase (OST) zusammengefasst wird. Die Spezifität der OST erklärt zum einen das Glykosylierungsmotiv, und zum anderen, weshalb Proteine eher an der Oberfläche glykosylierte Strukturen aufweisen. Durch die stark polaren Eigenschaften der Zuckerstrukturen wäre eine Glykosylierung der inneren hydrophoben Regionen eines Proteins energetisch ineffizient. Obwohl die Glykosylierung oft als post-translationale Modifikation bezeichnet wird, findet der Transfer normalerweise statt, wenn das naszierende Polypeptid im Lumen des ER entsteht und ist somit ein co-translationales Ereignis. Nach Transfer des Glykans beginnt die Prozessierung durch Exoglycosidasen, die am nicht-reduzierenden Ende des Glykans Monosaccharide abspalten. Drei Glucosereste sowie ein Mannoserest werden abgetrennt, bevor das Glykoprotein die Calnexin/Calretikulin-Proteinqualitätskontrolle durchläuft und anschließend zum Golgi-Apparat transportiert wird [25-27].

#### **Modifikationen des N-Glykans im Golgi-Apparat**

Das im ER begonnene Prozessieren des Glykans wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Das Prozessieren nimmt im Golgi unterschiedliche Verläufe und ist der Grund für die Vielzahl an unterschiedlichen Glykanen, die auf Glykoproteinen zu finden sind [28].

Zunächst werden von einer Reihe an Mannosidasen im *cis*-Golgi manche, alle oder keine  $\alpha(1,2)$  verknüpften Mannosereste abgespalten. Einige der entstanden Glykane werden nicht weiter prozessiert und enthalten zwischen fünf und neun Mannoseeinheiten und werden den mannosereichen Glykanen zugeschrieben [29, 30].

Andere Glykane werden weiter prozessiert und bilden umfassendere Strukturen, die dem Komplextyps zugeordnet werden. Diese Glykane basieren auf einer Grundstruktur aus drei Mannose- und zwei GlcNAc-Einheiten. Am 1,3 Arm des getrimmten Glykans beginnt der Neuaufbau durch Übertragung eines GlcNAc-Monosaccharids, während noch fünf Mannosereste vorhanden sind. Die

GlcNAc-Transferase I, die die Anheftung katalysiert, befindet sich im medialen Teil des Golgis. Anschließend werden die restlichen Mannosezucker am 1,6 Arm durch Mannosidasen entfernt. Darauffolgend können weitere GlcNAc-Transferasen die finale Zusammensetzung des einzelnen Glykans bestimmen. Am häufigsten entstehen hierbei bi-antennäre Strukturen, aber auch tri- oder tetra-antennäre Glykane können gebildet werden. Typischerweise werden die Strukturen durch Galactose (Gal) und Sialinsäure (NeuAc) weiter verlängert. Diese Reaktionen werden durch Galactosyltransferasen und Sialyltransferasen katalysiert, welche sich weiter im Sekretionsweg im *trans*-Golgi, befinden. Alle Monosaccharide, die im Golgi-Netzwerk angehängt werden, liegen vorher als Nukleotidzucker vor (UDP-GlcNAc, UDP-Gal und Cytidin-5'-Monophospho-N-Acetylneuraminsäure (CMP-NeuAc)) [31].

Weitere Modifikationen der Grundstruktur des Oligosaccharids führen zu der dritten Gruppe der Glykane, die dem Hybridtyp zugeordnet werden. Hybride Strukturen werden vor allem dann gebildet, wenn die Mannosidasen nach der Anheftung des einzelnen GlcNAc-Restes, durch die GlcNAc-Transferase I, inaktiv bleiben. Zu den möglichen Modifikationen gehört der Transfer eines „halbierenden“ (engl. bisecting) GlcNAc-Restes an Position 4 des zur Grundstruktur gehörenden Mannoserestes.

An die erste GlcNAc-Einheit kann außerdem eine Fucose angehängt werden, die als core Fucose bezeichnet wird. Auch an die antennären Zuckerzweige können Fucoseeinheiten gehängt werden. Innerhalb der N-Glykane ist die Fucose stets endständig. Auf die Fucosylierung wird in Kapitel 3.4.3 detailliert eingegangen.

Die letzte äußerst auffällige Variation des Glykangrundgerüsts ist die Polylactosamin-Verlängerung. Hierbei wird einer der Glykanarme mit einer unbestimmten Anzahl an Wiederholungen des Disaccharids Gal-GlcNAc verlängert. Eine weitere Verlängerung wird durch eine terminale Sialinsäure an einen Galactoserest verhindert. Die Länge des Arms ist also durch das Verhältnis der Aktivitäten der GlcNAc-Transferase und der Sialinsäuretransferase gegeben [32].

In der folgenden Abbildung werden die in 3.3.1 genannten Prozesse detailliert aufgeführt.

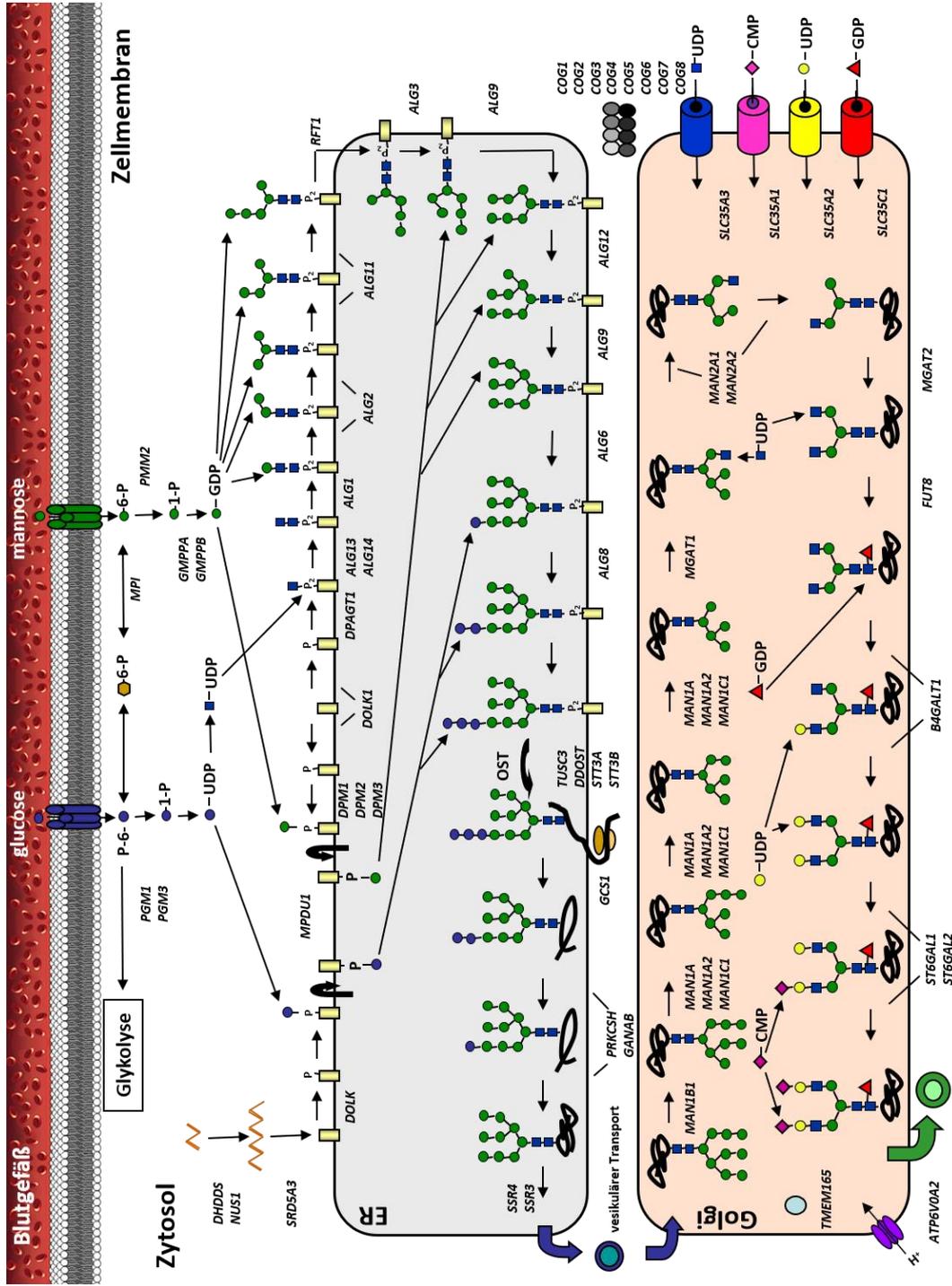


Abbildung 1 – Übersicht über die N-Glykosylierung. Dargestellt sind die einzelnen Prozessierungsschritte beginnend im Zytosol bis hin zum vollständigen, an das Protein gebundene N-Glykan des komplexen Typs im Golgi. Abbildung adaptiert von Thiel & Körner.

### 3.3.2 O-Glykosylierung

Insbesondere die Eigenschaften der Mucine und Proteoglykane werden durch die große Anzahl an O-glykosylierten Zuckern geprägt. Eine Vielzahl weiterer Typen von O-verknüpfter Glykosylierung wurde bereits entdeckt, darunter einige, die strukturelle Aufgaben erfüllen, und andere, die Signalfunktionen haben. Eigene Untergruppen bilden auch die O-GlcNAcylierung, O-Sialylierung und die O-Fucosylierung, die im Kapitel 3.4.3 weiter ausgeführt wird. Alle Untergruppen haben gemein, dass Kohlenhydrate an eine Hydroxygruppe eines Serin oder Threonin eines Proteins geknüpft werden.

#### **Mucine**

Die charakteristische Eigenschaft der Mucine, viel Wasser zu binden, wird durch eine große Anzahl an glykosylierten Strukturen ermöglicht. Die Glykane tragen über 50 % zu der Gesamtmasse der Mucine bei [33]. Die Sialinsäurereste und die Hydroxygruppen der Polysaccharide verleihen den Mucinen einen äußerst polaren Charakter und erklären damit die Wasserbindungskapazität. Ein Beispiel ist Mucin-1 (*MUC-1*), welches unter anderem in der Hornhaut des Auges exprimiert und dort in Epithelzellen eingebaut wird, um eine Adhäsion anderer Zellen oder Mikroorganismen zu verhindern.

Die Synthese der O-verknüpften Saccharide ist grundlegend anders organisiert als die der N-Glykane. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung gibt es kein Glykosylierungsmotiv und der Aufbau der Zuckerstrukturen erfolgt schrittweise nacheinander beginnend mit der ersten N-Acetylgalactosamin (GalNAc-)Einheit direkt an der Hydroxygruppe (OH-) eines Serins oder Threonins. Es erfolgt keine Bildung einer Grundstruktur und kein *en bloc* Transfer. Eine Reihe unterschiedlicher GalNAc-Transferasen katalysieren den ersten Schritt der Synthese, welche sich in ihrer Spezifität unterscheiden. Diese Transferasen befinden sich im Golgi-Apparat und sind somit posttranslational aktiv. Weitere Transferasen, die zusätzliche Zucker an das O-Saccharid verknüpfen sind ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert [34, 35].

## Proteoglykane

Ähnlich wie die Mucine binden auch Proteoglykane viel Wasser. Die wasserbindende Eigenschaft führt bei den Proteoglykanen jedoch zu einem strukturegebenden Effekt. Das bekannteste Proteoglykan ist die Hyaluronsäure. Während die O-Glykane der Mucine oftmals nur wenige Zuckereinheiten umfassen, bestehen die Glykane, die an Proteoglykane gebunden sind aus bis zu hunderten Zuckern [36, 37]. Die Zucker sind als wiederholende, lineare Disaccharide angeordnet und werden Glykosaminoglykane (GAG) genannt.

Die Zielsequenz für Anheftung einer GAG-Kette ist eine Serin-Glycin Folge, wobei nicht alle dieser Motive glykosyliert werden. Ähnlich zu den Mucin-Glykanen erfolgt auch hier die Bildung der Glykankette aufeinanderfolgend direkt am Protein. Die entstehenden Strukturen unterscheiden sich im Detail, enthalten aber wiederholend die Strukturelemente, die für die Funktion der Proteoglykane benötigt werden.

### 3.3.3 C-Mannosylierung

Die C-Mannosylierung beschreibt die kovalente Bindung eines  $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-Restes an C2 der Indolgruppe eines Tryptophans [38]. Die Konsensussequenz W-X-X-W/C wurde zunächst in RNase 2 identifiziert, konnte später aber auch unter Anderem in Properdin und R-spondin2 nachgewiesen werden [39, 40].

### 3.3.4 Congenital Disorders of Glycosylation

Der Nachweis, dass Veränderungen in der Glykosylierung eine direkte Rolle in der Entstehung von Krankheiten spielen, ist eine Herausforderung. Die zunehmende Verbesserung bei der Identifizierung von Genen, die für Proteine kodieren, die an der Biosynthese, dem Transport, dem Abbau und der Erkennung von Glykokonjugaten beteiligt sind, wird zweifelsohne dazu beitragen, weitere Zusammenhänge zwischen Glykanen und Krankheitsprozessen zu ermitteln. Bereits heute ist bekannt, dass viele Erkrankungen aus einem inkorrektem Glykosylierungsmechanismus resultieren. Zudem können Krankheiten selbst einen Einfluss auf die Glykosylierung haben. So ändert sich beispielsweise die Glykosylierung von IgG-Antikörpern bei Rheumatoider Arthritis, oder sogar ganze Glykosylierungsmuster durch Krebs. Erst das umfassende Wissen über die

Veränderungen der Glykosylierungsstruktur von Proteinen und Lipiden oder auch nur der einzelne spezifische Glykane mit deren Rezeptoren kann dazu beitragen, wirksame Therapien auf Zell-, Gewebe- oder organischer Ebene zu etablieren.

Bei einigen Krankheitsbildern kann ein direkter Zusammenhang zwischen einem genetischen Defekt und der Glykosylierung beobachtet werden, diese Defekte werden unter den Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) zusammengefasst [41]. Anfänglich wurden Mutationen in Genen von Glykosyltransferasen, Glykosidasen und nukleotid-aktivierten Zuckertransportern in Verbindung mit CDG gebracht. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass auch Defekte im vesikulären Transport, der pH- oder  $Mn^{2+}$ -Homöostase zur Gruppe der CDG gehören [9]. Die ersten Fälle, die heute der Gruppe der CDG zugeordnet werden, wurden von Jaak Jaeken klinisch bereits 1980 beschrieben [42]. Die Prävalenz wird heute auf 1:20.000 bis 1:100.000 geschätzt, womit Glykosylierungsdefekte zu den seltenen Stoffwechselerkrankungen gehören. Ordnet man diese Defekte nach Reihe der Häufigkeit, ergeben sich folgende Untergruppen: Defekte der N-Glykosylierung, der Glykosaminoglykan Synthese, der Glykosylphosphatidylinositol (GPI-) Anker Synthese, Dystroglykanopathien, Defekte der O-Fucosylierung bzw. O-Glykosylierung, sowie O-GalNAc und O-GlcNAc Defekte und zuletzt Defekte des Glykolipidstoffwechsels [43]. Die Defekte der N-Glykosylierung umfassen mit über der Hälfte der beschriebenen Defekte die größte Gruppe. Anhand der Routinediagnostik von Serum-Transferrin kann innerhalb dieser Gruppe zwischen frühen Defekten, die bis zum Transfer des LLO auf das Polypeptid (CDG-I) reichen, und späten Defekten, die vor allem Prozessierungsschritte im Golgi (CDG-II) betreffen, unterschieden werden. Die Nomenklatur der Defekte richtet sich nach dem betroffenen Protein mit der Verbindung '-CDG'. So wird der häufigste Glykosylierungsdefekt der Phosphomannomutase 2 (PMM2) Entsprechend PMM2-CDG genannt.

Die Routinediagnostik dieser Defekte erfolgt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) von Serum-Transferrin. Dieses Glykoprotein trägt zwei biantennär-sialylierte Oligosaccharide und ist daher negativ geladen. Im Fall eines Glykosylierungsdefekts kann es zum Verlust dieser Sialinsäurereste kommen, was eine Änderung der Ladung und des Isoelektrischen Punkts (IEP) zur Folge hat. Dadurch entsteht ein verändertes, charakteristisches Bandenmuster in der IEF.

Patienten, die an einer Form von CDG leiden, haben meist multisystemische Erkrankungsbilder einschließlich psychomotorischer und neurologischer Retardierung [44]. Auch der Schweregrad ist sehr breit gefächert und reicht vom pränatalen Tod bis hin zu fast gesundem Erwachsensein [45]. Zu den häufigsten Symptomen gehören Entwicklungsstörungen, invertierte Brustwarzen, ein geringeres Kleinhirnvolumen, Krampfanfälle, Strabismus, Herz- und Leberprobleme, generelle Hypotonie und eine verzögerte Sprachentwicklung [9].

### **Fucosylierungsdefekte**

Die Fucosylierung ist essenziell für inter- und intrazelluläre Identifikation, Zell-Zell-Interaktionen, Befruchtung und entzündliche Prozesse [46-48]. Bisher wurden nur vier Arten von kongenitalen Störungen der Glykosylierung (CDG) beschrieben, die mit einer gestörten Fucosylierung einhergehen: FUT8-CDG, FCSK-CDG, POFUT1-CDG und SLC35C1-CDG. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiterer Defekt der Fucosylierung identifiziert und charakterisiert: GFUS-CDG.

Acht Patienten mit pathogenen FUT8 Varianten (MIM #618005, NM\_178155.2) sind in der Literatur beschrieben [49, 50]. Alle Betroffenen litten unter einer Unterentwicklung der Statur sowie an Ernährungsproblemen. Bei allen wurde über Epilepsie und Mikrozephalie berichtet. Weitere neurologische oder immunologische Befunde lagen nicht vor. Es waren weder Angaben zu einer Bombay-Blutgruppe, bei der die Blutgruppenantigene keine Fucose aufweisen, noch zu MRT-Befunden verfügbar. Von einer oralen Supplementierung mit L-Fucose wurde nicht berichtet.

FCSK-CDG (MIM #618324, NM\_145059.3) wurde in zwei Patienten unterschiedlicher Familien beschrieben [51]. Die Patienten fielen durch eine verzögerte Entwicklung, intellektuelle Behinderung und schwerer Epilepsie im Säuglingsalter auf. In beiden Fällen wurde ein niedriger Muskeltonus beschrieben, in einem Fall mit zusätzlichen Krämpfen. Beide Betroffenen waren aufgrund rezidivierender Aspiration auf Sondennahrung angewiesen und bei einem wurde chronische Diarrhoe festgestellt. Bei den FCSK-CDG Patienten wurden ebenfalls ophthalmologische Probleme mit schwerer Sehbehinderung festgestellt. Auch hier wurden keine Angaben über die Blutgruppe oder eine mögliche L-Fucose Therapie genannt.

POFUT1-CDG (NM\_172236.2) wurde zunächst als Dowling-Degos Disease-2 (DDD2, MIM#615327) beschrieben [52, 53]. DDD2 äußert sich durch eine Genodermatose und die Betroffenen haben eine netzartige Pigmentstörung und sind durch zahlreiche knotig-fleckige Hautausschläge („Makeln und Papeln“) gekennzeichnet.

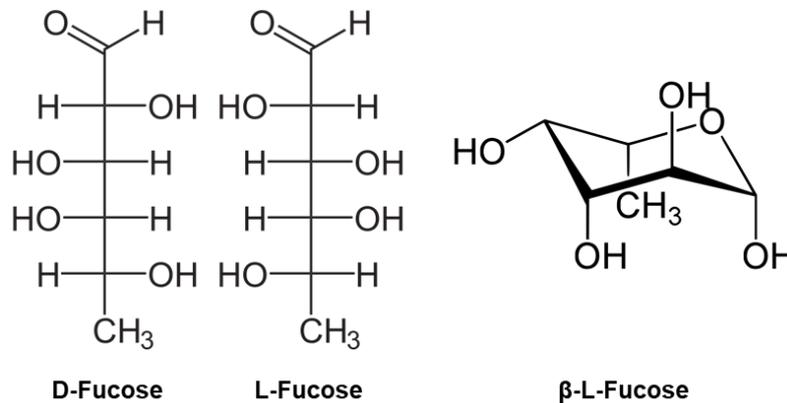
Die erste und häufigste beschriebene Störung im Fucosestoffwechsel ist SLC35C1-CDG (MIM #266265, NM\_018389.5). Bis heute wurden 14 Personen mit pathogenen Varianten in *SLC35C1* beschrieben [54-66]. Über alle Patienten wurde eine verzögerte Entwicklung sowie eine intellektuelle Behinderung berichtet. Das Alter der letzten Nachuntersuchung reicht von 1,3 bis 34 Jahren. Die meisten Patienten leiden an Kleinwuchs, Leukozytose und groben Gesichtszügen. Zu den weiteren häufigen Symptomen zählen Fütterungsstörungen, Epilepsie, muskuläre Hypotonie und Mikrozephalie. Sieben der Patienten wurden mit oraler L-Fucose behandelt. Vier Patienten zeigten einen positiven Effekt unter Zuckersupplementierung in Bezug auf Verbesserung der Leukozytose (3/4 Patienten), Ausbleiben von Fieberepisoden (2/4 Patienten), eine Besserung der Diarrhöe (1/4 Patienten) und gesteigerten Wachstum (1/4 Patienten). Bei sieben der Patienten wurde eine Bombay Blutgruppe festgestellt.

## 3.4 Fucose

### 3.4.1 L-Fucose

Fucose ist ein natürlich vorkommendes Kohlenhydrat. Fucose kann als D- bzw. L-Enantiomer vorliegen. Im Gegensatz zu den meisten Monosacchariden, ist bei Fucose das L-Enantiomer die in der Natur bedeutendere Form. Fucose trägt die Summenformel  $C_6H_{12}O_5$  und zählt somit zu den Hexosen, die sich durch sechs Kohlenstoffatome auszeichnen. Fucose trägt an C1 eine Aldehydgruppe, aber im Unterschied zu den meisten Hexosen an C6 keine Hydroxygruppe. Die molare Masse beträgt 164,16 g/mol [67].

Eine Studie über die Zusammensetzung von Oligosacchariden ergab, dass Fucose das zweithäufigste endständige Kohlenhydrat in Glykanen von Säugetieren ist, wobei nur die Sialinsäure in Glykoproteinen stärker vertreten ist. Bezogen auf die Gesamthäufigkeit ist L-Fucose der fünfhäufigste Zucker [68].



**Abbildung 2 - Strukturformeln der Fucose.** Dargestellt sind die D- und L-Fucose in der Fischer-Projektion (links und mittig), sowie die β-L-Fucose in der Sesseldarstellung (rechts).

### 3.4.2 Fucose-Metabolismus

Fucose wird durch Fucosyltransferasen in Glykane eingebaut, die als Substrat GDP-L-Fucose benötigen. In Säugerzellen gibt es zwei unterschiedliche Stoffwechselwege, um GDP-L-Fucose zu gewinnen. Einerseits kann GDP-L-Fucose aus GDP-Mannose im Rahmen der *de novo* Synthese gewonnen werden, andererseits existiert auch ein „Salvage pathway“ (Bergungstoffwechselweg), der aus freier L-Fucose zum gleichen Produkt führt.

Beide Stoffwechselwege finden im Zytoplasma der Zelle statt, weshalb auch ein Transportmechanismus zum ER und zum Golgi-Apparat von Bedeutung ist [69]. Im Folgenden sollen diese Zusammenhänge genauer betrachtet werden. Einen Überblick über *de novo* und Salvage pathway verschafft Abbildung 3.

### ***De Novo* Synthese**

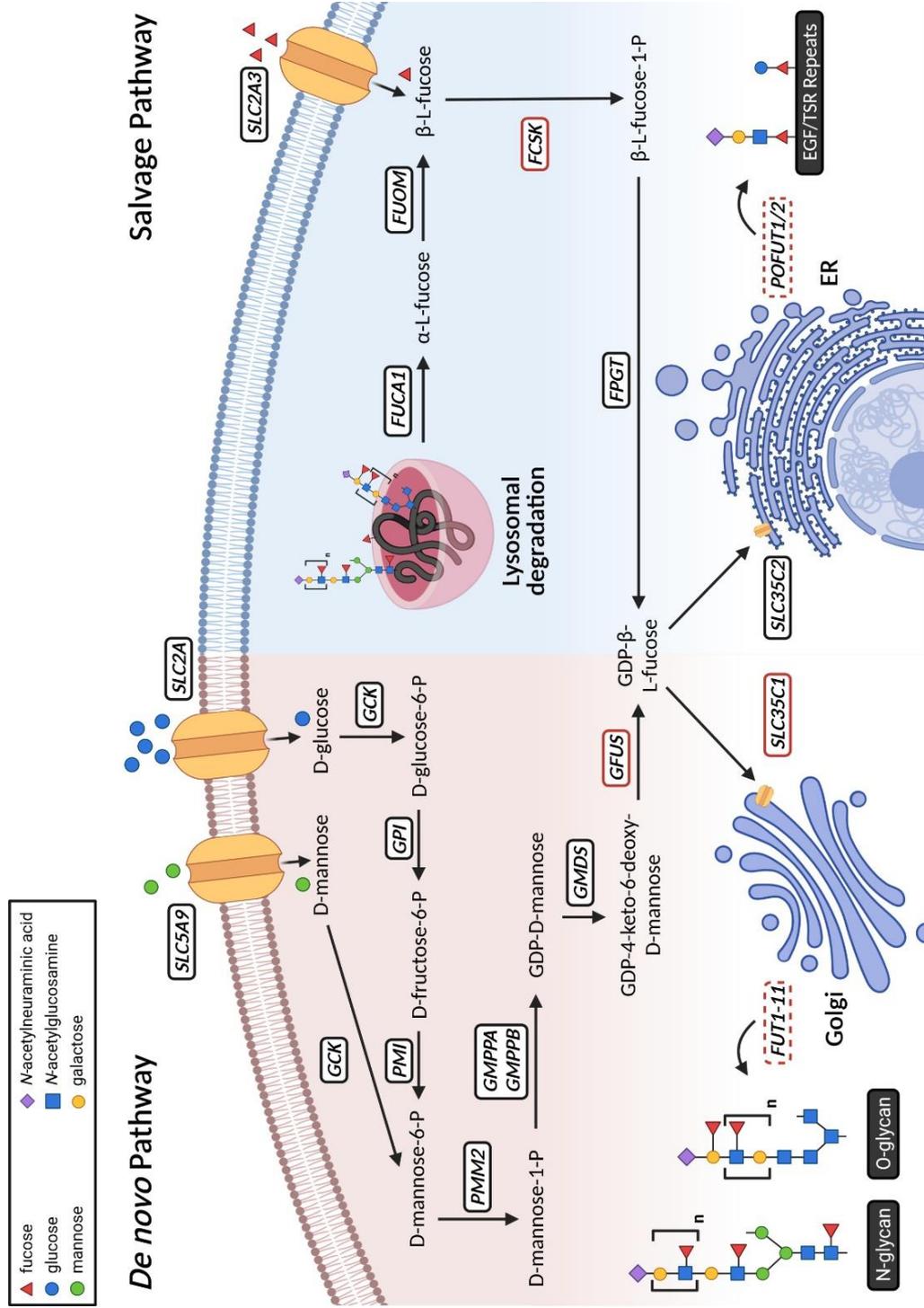
Etwa 90 % der verfügbaren GDP-L-Fucose innerhalb der Zelle wird über die *de novo* Synthese gewonnen [70]. Die erste Reaktion in diesem Stoffwechselweg ist eine Oxidation der C4-Hydroxylgruppe zu einem Keton sowie eine parallele Reduktion des C6-Kohlenstoffs, was zur Bildung von GDP-4-Keto-6-Desoxymannose führt. Diese Reaktion wird durch das Enzym GDP-Mannose 4,6-dehydratase (GMD) katalysiert, das NADP als entsprechenden Cofaktor benötigt [71]. Es wird vermutet, dass die Reaktion intramolekular abläuft, wobei ein Elektron zwischen den beiden Reaktionsgruppen über den Cofaktor übertragen wird [72-74]. Auch die Gentranskription in menschlichen Zellen umfasst fast alle Gewebe, die jeweiligen Niveaus der Transkriptionsaktivität variieren jedoch erheblich [75]. Die weitere Umsetzung wird durch ein zweites Protein, GFUS, katalysiert, das mittels 3,5-Epimerase-Aktivität, GDP-4-Keto-6-Desoxymannose in GDP-4-Keto-6-Desoxygalactose umwandelt. Außerdem erfolgt eine NADP-abhängige Reduktasereaktion an C4, die den letzten Schritt des Weges zu GDP-L-Fucose kennzeichnet.

### **Salvage pathway**

Alternativ zur *de novo* Synthese, kann Fucose in Säugetierzellen importiert und direkt im Zytosol in aktivierte GDP-L-Fucose umgewandelt werden [76, 77]. Zwei zytosolische Enzyme katalysieren die Aktivierung des Monosaccharids: Erstens phosphoryliert die Fucose-Kinase (FCSK) Fucose durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Fucose-1-Phosphat [78-80]. Anschließend erfolgt durch die GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase (FPGT) die Katalyse der Reaktion mit Guanosintriphosphat (GTP), wodurch GDP-L-Fucose und Phosphat entstehen [81, 82]. Diese Reaktion ist ein reversibler Prozess und wird durch Guanosinmonophosphat (GMP) und GDP-L-Fucose stark gehemmt [79, 80].

### **GDP-L-Fucosetransport**

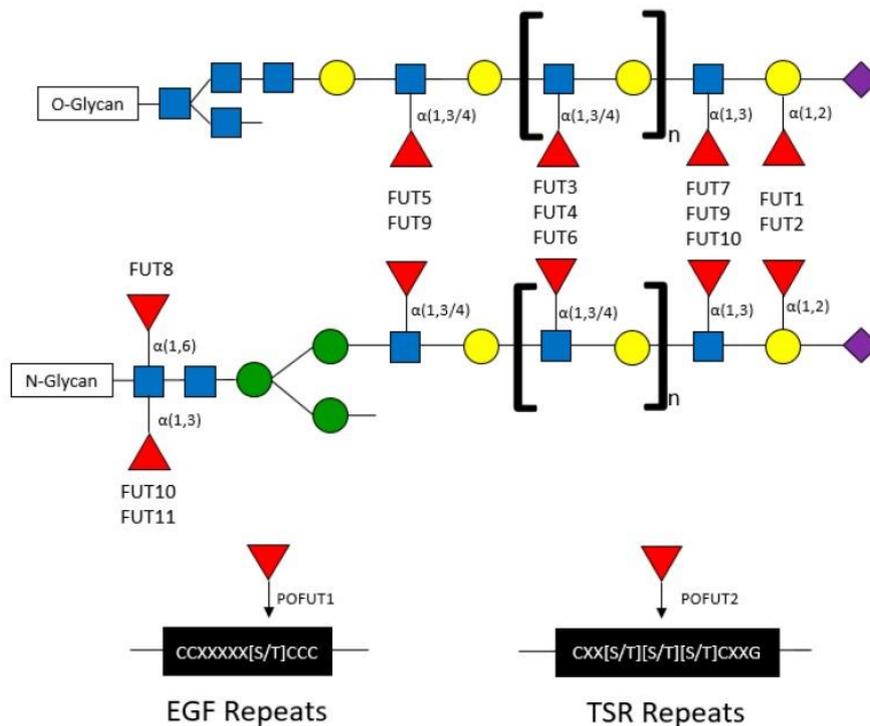
Zytosolische GDP-L-Fucose, die auf einem der beiden Wege produziert wird, wird zum Golgi-Apparat oder zum ER transportiert, wo sie in entsprechenden Reaktionen an Glykoproteine angefügt werden kann [69]. Dieser Importprozess wird durch ein GMP/GDP-L-Fucose-Antiporter-Protein gesteuert, das später SLC35C1 genannt wurde [65, 83-85]. Der Ablauf des Transports in das ER ist bisher noch nicht genau bekannt. Ein Transportprotein in *D. melanogaster* im ER wurde identifiziert, das entsprechende Homolog in Säugetieren scheint jedoch eine andere Funktion zu haben [86]. Es wird angenommen, dass SLC35C2 eine Rolle beim Transport in das ER spielt [87].



**Abbildung 3 – Übersicht über die Synthese von GDP-L-Fucose.** Dargestellt sind die einzelnen Prozessierungsschritte im Zytosol bis hin zum Transport in das ER und den Golgi-Apparat. Die jeweiligen Transferasen in den Kompartimenten sind ebenfalls aufgeführt. Die rot markierten Enzyme stehen im Zusammenhang mit bekannten CDG-Typen. (Abbildung wurde mit BioRender erstellt.)

### 3.4.3 Fucosylierung

Die Anlagerung von Fucose an biologische Makromoleküle geschieht im Wesentlichen auf drei Arten: Über die terminale Anlagerung an lipidgebundene Oligosaccharidketten, die Bindung an die Grundstruktur komplexer N-Glykane und die direkte Verknüpfung an Sauerstoffatome alkoholischer Aminosäurereste (Serin oder Threonin). Die Übertragung von Fucose aus GDP-L-Fucose auf eine dieser funktionellen Gruppen wird durch eine der dreizehn derzeit bekannten Fucosyltransferasen katalysiert [88]. Die große Bedeutung der Fucosylierung in Säugetierzellen wurde durch Knockout-Experimente verdeutlicht. Jede Deletion von nur einer der drei Fucosyltransferasen FUT8, POFUT1 oder POFUT2 in Mäusen ist letal [89-91]. Analytisch ist es selbst mit MS/MS-Spektren schwer, zwischen Core und terminaler Fucosylierung zu unterscheiden, weshalb neueste Ansätze „Machine Learning Algorithms“, wie das „Deep Neural Network“ (DNN), nutzen [92]. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der katalytischen Aktivität aller Fucosyltransferasen [93].



**Abbildung 4 - Bekannte Fucosyltransferasen und deren Beteiligung am Aufbau von N- und O-Glykanen.** Aufbau von N- und O-Glykanen sowie EGF/TSR Repeats mit möglichen Fucosylierungsstellen. Die Enzyme, die die jeweilige Verbindung katalysieren sind angegeben [93].

### **Terminale Fucosylierung**

Die terminale Verknüpfung von Fucose an eine Vielzahl von Makromolekülen, einschließlich N-Glykanen, Mucin-O-GalNAc-Glykanen und Glykolipiden, ist in Säugetierzellen vergleichsweise häufig und beinhaltet einen komplexen Mechanismus, an dem eine große Anzahl von Enzymen beteiligt ist [88]. Der Fucosylierungsprozess wird in der Regel durch eine von zehn Fucosyltransferasen katalysiert, namentlich FUT1 bis FUT7 und FUT9 bis FUT11, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Sie übertragen Fucose von GDP-L-Fucose auf terminale Galactose unter Bildung einer  $\alpha(1,2)$ -Verknüpfung oder alternativ auf ein subterminales GlcNAc-Molekül mittels  $\alpha(1,3/4)$ -Verknüpfung bei der Blutgruppen- und Lewis-Antigenbildung [88].

### **Core Fucosylierung**

Die core-Fucosylierung beschreibt die Bindung von Fucose in einer  $\alpha(1,6)$ -Bindung an GlcNAc, das wiederum an den Asparaginsäure-Reste gebunden ist, innerhalb der Glykangrundstruktur. Sie ist die häufigste Art der Fucosylierung in Säugetieren. Diese Reaktion findet ausschließlich im Golgi-Apparat statt und wird von dem Enzym FUT8 katalysiert [94].

### **O-Fucosylierung**

Eine Unterform der O-Glykosylierung, welche in Abschnitt 3.3.2 beschrieben wurde, ist die O-Fucosylierung. Fucose kann hierbei direkt an die Hydroxyl-Gruppe von Serin- und Threonin-Resten durch eine von zwei Protein-O-Fucosyltransferasen POFUT1 oder POFUT2 angefügt werden. Im Gegensatz zu FUT1-11 erkennen beide POFUT-Enzyme spezifische Konsensussequenzen. Beobachtungen, dass beide Protein-O-Fucosyltransferasen für die Entwicklung essentiell sind und sowohl in embryonalen als auch in adulten Geweben der Maus breit exprimiert werden, implizieren die hohe Bedeutung des Prozesses der Protein-O-Fucosylierung [95, 96]. POFUT1 knüpft Fucose an Epidermal Growth Factor Like (EGF) Repeats an, die die Konsensussequenz  $C^2XXXX(S/T)C^3$  enthalten, wobei  $C^2$  und  $C^3$  die zweiten und dritten konservierten Cysteinreste dieser Wiederholung sind und X für eine beliebige Aminosäure steht [97, 98]. POFUT2 hingegen erkennt spezifisch Thrombospondin Typ 1 Repeats (TSR) an den spezifischen Sequenzen:  $C^1XX(S/T)C^2$  (TSRs der Gruppe 1) und  $C^2XX(S/T)C^3$  (TSRs der Gruppe 2) und bindet Fucose an diese

Serin- oder Threonin-Reste [99-101]. Die genannten Repeats enthalten insgesamt sechs konservierte Cysteine, die jeweils drei Disulfid-Bindungen bilden, die ihrerseits für die korrekte Faltung der Repeats essenziell sind. POFUT1 und POFUT2 wiederum benötigen korrekt gefaltete Repeats für deren katalytische Reaktion. Daher kann Fucose als Signalmolekül dienen, das die korrekte Faltung der Proteine/Repeats signalisiert [100, 102-104].

#### 3.4.4 Fucosylierung in Krebserkrankungen

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass sich der Glykosylierungsgrad und die Struktur von Proteinen in Krebszellen deutlich von denen in gesunden Zellen unterscheiden [105, 106]. In der gesunden Leber und im Kolon ist der Fucosylierungsgrad niedrig, bei Entzündungsprozessen oder während der Karzinogenese steigt er an. Mit diesem Zusammenhang beschäftigt sich das Forschungsgebiet der Glykomik in der Krebsforschung, wobei geklärt werden soll, warum bestimmte Arten der Fucosylierung und fucosylierte Proteine bei bestimmten Krebsarten erhöht sind [107]. Fucosylierte Proteine dienen als zuverlässige Biomarker für verschiedene Krebsarten. Sie sind ein wichtiges Instrument für die Erstdiagnose und die Überwachung der Tumorprogression. Sie ermöglichen therapeutische Entscheidungen allein durch eine Blutuntersuchung. Beispielsweise ist der  $\alpha$ -Fetoprotein-(AFP) Spiegel und dessen Fucosylierungsstatus ein häufig verwendeter und bekannter Biomarker für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) [108]. Ein erhöhter AFP-Wert allein ist jedoch nicht spezifisch genug für eine Diagnose, da erhöhte AFP-Werte auch mit anderen Formen von Lebererkrankungen wie einer fortschreitenden Leberzirrhose oder Hepatitis in Verbindung gebracht werden. Der entscheidende Unterschied ist im Fucosylierungsgrad begründet. Ein erhöhter Spiegel an core-fucosyliertem AFP, AFP-L3, ist ein äußerst spezifischer Marker für hepatozelluläre Karzinome [109, 110].

Lektine erkennen und binden im Allgemeinen Kohlenhydratsstrukturen. Sie können zur Analyse von Serum von Krebspatienten eingesetzt werden, um mögliche Biomarker für die Frühdiagnose zu erkennen. *Aleuria Aurantia Lectin* (AAL) erkennt  $\alpha(1,3)/\alpha(1,4)$  und  $\alpha(1,6)$  Fucose. Die Lektine *Ulex Europaeus Agglutinin* (UEA) und *Lotus Tetragonolobus* (LTL) binden an  $\alpha(1,2)$ -Fucose. Das Lektin *Lens Culinaris* (LCA) erkennt native  $\alpha(1,6)$ -Fucose [93]. Bei Western-

Blots mit UEA- und AAL-Lektin aus dem Serum verschiedener Krebspatienten zeigte sich, dass Haptoglobin bei Patienten mit Pankreas-, Ovarial- und Brustkrebs stark fucosyliert ist [111].

### 3.4.5 GFUS

Für das weitere Verständnis dieser Arbeit ist ein gesonderter Blick auf das Enzym GDP-L-Fucose Synthase (GFUS, Q13630, NP\_001304712, NM\_001317783.2) nötig. GFUS wurde zunächst als FX Protein charakterisiert und benannt [112]. Später fiel das Enzym als potenzielles Onkogen bei Brustkrebs auf und wurde dort als Tissue-specific transplantation antigen P35B (TSTA3) eingeführt [113]. 2019 wurde einem Antrag auf Anpassung des Enzymnamens durch das HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) stattgegeben, was zu der aktuellen Nomenklatur GDP-L-Fucose Synthase (GFUS) führte.

GFUS ist, wie zuvor beschrieben, verantwortlich für den letzten Schritt der *de novo* Synthese von GDP-L-Fucose (siehe Abbildung 3). Es handelt sich um ein Enzym mit einer Größe von 36 kDa, bestehend aus 321 Aminosäuren. Das Enzym liegt im Zytosol als Homodimer vor [112]. GFUS besitzt sowohl eine 3,5-Epimerase- als auch eine Reduktase-Aktivität und bindet dazu NADPH als Cofaktor [114]. Die Epimerase-Aktivität sorgt für die Umwandlung des Intermediats GDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Mannose zu GDP-4-Keto-6-Deoxy-L-Glucose. Im Anschluss führt die Reduktase-Aktivität des Enzyms zur Bildung von GDP-L-Fucose, wobei NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird [114]. Da der Großteil der GDP-L-Fucose in der Zelle *de novo* gewonnen wird, ist die Funktionalität dieses Synthesewegs essenziell, um die Fucosylierung von Proteinen im ER und Golgi-Apparat zu ermöglichen. Im Tiermodell konnte anhand von GFUS-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass nur wenige Mäuse lebensfähig sind und ein Großteil bereits während der Embryonalentwicklung verstarb. Die überlebenden Mäuse zeigten Symptome wie gehemmtes Wachstum, Diarrhoe, Unfruchtbarkeit und eine kurze Lebensdauer. Durch Fucosegabe in die Nahrung und das Trinkwasser konnten die Symptome gemindert werden [115].

In den Jahren zwischen 2012 und 2014 wurden fünf Röntgenkristallstrukturen des Enzymkomplexes veröffentlicht. In der Protein Data Bank (PDB) sind diese als 4E5Y, 4B8Z, 4B8W, 4BKP und 4BL5 gelistet [116, 117].

### 3.5 Zielsetzung

Angeborene genetische Defekte in der Glykoproteinbiosynthese zählen bei Menschen zu der Gruppe der Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). Diese Defekte führen meist zu schweren multisystemischen Erkrankungen. Mittels CDG-Routinediagnostik wurden in den vergangenen Jahren in unserer Arbeitsgruppe, zusätzlich zu den bereits bekannten Typen, eine Reihe von CDG-Verdachtspatienten entdeckt, bei denen die molekulare Ursache bislang ungeklärt ist.

Das Ziel dieser Dissertation ist die klinische, molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines neuen CDG-Defektes anhand des ersten Patienten mit pathogenen Mutationen im *GFUS*-Gen. Durch ein breites Spektrum an Analysen von Patientenserum und -Fibroblasten soll die Pathophysiologie dieses Defekts verstanden werden. Dazu sollten unter anderem die N-Glykane untersucht werden sowie Lektin- und Antikörperbindestudien sowie Immunfluoreszenzuntersuchungen erfolgen. Einhergehend galt es als Ziel mittels retroviraler Komplementationsstudien den biochemischen Phänotypen zu beheben und somit die Pathogenität der Patienten-Mutation zu bestätigen.

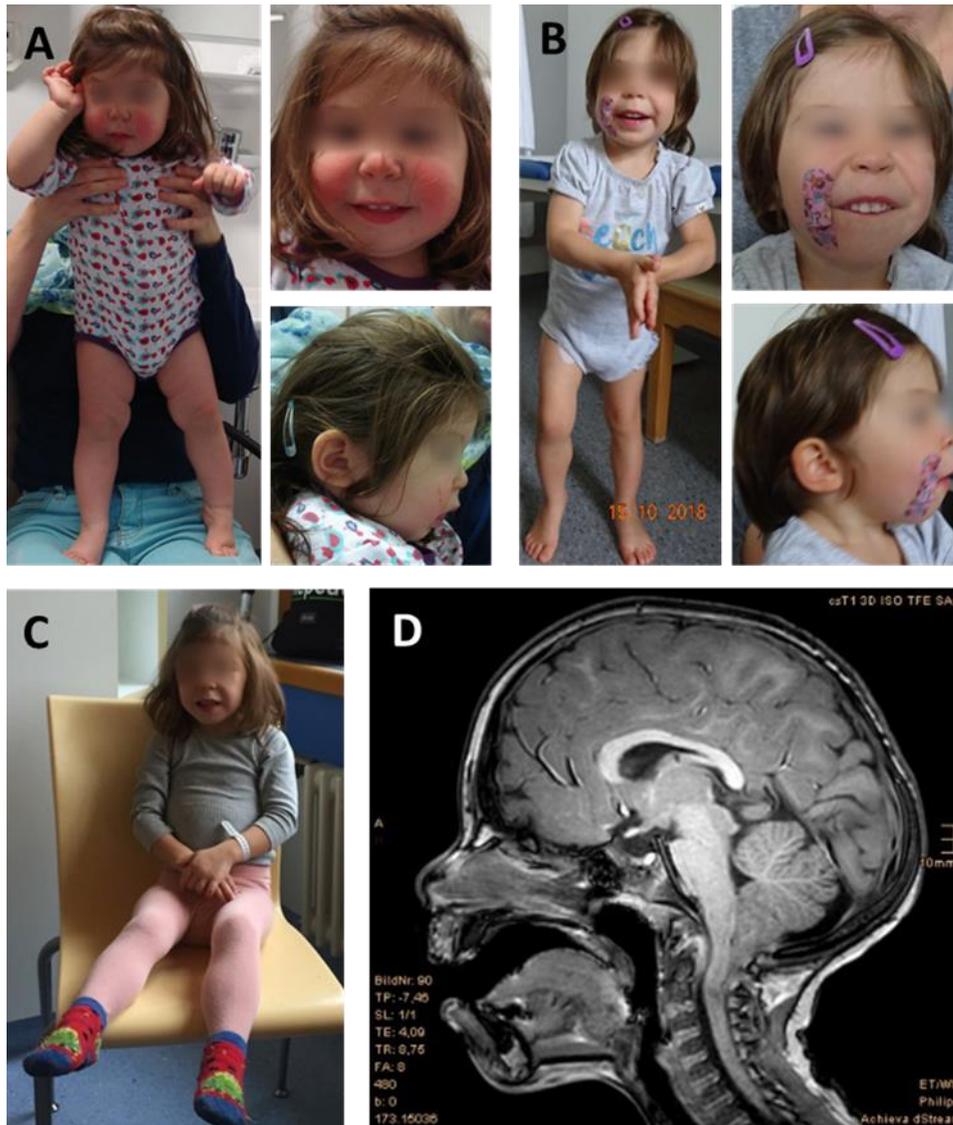
Schließlich soll die Frage geklärt werden, ob eine Zuckertherapie zu einer Re-Fucosylierung von Proteinen in der Zellkultur führt und falls ja, ob dieser Ansatz im Rahmen einer oralen Supplementation der Patientin übertragen werden kann. Weiterhin sollen die gewonnen Erkenntnisse in Zusammenhang mit ähnlichen Defekten gesetzt werden. Dabei soll auch verglichen werden, wie effektiv die verschiedenen Suppletionsansätze sind.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenanamnese

Die Patientin wurde als zweites Mädchen gesunder, österreichischer Eltern geboren. Die Familienanamnese war weitgehend unauffällig, mit Ausnahme der älteren Schwester, die eine Konzentrationsschwäche sowie Probleme mit visuell-räumlichen Aufgaben hatte. Abgesehen davon entwickelte sie sich altersgemäß. Vor der Geburt der Patientin wurden während der Schwangerschaft zerebrale Zysten nachgewiesen. Wachstum und Bewegung des Kindes waren unauffällig. Die anthropometrischen Daten bei der Geburt lagen im Normbereich (Geburtsgewicht = 3210 g (p50), Geburtslänge = 52 cm (p50), Geburtskopfumfang = 36 cm (p97)) und die neonatale Anpassung war unauffällig. Von Geburt an wurden Appetitlosigkeit und eine Abneigung gegen Nahrungsaufnahme festgestellt, jedoch ohne damit verbundene Schluckstörungen, Durchfall oder Erbrechen. Anfänglich wurde sie über eine nasogastrale Sonde, später über eine Magensonde ernährt. Trotz verschiedener Säuglingsnahrungen und klinischer Rehabilitationsprogramme konnte kein ausreichendes Wachstum und keine Gewichtszunahme erreicht werden (siehe Appendix 0). Ihre Entwicklung war allgemein verzögert. Das Laufen lernte sie erst im Alter von 3 9/12 Jahren. Sie war ein fröhlich spielendes Mädchen, interagierte aber wenig mit ihrer Umwelt und sie sang beim Spielen lediglich einzelne Silben. Im Alter von 4 4/12 Jahren war es aufgrund von mangelndem Interesse und mangelnder Konzentration nicht möglich, sie mit einem altersgerechten Test zu untersuchen. Die alternative Anwendung des „Bayley Scales of Infant Development II Tests“ (BSID bzw. Bayley-II) ergab ein Entwicklungsalter von etwa 23 Monaten. Ein MRT im Alter von 2 11/12 Jahren zeigte normale innere und äußere Liquorräume und eine altersgemäße Myelinisierung. Ein kleines Corpus callosum wurde ebenso festgestellt wie eine Arnold-Chiari-Malformation Typ 1. Bei der körperlichen Untersuchung im Alter von 4 4/12 Jahren wurde eine verhältnismäßige Kleinwüchsigkeit (Körpergröße 89 cm, p<3), Körpergewicht 11 kg (p<3) und Mikrozephalie (48 cm, p10) festgestellt. Sie hatte leicht grobe Gesichtszüge, mandelförmige Augen, leicht schräg nach unten verlaufende Lidspalten, ein langes Philtrum, eine leichte Retrognathie sowie tief angesetzte Ohren (Abbildung 5), volles Haar mit einem niedrigen Nackenhaaransatz und eine leichte Hypertrichose

an beiden Armen. Das komplette Blutbild und die Gerinnungsuntersuchungen waren unauffällig. Die Blutgruppe war O Rh-positiv; ein Bombay-Phänotyp wurde nicht festgestellt. Anhand der Anamnese und der klinisch-chemischen Untersuchungen (vollständiges Blutbild, IgG/A/M/E und Impftiter auf regelmäßige Impfungen) wurde keine andere Organbeteiligung und kein immunologisches Problem festgestellt.



**Abbildung 5 - Klinische und bildgebende Befunde bei der Patientin mit biallelischen GFUS-Varianten.** Klinische Fotos der Patientin im Alter von 2 Jahren (A), 4 Jahren (B) und 6 Jahren (C). MRT im Alter von 6 Jahren mit Herniation der Kleinhirntonsillen 1,4 cm unterhalb des Foramen magnum und Kompression der Medulla (D). Weitere unverpixelte Bilder folgen in der Publikation „A spoonful of L-fucose - An efficient therapy for GFUS-CDG, a new glycosylation disorder“ von Feichtinger, Hüllen, et al..

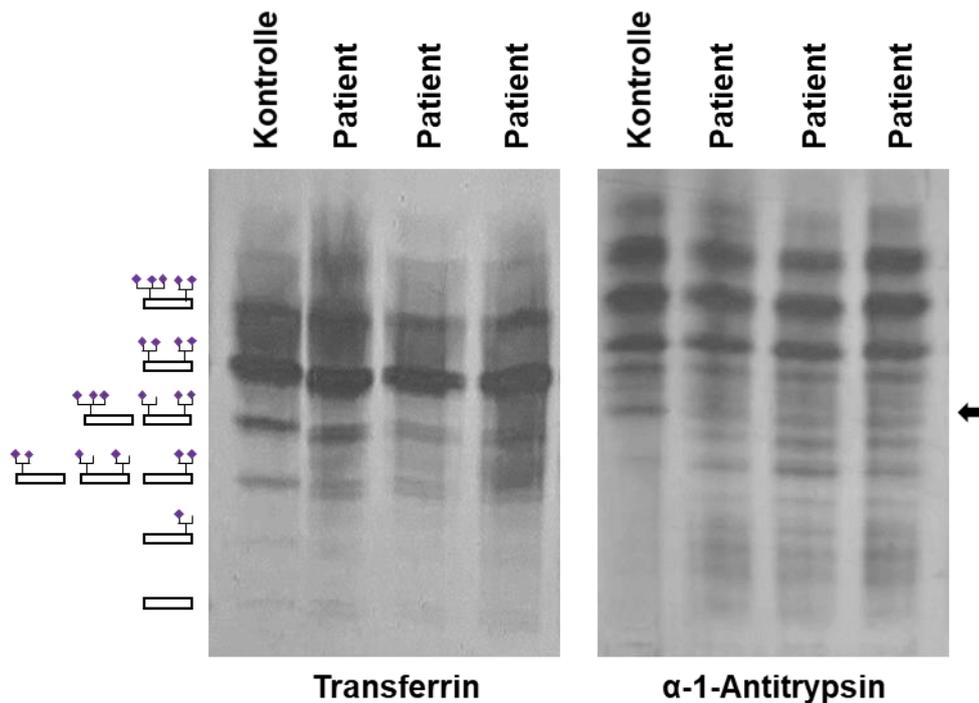
## 4.2 Identifizierung eines Glykosylierungsdefekts

Die Patientenanamnese und der Phänotyp wiesen auf einen möglichen Glykosylierungsdefekt hin, weshalb die CDG-Routinediagnostik initiiert wurde. Die Diagnostik erfolgte hierbei zunächst ausschließlich aus Serumproben, was die Durchführung einer isoelektrischen Fokussierung sowie eine N-Glykananalyse ermöglichte. Zudem erfolgten molekularbiologische Untersuchungen mittels Whole-Exome-Sequenzierung, die einen Gendefekt in *GFUS* aufzeigten. Weitere diagnostische Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von isolierten und kultivierten Patientenfibroblasten.

### 4.2.1 Unauffällige Isoelektrische Fokussierung von Transferrin und $\alpha$ -1-Antitrypsin

Die standardmäßige CDG-Labordiagnostik mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) vom Serum-Transferrin ergab keine Auffälligkeiten im Bandenmuster verglichen zu einer Normalkontrolle (siehe Abbildung 6). Insbesondere die vollständig glykosylierte Tetrasialotransferrinbande (Referenzwert 30 % - 55 %) ist im Patienten äußerst prominent. Die Tri- (Referenzwert 4 % - 17,5 %), Di- (Referenzwert 5 % - 13,5 %), Mono- (Referenzwert 0 % - 3 %) und Asialotransferrinbanden (Referenzwert 0 % - 2 %) sind schwächer als in Kontrollseren. Dieses Fokussierungsmuster ließ zunächst nicht auf einen klassischen Glykosylierungsdefekts schließen.

Da das alternative Markerprotein  $\alpha$ -1-Antitrypsin mehr Glykosylierungsstellen sowie komplexere Strukturen als Transferrin hat, hat ein unauffälliges Bandenmuster bei  $\alpha$ -1-Antitrypsin auch mehr Banden als bei Transferrin. Das  $\alpha$ -1-Antitrypsin Bandenmuster des Patienten zeigte insbesondere in Nähe zur negativ geladenen Anode zusätzliche Banden (siehe Abbildung 6). Durch das Fehlen von negativ geladenen Strukturen, läuft das Protein im elektrischen Feld bevorzugt in Richtung der Anode. Bei CDG-Patienten ist das Fehlen der endständigen Sialinsäure(n) für dieses Laufverhalten verantwortlich.



**Abbildung 6 - Isoelektrische Fokussierung des Transferrins und  $\alpha$ -1-Antitrypsins.** Es wurden je drei Patientenproben aus Serum und eine Kontrolle auf das Gel aufgetragen. Eine schematische Darstellung der N-Glykosylierung des Transferrins zeigt Beispiele für sialylierte N-Glykane entsprechend zu den jeweiligen Laufbändern. Der Verlust einzelner Sialinsäurereste (allein oder in Kombination mit darunter befindlichen Monosacchariden) oder ganzer Glykane führt aufgrund von Ladungsveränderungen zur Verschiebung der Proteinbänder. Die Patientin zeigte für Transferrin ein normales Bandenmuster. Die IEF des  $\alpha$ -1-Antitrypsins zeigt weitere Bänder in Nähe der positiv geladenen Kathode. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die unterste Laufhöhe der normalen Bänder.

#### 4.2.2 N-Glykananalyse aus Serum

Die gesamten N-Glykane wurden mittels xCGE-LIF aus Serumproben bestimmt und mit zwei Kontrollen des gleichen Geschlechts und Alters verglichen. Die Messung erfolgte in Kooperation mit Erdmann Rapp (MPI Magdeburg). Untersucht wurden einzelne Serumproben vor und nach 14-tägiger Fucosetherapie. Da nur jeweils eine Serumprobe für den jeweiligen Zeitpunkt zur Verfügung stand, konnten keine Replikate gemessen werden, was eine statistische Auswertung unmöglich machte.

Der relative Peakhöhenanteil der fucosylierten Glykane ist in Abbildung 7 zusammengefasst. Es konnten insgesamt 22 fucosylierte Glykanpeaks im Serum

der Kontrollen und der Patientin gefunden werden. Hierbei fiel auf, dass der Peak FA3G3S1(2,6) nur im Patienten zu finden war. Entgegensetzt dazu wurden vier Strukturen identifiziert, die nicht im Patientenserum auftraten: A2F(3)G2S1(2,6)S1(2,3), FA1G1S1(2,6)[3], FA2BG2S1(2,6) und FA3G2[2,6]. Von den 22 gemessenen fucosylierten N-Glykanen war nur bei zwei N-Glykanpeaks (FA2G2F1(2)[6]S1(2,6)[3] + 0,04 % und FA2G2S2(2,3) + 0,15 %) im Patientenserum mehr vorhanden im Vergleich zum Kontrollpool. Die größten Diskrepanzen zwischen Kontroll- und Patientenserum traten bei vier nicht-sialysierten Glykanen auf (siehe Tabelle 1):

**Tabelle 1 - Zusammenfassung der am stärksten betroffenen, fucosylierten N-Glykane**

Glykan	Kontrolle [%]	Patient [%]	Differenz [%]
FA2G0	5,84	0,36	- 5,48
FA2BG0	0,90	0,09	- 0,81
FA2G1[6]	5,88	0,36	- 5,52
FA2G1[3]	2,83	0,13	- 2,70

Der Therapieverlauf der ersten 14 Tage unter Fucosesupplementation der Patientin wird in Abbildung 8 dargestellt. Für eine bessere Übersicht wurden die N-Glykanpeaks in sechs Gruppen zusammengefasst und in Zusammenhang zum Kontrollpool gesetzt. In Abbildung 8 ist das Kontrollniveau durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Allgemein unterscheidet man N-Glykane zwischen den Komplextypen, den mannosereichen Typen und den Hybridtypen. Die N-Glykane des Komplextyps bilden typischerweise die Gruppe mit dem größten prozentualen Anteil. Für diese Gruppe ergaben die Messungen bei der Patientin einen Anteil von 95,05 % in der ersten Serumprobe, welcher sich nach 14 Tagen durch die Fucosesupplementation auf 96,42 % (+ 1,4 %) erhöhte. Im Vergleich zum Durchschnitt der Kontrollen von 98,60 % lagen in beiden Serumproben der Patientin anteilmäßig weniger Glykane des Komplextyps vor.

Die Verteilung des mannosereichen Typs verhielt sich ähnlich. Nach zwei Wochen Fucosetherapie nahm der Anteil der mannosereichen Glykane von 6,35 % auf 9,01 % zu, was einer Zunahme um 41,9 % entspricht. Dabei näherte sich die Verteilung auch an den Kontrollwert von 14,99 % an.

Für die Glykane des Hybridtyps führten die zwei Wochen Fucosetherapie zum Erreichen des Kontrollwerts. Der anfänglich Wert von 1,18 % sank nach den 14 Tagen auf 0,59 % (- 50,0 %) und näherte sich den 0,54 % der Kontrollen an.

Abgesehen von den drei Glykantypen, wurden die detektieren Peaks auch in core-fucosyliert, antennär-fucosyliert und nicht-fucosyliert (Abbildung 8) unterschieden bzw. sortiert. Die nicht-fucosylierten Glykane reduzierten sich von 73,82 % auf 65,80 % nach vierzehntägiger Fucosetherapie. Der gemessene Anteil an nicht-fucosylierten Glykanen in den Kontrollen lag bei 46,76 %. Entsprechend zu den nicht-fucosylierten Glykanen nahmen jeweils die Anteile für die core- und antennär-fucosylierten Glykane zu. Die core-fucosylierten Glykane nahmen um 7,95 %, von 17,45 % auf 25,40 %, zu. Der Anteil der antennär-fucosylierten Glykane stieg um 0,60 %, von 3,90 % auf 4,50 %. Die gemessenen, prozentualen Anteile der Kontrollwerte lagen für core-fucosylierten Glykane bei 48,13 % und für antennär-fucosylierte Glykane bei 5,30 %. Die N-Glykanverteilung näherte sich in jeder Gruppe nach 14-tägiger Fucosetherapie dem Kontrollniveau an.



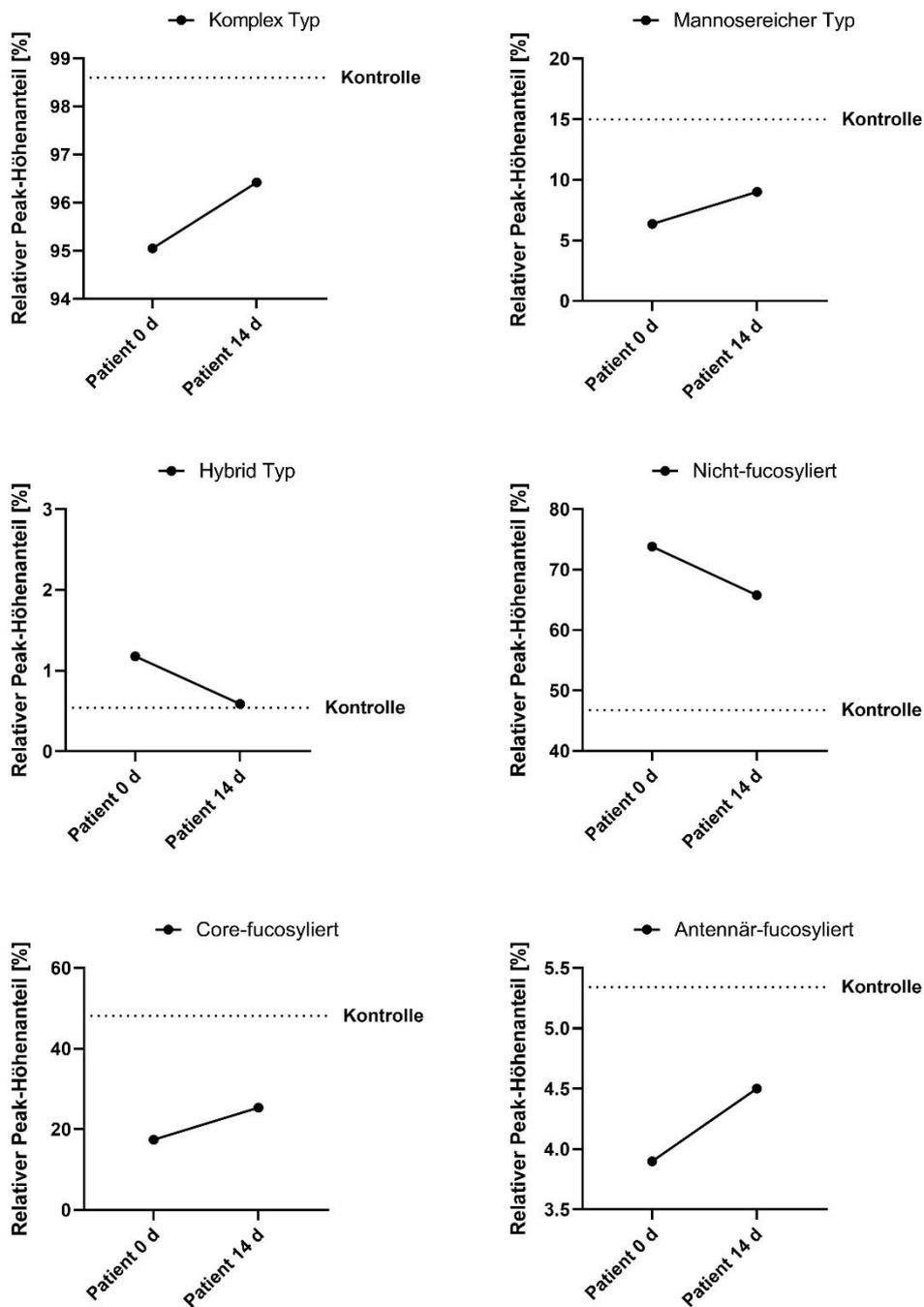


Abbildung 8 – Übersicht über die Verteilungsänderung der N-Glykane nach Beginn der Fucosetherapie. Die gemessenen N-Glykanpeaks wurden den Gruppen: Komplex Typ, mannosereicher Typ, Hybridtyp, nicht-fucosyliert, core-fucosyliert und antennär-fucosyliert zugeordnet. Dargestellt wird die Veränderung der N-Glykanverteilung nach 14 Tagen Fucosetherapie der Patientin im Vergleich zu einem Kontrollpool. Die Messungen erfolgten aus Serumproben.

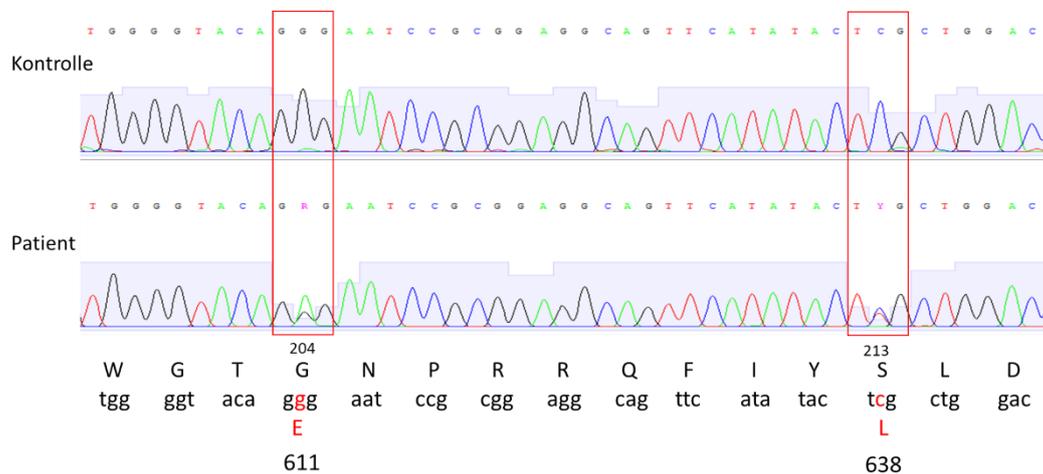
### 4.3 Molekularbiologische Untersuchungen der genetischen Mutation der CDG-Patientin

#### 4.3.1 „Whole Exome Sequencing“ ergab eine Compound-Heterozygotie in *GFUS*

Eine „Whole Exome Sequencing“ (WES), die in Kooperation mit der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg erfolgte, zeigte keine Varianten in bekannten Krankheitsgenen, ergab aber zwei biallelische heterozygote Mutationen im *GFUS*-Gen (NM\_003313.3).

#### 4.3.2 Bestätigung der Punktmutationen durch Sanger-Sequenzierung im *GFUS*-Gen

Durch Sanger-Sequenzierung konnten die beiden Varianten c.[632G>A];p.[Gly211Glu] und c.[659C>T];p.[Ser220Leu] im *GFUS*-Gen (siehe Abbildung 9) bestätigt werden. Die beiden Mutationen liegen dabei auf unterschiedlichen Allelen und innerhalb des Gens 27 Basenpaare auseinander. Beide Punktmutationen führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch.



**Abbildung 9 – Sanger-Sequenzierung der Patientin und einer Kontrolle von *GFUS*.** Die heterozygoten Mutationen im unteren Elektropherogramm der Patientin an Stelle 204 und 213 sind durch das Auftreten von zwei Signalen an der gleichen Stelle zu erkennen.

Durch Untersuchungen der genotypischen Präsenz des *GFUS*-Gens in der engeren Familie konnte festgestellt werden, dass c.[632G>A];p.[Gly211Glu] paternal und c.[659C>T];p.[Ser220Leu] maternal vererbt wurden. Die heterozygote Mutation c.[632G>A] wurde auch im älteren Geschwisterkind gefunden (Abbildung 10).

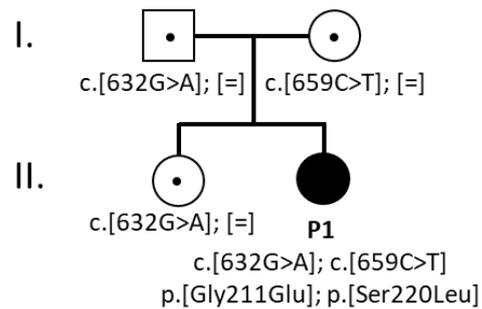


Abbildung 10 - Vererbungsweg der mutierten *GFUS* Allele innerhalb der Familie.

Beide Mutationen wurden noch nicht in der gnomAD Datenbank geführt und waren daher nicht als krankheitsverursachend bekannt. Die betroffenen Regionen sind von Mensch bis *Trichoplax adhaerens* (Placozoa gehörend zu den vielzelligen Tieren; Metazoa) hochkonserviert (Tabelle 2).

Tabelle 2 - Konservierung der Aminosäuren im Bereich der beiden biallelischen Mutationen im *GFUS*-Gen.

Patient	KSSGSALT <del>V</del> WGTE <del>N</del> PRRQFIY <del>L</del> LLDLAQLFIWVL	231
<i>Homo_sapiens</i>	KSSGSALT <del>V</del> WGTE <del>N</del> PRRQFIYSLDLAQLFIWVL	231
<i>Mus_musculus</i>	KSSDSALT <del>V</del> WGTE <del>G</del> KPRRQFIYSLDLARLFIWVL	231
<i>Xenopus_tropicalis</i>	KQDGTPLSIWGTGKPRRQFIYSLDLARLFIWVL	233
<i>Octopus_bimaculoides</i>	RKNNTPV <del>T</del> IFGTGAPRRQFIYSLDLAHLIVWVL	230
<i>Aplysia_californica</i>	KENNKPFVIWGTGSPRRQFIYSLDLGRLFLWVL	228
<i>Drosophila_melanogaster</i>	PENDKVFTV <del>F</del> SGMPLRQFVYSRDLAELMIWVL	231
<i>Caenorhabditis_elegans</i>	QRDGTPLQ <del>V</del> YGS <del>G</del> TPLRQFIYSIDLARLFI <del>R</del> VV	225
<i>Daphnia_pulex</i>	KKEGKPLV <del>V</del> AGSGKPLRQFIYSIDLAKLFLFVL	228
<i>Trichoplax_adhaerens</i>	KKNNEPFPVWGSGSPRRQFIYALDLARLFIWVL	221
	.. . : *:* * ***:*: **..*:: *:	

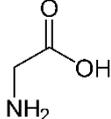
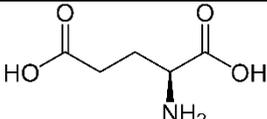
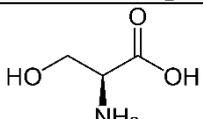
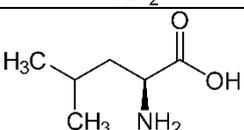
#### 4.3.3 Theoretische Auswirkung des Aminosäureaustauschs

Um ein Verständnis für die Auswirkungen der Mutationen zu erlangen, wurden die Mutationen zunächst theoretisch auf Proteinebene untersucht, da die Tertiärstruktur eines Enzyms von den Eigenschaften seiner einzelnen Aminosäuren beeinflusst wird. Zudem wurden mit Hilfe des DynaMut-Softwaretools strukturbasierte Simulationsberechnungen durchgeführt

[118]. Das Tool gibt Hinweise darauf, wie sich die Stabilität eines Proteins aufgrund von Mutationen verändern könnte.

In Tabelle 3 sind die chemisch-physikalischen Eigenschaften der beteiligten Aminosäuren zusammengefasst. Folgend wurden die beiden Mutationen getrennt voneinander untersucht, da sie auf unterschiedlichen Allelen liegen und somit nicht innerhalb eines Moleküls translatiert werden können.

**Tabelle 3 – Chemisch-physikalische Eigenschaften der vier Aminosäuren, die an den Mutationen beteiligt sind.**

Aminosäure	IEP	Polarität	Molekulargewicht [g/mol]	Strukturformel
Glycin	5,97	Unpolar	75,07	
Glutaminsäure	3,22	Polar	147,13	
Serin	5,68	Polar	105,09	
Leucin	5,98	Unpolar	131,17	

#### p.[Gly211Glu]

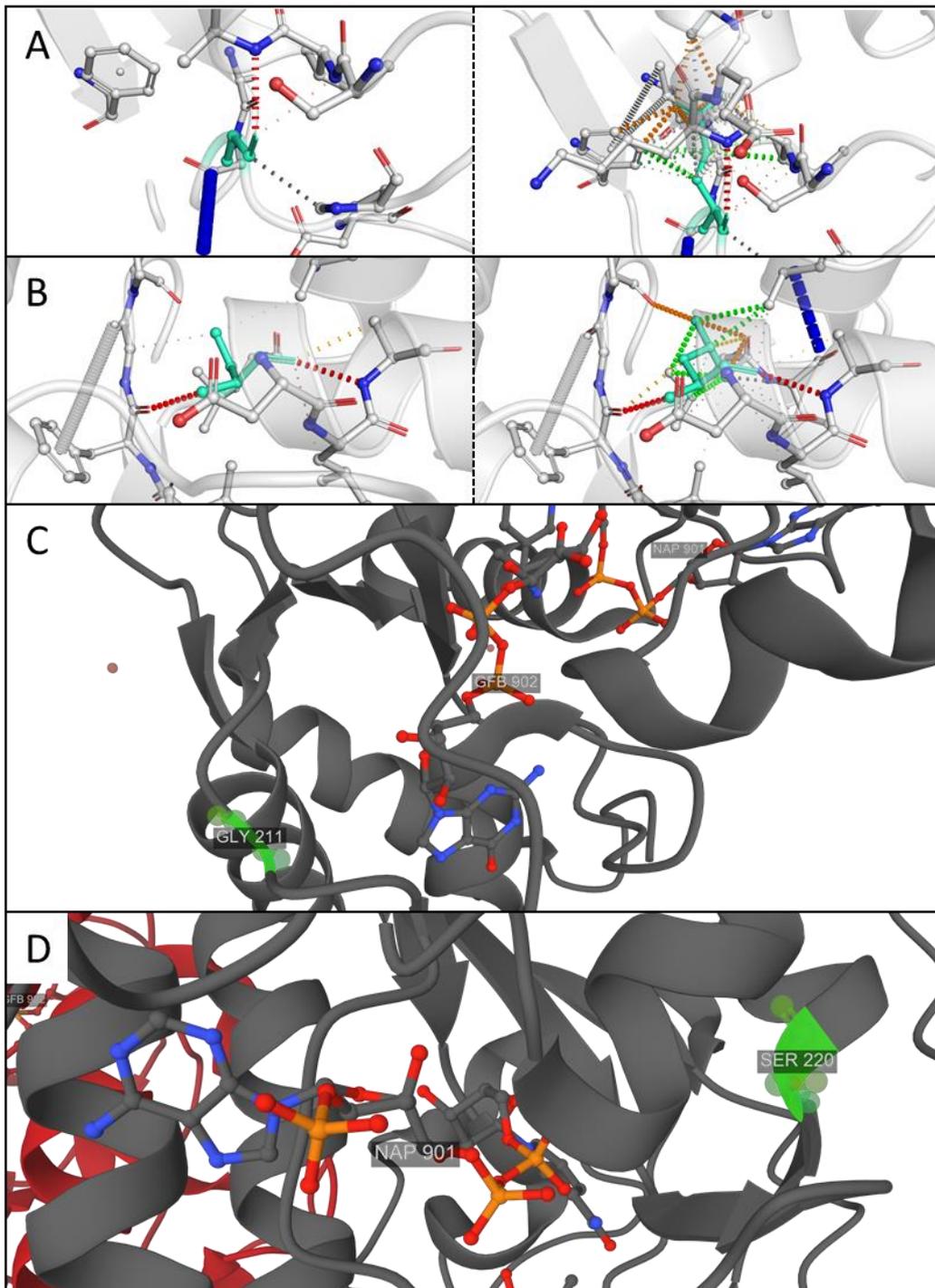
Die väterlicherseits vererbte Mutation an Stelle 211 des GFUS Proteins führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutaminsäure. Glycin ist die kleinste Aminosäure und hat einen unpolaren Charakter. Im Gegensatz dazu hat Glutaminsäure etwa das doppelte Molekulargewicht und ist durch die zusätzliche Carboxylgruppe polar. Weiterhin kann die Carboxylgruppe deprotoniert werden und trägt so zu dem äußerst sauren Charakter der Aminosäure bei. Durch die zweite Säuregruppe der Aminosäure verschiebt sich auch der Isoelektrische Punkt (IEP) von 3,22 deutlich weiter in den sauren Bereich (Vergleich Tabelle 3).

Mutationsvorhersagen mittels DynaMut ergaben eine Protein-stabilisierende Veränderung durch die Mutation. Wie aus Abbildung 11, A zu entnehmen ist, entstehen zahlreiche neue interatomische Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken (rot/orange gestrichelte Linien) oder hydrophobe Anziehungen (grün gestrichelte Linien). Daraus resultiert eine stabilisierende, versteifende Proteinstruktur. Die vorhergesagte Änderung der freien Gibbs-Energie beträgt  $\Delta G$ : 1,087 kcal/mol. Die ausgetauschte Aminosäure liegt nahe des aktiven Zentrums, welches das Substrat, GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose, bindet (Abbildung 11, C).

#### **p.[Ser220Leu]**

Die zweite Mutation an der Stelle 220 hat einen Austausch von Serin gegen Leucin zur Folge. Serin trägt zusätzlich zu der Aminogruppe eine weitere Hydroxylgruppe, die zu einer hohen Polarität der Aminosäure führt. Die etwas größere Aminosäure Leucin hingegen hat zwei Methylgruppen, die zu dem unpolaren Charakter beitragen. Weiterhin ist Leucin eine der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren und hat damit einen besonderen strukturellen Stellenwert.

Durch die beiden zusätzlichen unpolaren funktionellen Gruppen bilden sich zahlreiche neue unpolare Wechselwirkungen aus, die damit für eine räumliche Begünstigung der Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke sorgen (Vergleich Abbildung 11, B). Vorhergesagt wird deshalb eine deutlich stringenteren Struktur mit einer starken Abnahme der Flexibilität innerhalb des Moleküls. Die freie Gibbs Energie nimmt den Berechnungen zufolge um  $\Delta G$ : 2,852 kcal/mol ab. Damit hat die zweite Mutation p.[Ser220Leu] eine fast dreifache Stabilisierungsänderung im Vergleich zu der p.[Gly211Glu] Mutation. Abbildung 11, D zeigt, dass die Mutation innerhalb des Enzyms nahe der Bindungsstelle für den Cofaktor NADPH (In der Struktur als „NAP 901“ gekennzeichnet) ist.



**Abbildung 11 – Strukturanalyse der beiden Mutationen p.[Gly211Glu] und p.[Ser220Leu].** Abbildungen A und B zeigen die Veränderungen der Wechselwirkungen ausgelöst durch die Mutationen p.[Gly211Glu] (A) und p.[Ser220Leu] (B). Die gestrichelte Linie trennt jeweils den WT (links) von der mutierten Variante (rechts). In der unteren Hälfte der Grafik sind jeweils in Grün die mutierten Aminosäuren Gly211 (C) und Ser220 (D) in ihrem räumlichen Zusammenhang im Enzym dargestellt.

#### 4.4 Western Blot-Analyse zeigt reduzierte GFUS-Proteinmenge

Für die biochemische Charakterisierung des Fucosylierungsdefekts wurde die Proteinexpression von GFUS in Patientenfibroblasten untersucht. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot konnte aus dem Fibroblastenlysat die Proteinexpression bestimmt werden. Die Intensität des immundetekierten GFUS-Proteins wurde auf  $\beta$ -Aktin normalisiert (siehe Abbildung 12). Bei den Untersuchungen fiel auf, dass bei einem Molekulargewicht von etwa 37 kDa und 30 kDa eine Bande detektierbar war, was auf das Vorhandensein von Isoformen hindeutet. Auch in der UniProt-Datenbank ist eine theoretische Isoform (UniProtKB: E9PKL9) bei der beobachteten Größe gelistet.

Die kürzere Isoform war um 74,8 % signifikant auf 26,2 % ( $\pm 34,1$  %;  $p = 0,046$ ;  $n = 4$ ) vermindert. Die vollständige, größere Isoform des GFUS-Proteins zeigte sich nahezu unverändert im Patienten verglichen zu Kontrollen.

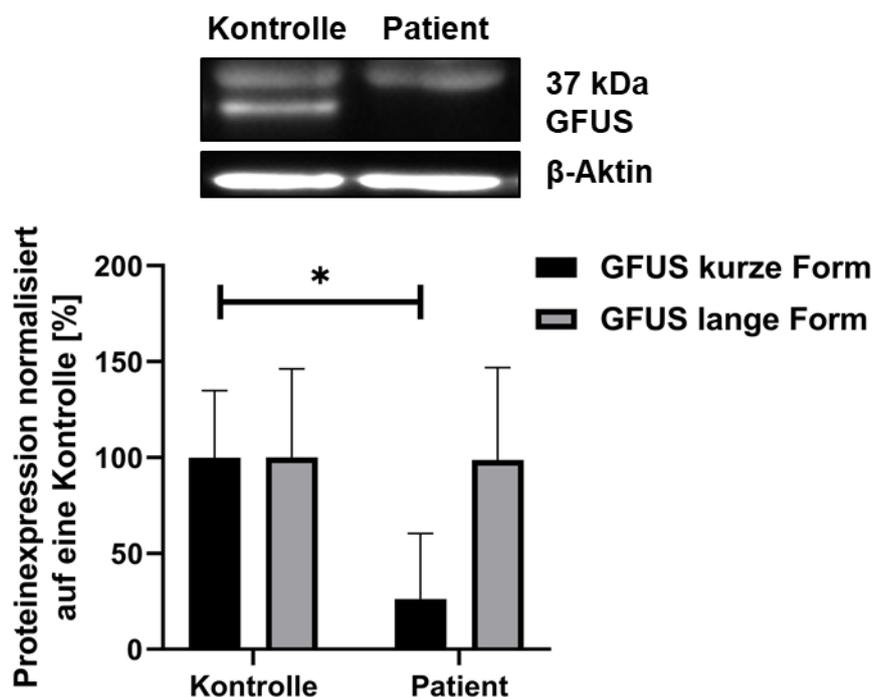


Abbildung 12 – Western Blot Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression. Eine signifikante Reduktion der kurzen Isoform konnte festgestellt werden. Die Expression der längeren Isoform war unverändert.

#### 4.5 Verminderte Expression des kurzen *GFUS* Transkripts

Um Kenntnis darüber zu gelangen, ob die Mutationen in *GFUS* auch Auswirkungen auf das Expressionsniveau des Gens hatten, wurden qPCR-Messungen durchgeführt. Die ermittelten  $C_t$ -Werte (engl. *cycle threshold*) für die beiden Isoformen wurden auf das Referenzgen *RAB7A* normiert.

Die kürzere *GFUS* Isoform ist hoch signifikant auf das 0,61-fache ( $\pm 0,13$  %;  $p = 0,003$ ;  $n = 4$ ) reduziert verglichen zur Kontrolle (siehe Abbildung 13).

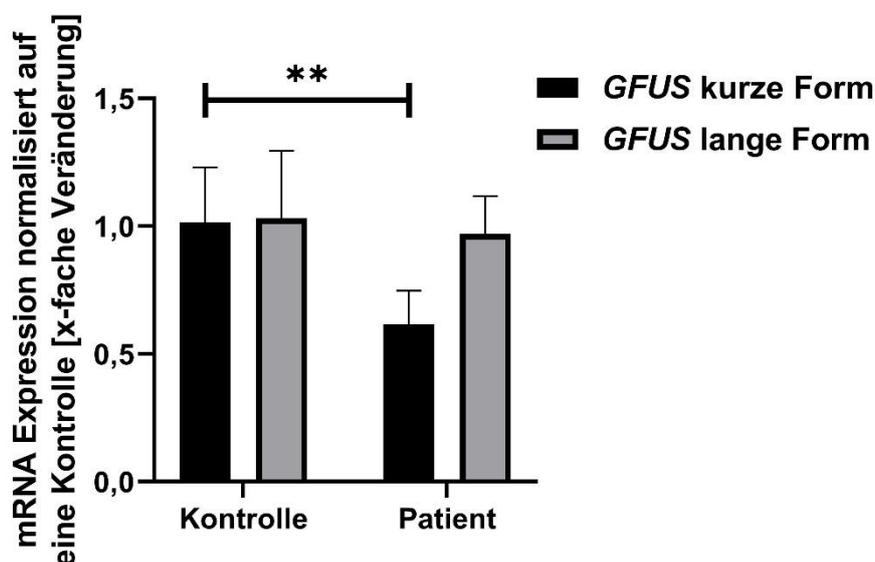
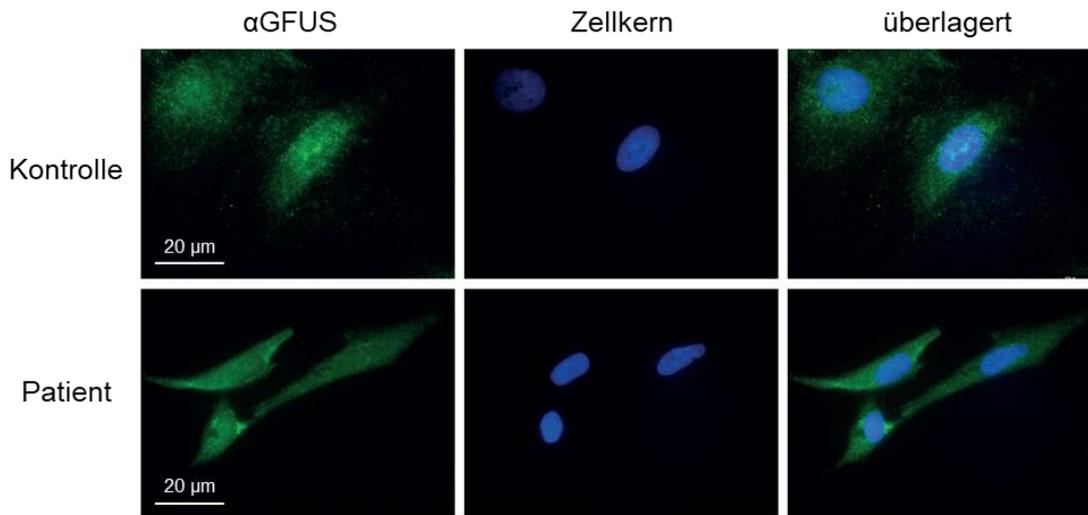


Abbildung 13 – Quantifizierung der mRNA Expression des *GFUS*-Gens. Beide Isoformen, die im Western Blot detektiert wurden, wurden auch auf die mRNA Expression hin untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls für die kurze Isoform des *GFUS*-Gens eine signifikant reduzierte mRNA-Expression.

#### 4.6 Immunfluoreszenzen ergeben eine zytosolische Lokalisation von GFUS

Das Wachstum der Fibroblasten im Vergleich zu anderen, gesunden Zellen war unauffällig. Die zytosolische Lokalisation von GFUS in Fibroblasten wurde mit Immunfluoreszenzen untersucht. Zudem wurde der Zellkern mit Bisbenzimid angefärbt. Es zeigte sich, dass in der Nähe des Zellkerns das detektierte Intensitätssignal der GFUS-Färbung stärker war.



**Abbildung 14 - Intrazelluläre Lokalisation von GFUS.** GFUS wurde sowohl in den Kontrollfibroblasten, als auch in den Fibroblasten der Patientin im Zytosol detektiert. Das Fluoreszenzsignal zeigte sich stärker in unmittelbarer Nähe des Zellkerns.

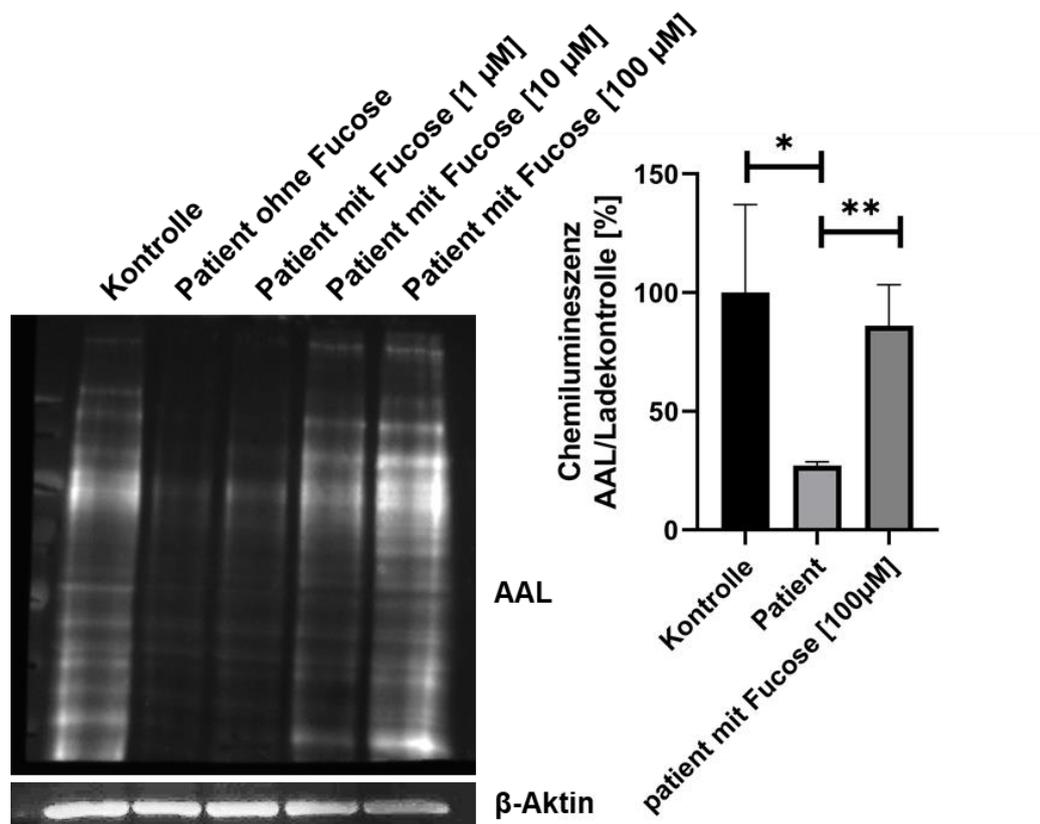
## 4.7 Defucosylierte Proteine in der Patientin

Da verschiedene Lektine spezifisch an unterschiedliche Zuckerstrukturen und Zuckerverknüpfungen binden, können sie genutzt werden, um Glykosylierungsdefekte biochemisch zu untersuchen. Lektine, die üblicherweise für den Nachweis spezifischer Fucosylierungsstrukturen verwendet werden, sind: *Ulex Europaeus-I* (UEA-I), *Aleuria aurantia Lektin* (AAL), *Lens culinaris* (LCA/LcH) und *Lotus tetragonolobus Lektin* (LTL) [93]. Die deutlichsten Effekte zeigten sich bei Experimenten mit AAL. Da Lektine an alle Glykane binden und dies unabhängig von der Proteingröße ist, muss für eine Auswertung bzw. Quantifizierung der Daten die gesamte Spur des SDS-Gels berücksichtigt werden. Die Auswertung erfolgte also stets bezogen auf die Gesamtintensität einer Spur im Vergleich zur Intensität der Ladekontrolle. Es wurden sowohl Fibroblasten als auch Patientenserum untersucht.

### 4.7.1 Fibroblasten

Die Patientenfibroblasten wurden über das Zellkulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen an Fucose supplementiert. Da es im Menschen zwei Stoffwechselwege gibt, um GDP-L-Fucose zu synthetisieren, nämlich die *de novo*-Synthese sowie der Salvage pathway, war ein möglicher Therapieansatz, den Salvage pathway mittels supplementärer L-Fucose zu verstärken.

Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  L-Fucose im Medium wurden getestet und nach 48 h Inkubation untersucht. Der Effekt auf die Fucosylierung anhand des Intensitätssignals von AAL wurde gemessen und ausgewertet. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  L-Fucose im Zellkulturmedium nötig war, um einen zur Kontrolle vergleichbaren Fucosylierungsgrad zu erreichen.



**Abbildung 15 - Detektion und Quantifizierung fucosylierter Glykanstrukturen in Proteinextrakten aus Fibroblasten.** Mithilfe von AAL wurden fucosylierte Glykanstrukturen in den Zelllysaten angefärbt. Das Zellkulturmedium wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Fucose versetzt, was eine erhöhte Fucosylierung der Proteine der Patientin zur Folge hatte. Die Quantifizierung ergab einen signifikant verminderten Level an fucosylierten Glykanstrukturen in unbehandelten Patientenfibroblasten, aber einen hoch signifikanten Grad an Refucosylierung nach Zugabe von L-Fucose.

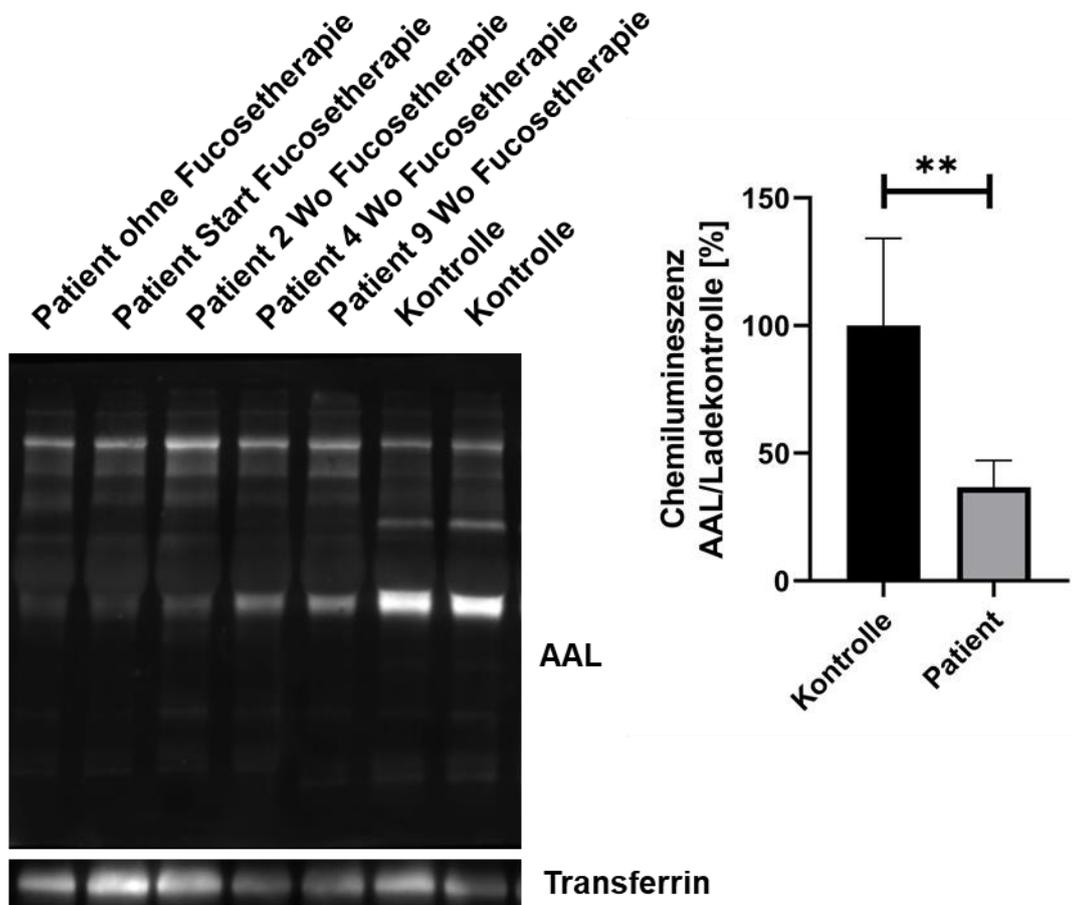
Aus der Quantifizierung in Abbildung 15 geht hervor, dass die Fucosylierung im Patienten signifikant auf 27,04 % ( $\pm$  1,58 %;  $p = 0,020$ ;  $n = 3$ ) reduziert war. Nach Supplementation mit 100  $\mu\text{M}$  L-Fucose im Medium der Patientenzellen zeigte sich ein Fucosylierungsgrad von 86,08 % ( $\pm$  17,29 %;  $n = 3$ ). Verglichen

zu dem Intensitätssignal der Patientenfibroblasten ohne L-Fucose im Medium ist dies ein hoch signifikanter Anstieg um 41,04 % an Intensitätssignal ( $p = 0,004$ ).

#### 4.7.2 Serum

Es zeigte sich ein deutlicher Defucosylierungseffekt in den Patientenfibroblasten, der mittels Fucosegabe reduziert werden konnte. Im Anschluss sollte geklärt werden, ob eine entsprechende Zuckertherapie auch im Patienten biochemisch anschlägt. Die Patientin erhielt hierzu 700 mg/kg/Tag Fucose aufgeteilt in drei gleiche Dosen. Die Serumproben wurden vor Fucosetherapie sowie nach zwei Wochen, vier Wochen und neun Wochen entnommen und analysiert. Für die Analysen aus Patientenserum standen unterschiedliche Volumina zur Verfügung. Insbesondere für die Serumproben der Verlaufskontrolle im Rahmen der Fucosesupplementation standen nur sehr begrenzte Probenmengen zu Verfügung, weshalb Replikate und eine damit verbundene Quantifizierung nicht möglich war. Nur für die erste Serumprobe, die im Alter von 2 Jahren entnommen wurde und noch vor einer möglichen Fucosetherapie entnommen wurde, konnte eine Statistik erhoben werden. Als Ladekontrolle diente in Serumblots stets Transferrin. Transferrin ist ein Glykoprotein und daher keine optimale Ladekontrolle für Patientenproben, die an einem Glykosylierungsdefekt leiden. Da aber alle ins Serum sekretierten Proteine in irgendeiner Weise glykosyliert sind, mangelte es hier an Alternativen.

Betrachtet man Lane 3 – 6, kann man qualitativ eine Zunahme an fucosylierten Proteinstrukturen im Serum nach Beginn der Fucosetherapie über neun Wochen hinweg erkennen (siehe Abbildung 16). Unter Berücksichtigung, dass in den beiden Serumproben vier Wochen und neun Wochen nach Beginn der Therapie weniger Transferrin enthalten ist, kann man davon ausgehen, dass der Effekt auf die fucosylierten Strukturen noch deutlicher ist, als es im Blot zunächst scheint. Bei der Quantifizierung der Serumprobe vor Fucosetherapie, zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion ( $p = 0,002$ ) des AAL-Signals auf 36,6 % ( $\pm 1,58$  %;  $n = 5$ ). Dies entspricht einer Differenz von 63,4 % im Vergleich zu den Kontrollen.



**Abbildung 16 - Detektion und Quantifizierung fucosylierter Glykanstrukturen in Blutserum.** Detektion der fucosylierten Proteine erfolgte mithilfe von AAL. In den Kontrollseren konnte eine sehr viel ausgeprägtere Proteinfucosylierung festgestellt werden als in den Seren des Patienten ohne Fucosetherapie. In den Seren, die im Laufe der ersten vier Wochen der Fucosetherapie abgenommen wurden, steigt das Signal stetig an, erreicht aber nicht das Intensitätsniveau der Kontrollen. Die Quantifizierung erfolgte aus Patientenserum von vor Beginn der Fucosetherapie, da hier ausreichend Serum für eine Statistik zur Verfügung stand. (In der Abbildungsbeschriftung sind Wochen mit „Wo“ abgekürzt.)

#### 4.8 Komplementation der Patientenfibroblasten

Um den Verdacht der krankheitsverursachenden Mutationen in *GFUS* abschließend zu bestätigen, wurde eine virale Komplementation mit dem wildtypischen *GFUS*-Gen in Patientenfibroblasten durchgeführt. Durch die Komplementation sollte der biochemische Phänotyp der Patientenfibroblasten reduziert bzw. sogar aufgehoben werden. Der deutlichste Effekt zeigte sich bei Untersuchungen mit dem Lektin AAL. Weiterhin sollte ein Western Blot mit

GFUS zeigen, dass es nach viralem Einbringen des Wildtyp-GFUS-Gens zu einer verstärkten Expression des GFUS-Proteins kommt.

Ein vollständiges Bild der verschiedenen Konditionen im Experiment ist in Abbildung 17 dargestellt. Auf einem SDS-Gel wurden Kontrollzellen als Basis für die Vergleiche aufgetragen. Das GFUS-Proteinsignal zeigte deutlich, dass in den Kontrollzelllinien endogenes Protein vorhanden war, wohingegen kein endogenes Proteinsignal in den Patientenzellen zu erkennen war. In den mit *GFUS*-infizierten Zellen zeigte sich dagegen ein starkes Signal. Aufgrund der möglichen Auswirkungen von zusätzlicher Fucose im Medium auf das AAL-Signal, wurden auch die Kontrollzellen mit 100  $\mu$ M Fucose kultiviert. Die Quantifizierung zeigte, dass es keine signifikante Veränderung des Intensitätssignals durch die zugegebene Fucose zu den Kontrollfibroblasten gab. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Fucosesupplementation veränderte sich das normalisierte Signal von 100,0 %  $\pm$  26,52 % (n = 4) um 3,07 % auf 96,93 %  $\pm$  24,27 % (n = 4). Das Experiment aus 4.7.1 wurde im Rahmen der Komplementation wiederholt und die Intensität der Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Erneut zeigte sich eine hoch signifikante Reduktion der Fucosylierung auf 35,54 % ( $\pm$  13,13 %; n = 4; p = 0,004). Auch in diesem Experiment stieg das AAL-Signal an, wenn Fucose in das Zellkulturmedium gegeben wurde (59,76 %  $\pm$  18,84 %). Virale Infektionen können das Expressionsverhalten und den Stoffwechsel der Zellen vielschichtig verändern, daher ist es nötig die Auswirkungen einer Infektion mit einem Leervektor (MOCK) zu untersuchen. In Bezug auf die Fucosylierung änderte die Infektion mit einem Leervektor das AAL-Signal bei den Patientenzellen nur geringfügig. Die normalisierte Intensität betrug 31,71 %  $\pm$  21,39 % und war damit schwächer als das Signal der Patientenzellen (- 3,83 %). Bezogen auf die Kontrollen lag auch hier eine hoch signifikante Verminderung vor (- 68,28 %; n = 4; p = 0,002).

Durch die virale Infektion mit dem wildtypischen *GFUS*-Gen wird im Vergleich zu den Patientenzellen (MOCK) eine signifikante Refucosylierung erreicht. Die Intensität des AAL-Signals nahm um 48,08 % (p = 0,045) zu und betrug als normalisierte Intensität 77,80 %  $\pm$  30,66 %.

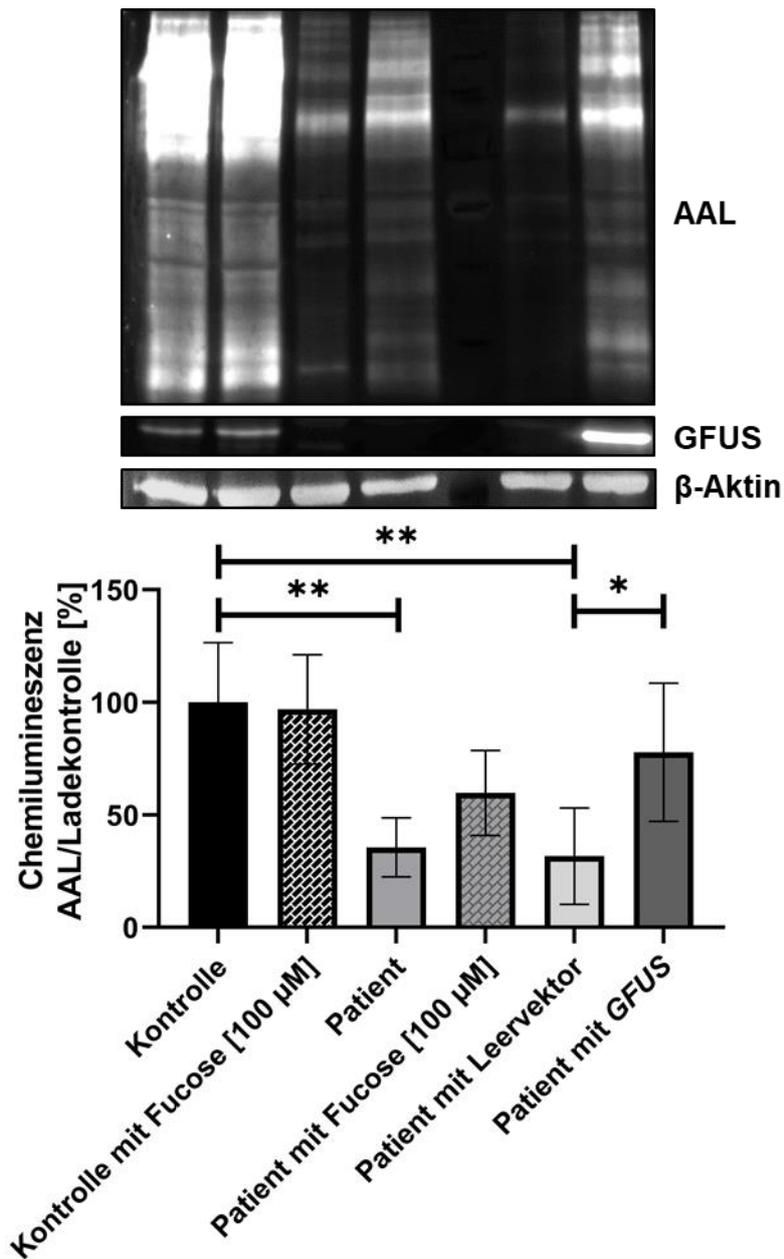
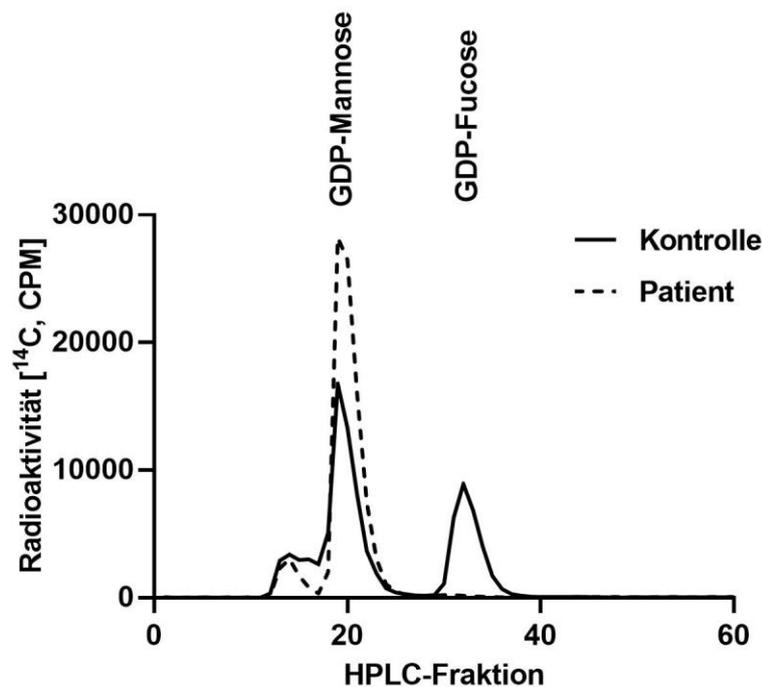


Abbildung 17 – Komplementationsstudie mit wildtypischem *GFUS*. Patientenzellen wurden mit Wildtyp-*GFUS* stabil infiziert. Weiterhin wurde auch ein pLNCX2-Leervektor (MOCK) in die Patientenzellen gebracht. Die komplementierten Zellen wurden sowohl mit Kontrollzellen als auch mit den Patientenzellen verglichen. Auch Patientenzellen mit supplementierter Fucose im Medium wurden aufgetragen. Die Expression von *GFUS* wurde mittels Western Blot überprüft. Das starke *GFUS*-Signal in Verbindung mit der Zunahme an Fucosylierung in den infizierten Patientenzellen belegt die erfolgreiche virale Komplementation. Der Graph wurde analog zu den Spuren des Gels ausgewertet, sodass die Beschriftung unterhalb der Balken auch für die Spur des Blots gilt.

#### 4.9 *In vitro* Umsetzung von $[^{14}\text{C}]\text{GDP-D-Mannose}$ in $[^{14}\text{C}]\text{GDP-L-Fucose}$

Die Aktivität des GFUS-Enzyms konnte *in vitro* mithilfe von radioaktiv-markierter  $[^{14}\text{C}]\text{GDP-D-Mannose}$  verfolgt werden. Da GFUS in der Zelle zytosolisch vorliegt, konnte das Lysat aus Fibroblastenzellen für die Aktivitätsstudien verwendet werden. Das umgesetzte Produkt wurde mittels HPLC aufgetrennt, die Fraktionen gesammelt und die enthaltene Radioaktivität im Szintillationscounter bestimmt.

Die 60-minütige Messung ergab, dass das GFUS-Protein aus den Patientenfibroblasten lediglich 1,15 % der GDP-Mannose zu GDP-L-Fucose umgesetzt hat. In der Kontrolle wurden in der gleichen Zeit 45 % der eingesetzten GDP-Mannose in GDP-L-Fucose umgewandelt.



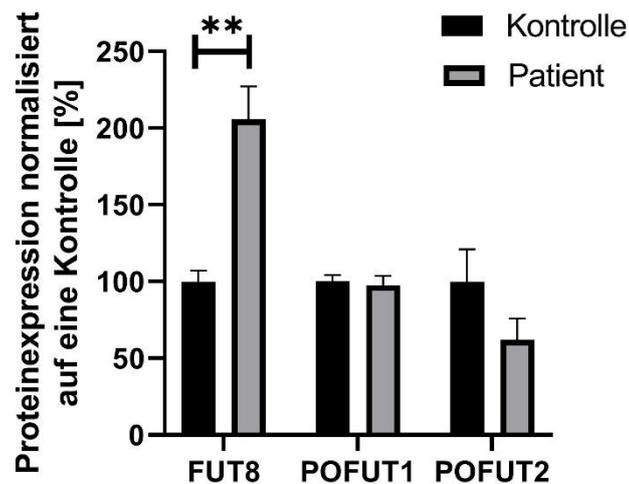
**Abbildung 18 - Aktivitätsmessung des GFUS Proteins.** Lysat aus Kontroll- und Patientenzellen wurde untersucht. Die Umsetzung von radioaktiv markierter  $[^{14}\text{C}]\text{GDP-D-Mannose}$  in  $[^{14}\text{C}]\text{GDP-L-Fucose}$  wurde bestimmt. Die Messung wurde über 60 Minuten verfolgt und anschließend die aufgefängenen HPLC Fraktionen nach der enthaltenen Radioaktivität untersucht.

## 4.10 GFUS-Defizienz führt zu weitreichenden Sekundäreffekten

Da sich aus den bisher erhobenen Daten ein multisystemischer Defekt abzeichnet, wurden weitere wichtige nachgeschaltete Proteine untersucht. Es sollte gezeigt werden wie weitreichend die Auswirkungen des GFUS-Defekts auf dessen Downstream-Proteine sind.

### 4.10.1 FUT8, POFUT1 und POFUT2

Bei der N-Glykanmessung aus Serum (siehe 4.2.2) zeigte sich, dass bei der Patientin vor allem Glykane mit core-Fucose vermindert vorlagen. Da von den zehn Fucosyltransferasen ausschließlich Fucosyltransferase 8 (FUT8) die core-Fucosylierung katalysiert, wurde ein Western Blot zur Expressionsanalyse für FUT8 durchgeführt. Es zeigte sich, dass FUT8 hoch signifikant um  $105,7\% \pm 21,6\%$  ( $n = 3$ ;  $p = 0,008$ ) erhöht vorlag (siehe Abbildung 19).



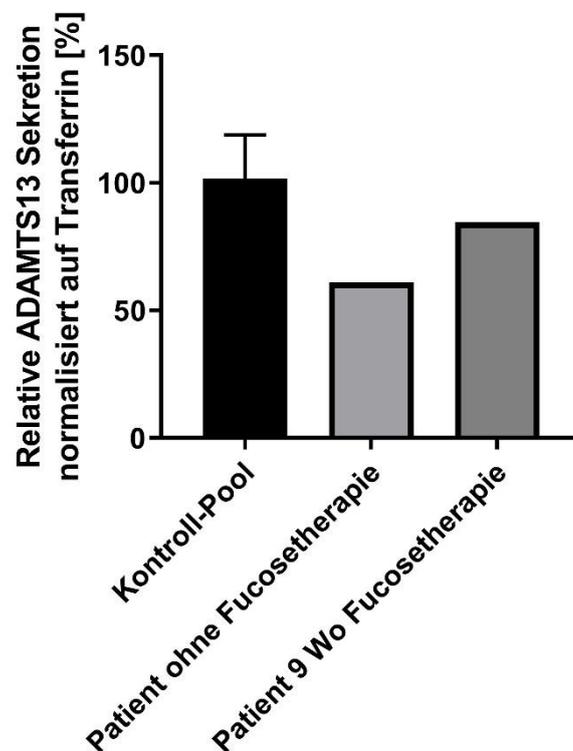
**Abbildung 19 - Proteinexpression von FUT8, POFUT1 und POFUT2.** Für die Analyse der Proteinexpression dieser Transferasen wurde ein Western Blot mit anschließender immunologischer Detektion durchgeführt. Die Fucosyltransferase 8 war signifikant erhöht. Die Proteinexpression von POFUT1 und POFUT2 war nicht signifikant verändert.

Die bisherigen Untersuchungen des Defekts beschränkten sich bislang ausschließlich auf die N-Glykane. Da GDP-L-Fucose aber auch für die beiden O-Fucosyltransferasen POFUT1 und POFUT2 das spezifische Donorsubstrat für die Übertragung des Fucoserests auf Proteine darstellt, wurde deren Proteinexpression mittels Western Blot überprüft. Es zeigten sich bei POFUT1

(97,5 %  $\pm$  4,2 %) eine schwache Verminderung um 2,5 %, wohingegen die Proteinmenge von POFUT2 (62,0 %  $\pm$  14,6 %) deutlich, aber nicht signifikant, reduziert vorlag. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

#### 4.10.2 ADAMTS13

Glykosylierungsdefekte im Fucosestoffwechsel lassen sich aktuell noch nicht mit Hilfe des CDG-Standardscreeningverfahrens detektieren, da bislang ein entsprechendes Markerprotein fehlt. Ein möglicher Lösungsansatz liegt in ADAMTS13 („a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13“), welches nur in das Blut sekretiert wird, wenn die TSP1-Wiederholungsmotive („thrombospondin type 1“) O-fucosyliert sind [119]. Mittels Serumblots wurde die Sekretion von ADAMTS13 im Vergleich zu einem Kontrollpool untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor der Fucosetherapie 39,0 % weniger ADAMTS13 im Serum zu finden war. Nach neun Wochen Fucosetherapie konnte 15,4 % mehr ADAMTS13 im Serum gefunden werden (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20 - ADAMTS13-Sekretion im Serum.** Die Sekretion wurde mit Hilfe von Antikörpern bestimmt und per Western Blot detektiert.

## 4.11 Genexpression der Proteine des Fucosestoffwechsels

Um die Auswirkungen des GFUS-Defekts auf den gesamten Fucosestoffwechsel besser zu verstehen, wurden alle Gene des Fucosestoffwechsels mittels qPCR untersucht. Neben Patienten- und Kontrollzelllinien wurden auch jeweils die gleichen Zelllinien mit 100  $\mu$ M Fucose im Medium supplementiert, um die Auswirkungen einer Fucosetherapie im Patienten auf den damit verbundenen Stoffwechselweg nachzustellen. Die Fucose wurde permanent während des Wachstums bereitgestellt und sofort nach Ausplattieren der Zellen hinzugegeben. Die gemessenen  $C_t$ -Werte der Kontrollzellen mit Fucose, der Patientenzellen und der Patientenzellen mit Fucose wurden in Korrelation auf die  $C_t$ -Werte der Kontrolle berechnet. Die ausführlichen  $\Delta C_t$ -Werte sind im Anhang gelistet (siehe 9.3.4). In den Graphen in Abbildung 21 und Abbildung 22 sind die vielfachen-Expressionsänderungen aufgetragen. Diese berechnen sich aus der negativen Potenz der  $\Delta C_t$ -Werten zur Basis 2. Durch die negative Potenz ist es nicht möglich, mit diesen Werten statistische Tests durchzuführen, weshalb die Signifikanzen und Standardabweichungen mit den  $\Delta C_t$ -Werten berechnet wurden. Für alle gemessenen Gene des Stoffwechselwegs war  $\beta$ -Aktin das Referenzgen. Unter den untersuchten Genen waren die zwei Gene des Salvage- (*FCSK* und *FPGT*) und die zwei Gene des *de novo*-Stoffwechselweges (*GMDS* und *GFUS*), zwei GDP-L-Fucose-Transporter (*SLC35C1* und *SLC35C2*), sowie 13 Fucosyltransferasen (*FUT1-11* und *POFUT1/2*).

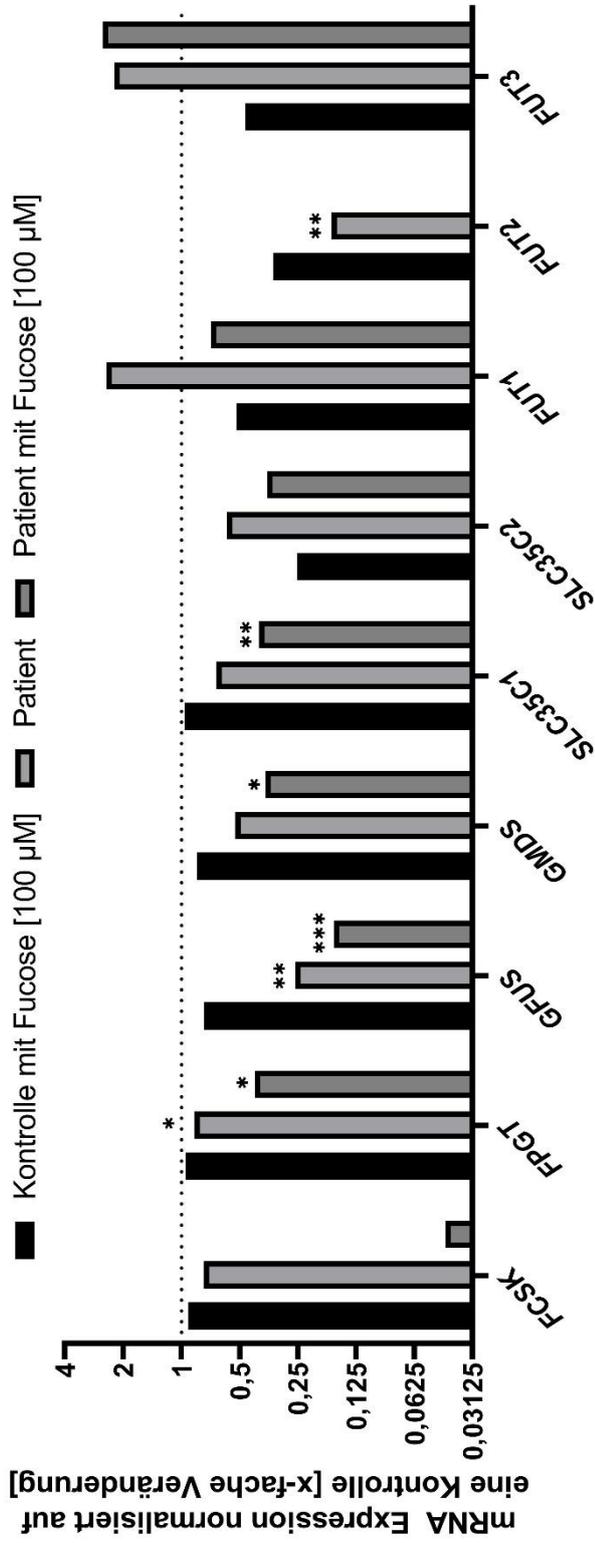
Die Kontrollzelllinien, die mit 100  $\mu$ M Fucose kultiviert wurden, zeigten innerhalb der 19 Gene kaum Veränderungen bezogen auf die Kontrollen ohne Fucose. Bei den beiden Fucosyltransferasen 5 und 6 wurde eine signifikante Verminderung der Expression festgestellt (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). *FUT5* war 5-fach weniger exprimiert als in den Kontrollzellen ohne Fucosegabe (19,9 %;  $p = 0,002$ ) und bei *FUT6* war nur ein Drittel der cDNA-Menge gemessen worden (29,9 %;  $p = 0,015$ ).

Die Genexpressionsanalyse der Patientenfibroblasten ergab, dass insgesamt sieben Gene signifikant dereguliert waren. Bei drei der Gene wurde ein vermindertes mRNA-Niveau festgestellt, bei vier war es erhöht. *FPGT* war 0,86-fach weniger exprimiert, was durch die kleine Standardabweichung (siehe Abbildung 28) dennoch signifikant war (85,5 %;  $p = 0,003$ ). *GFUS* war vierfach weniger exprimiert als in den Kontrollen (25,7 %;  $p = 0,002$ ), was mit den bereits

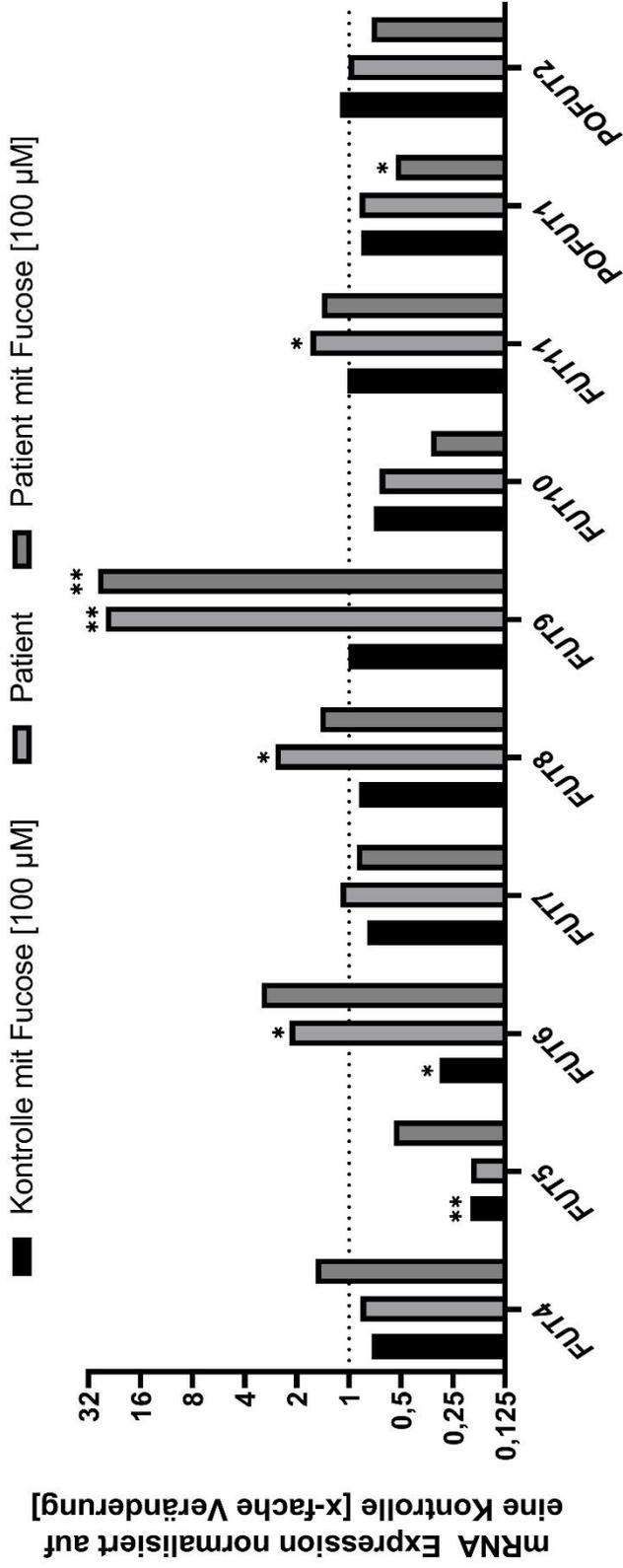
gemessenen Ergebnissen aus Kapitel 4.5 übereinstimmt. Die Fucosyltransferase 2, *FUT2*, war auf das 0,17-fache des Kontrollexpressionsniveaus vermindert (16,7 %;  $p = 0,005$ ). *FUT6* und *FUT8* waren 2,20- und 2,66-fach hochreguliert verglichen zu den Kontrollzellen (220,5 %;  $p = 0,015$ ; bzw. 265,9 %;  $p = 0,016$ ). Der deutlichste Unterschied zeigte sich in *FUT9*, das 25,41-fach höher exprimiert wurde (2541,40 %;  $p = 0,003$ ). *FUT11* (166,7 %) war 1,66-fach erhöht und mit einem p-Wert von 0,020 signifikant.

Zuletzt wurde betrachtet, wie sich die Genexpression der Patientenzellen verhält, wenn sie unter Einfluss an zugesetzter L-Fucose stehen. Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle konnten in sechs Genen festgestellt werden, wobei *FUT2* nicht mehr detektiert werden konnte. Auch fiel auf, dass die Fucosekinase (*FCSK*) im Durchschnitt der Replikate zwar 25-fach weniger exprimiert, aber dennoch nicht signifikant verändert vorlag. Von den sechs signifikant veränderten Genen ist die Fucosyltransferase *FUT9* der N-Glykane sowie die O-Fucosyltransferase *POFUT1* betroffen. *FUT9* ist noch höher als in den Patientenzellen exprimiert (28,25-fach; 2824,8 %;  $p = 0,003$ ). *POFUT1* hingegen war auf das 0,53-fache des Kontrollwertes reduziert (53,6 %;  $p = 0,041$ ) und somit stärker runterreguliert als in den Patientenzellen ohne Fucosegabe. Im Bereich der GDP-L-Fucose-Synthese waren, wie auch in den Patientenzellen, *FPGT* (41,8 %) und *GFUS* (16,3 %) weniger exprimiert (0,41- bzw. 0,16-fach).

Auch hier zeigte sich eine erhöhte Tendenz zu einer reduzierten Expression verglichen zu den wildtypischen Patientenzellen, was sich auch in den p-Werten äußerte:  $p = 0,011$  bei *FPGT* und  $p = 0,0005$  bei *GFUS*. Anders als in den Patientenzellen ohne Fucose waren der GDP-L-Fucose Transporter, *SLC35C1* (0,39-fach; 39,7 %;  $p = 0,033$ ) und die GDP-mannose 4,6 dehydratase, *GMD5* (0,37-fach; 36,7 %  $p = 0,001$ ), weniger exprimiert als in den Kontrollzellen.



**Abbildung 21 - Genexpression des Fucosestoffwechsels A.** Die Genexpression wurde in Fibroblasten untersucht. Die gestrichelte Linie in den Graphen zeigt dabei jeweils das Kontrollniveau an, auf das die anderen Zelllinien normalisiert wurden. Zum Vergleich wurde die gleiche Zelllinie ebenfalls mit 100 µM Fucose versetzt, um auch den Einfluss auf gesunde Zellen besser zu verstehen. Weiterhin wurden die Patientenzellen ohne und die Patientenzellen mit Fucose im Medium auf 19 Gene in der qPCR untersucht. Jedes Gen wurde dabei in je drei unterschiedlichen RNA-Isolationen und diese in Triplicaten gemessen. Die ausführenden  $\Delta C_t$  Werte mit deren Standardabweichungen sind im Anhang 9.3.4 dargestellt. Um eine anschaulichere Darstellung zu erreichen, wurde die Abbildung auf zwei Graphen verteilt. In Abbildung 21 sind die Gene *FCSK* bis *FUT3* dargestellt. Die restlichen Fucosyltransferasen sind auf der folgenden Seite in Abbildung 22 zu finden.



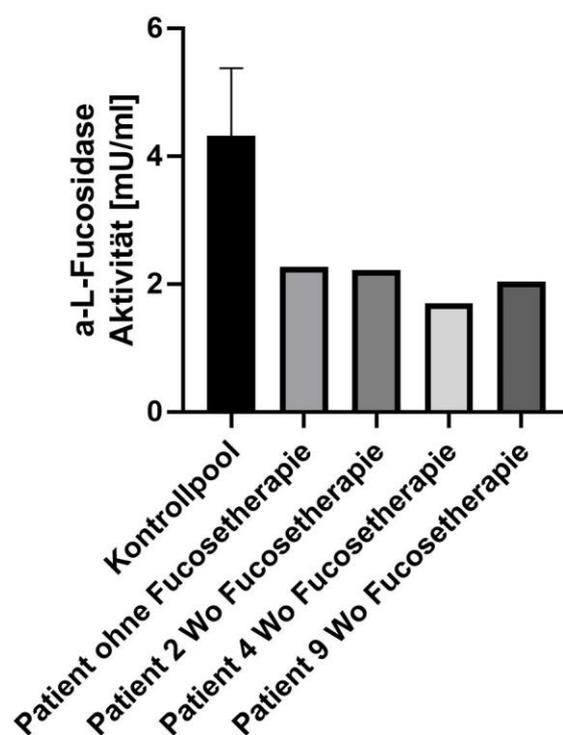
**Abbildung 22 - Genexpression des Fucosestoffwechsels B.** Die Genexpression wurde in Fibroblasten untersucht. Die gestrichelte Linie in den Graphen zeigt dabei jeweils das Kontrollniveau an, auf das die anderen Zelllinien normalisiert wurden. Zum Vergleich wurde die gleiche Zelllinie ebenfalls mit 100 µM Fucose versetzt, um auch den Einfluss auf gesunde Zellen besser zu verstehen. Weiterhin wurden die Patientenzellen ohne und die Patientenzellen mit Fucose im Medium auf 19 Gene in der qPCR untersucht. Jedes Gen wurde dabei in je drei unterschiedlichen RNA-Isolationen und diese in Triplikaten gemessen. Die ausführenden  $\Delta C_t$  Werte mit deren Standardabweichungen sind im Anhang 9.3.4 dargestellt. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind in Abbildung 15 die Gene *FUT4* bis *POFUT2* dargestellt.

## 4.12 Metabolite

Zur weiteren Analyse der Auswirkungen des GFUS-Defekts auf biochemische Prozesse, wurden auch verschiedenste Metabolite aus Serum und Fibroblasten überprüft.

### 4.12.1 Fucosidase

Die lysosomale  $\alpha$ -L-Fucosidase, die von *FUCA1* kodiert wird und für die Wiederaufbereitung von verknüpften Fucoseresten verantwortlich ist, wurde aus Serumproben während der initialen Phase der Fucosetherapie der Patientin bestimmt (Abbildung 23). Als Kontrollwert wurde ein Kontrollpool aus vier Serumproben von gesunden Individuen des gleichen Geschlechts und Alters gewählt.



**Abbildung 23 - Lysosomale Fucosidase Aktivität aus Serum.** Die Fucosidaseaktivität wurde aus dem Serum bestimmt und mit einem Pool ( $n = 4$ ) von gesunden, gleichaltrigen Kontrollen verglichen. Von der Patientin sind Proben vor- und zwei Wochen-, vier Wochen- und neun Wochen nach Start der Fucosetherapie aufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus technischen Duplikaten.

Die Daten aus Abbildung 23 zeigen, dass die Aktivität in allen Serumproben der Patientin etwa um die Hälfte reduziert war. In der ersten Patientenprobe vor der Fucosetherapie wurde eine Aktivität von 2,3 mU/ml gemessen. Nach zweiwöchiger Fucosetherapie ergab sich eine Aktivität von 2,2 mU/ml. In der Probe vier Wochen nach Start der Fucosetherapie ist eine Reduktion auf 1,71 mU/ml gemessen worden. In der letzten Probe, neun Wochen nach Beginn der Fucosetherapie wurde ein Wert von 2,0 mU/ml festgehalten.

#### 4.12.2 Acylcarnitine und Aminosäuren

Die Messungen der Acylcarnitine und Aminosäuren wurden per LC-MS durchgeführt und die Grenzwerte des Labors für das Neugeborenen Screening des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin Heidelberg übernommen. Es zeigte sich eine Erhöhung für das freie Carnitin (C0) um 2,8  $\mu\text{mol/l}$  über dem oberen Grenzwert von 49,42  $\mu\text{mol/l}$ . Die Erhöhung eines einzelnen Acylcarnitins hat metabolische keine Signifikanz. Die restlichen aufgenommenen Parameter waren vollständig im Rahmen der Normwerte. Die detaillierten Messwerte der Acylcarnitine und Aminosäuren sind im Anhang 9.3.5 in der Tabelle 4 dargestellt.

#### 4.12.3 Nukleotid-aktivierte Zucker

Zur Überprüfung, ob sich ein verminderter GDP-L-Fucosespiegel auch auf die Bereitstellung anderer Nukleotid-aktiverter Zucker auswirkt, wurden Zellysate von Kontrollzelllinien und der Patientenzelllinie in Zusammenarbeit mit Dr. Gernot Poschet am COS (Universität Heidelberg) massenspektrometrisch bestimmt. Die Normierung erfolgte auf den ATP-Gehalt der Zellen.

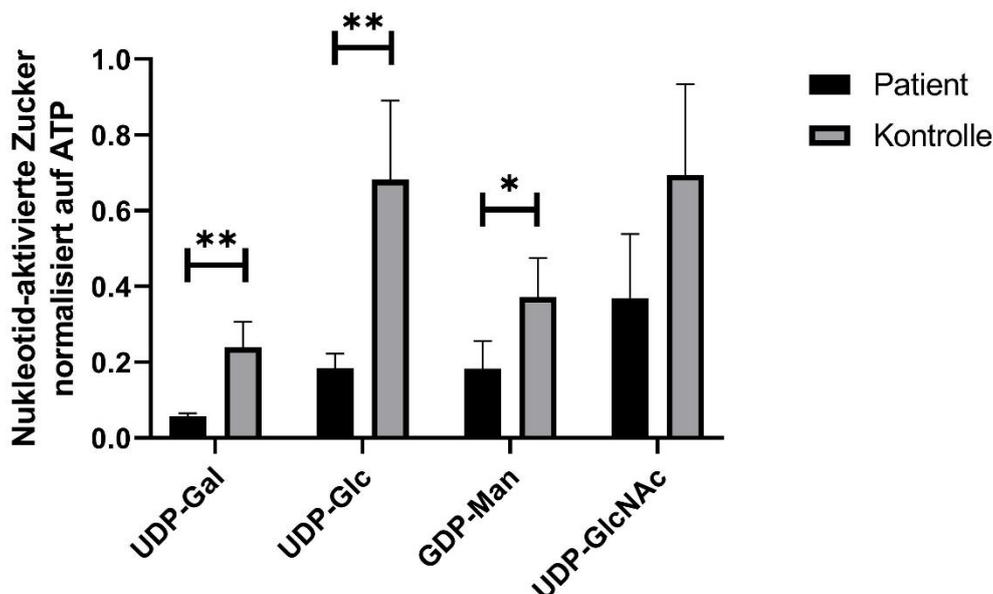


Abbildung 24 - Messung der Nukleotid-aktivierten Zucker aus Fibroblasten. Aus Fibroblastenlysat wurden die Nukleotid-aktivierten Zucker massenspektrometrisch bestimmt. Die Messungen wurden dabei auf den ATP-Gehalt der Zellen normiert. (Gal = Galactose, Glc = Glucose, Man = Mannose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin)

Wie aus Abbildung 24 zu entnehmen ist, sind die auf ATP normierten Messwerte für die vier Nukleotid-aktivierten Zucker UDP-Gal, UDP-Glc, GDP-Man und UDP-GlcNAc erhöht.

Der Nucleosiddiphosphat-Zucker UDP-Galactose ist in den Patientenzellen 4-fach mehr vorhanden. Diese Veränderung ist hoch signifikant ( $p = 0,003$ ;  $n = 3$ ). Ebenfalls hoch signifikant ist die Differenz an UDP-Glucose zwischen Patienten- und Kontrollzellen. Das UDP-Glc/ATP-Verhältnis ist um 0,5 höher ( $p = 0,005$ ;  $n = 3$ ). GDP-Mannose, welches das Ausgangssubstrat für die GDP-L-Fucose ist, ist in Patientenzellen zweifach erhöht ( $p = 0,034$ ). Der Anstieg von UDP-GlcNAc ist ebenfalls zweifach erhöht, allerdings nicht signifikant ( $p = 0,086$ ).

## 5 Diskussion

Die Glykosylierung ist eine der wichtigsten co- und posttranslationalen Proteinmodifikationen. In Säugetierzellen sind über 300 verschiedene Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Transportproteine beteiligt. Angeborene Defekte innerhalb dieses Stoffwechselwegs werden unter der Erkrankungsgruppe „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) zusammengefasst. Bis heute wurden mindestens 130 verschiedene Defekte identifiziert [9, 120]. Diese Defekte äußern sich in oft komplexen, multiorganischen Krankheitsbildern. Von den bislang bekannten CDG-Typen stehen bisher lediglich vier Defekte in Verbindung mit einer fehlerhaften Fucosylierung. In dieser Arbeit wird erstmals über eine Patientin mit einem Defekt in der *de novo* Synthese des Nukleotid-aktivierten Zuckers GDP-L-Fucose berichtet. Dieser Zucker ist das Ausgangssubstrat für die Fucosylierung von proteingebundenen N- und O-Glykanen sowie für die Fucosylierung von Gangliosiden.

### 5.1 Eine Krankheitsverursachende Mutation in *GFUS*

Die beschriebene Patientin zeigte von Geburt an eine abweisende Tendenz zur Nahrungsaufnahme. Es wurde eine zu geringe Gewichts- und Größenzunahme festgestellt, die mit der verminderten Nahrungsaufnahme in Verbindung gebracht wurde. Allerdings konnte auch trotz nasogastraler Sonde kein ausreichendes Wachstum erreicht werden. Außerdem zeigte sich in den ersten Lebensjahren eine langsame geistige Entwicklung, sowie Auffälligkeiten im MRT. Die Gesichtsdysmorphismen und die generell multisystemische Symptomatik ließen den Verdacht auf eine Erkrankung der Glykosylierung zu. Aus Serumproben und Fibroblasten wurden erste Analysen der CDG-Routinediagnostik durchgeführt.

Die Standarddiagnostik mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) des Transferrins fiel jedoch unauffällig aus. Dies liegt darin begründet, dass die Glykane des Transferrins nur zu etwa 10 % fucosyliert sind und eine fehlende Fucosylierung zudem nicht zu einem Ladungsshift führt. Hiermit bleibt der Isoelektrische Punkt gleich und ruft so kein verändertes Laufverhalten hervor [121]. Interessanterweise wies das alternative Markerprotein für die N-Glykosylierung,  $\alpha$ -1-Antitrypsin, auffällige Banden auf (siehe 4.2.1).

$\alpha$ -1-Antitrypsin wird in unserer Gruppe als genereller Marker für N-Glykosylierungsdefekte verwendet, da es mehr und komplexere N-Glykanstrukturen aufweist als Transferrin. Zudem kann man mit  $\alpha$ -1-Antitrypsin auch CDG-Verdachtspatienten bis zu einem Alter von drei Monaten sicher diagnostizieren, wohingegen Transferrin in diesem Alter oftmals falsch-positive Ergebnisse liefern kann [122]. Im Laufe der Jahre zeigte sich innerhalb unserer Gruppe auch, dass das  $\alpha$ -1-Antitrypsin bei Defekten in *SLC35C1*, dem GDP-L-Fucose Transporter im Golgi, auffällig ist. Dahingegen zeigte die Diagnostik mittels Transferrin keine Auffälligkeiten. Weshalb  $\alpha$ -1-Antitrypsin bei einem GDP-L-Fucosetransporterdefekt ein alternatives Bandenmuster ergibt, ist noch nicht völlig verstanden und wird innerhalb unserer Gruppe momentan weiter untersucht.

Die Fucosereste an O-Glykanen werden meist endständig verknüpft, können aber auch direkt als O-verknüpfter Zucker an Serin oder Threonin gebunden sein. Der durch POFUT1 im ER initiierte O-Glykanbaum, kann im Golgi mit einer endständigen Sialinsäure versehen werden. Fehlt die Fucose als Anker bei diesen Glykanen, könnte es dadurch auch zum Fehlen der verknüpften Sialinsäure und demnach zu einer Ladungsänderung kommen. Möglicherweise trägt  $\alpha$ -1-Antitrypsin im Gegensatz zu Transferrin solche O-glykosylierten Bindungsstellen, die durch die Abwesenheit von Fucoseresten einen Shift des IEPs verursachen können. Bislang gibt es noch keine Daten zu einer möglichen O-Fucosylierung des  $\alpha$ -1-Antitrypsins.

Aufgrund des auffälligen  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Bandenmusters erhärtete sich der Verdacht auf einen möglichen Fucosylierungsdefekt bei der Patientin, weshalb zunächst Bindestudien mit fucosedetektierenden Lektinen in Fibroblasten und Serum durchgeführt wurden. Verwendet wurden hier UEA, LCH, LTL und AAL, wobei mit AAL die stärksten Signalunterschiede detektiert wurden (siehe 4.7). AAL bindet vorwiegend an  $\alpha(1,6)$  verknüpfte Fucose und ist somit insbesondere geeignet, um core-fucosylierte Strukturen zu detektieren, da sie die einzig bekannte Fucosylierung in  $\alpha(1,6)$  Orientierung ist. Das AAL-Signal im Lektin Blot war bei den Serum- und Zellproben der Patientin signifikant vermindert. Zur weiteren Abklärung des Fucosylierungsdefekts, wurden N-Glykanstudien im Serum mittels xCGE-LIF durchgeführt.

Aus den N-Glykandaten ergab sich, dass sowohl antennär- als auch core-fucosylierte Glykane im Patientenserum auffällig vermindert waren (siehe 4.2.2). Besonders schwer betroffen waren Glykane mit der häufigeren core-Fucose, was die Ergebnisse der Lektinbindestudien mittels AAL belegte. Bemerkenswert ist, dass mehrere GFUS-CDG spezifische Glykane im Serum der Patientin nachgewiesen wurden, wie die di-antennären Zuckereinheiten A2G0, A2G2, A2G2S1(2,3) und A2G1, die alle nur als fucosylierte Strukturen in den Kontrollen gefunden werden konnten. Im Patienten reicherte sich interessanterweise das core-fucosylierte Glykan FA3G3S1(2,6) an, welches in Kontrollseren nicht gefunden wurde. Auffällig war ebenfalls, dass insbesondere nicht-sialylierte N-Glykane im Patientenserum vermindert waren, was die unauffällige IEF von Transferrin ebenfalls erklärt.

Da sich manche Retentionszeiten einzelner Glykanpeaks zu sehr ähnelten, konnte die Methode bei einigen Glykanpeaks die Zuckerstrukturen nicht mehr differenzieren. So mussten einige Glykanpaare, wie beispielsweise FA2BG1[3] und Man8 zusammengefasst werden, was dazu führte, dass die Summe der Peakgruppenverteilung (komplex, mannosereich und hybrid) mehr als 100 % ergaben.

Zur Identifizierung der molekularen Ursache dieses Fucosylierungsdefekts wurde eine Exom Sequenzierung aus Leukozyten der Patientin initiiert, wobei Varianten im *GFUS*-Gen entdeckt wurden. Es zeigte sich, dass eine Compound-Heterozygotie vorlag, die mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Nachdem *GFUS* innerhalb der Familie ebenfalls sequenziert wurde, stellte sich heraus, dass die Mutation c.[632G>A];p.[Gly211Glu] paternal und die Mutation c.[659C>T];p.[Ser220Leu] maternal vererbt wurde und somit eine *de novo* Mutation ausschloss. Das ältere und nicht betroffene Geschwisterkind ist ebenfalls Träger der paternalen Variante. Beide Varianten liegen in Exon 6 des Gens und befinden sich in einem hoch konservierten Bereich des Proteins (siehe 4.3.2). Die Varianten innerhalb des Gens waren zu diesem Zeitpunkt nicht als krankheitsverursachend beschrieben, weshalb weitere biochemische Tests die Pathogenität des Defekts belegen sollten. In *in silico* Studien zeigte sich zunächst, dass der durch die Mutationen verursachte Aminosäureaustausch zu einer veränderten Polarität führt, was sich auf die Bindungsverhältnisse innerhalb des Proteins stark auswirkt (siehe 4.3.3). Beide

Mutationen führen zu einer Versteifung der Proteinstruktur, wobei die p.[Ser220Leu] Mutation eine fast dreifach stärkere Änderung der freien Gibbs-Energie bewirkt. Die räumliche Nähe zu den wichtigen Bindungsstellen des Cofaktors NADPH und des Substrats GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose könnte dazu führen, dass die Versteifung der Struktur an den jeweiligen Stellen zu einer geringeren Bindungsaffinität führt. Dies könnte eine verminderte Funktionalität des Proteins zur Folge haben. Weiterhin sind beide ausgetauschten Aminosäuren deutlich größer, was zu einer sterischen Hinderung und dadurch zu einer schlechteren Bindung von Cofaktor oder Substrat führen könnte. Beide betroffenen Aminosäuren sind über verschiedene Spezies hochkonserviert, was die Bedeutung der Aminosäuren weiter unterstreicht. Die Strukturaufklärung von Zhou et al. Beschreibt allerdings keine Interaktion der betroffenen Aminosäuren Gly211 und Ser220 mit dem aktiven Zentrum [117]. Da eine Heterozygotie der jeweiligen Mutationen in den Eltern und beim älteren Geschwisterkind jedoch zu keinem Krankheitsbild führt, ist dennoch davon auszugehen, dass die beiden Mutationen in Kombination zu einem Funktionsverlust des Proteins führen.

Die Proteinuntersuchungen im Lysat von Kontroll- und Patientenzellen mittels Western Blot ergaben, dass zwei Isoformen des GFUS Proteins exprimiert werden. Dies könnte erklären, weshalb das Enzym bifunktionell in der zellulären Umsetzung zu GDP-L-Fucose ist. Die beiden zu Grunde liegenden Transkriptvarianten (NM\_001317783 und NM\_003313.4) unterscheiden sich im Beginn der 5'-kodierenden Region. In der kürzeren Transkriptvariante fehlen in diesem Bereich 37 Basenpaare, was dazu führt, dass ein alternatives späteres Startcodon verwendet wird. Die beiden Isoformen unterscheiden sich auf Proteinebene lediglich durch sechs Aminosäuren im N-Terminus. Unterschiede zwischen Kontrollen und Patient zeigten sich allerdings vor allem bei der kleineren Isoform (NP\_003304.1; 35,9 kDa). Da die Expression der größeren Isoform (NP\_001304712; 36,5 kD) bei Kontrolle und Patient gleich war, lässt sich der Fucosylierungsdefekt auf die kürzere Variante zurückführen, weshalb wir die dazugehörige Transkriptvariante 2 (NM\_003313.4) somit als krankheitsverursachend ansehen. Was die Funktion der langen GFUS-Variante für den Metabolismus der Zelle bedeutet, ist aktuell noch unklar.

qPCR-Analysen zu beiden Transkriptvarianten ergaben, dass beide Isoformen exprimiert werden. Hierbei ergaben sich vergleichbare Transkriptionslevel der längeren Isoform, wohingegen die kürzere Isoform ein signifikant vermindertes Level an mRNA bei der Patientin im Vergleich zu Kontrollen aufwies, womit sich der Effekt auf Proteinebene zumindest zum Teil mit dem verminderten mRNA-Level erklären lässt. Es bleibt dabei offen, ob dies durch eine der beiden Varianten oder von beiden hervorgerufen wird. Möglicherweise könnte die Reduktion auf Proteinebene zum Teil durch ein vermindertes Transkriptionslevel durch eine der beiden Mutationen hervorgerufen und zum Teil durch eine Proteininstabilität durch die andere Mutation erklärt werden.

Um die intrazelluläre Lokalisation des mutierten Proteins zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzstudien in Patienten- und Kontrollfibroblasten durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben (Kapitel 4.6).

Die *in vitro* Analytik der GFUS-Aktivität mittels radioaktiv-markierten Substrats ergab eine stark reduzierte Bereitstellung von GDP-L-Fucose im Fibroblastenlysat der Patientin (siehe 4.9). Weiterhin konnte die Fucosylierung durch eine virale Komplementationstudie mit wildtypischem cDNA Material des *GFUS*-Gens nahezu vollständig wiederhergestellt werden, womit die krankheitsverursachende Folge der Mutationen bewiesen werden konnte (Kapitel 4.8).

Da sich die Mehrzahl der bisherigen Experimente auf die N-Glykosylierung beschränkte, sollte nun auch die O-Fucosylierung untersucht werden. Dafür wurden Western Blots mit Fibroblastenlysat durchgeführt, bei denen das Proteinlevel der O-Fucosyltransferasen POFUT1 und POFUT2 detektiert wurde. Außerdem wurde die Expression dieser beiden Enzyme auf mRNA Ebene mittels qPCR ermittelt (siehe 4.10.1 und 4.11). Als weiteren Hinweis auf eine stattfindende O-Fucosylierung wurde die Sekretion von ADAMTS13 in Serum untersucht. ADAMTS13 trägt acht Thrombospondin Typ 1 (TSP1)-Motive, die von POFUT2 im ER O-fucosyliert werden. Da beschrieben wurde, dass die Sekretion von ADAMTS13 auf der O-Fucosylierung der TSP1-Wiederholungen beruht [119], wurde der ADAMTS13-Spiegel im Serum als Marker für einen O-Fucosylierungsdefekt genutzt. Die durchgeführten Experimente ergaben eine geringfügig reduzierte Proteinmenge an POFUT1 und POFUT2 im Zelllysat,

wobei die Expression der beiden O-Fucosyltransferasen auf mRNA Ebene vergleichbar mit Kontrollproben war. Die Sekretion von ADAMTS13 ins Serum war ebenfalls leicht vermindert. Dennoch sind die biochemischen Effekte der Mutationen auf die O-Fucosylierung weniger deutlich als die Auswirkungen auf die N-Glykane. Dies könnte einen Hinweis darauf darstellen, dass die Fucosylierung von N-Glykanen einen höheren Stellenwert im Körper einnimmt als die O-Fucosylierung. Hier wären weitere umfassende quantitative und qualitative Untersuchungen zur Fucosylierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie notwendig. Da innerhalb der Zelle die O-Fucosylierung und N-Fucosylierung räumlich getrennt sind, könnte auch ein effektiverer Transport ins ER, wo POFUT1 und POFUT2 aktiv sind, für die unterschiedliche Ausprägung verantwortlich sein.

Typischerweise können die Fucosyltransferasen gegenseitig gleiche Reaktionen übernehmen, sodass eine bestimmte Verknüpfung nicht nur ausschließlich von nur einem Enzym katalysiert wird [93]. Eine wichtige Ausnahme spielt dabei FUT8. Nur FUT8, die die  $\alpha(1,6)$ -verknüpfte core-Fucose synthetisiert, hat eine einmalige Funktion unter den Fucosyltransferasen. Es lässt sich spekulieren, dass bei einem Mangel des Substrats GDP-L-Fucose der Ablauf der Reaktion, welche nur durch ein einziges Enzym katalysiert werden kann, besonders beeinträchtigt ist. Ein Beleg dafür findet sich auch in den Ergebnissen aus 4.10.1, die zeigen, dass die Proteinexpression von FUT8 erhöht ist. Dies könnte auf einen regulatorischen Prozess der Zelle hindeuten. Bekräftigt wird diese These durch die qPCR Daten aus 4.11, die ebenfalls ein erhöhtes mRNA Level von *FUT8* preisgaben. Neben *FUT8* sind auch *FUT1*, *FUT3*, *FUT6*, *FUT9* und *FUT11* höher exprimiert in den Zellen der Patientin. Auch diese Regulation der Zelle könnte als kompensatorischer Mechanismus gesehen werden, um einer Hypofucosylierung der verschiedenen Strukturen entgegenzuwirken.

Stattdessen werden *FUT2* und *FUT5* in den Patientenzellen weniger exprimiert als in der Kontrolle. *FUT2*, das die  $\alpha(1,2)$ -verknüpfte Fucose am H-Antigen des Typ 1 katalysiert, hat eine ähnliche Funktion wie *FUT1*. Diese beiden Fucosyltransferasen sind die einzigen, die ein Anheften von Fucose an terminale Galactose katalysieren. Der Hauptunterschied der beiden Gene ist der Ort der Expression. *FUT1* wird vorwiegend in erythroidem Gewebe und primären sensorischen Neuronen exprimiert [123], während *FUT2* überwiegend in

epithelialen Zellen und exokrinen Sekreten exprimiert wird [124]. Eine gegensätzliche Expression wird aber durch die ähnliche Funktion und die gegenseitige Ersetzbarkeit erklärt. Ähnlich verhält es sich auch mit FUT5, welches 91 % Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu FUT3 und FUT6 aufweist, sodass auch hier die entgegengesetzte Expression der Gene grundsätzlich durch eine ähnliche Funktion erklärt werden kann [125].

Die Gene der GDP-L-Fucosebereitstellung waren durch die Mutationen in *GFUS* weniger stark beeinflusst. Das mutierte Gen selbst, sowie *GMDS*, *SLC35C1*, *SLC35C2* und *FPGT* waren vermindert exprimiert, wobei die reduzierte Expression nicht so eindeutig war wie die der Fucosyltransferasen. Eine signifikante Verminderung konnte nur bei der mRNA Expression von *FPGT* aus dem Salvage pathway beobachtet werden.

Aufgrund der Labordaten, die einen Fucosylierungsdefekt durch *GFUS* belegten, wurde mit einer Fucosetherapie in den Hautzellen der Patientin begonnen. Dazu wurden die Fibroblasten der Patientin mit L-Fucose im Medium supplementiert. Erste Studien zeigten, dass eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  L-Fucose im Medium reichte, um eine signifikante Refucosylierung der Proteine in Patientenfibroblasten herbeizuführen. Die Detektion der Fucosylierung erfolgte mit Lektinen. Die *in vitro* Fucosetherapie wurde ebenfalls in der Komplementationsstudie (Kapitel 4.8) betrachtet. Dort zeigte sich, dass L-Fucose im Medium einen geringeren Einfluss auf die Refucosylierung hat als das überexprimierte wildtypische *GFUS*-Gen. Daher ist anzunehmen, dass eine humane Fucosetherapie die abwesende Funktion des mutierten Gens nicht völlig ersetzen kann. Weiterhin ist eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  L-Fucose nötig gewesen, um signifikante Refucosylierungseffekte zu erreichen. Bei Fibroblasten mit einem Defekt im Golgi GDP-L-Fucose Transporter (*SLC35C1*-CDG), wurde eine L-Fucose Konzentration von 0,1 mM bis 10 mM verwendet, um die Zellen zu supplementieren, wobei sich vergleichbare Effekte erst bei der Konzentration von 10 mM ergaben.

Im Kapitel 4.11 wurde *in vitro* die Auswirkung von L-Fucose im Medium auf die Genexpression des gesamten Fucosestoffwechsels betrachtet. Die Ergebnisse der Lektinstudien deuteten darauf hin, dass eine L-Fucosesupplementation in den Zellen der Patientin den Salvage pathway anregt. Da so vermutlich mehr GDP-L-Fucose synthetisiert werden konnte, kann damit die Refucosylierung

erklärt werden. Entgegen der Erwartung, dass die Gene des Salvage pathways höher exprimiert sein müssten, war die Genexpression von *FCSK* und *FPGT* in den supplementierten Patientenzellen nicht erhöht. Beide Gene waren niedriger exprimiert als in den Kontrollzelllinien und sogar niedriger exprimiert als in den Patientenzellen ohne Fucose. Auffällig war dabei, dass die gemessenen Triplikate des mRNA Levels des *FCSK*-Gens äußerst große Schwankungen aufwiesen. Da die technischen Replikate und auch die  $\beta$ -*Aktin* Messung sehr konsistent waren, ist nicht von Ausreißermessungen auszugehen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Zeitpunkt der Supplementation ungünstig gewählt wurde. Die L-Fucose wurde dem Medium direkt nach Passagieren der Zellen ins Medium gegeben und alle 48 h erneut aufgefrischt. Die Zellen wurden geerntet, sobald die Flaschen Konfluenz erreicht hatten, was in etwa nach zwei Wochen der Fall war. Dadurch könnte es sein, dass die Zellen von Beginn an ausreichend große Mengen der Enzyme *FCSK* und *FPGT* gebildet hatten, was möglicherweise einen beobachtbaren Effekt auf transkriptioneller Ebene verhindert hatte. Denkbar wäre dies vor allem dann, wenn *FCSK* und *FPGT* eine hohe Proteinstabilität und damit einhergehend eine große Halbwertszeit hätten. Daten dazu fehlen allerdings bislang in der Literatur. Allgemein verstärkten sich die in den Patientenzellen beobachteten Genexpressions-Tendenzen durch eine L-Fucosegabe.

Bei den gesunden Kontrollzellen, die mit Fucose supplementiert wurden, änderte sich im Stoffwechselweg der GDP-L-Fucosesynthese wenig. Im Gegensatz dazu waren *FUT5* und *FUT6* signifikant geringer exprimiert. Interessanterweise haben die Proteine *FUT5* und *FUT6* eine ausgesprochene Ähnlichkeit untereinander, aber auch zu *FUT3*, welches ebenfalls eine verminderte Tendenz zeigt. Alle Transferasen sind tendenziell geringer, wenn auch nicht signifikant, exprimiert als in den unbehandelten Kontrollzellen. Auch auf gesunde Zellen hat eine L-Fucosegabe also einen Einfluss.

## 5.2 Vergleich von GFUS-CDG mit bereits bekannten Fucosylierungsdefekten

Bei der hier vorgestellten Patientin zeigte sich, dass ihr komplexer klinischer Phänotyp auf die Kombination aus reduzierter Fucosylierung von N- und O-Glykanen zurückzuführen ist, die durch biallelischen Mutationen im

*GFUS*-Gen hervorgerufen wurden. Da die Bestimmung der ABO- und Lewis<sup>x</sup>-Blutgruppensysteme von der Fucosylierung abhängt, zeigen einige schwer betroffene *SLC35C1*-CDG-Patienten einen Bombay-Blutgruppen-Phänotyp aufgrund des Verlusts ihrer Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Strukturen, die normalerweise auf Granulozyten und Monozyten zu finden sind [126]. Bemerkenswerterweise war dies bei der hier vorgestellten *GFUS*-Patientin nicht zu sehen. Darüber hinaus sind Glykane mit  $\alpha(1,3)$ -verknüpften Fucosemolekülen wichtig für die Lymphozytenzirkulation und entzündliche Prozesse [69]. Obwohl ein deutlicher Effekt auf die Fucosylierung bei der Patientin festgestellt wurde, konnte kein immunologischer Phänotyp beobachtet werden. Dies könnte auf die funktionelle Ergänzung des Salvage pathways für GDP-L-Fucose zurückzuführen sein. Zusätzlich wurde eine enzymatische Restaktivität von *GFUS* festgestellt, die ein Mindestmaß an GDP-L-Fucose *de novo* synthetisiert hat.

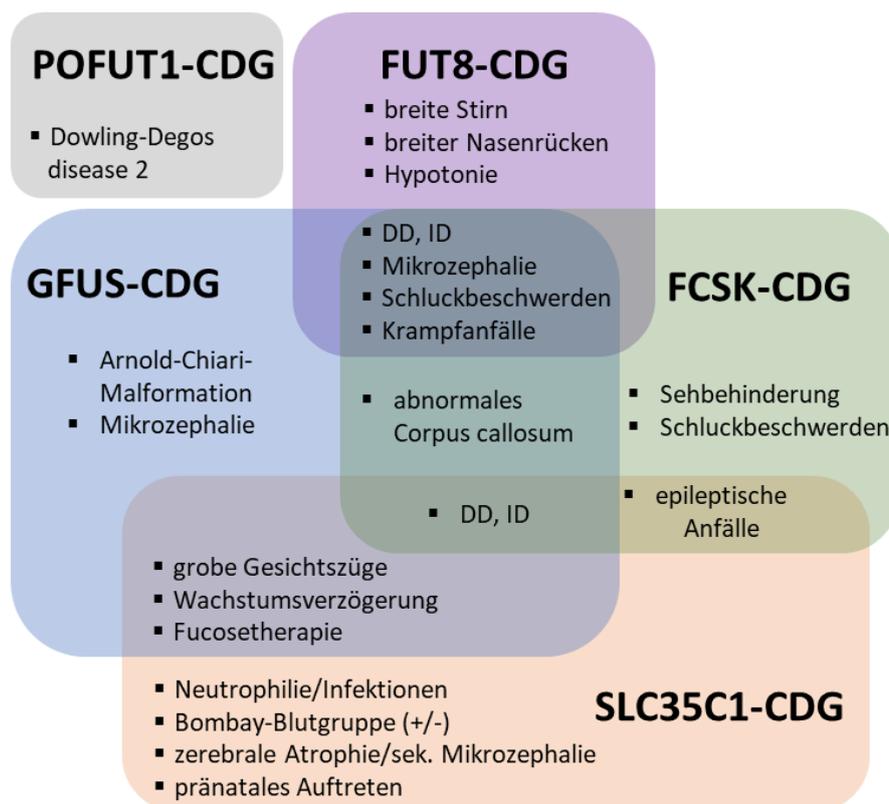
Die Proteinfucosylierung ist in allen wichtigen Phasen des Lebens von der Fertilisation über die Embryonal- bis zur postnatalen Entwicklung beteiligt und übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben. Im Zentralnervensystem sind fucosylierte Strukturen weit verbreitet und dienen z. B. als Lektinliganden im Rahmen des axonalen Wachstums, der Faszikulation, der neuronalen Migration, der Synaptogenese und der Myelinisierung während der neuronalen Entwicklung und beeinflussen später den Prozess des Lernens und des Gedächtnisses. Darüber hinaus werden die Blutgruppensysteme ABO und Lewis<sup>x</sup> durch L-Fucose bestimmt. Je nach Art und Ort der Bindung der Fucose an die Grundstruktur der Blutgruppenantigene werden Substanzen mit H-, Lewis<sup>a</sup>- oder Lewis<sup>b</sup>-Spezifität gebildet. Fucosylierte Glykane sind wichtig für Entzündungsprozesse und initiieren durch Adhäsion an Endothelzellen die Extravasation von Leukozyten.

Neben dem hier beschriebenen Defekt in *GFUS*, sind Mutationen in *FCSK*, *SLC35C1*, *FUT8* und *POFUT1* im Fucosestoffwechsel als krankheitsverursachend beschrieben worden [49, 51, 53, 54, 56, 127]. Wie *GFUS* ist auch *FCSK*, welches für die Phosphorylierung von  $\beta$ -L-Fucose sorgt, ein Enzym, das für die Bereitstellung von GDP-L-Fucose im Zytosol benötigt wird. Im Gegensatz zu *GFUS* gehört *FCSK* zum Salvage pathway der GDP-L-Fucosesynthese. *SLC35C1*-CDG (früher CDG-IIc/LADII) betrifft den Golgi-GDP-L-Fucose-Transporter, der GDP-L-Fucose aus dem Zytosol in den

Golgi transportiert. FUT8 und POFUT1 sind Fucosyltransferasen, die die Übertragung des Zuckerrestes von GDP-L-Fucose auf N- und O-Glykane im Golgi bzw. ER katalysieren. Insgesamt sind 30 Patienten bekannt, die an einem der vorhergenannten Defekten leiden [49-51, 53-57, 59-62, 66, 128]. Es ist denkbar, dass eine große Dunkelziffer an Stoffwechselerkrankungen in Zusammenhang mit Fucose besteht, da die bis heute gängige CDG-Routinediagnostikmethode der IEF von Serum-Transferrin Fucosylierungsdefekte nicht erkennt. Auch die hier beschriebene Patientin zeigte ein unauffälliges Laufverhalten des Serum-Transferrins in der IEF (siehe 4.2.1). Dieser Umstand zeigt den dringenden Bedarf eines geeigneten Markerproteins für Fucosylierungsdefekte, denn selbst sensitivere Methoden wie die Massenspektrometrie oder xCGE-LIF ergeben bei Transferrinanalysen kein klares Defucosylierungsmuster. Es zeigte sich, dass bislang die einzig verlässliche Methode zur Identifizierung solcher Defekte eine N-Glykananalyse der Gesamtplasmaproteine ist. Dies konnte in SLC35C1-CDG und FUT8-CDG gezeigt werden [49, 66]. Die Next Generation Sequenzierung ermöglicht heutzutage ein genetisches Screening mit hoher diagnostischer Trefferquote bei Individuen mit neurologischen Entwicklungs- und multisystemischen-Phänotypen. Dadurch, dass Next Generation Sequenzierungen oft viele Varianten im Genom der Betroffenen aufzeigt, muss eine anschließende biochemische Analyse folgen, um die Pathogenität der Varianten zu überprüfen. Durch die kürzlich erreichten Fortschritte in der Diagnostik, sind vier der fünf bekannten Fucosylierungsdefekte (FCSK-, POFUT1-, FUT8-CDG und GFUS-CDG) erst unlängst entdeckt worden.

Fast alle der beschriebenen Patienten mit einem Fucosemangel leiden unter Kleinwuchs, Entwicklungsverzögerung, geistiger Behinderung, Gesichtsdysmorphismen wie beispielsweise ein breiter Stirn- bzw. Nasenrücken und rezidivierenden Infektionen. Der häufigste Fucosylierungsdefekt ist SLC35C1-CDG, weshalb für diesen Typ auch die meisten Daten zu der Symptomatik verfügbar sind. Es scheint, dass der Krankheitsverlauf nicht progressiv ist, was bedeutet, dass die Patienten bis ins Erwachsenenalter überleben können. Der älteste Patient ist 34 Jahre alt. Die hohe Prävalenz der p.Phe168del Variante in SLC35C1 lässt darauf schließen, dass diese Mutation zu einem vergleichsweise milden Phänotyp führt.

In Abbildung 25 ist eine Übersicht der überlappenden Symptome der bekannten Fucosylierungsdefekte dargestellt. Besonders die Überschneidung zu FUT8-CDG und FCSK-CDK sticht dabei hervor, was auch biochemisch zu belegen ist. FUT8-CDG verursacht eine verminderte core-Fucosylierung, die auch in der ersten, hier beschriebenen Patientin beobachtet wurde. FCSK-CDG dagegen, war bislang der einzige Glykosylierungsdefekt mit einer beeinträchtigten GDP-L-Fucose Synthese. Die Seltenheit dieser Defekte betont gleichzeitig die Bedeutung der GDP-L-Fucose Synthese. Es ist denkbar, dass ein schwerer Defekt in der Synthese nicht mit dem Leben vereinbar ist. Außerdem fällt auf, dass alle Defekte der Fucosylierung sowohl eine Entwicklungsstörung als auch eine mentale Retardierung verursachen. Lediglich Mutationen in *POFUT1* führen zu der Dowlin-Degos disease 2, deren Symptome keine Überschneidung mit den anderen Defekten im Fucosestoffwechsel haben.



**Abbildung 25 - Übersicht der Symptome der bekannten Fucosylierungsdefekte.** Dargestellt sind die Symptome aller bekannten Defekte im Bereich der Fucosylierung. Verwendete Abkürzungen: Entwicklungsverzögerung bzw. „developmental delay“ (DD) und mentale Retardierung bzw. „intellectual delay“ (ID)

### 5.3 Ein Therapieansatz durch Supplementierung mit L-Fucose

GFUS spielt eine entscheidende Rolle in der *de novo* Umwandlung von GDP-Mannose zu GDP-L-Fucose. Zusätzlich wird GDP-L-Fucose auch aus freier L-Fucose im Salvage pathway gewonnen. Der Salvage pathway ist in gesunden Zellen für nur etwa 10 % der entstehenden GDP-L-Fucose verantwortlich, was erklären könnte, weshalb die Patientin trotz eines alternativen Stoffwechselweges eine schwere Symptomatik zeigt [70]. Die freie L-Fucose, die im Salvage pathway als Ausgangssubstrat dient, kann entweder aus lysosomaler Degradation gewonnen oder über die Ernährung aufgenommen werden. Im Lysosom hydrolysiert das Enzym  $\alpha$ -L-Fucosidase Fucosereste aus fucosylierten Glykoproteinen [129]. Ein Mangel dieses Enzyms führt zu Fucosidosen, die durch eine langfristige Anhäufung von nicht metabolisierten fucosehaltigen Oligosacchariden zum Tod führen kann. Die Patientin hat eine  $\alpha$ -L-Fucosidase Aktivität von 2,2 mU/ml, was in den Normbereichen der Stoffwechselanalytik liegt und nicht pathogen ist. Der Großteil der freien L-Fucose für den Salvage pathway kommt demnach aus der lysosomalen Wiederaufarbeitung von Glykanen. Die Grundidee des Therapieansatzes war es, den Salvage pathway der GDP-L-Fucose mittels erhöhter L-Fucose Zufuhr in der Zelle zu aktivieren. Die Nahrungsaufnahme von L-Fucose durch eine gewöhnliche Diät ist unwahrscheinlich, da L-Fucose fast ausschließlich in Braunalgen vorkommt. Die Firma Jennewein in Rheinbreitbach gibt an, dass sie 40 Tonnen Tang benötigen, um 1 kg L-Fucose zu extrahieren, was auch den hohen Preis von ca. 7.000 Euro pro kg Fucose erklärt. Fucose ist einer der wenigen Zucker, die als L-Enantiomer eine höhere biologische Relevanz haben. Es gibt wenige Enzyme, die diese Stereoisometrie ineinander überführen können. Auch sind die bekannten Reaktionen der L-Fucose irreversibel und daher ist eine Umwandlung von L-Fucose über GDP-L-Fucose als potenzielles Intermediat zu GDP-Mannose unmöglich. Dies könnten Gründe sein, weshalb L-Fucose keine Rolle in der Energiebereitstellung spielt und somit sehr selten über die Nahrung aufgenommen wird. Um eine Therapie am Patienten zu ermöglichen, reicht es also nicht aus, auf eine bestimmte Ernährung umzustellen, sondern isolierte L-Fucose muss als extrahierter Zucker in Pulverform zugeführt werden. In einer Mausstudie von Smith et al., die eine  $Fx^{-/-}$  (*Gfus*) Knockout Linie generierten, zeigte sich, dass die meisten Mäuse nicht überlebensfähig waren. Interessanterweise konnte die beobachtete Gedeihstörung der überlebenden Mäuse durch eine L-Fucose

Supplementation behoben werden [115]. Da L-Fucose in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [130] und auch schon erfolgreich Patienten mit SLC35C1-CDG verabreicht wurde [56], wurde auch bei der GFUS-Patientin eine Behandlung mit oraler Fucose eingeleitet.

Hierdurch konnte eine initiale Gewichts- und Größenzunahme nach Beginn der Fucosetherapie beobachtet werden (siehe Kapitel 0). Dieser Wachstumsschub hielt jedoch nicht nachhaltig an. Die orale Fucose-Behandlung wurde von unserer Patientin gut vertragen und es wurden keine Nebenwirkungen beschrieben. Es gab eine erhebliche Verbesserung der neurologischen Entwicklung, nachgewiesen durch psychologische Tests. Überraschenderweise lag die Patientin nach 19 Monaten Fucosebehandlung in mehreren Testaufgaben innerhalb des altersgemäßen Bereichs, während er vorher mit einem regulären Testverfahren nicht zu charakterisieren war. Die Serumverlaufsproben, die mithilfe von AAL analysiert wurden, zeigten ebenfalls vielversprechende Refucosylierungsmuster (siehe 4.7.2). Auch wurden die N-Glykane zwei Wochen nach Beginn der Fucosebehandlung erneut untersucht. Auch hier waren die Ergebnisse durchweg positiv. Sowohl die antennär fucosylierten Strukturen als auch die core-fucosylierten N-Glykane haben im Serum der Patientin zugenommen und sich in Richtung des Kontrollwerts verbessert. In gesunden menschlichen Gehirnen konnte eine zunehmende Anzahl von fucosylierten Glykanen nachgewiesen werden. Die Fucosereste auf den Glykanen sind wichtig für die neuronale Entwicklung, das Lernen und das Gedächtnis [131, 132]. Eine Zunahme solcher fucosylierten Glykane auch im Gehirn könnte also die neurologischen Verbesserungen der Patientin erklären. Es stand nur sehr wenig Volumen der Serumproben nach Therapiebeginn zur Verfügung, weshalb weitere Analysen und eine Statistik leider nicht möglich waren.

## 5.4 Ausblick

Trotz intensiver Suche im Rahmen unserer zahlreichen Forschungsverbünde ist es nicht gelungen, einen weiteren Patienten mit diesem Gendefekt zu finden. Eine Erklärung könnte die Bedeutung der Fucosylierung für viele menschliche Prozesse sein, was sich insbesondere in der geringen Lebensfähigkeit der GFUS<sup>-/-</sup> Mäuse widerspiegelt. Wahrscheinlich ist die bislang einzigartige Kombination aus den beiden Mutationen, die auf unterschiedlichen Allelen liegen der Grund dafür,

dass die Patientin trotz eines Defekts in *GFUS* lebensfähig ist. Eine homozygote Kombination der beiden Varianten wäre vermutlich nicht mit dem Leben vereinbar. Diese Annahme wird auch dadurch weiter gestützt, dass in der gnomAD-Datenbank keine homozygoten Loss of function-Mutationen (LoF) vorhanden sind. Die erste missense Variante c.[632G>A] ist in 250.736 Allelen (also 125.368 untersuchte Genome) lediglich zwei Mal beschrieben worden. Die zweite Mutation c.[659C>T] ist drei Mal in der Datenbank annotiert. Dies entspricht einer Häufigkeit von 0,0008 % für die erste Mutation bzw. 0,0012 % für die zweite Variante.

Dass nur ein weiterer Defekt (FCSK-CDG) in der GDP-L-Fucosesynthese bisher identifiziert werden konnte, zeigt, wie wichtig dieser Stoffwechselweg für die Entwicklung des Menschen zu sein scheint. Bei FCSK-CDG ist der Salvage pathway beeinträchtigt und obwohl dieser Stoffwechselweg für nur ca. 10 % der gewonnenen GDP-L-Fucose verantwortlich ist, hat ein Defekt pathogene Auswirkungen [51]. Auch dies belegt wie wichtig die Enzyme für die Bereitstellung von GDP-L-Fucose für das Leben sind.

Angesichts der einfachen und effizienten Behandelbarkeit erwies sich GFUS-CDG als ein weiteres Beispiel für die Notwendigkeit eines frühen Screenings von betroffenen Kindern mit Entwicklungsstörungen und mentaler Retardierung. Das Gen sollte als Kandidat für zukünftige, genetische Neugeborenen Screenings im Auge behalten werden. In der Patientin reicherte sich interessanterweise das core-fucosylierte Glykan FA3G3S1(2,6) an. Ob dieses Glykan als diagnostischer Marker für GFUS-CDG dienen kann, muss in weiteren Studien mit zusätzlichen Patienten ermittelt werden. Weiterhin stellten sich auch  $\alpha$ -1-Antitrypsin und ADAMTS13 als mögliche Markerproteine heraus, die in zukünftigen Analysen aus Serum Hinweise auf eine verminderte Fucosylierung von N- und O-Glykanen geben könnten.

## 6 Material

### 6.1 Patientenmaterial

Die Eltern willigten einer Veröffentlichung der Patienten- und klinischen Bildern ein. Sie wurden außerdem über die Forschung unterrichtet. Die Studie wurde in Anlehnung an die Helsinki-Erklärung (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013) durchgeführt und wurde vom Ethikkomitee in Salzburg (415-E/2552/10-2019) genehmigt.

### 6.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid /0,8 % Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Albumin bovine Fraction V, pH 7,0	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98$ %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, ACS, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid, rein 95 %	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, getrocknet	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat, Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol $\geq 99,8$ %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt, $\geq 99,8$ %, mit ca. 1 % MEK	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid - Lösung 1 %	Applichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 4 %	Merck Darmstadt
Glycerin, wasserfrei, p.a.	neoLab, Heidelberg
Glycin, $\geq 99$ %	Roth, Karlsruhe
HEPES $\geq 99,5$ %, BioScience-Grade	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, reinst, Lebensmittelqualität	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol, $\geq 99,9$ %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
MOPS Pufferan $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat, kristallin, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid $\geq 99,5$ %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, reinst, DAC	Roth, Karlsruhe
Phosphoric acid	Sigma-Aldrich, St. Louis
PNGase F (500 U/vial)	Roche Diagnostics, Mannheim
Pyridin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Pyrophosphatase, Inorganic from baker's yeast	Sigma-Aldrich, St. Louis
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, $\geq 99$ %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Solution	Fluka, Buchs
Tween 20, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe
UltraPure Agarose	ThermoFisher, Waltham

### 6.3 Enzyme, Kits und Standards

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 <sub>2</sub> , 25 mM	ThermoFisher, Waltham, USA
NheI 5' - G*CTAGC - 3' (* Schnittstelle)	ThermoFisher, Waltham, USA
Omniscript 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
ECL Plus Western Blotting 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

#### 6.4 Verbrauchsmaterialien

4-, 6-, 24-well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Blotting Papier 330 g/cm <sup>2</sup>	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

## 6.5 Geräte

Autoklav VX-95	Systec, Linden
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Blottkammer PerfectBlue Semi-Dry	Peqlab, Erlangen
Brutschrank MCO-20A/C	Panasonic Biomedical, Kadoma, Japan
Cell Counter TC20	Biorad, München
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	The Baker Company, Sanford, USA
SterilGard III Advance	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

## 6.6 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

### **Ladepuffer DNA-Elektrophorese (6x)**

*40 % Saccharose (w/v)*

*0,25 % Bromphenolblau (w/v)*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

### **Lysispuffer**

*50 mM EDTA*

*50 mM NaCl*

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

*Tris/HCl pH 8,0*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

### **Mowiol**

*6,0 g Glycerin*

*2,4 g Mowiol 4-88*

*0,2 M Tris/HCl pH 8,5*

*Gelöst in 6,0 ml H<sub>2</sub>O*

**PBS-Puffer**

*8,0 g/l NaCl*

*11,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*

*0,2 g/l KCl*

*0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*

*Tris/HCl pH 7,4*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**PBST-Puffer**

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

*Tris/HCl pH 7,4*

*Gelöst in PBS-Puffer (1x)*

**PFA-Lösung**

*4 % Paraformaldehyd (w/v)*

*8,0 g/l NaCl*

*11,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*

*0,2 g/l KCl*

*0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*

*Tris/HCl pH 8,0*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10x)**

*151,1 g Tris*

*50 g SDS*

*720 g Glycin*

*Gelöst in 5,0 l H<sub>2</sub>O*

**SDS-PAGE Ladepuffer (6x)**

*12 % SDS (w/v)*

*45 % Glycerin (v/v)*

*12 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)*

*0,06 % Bromphenolblau (w/v)*

*480 mM Tris/HCl pH 6,8*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**SDS-PAGE Sammelgelpuffer**

*0,4 % SDS (w/v)*

*0,5 M Tris/HCl pH 8,8*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**SDS-PAGE Trenngelpuffer**

*0,4 % SDS (w/v)*

*1,5 M Tris/HCl pH 6,8*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**Semidry-Blot Anodenpuffer**

*20 % Methanol (v/v)*

*75 mM Tris/HCl pH 7,4*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**Semidry-Blot Kathodenpuffer**

*40 mM 2-Aminocapronsäure*

*20 % Methanol (v/v)*

*75 mM Tris/HCl pH 9,0*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**TAE-Puffer (50x)**

*2 M EDTA 100 mM*

*Tris/Acetat pH 8,0*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**TBS (10x)**

*80 g/l NaCl*

*2 g/l KCl*

*30 g/l Tris/HCl pH 8,0*

*Gelöst in H<sub>2</sub>O*

**TBST-Puffer**

*1 % Tween 20 (v/v)*

*Tris/HCl pH 7,4*

*Gelöst in TBS (1x)*

### **Zellkulturmedium**

*10 % FCS*

*5 ml Penicillin/Streptomycin*

*5 ml Amphotericin B*

*5 ml L-Glutamin*

*Gelöst in 500 ml DMEM GlutaMAX*

### **Zellkultur Einfriermedium**

*10 % DMSO (v/v)*

*Gelöst in Zellkulturmedium*

## 6.7 Oligonukleotide

Die Primer in dieser Arbeit wurden als Oligonukleotide synthetisiert und bestellt. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte durch die Firmen Invitrogen (Karlsruhe) oder Seqlab-Microsynth GmbH (Göttingen). Die Primerequenzen sind im Anhang unter 9.3.2 gelistet.

## 6.8 Software, Datenbanken und rechnergestützte Ressourcen

### 6.8.1 Software

ApE	M. Wayne Davis
CFX Manager	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Chromas 2	Technelysium
EndNote	Clarivate Analytics
GraphPad PRISM 8	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
nSolver 4.0	NanoString Technologies
Office	Microsoft
Tableau Software	Tableau Software, LLC

## 6.8.2 Datenbanken

Ensembl	<a href="http://ensembl.org">ensembl.org</a>
NCBI	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov">ncbi.nlm.nih.gov</a>
OMIM	<a href="http://omim.org">omim.org</a>
UniProt	<a href="http://uniprot.org">uniprot.org</a>

## 6.8.3 Rechnergestützte Ressourcen und Tools

BioRender	<a href="http://biorender.com">biorender.com</a>
CBS prediction Server	<a href="http://cbs.dtu.dk/services">cbs.dtu.dk/services</a>
DynaMut	<a href="http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut">biosig.unimelb.edu.au/dynamut</a>
NCBI Blast	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Pisa Server	<a href="http://ebi.ac.uk/pdbe/pisa/">ebi.ac.uk/pdbe/pisa/</a>

## 6.9 Antikörper, Lektine und Streptavidin-Konjugate

### 6.9.1 Primärantikörper

1:1.000 im Western Blot; 1:400 in Immunfluoreszenz

Kaninchen anti-Human ADAMTS13	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human ALG1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human ALG11	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen anti-Human ALG2	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen anti-Human Alpha-Tubulin	Cell Signaling, Leiden, NL
Kaninchen anti-Human DHDDS	Thermo Fisher, Waltham, USA
Kaninchen anti-Human PMM2	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human Transferrin	BIOZOL Diagnostica, Eching
Kaninchen anti-Human GFUS	Thermo Fisher, Waltham, USA
Maus anti-Human GAPDH	Proteintech, Manchester, USA
Maus anti-Human GM130	BD Transduction Laboratories
Maus anti-Human $\beta$ -Aktin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 6.9.2 Sekundärantikörper

1:10.000 im Western Blot; 1:700 in Immunfluoreszenz

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

### 6.9.3 Lektine und Streptavidin-Konjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Lektine waren an Biotin gekoppelt und wurden von Vector Laboratories (Burlingham, USA) gekauft. Zur Detektion der biotinylierten Lektine wurde HRP-konjugiertes Streptavidin verwendet. Die Lektine wurden 1:500 in TBST<sub>0,1%</sub> verdünnt, Streptavidin 1:10.000 in TBST<sub>0,1%</sub>.

*Concanvalin A* (ConA)

*Maackia amurensis Leukoagglutinin I* (MAL-I)

*Ricinus communis Agglutinin I* (RCA-I)

*Weizenkeim Agglutinin* (WGA)

*Aleuria Aurantia Lectin* (AAL)

*Ulex Europaeus Agglutinin 1* (UEA-1)

*Lens Culinaris Agglutinin* (LCA)

*Lotus Tetragonolobus Lectin* (LTL)

## 6.10 Vektoren und Bakterienstämme

Folgende Vektoren wurden im Laufe der Arbeit verwendet:

pCDNA3.1 (+)	Biocat, Heidelberg
pCI-neo	Promega, Walldorf
pGEM-T Easy	Promega, Walldorf
pLVX-Puro	Biocat, Heidelberg
pLNCX2	Takara, Mountain View, USA

Folgende Bakterienstämme wurde für Transfektionen verwendet:

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

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

## 6.11 Medien und Platten (*E. Coli*)

### **LB Medium**

1 % (w/v) Trypton/Pepton

1 % (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

Gelöst in H<sub>2</sub>O

### **LB-Amp**

50 g/ml Ampicillin

Gelöst in LB Medium

### **LB-Amp Platten**

*1,5 % Agar*

*gelöst in LB-Amp*

## 6.12 Medien für die Kultivierung von Säugerzellen

Die Puffer und Medien wurden von Gibco (ThermoFisher, Waltham, USA) bezogen. Trypsin und DPBS wurden gebrauchsfertig bezogen und verwendet. DMEM wurde mit FCS (10 % v/v), Penicillin (1 % v/v) und Amphotericin B (1 % v/v). Für Selektionsversuche wurde zusätzlich Gentamycin (1 % v/v) in das Zellkulturmedium gegeben. Eine Zusammenfassung ist nachfolgend gegeben:

Trypsin-EDTA 0.25 %	1x
DPBS	1x
DMEM (high glucose 4,5 g/l)	1x
FCS/ FKS (Hitzeinaktiviert: 40 min, 56 °C)	10 %
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml)	1 %
Fungizone Amphotericin B	1 %
Gentamycin (Neomycin / G418)	1 %

## 6.13 Zelllinien

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erfolgten an primären Fibroblasten. Um diese zu generieren, werden sterile Hautbiopsien entnommen und anschließend kultiviert. Primäre Linien können bis zu 50 Teilungszyklen erreichen, wurden aber nie öfter als 20-mal passagiert. Untersuchungen erfolgten sowohl an Patientenzelllinien als auch an Zelllinien von gesunden Kontrollpersonen.

Für weiterführende Experimente wurden außerdem HEK293- und COS-7 Zellen, die aus Fibroblasten der Äthiopische Grünmeerkatze hervorgingen, verwendet. Jeweils niedrige Passagen aller Zelllinien sind kryokonserviert, um nachhaltig vergleichbare Messungen zu ermöglichen.

## 7 Methoden

### 7.1 CDG-Routinediagnostik

#### 7.1.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) von Transferrin und $\alpha$ -1-Antitrypsin

Die IEF stellt eine Methode zur Trennung von Proteinen anhand ihres Isoelektrischen Punkts (IEP) in einem elektrischen Feld dar. Für die Analyse wurden 1  $\mu$ l einer eisengesättigten Serumprobe auf ein Gel aufgetragen und durch die angelegte Spannung getrennt. Die Proteinbanden wurden durch eine Immunfixation sichtbar gemacht und durch eine Silberfärbung detektiert. Die Protokolle wurden ausgehend von Niehus und Wopreis angepasst. [133, 134].

#### 7.1.2 *N*-Glykananalysen aus Serum mittels Multiplex-Kapillargel-Elektrophorese gekoppelter laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (xCGE-LIF)

Die Messungen erfolgten in Kooperation mit dem MPI Magdeburg. Die *N*-Glykane wurden aus 2  $\mu$ l Serum bestimmt. Dabei wurden die *N*-Glykane in einem PNGase F Verdau von den Glykoproteinen abgeschnitten und anschließend über eine Kapillare aufgetrennt. Die Glykane haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur verschiedene Retentionszeiten, die charakteristisch für die jeweiligen Kohlenhydratstrukturen sind. Aufgrund der großen Glykan-Vielfalt kann es zu Signalüberlagerung bei der Detektion kommen. Eine präzisere Auftrennung kann mit Glykosidasen erreicht werden, da so die Zuckerstrukturen gezielt verkürzt werden und damit unterschiedliche Retentionszeiten erzeugt werden [135].

#### 7.1.3 Exom Sequenzierung (ES)

Die aus peripherem Blut extrahierte DNA wurde für die ES verwendet [136, 137]. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Genetik der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg erarbeitet.

## 7.2 Zellbiologische Methoden

### 7.2.1 Kultivierung von Säugerzelllinien

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in T25, T75 und T125 Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert. Das Standardmedium der Zellkultur war DMEM-High Glucose (4,5 g/l) Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung und 1 % des Antimykotikums Amphotericin B. Die Zellen wurden stets bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 7.2.2 Passagieren und Zellernte

Die Zellen wurden passagiert bzw. für weitere Analysen geerntet bevor Konfluenz erreicht wurde. Sowohl für das Passagieren, als auch für das Ernten der Zellen aus T75 Zellkulturflaschen wurde zunächst mit 5 ml PBS gewaschen.

Das Ernten der Zellen erfolgte in 2 ml PBS durch mechanisches Ablösen der Zellen mit Zellschabern. Die Zellsuspension wurde bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das entstandene Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

Passagieren der Zellen erfolgte durch enzymatisches Ablösen mit 2 ml 0,25 %-iger Trypsin-EDTA Lösung bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit 8 ml DMEM-High Glucose (4,5 g/l) abgestoppt. Entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension wurden auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

### 7.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden 70 %-ig konfluente Zellkulturflaschen mit Trypsin geerntet und pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO in Zellkulturmedium) resuspendiert und mit je 1 ml auf drei Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden für 2 h bei -20 °C eingefroren und anschließend auf -80 °C überführt. Langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die in Stickstoff gelagerten kryokonservierten Zellen konnten revitalisiert werden. Dazu wurden die Zellen langsam erwärmt, bis die Suspension zu tauen anfang. Die Zellen wurden mit 4 ml vorgewärmten DMEM-Medium aufgenommen

und in T25 Flaschen Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium wegen des restlichen DMSOs gewechselt.

#### 7.2.4 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen erfolgten mit Hilfe eines TC20 Automated Cell Counter von BioRad. Die Zellen wurden durch Trypsin oder durch Schaben abgelöst und in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden mit 10 µl Trypanblau gemischt und auf eine Zählkammer gegeben. Die Zählung erfolgte anschließend automatisch.

#### 7.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Färbung erfolgte in 24-Well Platten. In die Wells wurden Deckgläschen platziert, auf denen 20.000 Fibroblasten über Nacht ausgesät wurden. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Lösungen wurden in PBS Puffer angesetzt, sofern nicht anders beschrieben. Zu Beginn wurde das Medium der angewachsenen Zellen entfernt und 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann 20 min mit 4 % PFA Lösung fixiert. Eine Permeabilisierung der Zellen wurde anschließend mit 10 min 0,5 % Triton erreicht. Um unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen, wurden die Zellen mit 5 % BSA Lösung geblockt. Die Bildung des Immunkomplexes wurde entweder mit Lektinen oder Antikörpern (1:200 und 1 % BSA) erwirkt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C gefolgt von drei Waschschritten mit PBS. Die Färbung erfolgte mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, welche 1:700 verdünnt und 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und dann H<sub>2</sub>O wurde der Zellkern 5 min mit Bisbenzimid (1:2.000 in H<sub>2</sub>O) gefärbt. Die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen wurden mit 5 µl Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Nach einer Trocknungsphase von 16 h konnten die Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

#### 7.2.6 Supplementation der Fibroblasten mit L-Fucose

Eine Supplementation mit Fucose erfolgte in verschiedenen Konzentrationen. Die Fucose wurde dabei in einer Stammlösung mit Wasser gelöst und ein Volumen entsprechend der Zielkonzentration in das Zellkulturmedium gegeben.

Es wurden Konzentrationen zwischen 1  $\mu$ M und 100  $\mu$ M L-Fucose im Medium verwendet. Die Fucose wurde nach Passagieren der Zellen hinzugegeben.

### 7.3 Methoden zur Arbeit mit Retroviren

Wildtypische DNA des *GFUS*-Gens wurde mit Hilfe von retroviralen Partikeln in Fibroblasten gebracht.

#### 7.3.1 Vorarbeit

Das wildtypische Gen wurde aus einer Kontrollzelllinie mittels reverser Transkriptase und anschließender PCR isoliert. Die Primer wurden so konfiguriert, dass an den Enden eine NotI Schnittstelle entsteht, mit der man per Restriktionsverdau das isolierte, amplifizierte Gen zielgerichtet in einen Säugerzellvektor klonieren konnte. Mittels bakterieller Transformation in *E. coli* konnte das Plasmid später vervielfältigt werden. Eine Selektion der Kolonien erfolgte durch eine Colony PCR, bei der die einzelnen Bakterienkolonien auf das humane *GFUS*-Gen hin untersucht wurden. Sofern die PCR Reaktion für eine bestimmte Kolonie funktionierte, ist davon auszugehen, dass diese Kolonien das Gen in Form des Plasmids aufgenommen hatten. Diese Kolonien wurden ausgewählt und in einem Volumen von 10 ml LB Medium kultiviert, um anschließend das Plasmid aufzureinigen (siehe 7.4.17). Nachdem die Plasmide sequenziert und die korrekte *GFUS* Sequenz überprüft wurde, konnte das Gen durch die Schnittstellen in den pLNCX2-Vektor kloniert werden.

#### 7.3.2 Produktion der retroviralen Partikel

Um das Plasmid in Säugertierzellen zu transfizieren, wurde das FUGENE®HD Transfection Reagent Kit verwendet. Ein Leervektor pLNCX2 sowie der gleiche Vektor mit dem *GFUS*-Konstrukt wurden in Phoenix-eco Zellen transfiziert. Die Transfektion wurde nach herstellerangaben durchgeführt. Der Transfektionsmix wurde für 48 h bei 37 °C inkubiert. Um retrovirale Partikel zu produzieren wurden die transfizierten Zellen gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium über Nacht auf 33 °C gestellt. Da die produzierten Retroviralenpartikel nicht effizient primäre Fibroblasten infizieren können, wurde erst eine weitere Zelllinie, PT67, infiziert. In einer 6-Well Platte wurden 2.000 PT67 Zellen/Well über Nacht ausgesät. Der Überstand der Phoenix-eco Zellen,

die Retroviralenpartikel enthält, wurde gefiltert und auf die ausgesäten PT67 Zellen gegeben. Um die Infektion effizienter zu gestalten wurden außerdem 1 µl/ml Polybrene dazugegeben und dann bei 37 °C inkubiert. Diese Prozedur wurde am darauffolgenden Tag wiederholt. Die infizierten PT67 Zellen wurden mit Neomycin (1 %) 10 Tage selektiert. Die Selektion galt als Erfolgreich abgeschlossen, wenn die nicht infizierten Kontrollen durch das Neomycin gestorben waren. Die infizierten PT67 Zellen wurden zur Sicherheit kryokonserviert.

### 7.3.3 Retrovirale Infektion der primären Fibroblasten

Die Infektion der primären Fibroblasten erfolgte im Prinzip analog zu der Infektion der PT67 Zellen. Die Infektion erfolgte in Duplikaten und mit einem Leervektor. In einer 6-Well Platte wurden 5.000 Fibroblasten des Patienten ausgesät und über Nacht bei 37 °C anwachsen lassen. Der Überstand mit den Retroviralenpartikeln wurde ebenfalls gefiltert, mit Polybrenen versetzt und dann auf die angewachsenen Fibroblasten gegeben. Auch diese Infektion wurde zweimal durchgeführt und anschließend mit Neomycin selektiert.

Die stabile Fibroblastenzelllinie mit den gewünschten Konstrukten wurde nach der Selektion mit Zellkulturmedium kultiviert, das weiterhin Neomycin (0,1 %) enthielt, um einen leichten Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Die Zellen konnten für weitere biochemische Analysen verwendet und geerntet werden. Außerdem wurden auch hier mehrere Passagen kryokonserviert.

## 7.4 Proteinbiochemische Methoden

### 7.4.1 Proteinisolation aus Fibroblastenzellen

Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl RIPA Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Lysate bei -80 °C weggefroren und nach 30 min wieder aufgetaut, um einen thermischen Aufschluss zu erzielen. Die Zellen der Suspension wurde dann durch zehnmaliges Aufziehen mit einer G20 Kanüle mechanisch durch Scherkräfte aufgeschlossen. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 4 °C bei 13.000 rpm und 4 °C bei 70.000 rpm, um die Fraktionen voneinander zu trennen. Für die meisten Versuche wurde die zytosolische Fraktion verwendet, die sich im Überstand des 70.000 rpm

Zentrifugats befanden. Die gelösten Proteine konnten für weitere Versuche wie Proteinbestimmungen, oder SDS-Gele verwendet werden. Eine Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 7.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Quantifizierung der aufgereinigten Proteine erfolgte nach Lowry [138]. Hierfür wurde das Kit „DC Protein Assay Kit“ von BioRad verwendet. Die Standardkurve für die photometrische Messung wurde mit einer BSA-Verdünnungsreihe in RIPA Puffer angesetzt. Die Standardkurve galt für Proteinkonzentrationen zwischen 0,0 mg/ml und 2,0 mg/ml. Die Bestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung erfolgte in 96-Well Platten in Doppelbestimmungen. Die Extinktion der Proben wurde bei 750 nm gemessen und anhand der Steigung der BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet.

#### 7.4.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es denaturierte Proteine entsprechend ihrer Größe eindimensional aufzutrennen [139]. Das Polyacrylamidgel wurde in zwei Etappen gegossen. Der untere Teil, das Trenngel, wurde zunächst hergestellt und variierte in der Acrylamidkonzentration, je nach Versuchszweck. Das Sammelgel wurde stets gleich angesetzt. Die Zusammensetzung eines 10 %igen Trenngels und des Sammelgels ist nachfolgend zu entnehmen:

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

Das Sammelgel wurde mit einem Kamm versehen, der nach der Polymerisierung entfernt wurde, und so Taschen für die Probeninjektion formte. Die Aufarbeitung der Proteinproben erfolgte mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und anschließendem Kochen für 5 min bei 95 °C, um die Proteine zu denaturieren. Im Laufpuffer ist ebenfalls SDS, welches sich um die denaturierten Proteine anlagert und negativ geladen ist, was die Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Pro Probe wurden 20  $\mu$ l mit 10  $\mu$ g Protein auf das Sammelgel aufgetragen. Die initiale angelegte Spannung betrug 100 V bis die Lauffront der Proben in das Trenngel gelaufen sind. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, wenn die Lauffront aus dem Trenngel am positiven Pol herausgelaufen war.

#### 7.4.4 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine im SDS-Gel wurden nach dem „Semi-dry“ Prinzip mit angelegter Spannung auf die Membran transferiert. Der Aufbau der Kammer erfolgte mit drei Filterpapieren und der Nitrozellulosemembran, die je in Anodenpuffer getränkt waren. Es folgten das SDS Gel und weitere drei Filterpapiere, die in Kathodenpuffer equilibriert waren. Die Schichtung erfolgte luftblasenfrei. Der Proteintransfer erfolgte für mindestens 50 min bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup>. Die Transferzeit wurde erhöht, wenn größere Proteine detektiert werden sollten. Die Membran wurde im Anschluss 1 h mit BSA (5 % in PBST<sub>0,1 %</sub>), oder in TBST<sub>0,5 %</sub> geblockt werden.

#### 7.4.5 Proteindetektion mittels Chemilumineszenz

Die übertragenen Proteine können mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Alternativ können auch die angehefteten Zuckerstrukturen der Proteine mit biotinylierten Lektinen gefärbt werden. Die geblockten Membranen wurden in drei Waschsritten à 5 min mit PBST<sub>0,1 %</sub> bei einer Antikörperinkubation, oder TBST<sub>0,1 %</sub> bei einer Lektinfärbung gewaschen. Die Inkubation mit Lektinen erfolgte in einer 1:2.000 Verdünnung in TBST<sub>0,1 %</sub>. Die Antikörper wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben in TBST<sub>0,1 %</sub> oder PBST<sub>0,1 %</sub> verdünnt. Die Membran wurde eine Stunde bei RT, oder über Nacht bei 4 °C mit den primären Kopplungslösungen inkubiert. Nach Abnahme des Antikörpers, bzw. der Lektine, erfolgten drei weitere Waschschriffe im jeweiligen

Puffer. Die proteingebundenen Antikörper oder Lektine auf der Membran können über „horseradish peroxidase“ (HRP)-gekoppelte Sekundärkonjugate sichtbar gemacht werden. HRP kann Luminol umsetzen, was eine detektierbare Lumineszenz bewirkt. Die biotinylierten Lektine wurden mit Streptavidin-HRP konjugiert, die primären Antikörper dagegen bildeten ein Immunkomplex mit sekundären, HRP-gekoppelten Antikörpern. Beide Inkubationen wurden 45 min lang durchgeführt. Nach anschließenden dreimaligen Waschschrritten konnten die HRP-Konjugate mit „ECL Plus Western Blotting Substrat“ entwickelt 5 min werden. Die Dokumentation der Lumineszenz erfolgte in der Expositionskammer des Fusions-Geräts. Die detektierten Banden konnten mittels der Software ImageJ anhand ihrer Intensität quantifiziert werden. Damit gewährleistet werden konnte, dass vergleichbare Massen an Protein eingesetzt wurden, erfolgte eine Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin (1:10.000 in PBST<sub>0,1</sub> %). Dazu wurde die Membran mit 10 % Essigsäure behandelt, was die Konjugate trennte. Die Membran wurde anschließend mit PBS mehrmals gewaschen und neutralisiert, um eine erneute Färbereaktion, wie oben beschrieben, durchführen zu können.

#### 7.4.6 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Fibroblastenpellets isoliert. Die Pellets wurden mit 500  $\mu$ l Lysepuffer und 50  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) verdaut. Die Reaktion erfolgte 2 h bei 37 °C und 800 rpm. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm, woraufhin die DNA mit 500  $\mu$ l Ethanol (EtOH, 99,9 %) gefällt und isoliert wurde. Genomische DNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 7.4.7 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die RNA-Isolation wurde das Kit RNeasy Plus (Qiagen) in Kombination mit gDNA-Säulen verwendet. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mit „QIAshredder spin Säulen“. Die sonstigen Schritte wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die RNA wurde in 50  $\mu$ l RNase freiem Wasser eluiert. RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### 7.4.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie

Die Konzentration der gelösten DNA und RNA wurden spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine

zusätzliche Messung bei 280 nm kann auf eine Verunreinigung mit Proteinen hindeuten. Ein Absorptionsverhältnis 260/280 von 1,8 wird für DNA als rein erachtet. Bei RNA ist ein Verhältnis von 2,0 Indikator für eine reine Probe. Doppelsträngige DNA hat ein höheres Absorptionsmaximum bei 260 nm als einzelsträngige RNA, weshalb das 260/280 Verhältnis einer reinen Probe geringer ist.

#### 7.4.9 Reverse Transkription

Aus isolierter RNA kann mittels reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) cDNA umgeschrieben werden. Hier wurde das „Omniscript RT“ Kit von Qiagen verwendet. Dabei können entweder zufällige Primer verwendet werden, um die gesamte RNA in cDNA umzuschreiben, oder genspezifische Primer, um einzelne Gene in cDNA zu erhalten. Gesamt-cDNA Bibliotheken wurden für qPCR (7.4.19) Studien verwendet, die cDNA einzelner Gene wurde für Sequenzierungen (7.4.14) und die Klonierung für das Komplementationsexperiment (7.3.1) verwendet. Für die Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt, die aus Fibroblasten isoliert wurden. Die enzymatische Reaktion der Reversen Transkriptase wurde nach einer Stunde bei 37 °C beendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs ist nachfolgend aufgeführt:

500 ng	gesamt-RNA
400 nM	Oligo(dT)-Primer
0,4 mM (je Nukleotid)	dNTP's
10 U	RNase Inhibitor
1x	RT-Puffer
4 U	Omniscript Reverse Transkriptase
X µl	RNase freies H <sub>2</sub> O

#### 7.4.10 Primerdesign

Das Design der Primer unterscheidet sich in der vorliegenden Arbeit durch die zwei unterschiedlichen Anwendungsgebiete der qPCR und der klassischen PCR. Wobei Primer der klassischen PCR auch für Sequenzierungen und für Reversetranskriptasereaktionen verwendet werden konnten. In der eigenen Nomenklatur sind qPCR Primer unter 9.3.2 stets als solche gekennzeichnet.

Standardprimer wurden in einer Länge zwischen 17 und 27 Basen designt, die eine möglichst geringe Tendenz zu Dimerisierung aufweisen. Weiterhin sollte der G/C-Gehalt zwischen 40 % und 60 % liegen. Die Schmelztemperatur  $T_m$  und die damit einhergehende Anlagerungstemperatur für die PCR Reaktion wurde möglichst bei 55 °C gewählt. Eine Abschätzung der Schmelztemperatur wurde wie folgt nach Wallace kalkuliert:

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

Bei Primern für qPCR Versuche wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide Exon-Exon-Verbindungen überspannen, da mögliche Kontaminationen durch gDNA eine geringere Rolle spielen. Die Länge wurde, wenn möglich, auf 22 Basen begrenzt und  $T_m$  sollte möglichst zwischen 50 °C und 65 °C liegen. Das resultierende Amplikon überschritt 500 Basenpaare nicht.

#### 7.4.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um spezifische, doppelsträngige DNA-Fragmente zu amplifizieren. Um ein präziseres Ergebnis zu erhalten, wurde in einigen Anwendungen eine geschachtelte („nested“) PCR durchgeführt. Im Laufe der Arbeit wurden sowohl die Taq- als auch die Pfu-Polymerase eingesetzt. Im Unterschied zur Taq-Polymerase besitzt die Pfu-Polymerase eine 3' -> 5'-Exonukleaseaktivität und damit eine „proof-reading“-Funktion. Der PCR-Ansatz eines 20 oder 50 µl Pfu-PCR-Ansatzes setzte sich beispielsweise wie folgt zusammen:

100 ng	cDNA
1x	Reaktionspuffer
250 nM	sense (5')-Primer
250 nM	antisense (3')-Primer
1 U	Polymerase
0,2 mM	dNTP's
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
x µl	H <sub>2</sub> O

Die DNA-Synthese innerhalb einer PCR folgt in Zyklen. In aufeinanderfolgenden Zyklen werden die entstehenden Produkte als

Ausgangsstoffe des aktuellen Zyklus genutzt. Die erhaltene Masse an DNA hängt also von der Anzahl der Zyklen ab. Ein Zyklus besteht aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Ein Standard PCR-Programm sah wie folgt aus:

94 °C	30 s (Denaturierung)	} x35
55 °C	30 s (Anlagerung)	
72 °C	3 min (Elongation)	

Üblicherweise wurde zu Beginn eines PCR Programms ein 5-minütige Denaturierungsphase bei 94 °C gefahren. Die Elongationszeit hängt von der Geschwindigkeit der Polymerase und der Länge des Amplikons ab. Zum Ende der PCR wurde einmalig die doppelte Elongationszeit bei 72 °C eingestellt, darauffolgend konnte das PCR-Produkt bei 4 °C stabil gelagert werden.

#### 7.4.12 Agarose Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose Gelelektrophorese kann zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet werden. Standardmäßig wurden 1 %ige Agarose-Gele in 1x TAE Puffer verwendet. Zum Nachweis der DNA wurde Ethidiumbromid (1:10.000 (w/v)) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer beschwert. Der horizontale Lauf wurde im elektrischen Feld bei 130 V für 1-2 h, je nach Größe der DNA-Fragmente durchgeführt. Das zwischen den Nukleotiden interkalierende Ethidiumbromid konnte anschließend bei 354 nm angeregt werden und in einem Gel-Dokumentations-System festgehalten werden. Für einige Versuche wurden einzelne, aufgetrennte DNA-Fragmente ausgeschnitten und die DNA isoliert.

#### 7.4.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für Sequenzierungen oder Klonierungsversuche musste die DNA aus dem Agarosegel zurückgewonnen werden. Dazu wurden die DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion aus der Agarose erfolgte im Anschluss mithilfe des „peqGOLD Gel Extraction Kits“ laut dessen Herstellerangaben. Die DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 7.4.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden über den Dienstleister Seqlab in Auftrag gegeben. Die Proben wurden laut den Vorgaben des Anbieters aufgearbeitet (900 ng DNA in 15 µl H<sub>2</sub>O). Für Sequenzierung von Plasmiden wurden die Standardprimer von Seqlab genutzt, bei spezifischen Gensequenzierungen wurden selbst designte vorwärts- und rückwärts Primer (1 µM) verwendet. Gensequenzierungen wurden stets zuvor als „nested“-PCR amplifiziert, um ein reineres Produkt zu erhalten, was zu weniger Störungen in den Elektropherogrammen führt.

#### 7.4.15 Ligation

Um Ligationen von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren durchzuführen, wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Das Massenverhältnis von Vektor zu Insert wurde in mehreren, parallelen Ansätzen zwischen 1:3 und 1:5 gewählt:

50 ng	Vektor DNA (~6 kb)
30 ng – 50 ng	Insert DNA (~2 kb)
1x	Reaktionspuffer
1 U	T4 DNA-Ligase
X µl	H <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz von 20 µl konnte entweder eine Stunde bei RT, oder über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4 °C.

#### 7.4.16 Herstellen kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach dem Protokoll von Nishimura hergestellt [140]. Kompetenz bedeutet, dass Zellen frei vorhandene DNA aufnehmen können und somit die Transformationseffizienz gesteigert wird. Für die Transformation wurden die zwei *E. coli*-Stämme XL1-blue und DH5-α verwendet. Um die Kompetenz zu steigern, wurden über Nacht Vorkulturen der Bakterienstämme angesetzt, die am Folgetag in 100 ml LB Medium mit MgSO<sub>4</sub> (10 mM), 0,2 % Glucose auf eine optische Dichte (OD) von 0,4 bis 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm expandiert wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und in 1 ml der vorigen Lösung resuspendiert wurde. 2,5 ml einer

zweiten Lösung (36 % Glycerin, 1,2 g PEG<sub>7500</sub>, 12 mM MgSO<sub>4</sub> in LB-Medium bei pH = 7) wurden zu dem Gemisch dazugegeben. Für die Lagerung wurden 200 µl Aliquote in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 7.4.17 Transformation in kompetente Bakterien

Die nicht-virale Übertragung von DNA in kompetente Bakterienzellen wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden die kompetenten Bakterien Stämme aus Kapitel 7.4.16 verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Bakterien für 30 min bei 4 °C inkubiert, es folgt der Hitzeschock bei 41 °C für 60 s. Anschließend wurden die Bakterien bei 37 °C kultiviert, um sie in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin aufzunehmen und auf Agarplatten auszustreichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag bei 4 °C kurzfristig gelagert, bzw. einzelne Kolonien „gepickt“ um daraus in LB-Amp Medium zu expandieren und mittels „Mini-“ oder „Midiprep“ die Plasmid-DNA zu gewinnen. Das Bakterienvolumen einer „Miniprep“ betrug 2 ml, bei der „Midiprep“ 50 ml. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 7.4.18 Restriktionsverdau von DNA

Die enzymatische Spaltung an spezifischen DNA-Stellen wurde mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Enzyme haben eine äußerst hohe Spezifität und folgen expliziten Erkennungsmustern. Die Endonukleasen nutzen unterschiedliche Puffersysteme, um eine optimale Aktivität zu erreichen. Ein typischer Restriktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

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

Der Restriktionsverdau erfolgte mindestens 1 h bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms und wurde anschließend über eine Agarosegel aufgereinigt.

#### 7.4.19 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die qPCR Messungen wurden mit dem „PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®“ von Quantbio durchgeführt. Die Reaktionsansätze erfolgten in einem Volumen von 10 µl und entsprachen der folgenden Zusammensetzung:

5 µl	PerfeCTa SYBR Green FastMix
400 nM	sense (5')-Primer
400 nM	antisense (3')-Primer
X µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O
1 µl (50 ng)	cDNA Template

Das PCR Zyklusprogramm wurde nach 30 s initialer Denaturierung bei 95 °C wie folgt gefahren:

95 °C	5 s	} x40
60 °C	15 s	
72 °C	10 s	

Zum Ende der Messung wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über Normierung eines Referenzgens (*RAB7A* und *β-Actin*). Das Expressionslevel wurde anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode kalkuliert. Der Fold-change wurde wie hier beschrieben kalkuliert:

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

und

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

Der  $C_t$ -Wert („cycle threshold“) beschreibt dabei die Anzahl an Replikationszyklen, die nötig waren, bis ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenz-Signals festgestellt wurde.

#### 7.4.20 Analyse der Aminosäuren und Acylcarnitine

Aminosäuren und Acylcarnitine wurden per Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) gemessen. Das verwendete Gerät war ein „triple Quad“ (QQQ), das mit einer Elektronenspray-Ionisationsquelle (ESI) ausgestattet war. Die Messdaten wurden in Duplikaten aufgenommen und mit Referenzwerten des Neugeborenen-Screenings verglichen.

#### 7.4.21 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte zu Beginn mit magnetischen Beads von Adamtech. Die Zellysate wurden in 200  $\mu$ l TBS-Puffer resuspendiert und mit 1  $\mu$ g des Zielantikörpers bei RT für 1 h inkubiert. 30  $\mu$ l der Beads wurden 3x mit 200  $\mu$ l TBS-Puffer gewaschen und schließlich in 30  $\mu$ l TBS aufgenommen und auf die Probe mit dem Immunkomplex gegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C in einem Drehrad. Die Proben mit den Beads wurden dann per Magnet getrennt und gewaschen. Elution des Zielproteins erfolgte mit 20  $\mu$ l des Elutionspuffers. Im Laufe der Arbeit wurde ebenfalls das Co-IP Kit von ThermoFisher verwendet. Die Prozedur erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Für jede IP wurde eine Negativprobe durchgeführt, die nur den Antikörper des Zielgens enthielt, um später auszuschließen, dass die leichte- oder schwere-Kette des Antikörpers detektiert oder gemessen wurde.

#### 7.4.22 Messung der Fucosidase

Die  $\alpha$ -L-Fucosidase wurde mit 6,25  $\mu$ l Serum in 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /0,1 M Citratpuffer (pH = 5,0) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l gemessen. Der Aktivitätstest wurde durch Zugabe von 4-Methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -L-fucopyranosid (4-MU-Fucosid) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M als Substrat gestartet. Die Fluoreszenz wurde für 30 min bei 37 °C an einem Fluorometer bei Wellenlängen von 360 und 465 nm für Anregung bzw. Emission abgelesen.

#### 7.4.23 Statistik

Der Stichprobenumfang wurde bei den Ergebnissen stets angeführt. Für die deskriptive Statistik erfolgte der arithmetische Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde anhand des Student'schen t-Tests, oder bei mehreren Konditionen mittels two-way ANOVA kalkuliert. Die Signifikanzgrenzen wurden bei \*  $p \leq 0,05$  (signifikant); \*\*  $p \leq 0,01$  (hoch signifikant) und \*\*\*  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant) gewählt. Nicht signifikante Unterschiede entsprachen einem p-Wert  $> 0,05$  (nicht signifikant) und wurden nicht entsprechend hervorgehoben [141].

## 8 Literaturverzeichnis

1. Neelamegham, S., et al., *Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans guidelines*. Glycobiology, 2019. **29**(9): p. 620-624.
2. Alper, J., *Searching for medicine's sweet spot*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2338-43.
3. Kelly, M.I., et al., *Importance of evaluating protein glycosylation in pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for research and clinical applications*. Pflugers Arch, 2021.
4. Neuberger, A., *Carbohydrates in protein: The carbohydrate component of crystalline egg albumin*. Biochem J, 1938. **32**(9): p. 1435-51.
5. Mescher, M.F. and J.L. Strominger, *Purification and characterization of a prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of Halobacterium salinarium*. J Biol Chem, 1976. **251**(7): p. 2005-14.
6. Sleytr, U.B., *Heterologous reattachment of regular arrays of glycoproteins on bacterial surfaces*. Nature, 1975. **257**(5525): p. 400-2.
7. Valguarnera, E., R.L. Kinsella, and M.F. Feldman, *Sugar and Spice Make Bacteria Not Nice: Protein Glycosylation and Its Influence in Pathogenesis*. J Mol Biol, 2016. **428**(16): p. 3206-3220.
8. Aebi, M., *N-linked protein glycosylation in the ER*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11): p. 2430-7.
9. Peanne, R., et al., *Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis?* Eur J Med Genet, 2018. **61**(11): p. 643-663.
10. Apweiler, R., *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
11. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
12. Alavi, A. and J.S. Axford, *Sweet and sour: the impact of sugars on disease*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(6): p. 760-70.
13. Lauc, G., et al., *Mechanisms of disease: The human N-glycome*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(8): p. 1574-82.
14. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**: p. 43 - 56.
15. Dell, A., et al., *Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes*. Int J Microbiol, 2010. **2010**: p. 148178.
16. Varki, A.C., R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E., *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. 2009: Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Medzihradszky, K.F., *Characterization of site-specific N-glycosylation*. Methods Mol Biol, 2008. **446**: p. 293-316.
18. Lowenthal, M.S., et al., *Identification of Novel N-Glycosylation Sites at Noncanonical Protein Consensus Motifs*. J Proteome Res, 2016. **15**(7): p. 2087-101.
19. Pitti, T., et al., *N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 15975.
20. Medus, M.L., et al., *N-glycosylation Triggers a Dual Selection Pressure in Eukaryotic Secretory Proteins*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8788.
21. Reily, C., et al., *Glycosylation in health and disease*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(6): p. 346-366.

22. Zdrazilova, L., et al., *A new role for dolichol isoform profile in the diagnostics of CDG disorders*. Clin Chim Acta, 2020. **507**: p. 88-93.
23. Burda, P. and M. Aebi, *The dolichol pathway of N-linked glycosylation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 239-57.
24. Abeijon, C. and C.B. Hirschberg, *Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(1): p. 32-6.
25. Knauer, R. and L. Lehle, *The oligosaccharyltransferase complex from yeast*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 259-73.
26. Schwarz, M., R. Knauer, and L. Lehle, *Yeast oligosaccharyltransferase consists of two functionally distinct sub-complexes, specified by either the Ost3p or Ost6p subunit*. FEBS Lett, 2005. **579**(29): p. 6564-8.
27. Sharma, C.B., R. Knauer, and L. Lehle, *Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in yeast: the ALG3 gene encodes the Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase*. Biol Chem, 2001. **382**(2): p. 321-8.
28. Allan, B.B. and W.E. Balch, *In vitro analysis of endoplasmic-reticulum-to-golgi transport in mammalian cells*. Curr Protoc Cell Biol, 2001. **Chapter 11**: p. Unit11 3.
29. Freeze, H.H. and C. Kranz, *Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 8**: p. Unit 8 15.
30. Spiro, R.G., *Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(9): p. 1025-41.
31. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 631-64.
32. Kimber, M.S., *How to extend your (polylactosamine) antennae*. J Biol Chem, 2020. **296**: p. 100212.
33. Hanisch, F.G. and S. Muller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*. Glycobiology, 2000. **10**(5): p. 439-49.
34. Hanisch, F.G., et al., *Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides*. Glycobiology, 2001. **11**(9): p. 731-40.
35. Marth, J.D., *Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. Glycobiology, 1996. **6**(7): p. 701-5.
36. Iozzo, R.V. and L. Schaefer, *Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans*. Matrix Biol, 2015. **42**: p. 11-55.
37. Rnjak-Kovacina, J., et al., *Glycosaminoglycan and Proteoglycan-Based Biomaterials: Current Trends and Future Perspectives*. Adv Healthc Mater, 2018. **7**(6): p. e1701042.
38. Furmanek, A. and J. Hofsteenge, *Protein C-mannosylation: facts and questions*. Acta Biochim Pol, 2000. **47**(3): p. 781-9.
39. Hartmann, S. and J. Hofsteenge, *Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28569-74.
40. Mizuta, H., et al., *C-mannosylation of Rspodin2 activates Wnt/betacatenin signaling and migration activity in human tumor cells*. Int J Oncol, 2019. **54**(6): p. 2127-2138.
41. Aebi, M., et al., *Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS*. Glycoconj J, 1999. **16**(11): p. 669-71.
42. Jaeken, J., et al., *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, 1980. **14**(2): p. 179-179.
43. Ng, B.G. and H.H. Freeze, *Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders*. Trends Genet, 2018. **34**(6): p. 466-476.

44. Francisco, R., et al., *The challenge of CDG diagnosis*. Mol Genet Metab, 2019. **126**(1): p. 1-5.
45. Jaeken, J. and R. Peanne, *What is new in CDG?* J Inherit Metab Dis, 2017. **40**(4): p. 569-586.
46. de Mattos, L.C., *Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2016. **38**(4): p. 331-340.
47. Mondal, N., et al., *Distinct human alpha(1,3)-fucosyltransferases drive Lewis-X/sialyl Lewis-X assembly in human cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(19): p. 7300-7314.
48. Johnston, D.S., et al., *Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1888-95.
49. Ng, B.G., et al., *Biallelic Mutations in FUT8 Cause a Congenital Disorder of Glycosylation with Defective Fucosylation*. Am J Hum Genet, 2018. **102**(1): p. 188-195.
50. Park, J.H., et al., *L-Fucose treatment of FUT8-CDG*. Mol Genet Metab Rep, 2020. **25**: p. 100680.
51. Ng, B.G., et al., *Pathogenic Variants in Fucokinase Cause a Congenital Disorder of Glycosylation*. Am J Hum Genet, 2018. **103**(6): p. 1030-1037.
52. Buket Basmanav, F., et al., *Pathogenicity of POFUT1 in Dowling-Degos disease: additional mutations and clinical overlap with reticulate acropigmentation of kitamura*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(2): p. 615-618.
53. Li, M., et al., *Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 895-903.
54. Etzioni, A., et al., *Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency*. N Engl J Med, 1992. **327**(25): p. 1789-92.
55. Frydman, M., et al., *Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype*. Am J Med Genet, 1992. **44**(3): p. 297-302.
56. Marquardt, T., et al., *Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose*. Blood, 1999. **94**(12): p. 3976-85.
57. Marquardt, T., et al., *Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism*. J Pediatr, 1999. **134**(6): p. 681-8.
58. Lübke, T., et al., *Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency*. 2001. **28**(1): p. 73-76.
59. Etzioni, A., et al., *Leukocyte adhesion deficiency (LAD) type II/carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) IIc founder effect and genotype/phenotype correlation*. Am J Med Genet, 2002. **110**(2): p. 131-5.
60. Hidalgo, A., et al., *Insights into leukocyte adhesion deficiency type 2 from a novel mutation in the GDP-fucose transporter gene*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1705-12.
61. Helmus, Y., et al., *Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3959-66.
62. Cagdas, D., et al., *A novel mutation in leukocyte adhesion deficiency type II/CDGIIc*. J Clin Immunol, 2014. **34**(8): p. 1009-14.
63. Dauber, A., et al., *Congenital disorder of fucosylation type 2c (LADII) presenting with short stature and developmental delay with minimal adhesion defect*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(11): p. 2880-7.
64. Gazit, Y., et al., *Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up and review of the literature*. J Clin Immunol, 2010. **30**(2): p. 308-13.
65. Luhn, K., et al., *The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 69-72.

66. Knapp, K.M., et al., *Biallelic variants in SLC35C1 as a cause of isolated short stature with intellectual disability*. J Hum Genet, 2020. **65**(9): p. 743-750.
67. Vanhooren, P.T. and E.J. Vandamme, *L-fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1999. **74**(6): p. 479-497.
68. Werz, D.B., et al., *Exploring the structural diversity of mammalian carbohydrates ("glycospace") by statistical databank analysis*. ACS Chem Biol, 2007. **2**(10): p. 685-91.
69. Becker, D.J. and J.B. Lowe, *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*. Glycobiology, 2003. **13**(7): p. 41R-53R.
70. Yurchenco, P.D. and P.H. Atkinson, *Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells*. Biochemistry, 1977. **16**(5): p. 944-53.
71. Yamamoto, K., et al., *Evidence that the enzyme catalyzing the conversion of guanosine diphosphate D-mannose to a 4-keto sugar nucleotide intermediate requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*. Arch Biochem Biophys, 1993. **300**(2): p. 694-8.
72. Chang, S., K.O. Broschat, and G.S. Serif, *An assay for GDP-D-mannose-4,6-dehydratase*. Anal Biochem, 1985. **144**(1): p. 253-7.
73. Oths, P.J., R.M. Mayer, and H.G. Floss, *Stereochemistry and mechanism of the GDP-mannose dehydratase reaction*. Carbohydr Res, 1990. **198**(1): p. 91-100.
74. Somoza, J.R., et al., *Structural and kinetic analysis of Escherichia coli GDP-mannose 4,6 dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose*. Structure, 2000. **8**(2): p. 123-35.
75. Sullivan, F.X., et al., *Molecular cloning of human GDP-mannose 4,6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis in vitro*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8193-202.
76. Coffey, J.W., O.N. Miller, and O.Z. Sellinger, *The Metabolism of L-Fucose in the Rat*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 4011-7.
77. Kaufman, R.L. and V. Ginsburg, *The metabolism of L-fucose by HeLa cells*. Exp Cell Res, 1968. **50**(1): p. 127-32.
78. Ishihara, H., D.J. Massaro, and E.C. Heath, *The metabolism of L-fucose. 3. The enzymatic synthesis of beta-L-fucose 1-phosphate*. J Biol Chem, 1968. **243**(6): p. 1103-9.
79. Park, S.H., et al., *Purification to apparent homogeneity and properties of pig kidney L-fucose kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5685-91.
80. Richards, W.L., R.D. Kilker, and G.S. Serif, *Metabolite control of L-fucose utilization*. J Biol Chem, 1978. **253**(23): p. 8359-61.
81. Ishihara, H. and E.C. Heath, *The metabolism of L-fucose. IV. The biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose in porcine liver*. J Biol Chem, 1968. **243**(6): p. 1110-5.
82. Pastuszak, I., et al., *GDP-L-fucose pyrophosphorylase. Purification, cDNA cloning, and properties of the enzyme*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30165-74.
83. Cacan, R., et al., *Intraluminal pool and transport of CMP-N-acetylneuraminic acid, GDP-fucose and UDP-galactose. Study with plasma-membrane-permeabilized mouse thymocytes*. Biochem J, 1984. **224**(1): p. 277-84.
84. Sommers, L.W. and C.B. Hirschberg, *Transport of sugar nucleotides into rat liver Golgi. A new Golgi marker activity*. J Biol Chem, 1982. **257**(18): p. 10811-7.
85. Hirschberg, C.B., P.W. Robbins, and C. Abeijon, *Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**(1): p. 49-69.
86. Ishikawa, H.O., et al., *Two pathways for importing GDP-fucose into the endoplasmic reticulum lumen function redundantly in the O-fucosylation of Notch in Drosophila*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 4122-4129.

87. Lu, L., et al., *Slc35c2 promotes Notch1 fucosylation and is required for optimal Notch signaling in mammalian cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 36245-54.
88. Schneider, M., E. Al-Shareffi, and R.S. Haltiwanger, *Biological functions of fucose in mammals*. Glycobiology, 2017. **27**(7): p. 601-618.
89. Du, J., et al., *O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats restricts epithelial to mesenchymal transition (EMT) and maintains epiblast pluripotency during mouse gastrulation*. Dev Biol, 2010. **346**(1): p. 25-38.
90. Shi, S. and P. Stanley, *Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5234-9.
91. Wang, X., et al., *Phenotype Changes of Fut8 Knockout Mouse: Core Fucosylation Is Crucial for the Function of Growth Factor Receptor(s)*, in *Functional Glycomics*. 2006, Academic Press. p. 11-22.
92. Hwang, H., et al., *Machine Learning Classifies Core and Outer Fucosylation of N-Glycoproteins Using Mass Spectrometry*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 318.
93. Keeley, T.S., S. Yang, and E. Lau, *The Diverse Contributions of Fucose Linkages in Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(9).
94. Zhang, N., et al., *Loss of core fucosylation enhances the anticancer activity of cytotoxic T lymphocytes by increasing PD-1 degradation*. Eur J Immunol, 2020. **50**(11): p. 1820-1833.
95. Leonhard-Melief, C. and R.S. Haltiwanger, *O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats*. Methods Enzymol, 2010. **480**: p. 401-16.
96. Zhang, A., et al., *O-Fucosylation of ADAMTSL2 is required for secretion and is impacted by geleophysic dysplasia-causing mutations*. J Biol Chem, 2020. **295**(46): p. 15742-15753.
97. Müller, J., et al., *O-fucosylation of the notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88571.
98. Shao, L., D.J. Moloney, and R. Haltiwanger, *Fringe modifies O-fucose on mouse Notch1 at epidermal growth factor-like repeats within the ligand-binding site and the Abruption region*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7775-82.
99. Luo, Y., A. Nita-Lazar, and R.S. Haltiwanger, *Two distinct pathways for O-fucosylation of epidermal growth factor-like or thrombospondin type 1 repeats*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9385-92.
100. Luo, Y., et al., *Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9393-9.
101. Valero-González, J., et al., *A proactive role of water molecules in acceptor recognition by protein O-fucosyltransferase 2*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(4): p. 240-6.
102. van Tol, W., et al., *A mutation in mannose-phosphate-dolichol utilization defect 1 reveals clinical symptoms of congenital disorders of glycosylation type I and dystroglycanopathy*. JIMD Rep, 2019. **50**(1): p. 31-39.
103. Vasudevan, D. and R.S. Haltiwanger, *Novel roles for O-linked glycans in protein folding*. Glycoconj J, 2014. **31**(6-7): p. 417-26.
104. Wang, Y. and M.W. Spellman, *Purification and characterization of a GDP-fucose:polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8112-8.
105. Rachagani, S., et al., *Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer*. Biofactors, 2009. **35**(6): p. 509-27.
106. Dube, D.H. and C.R. Bertozzi, *Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(6): p. 477-88.
107. Miyoshi, E., K. Moriwaki, and T. Nakagawa, *Biological function of fucosylation in cancer biology*. J Biochem, 2008. **143**(6): p. 725-9.

108. Watanabe, A., K. Taketa, and K. Kosaka, *Microheterogeneity of rat alpha-fetoprotein*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **259**: p. 95-108.
109. Taketa, K., et al., *A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 1993. **53**(22): p. 5419-23.
110. Becker-Assmann, J., et al., *[Diagnostic and prognostic significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma]*. Chirurg, 2020. **91**(9): p. 769-777.
111. Okuyama, N., et al., *Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation*. Int J Cancer, 2006. **118**(11): p. 2803-8.
112. Tonetti, M., et al., *Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27274-9.
113. Sun, Y., et al., *Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b*. Tumour Biol, 2016. **37**(4): p. 4963-72.
114. Korner, C., et al., *Decreased availability of GDP-L-fucose in a patient with LAD II with normal GDP-D-mannose dehydratase and FX protein activities*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 95-8.
115. Smith, P.L., et al., *Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 801-15.
116. Vollmar, M., et al. *Crystal structure of human GDP-L-fucose synthase with bound NADP*. 2013.
117. Zhou, H. and J. He. *Structure of human FX protein, the key enzyme in the biosynthesis of GDP-L-fucose*. 2013.
118. Rodrigues, C.H., D.E. Pires, and D.B. Ascher, *DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(W1): p. W350-W355.
119. Ricketts, L.M., et al., *O-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17014-23.
120. Verheijen, J., et al., *Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update*. Genet Med, 2020. **22**(2): p. 268-279.
121. Lefeber, D.J., E. Morava, and J. Jaeken, *How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation*. J Inherit Metab Dis, 2011. **34**(4): p. 849-52.
122. Thiel, C., et al., *Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life*. J Inherit Metab Dis, 2013. **36**(5): p. 887-92.
123. Mollicone, R., A. Cailleau, and R. Oriol, *Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes*. Transfusion Clinique et Biologique, 1995. **2**(4): p. 235-242.
124. Oriol, R., et al., *Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues*. 1992. **27**: p. 28-38.
125. McCurley, R.S., et al., *Physical maps of human  $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase genes FUT3–FUT6 on chromosomes 19p13.3 and 11q21*. Genomics, 1995. **26**(1): p. 142-146.
126. Cooper, N., et al., *Incidental diagnosis of leukocyte adhesion deficiency type II following ABO typing*. Clin Immunol, 2020. **221**: p. 108599.
127. Lubke, T., et al., *Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 73-6.
128. Ng, B.G., et al., *Expanding the molecular and clinical phenotypes of FUT8-CDG*. J Inherit Metab Dis, 2020. **43**(4): p. 871-879.
129. Asfaw, B., et al., *Degradation of blood group A glycolipid A-6-2 by normal and mutant human skin fibroblasts*. J Lipid Res, 1998. **39**(9): p. 1768-80.

130. Harsh, G.R., et al., *L-fucose labeling of brain tumors in rats*. *Exp Neurol*, 1986. **94**(1): p. 21-8.
131. Mountford, C., et al., *Six fucose- $\alpha$ (1-2) sugars and  $\alpha$ -fucose assigned in the human brain using in vivo two-dimensional MRS*. *NMR Biomed*, 2015. **28**(3): p. 291-6.
132. Tosh, N., et al., *Two New Fucose- $\alpha$  (1-2)-Glycans Assigned In The Healthy Human Brain Taking The Number To Seven*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 18806.
133. Niehues, R., et al., *Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(7): p. 1414-20.
134. Wopereis, S., et al., *Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis*. *Clin Chem*, 2003. **49**(11): p. 1839-45.
135. Hennig, R., et al., *N-Glycosylation Fingerprinting of Viral Glycoproteins by xCGE-LIF*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1331**: p. 123-43.
136. Kremer, L.S., et al., *Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing*. *bioRxiv*, 2016.
137. Kremer, L.S., et al., *NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood*. *Am J Hum Genet*, 2016. **99**(4): p. 894-902.
138. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
139. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
140. Nishimura, A., et al., *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(20): p. 6169.
141. Döring, N. and J. Bortz, *Forschungsmethoden und evaluation*. Wiesbaden: Springer-Verlag, 2016.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Übersicht über die N-Glykosylierung. ....	8
Abbildung 2 - Strukturformeln der Fucose. ....	14
Abbildung 3 – Übersicht über die Synthese von GDP-L-Fucose. ....	17
Abbildung 4 - Bekannte Fucosyltransferasen und deren Beteiligung am Aufbau von N- und O-Glykanen. ....	18
Abbildung 5 - Klinische und bildgebende Befunde bei der Patientin mit biallelischen GFUS-Varianten. ....	24
Abbildung 6 - Isoelektrische Fokussierung des Transferrins und $\alpha$ -1- Antitrypsins. ....	26
Abbildung 7 - Kontroll- und Patienten N Glykan Analysen aus Gesamtserum.	29
Abbildung 8 – Übersicht über die Verteilungsänderung der N-Glykane nach Beginn der Fucosetherapie. ....	30
Abbildung 9 – Sanger-Sequenzierung der Patientin und einer Kontrolle von <i>GFUS</i> . ....	31
Abbildung 10 - Vererbungsweg der mutierten <i>GFUS</i> Allele innerhalb der Familie. ....	32
Abbildung 11 – Strukturanalyse der beiden Mutationen p.[Gly211Glu] und p.[Ser220Leu]. ....	35
Abbildung 12 – Western Blot Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression. ....	36
Abbildung 13 – Quantifizierung der mRNA Expression des <i>GFUS</i> -Gens. ....	37
Abbildung 14 - Intrazelluläre Lokalisation von GFUS. ....	38
Abbildung 15 - Detektion und Quantifizierung fucosylierter Glykanstrukturen in Proteinextrakten aus Fibroblasten. ....	39
Abbildung 16 - Detektion und Quantifizierung fucosylierter Glykanstrukturen in Blutserum. ....	41
Abbildung 17 – Komplementationsstudie mit wildtypischem <i>GFUS</i> . ....	43
Abbildung 18 - Aktivitätsmessung des GFUS Proteins. ....	44
Abbildung 19 - Proteinexpression von FUT8, POFUT1 und POFUT2. ....	45
Abbildung 20 - ADAMTS13-Sekretion im Serum. ....	46
Abbildung 21 - Genexpression des Fucosestoffwechsels A. ....	49

Abbildung 22 - Genexpression des Fucosestoffwechsels B. ....	50
Abbildung 23 - Lysosomale Fucosidase Aktivität aus Serum. ....	51
Abbildung 24 - Messung der Nukleotid-aktivierten Zucker aus Fibroblasten....	53
Abbildung 25 - Übersicht der Symptome der bekannten Fucosylierungsdefekte. .....	64
Abbildung 26 - Wachstumskurve der Patientin im Vergleich zu den Standardperzentilen. ....	VII
Abbildung 27 - Gewichtskurve der Patientin im Vergleich zu den Standardperzentilen. ....	VII
Abbildung 28 - $\Delta C_t$ -Werte der Genexpressionsanalyse des Fucosestoffwechsels A.....	VIII
Abbildung 29 - $\Delta C_t$ -Werte der Genexpressionsanalyse des Fucosestoffwechsels B.....	VIII

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Zusammenfassung der am stärksten betroffenen, fucosylierten N- Glykane.....	27
Tabelle 2 - Konservierung der Aminosäuren im Bereich der beiden biallelischen Mutationen im <i>GFUS</i> -Gen.....	32
Tabelle 3 – Chemisch-physikalische Eigenschaften der vier Aminosäuren, die and den Mutationen beteiligt sind.....	33
Tabelle 4 - Zusammenfassung der Acylcarnitin- und Aminosäurenmesswerte ..	IX

## 9.3 Appendix

### 9.3.1 Nukleotid- und Proteinsequenzen

#### *GFUS* (NM\_001317783.2) mRNA

Die in Großschrift dargestellten Nukleotide kennzeichnen den codierenden Bereich der mRNA der ersten Isoform von *GFUS*. Insgesamt umfasst der Genlokus 1391 Basenpaare.

```
1      acctggctcc gcgggcagcc ggagcgcacc cggccggaag ccgctgtcgg ggagccggcg
61     gtggggctgg acgcaggtga ggtggcaccg gactcagccg cgccctgggc cctggATGCT
121    CCGTGCAACT GACATGGGTG AACCCAGGG ATCCATGCGG ATTCTAGTGA CAGGGGGCTC
181    TGGGCTGGTA GGCAAAGCCA TCCAGAAGGT GGTAGCAGAT GGAGCTGGAC TTCCTGGAGA
241    GGACTGGGTG TTTGTCTCCT CTAAAGACGC CGATCTCAGG GATACAGCAC AGACCCGCGC
301    CCTGTTTGAG AAGGTCCAAC CCACACACGT CATCCATCTT GCTGCAATGG TGGGGGGCCT
361    GTTCCGGAAT ATCAAATACA ATTTGGACTT CTGGAGGAAA AACGTGCACA TGAACGACAA
421    CGTCCTGCAC TCGGCCTTTG AGGTGGGCGC CCGCAAGGTG GTGTCTTGCC TGTCCACCTG
481    TATCTTCCCT GACAAGACGA CCTACCCGAT AGATGAGACC ATGATCCACA ATGGGCCTCC
541    CCACAACAGC AATTTTGGGT ACTCGTATGC CAAGAGGATG ATCGACGTGC AGAACAGGGC
601    CTACTTCCAG CAGTACGGCT GCACCTTCAC CGCTGTCATC CCCACCAACG TCTTCGGGCC
661    CCACGACAAC TTCAACATCG AGGATGGCCA CGTGCTGCCT GGCCTCATCC ACAAGGTGCA
721    CCTGGCCAAG AGCAGCGGCT CGGCCCTGAC GGTGTGGGGT ACAGGGAATC CGCGGAGGCA
781    GTTCATATAC TCGCTGGACC TGGCCCAGCT CTTTATCTGG GTCCTGCGGG AGTACAATGA
841    AGTGGAGCCC ATCATCCTCT CCGTGGGCGA GGAAGATGAG GTCTCCATCA AGGAGGCAGC
901    CGAGGCGGTG GTGGAGGCCA TGGACTTCCA TGGGGAAGTC ACCTTTGATA CAACCAAGTC
961    GGATGGGCAG TTTAAGAAGA CAGCCAGTAA CAGCAAGCTG AGGACCTACC TGCCCCACTT
1021   CCGGTTTACA CCCTTCAAGC AGGCGGTGAA GGAGACCTGT GCTTGGTTCA CTGACAACCTA
1081   CGAGCAGGCC CGGAAGTGAA gctggaagac aggatcaggt gccagcggac catcggtggtg
1141   cagagcccag cggccaccac ccgtcaaccc tgccaggagc tgagggcacc acccagcaac
1201   ctgggcctgc attccatccg ctctgcagcc ccaagcatct ttccagtggg gccccattc
1261   acgttggtcc tcaggaaac caggttcccg ggcaggcccg gcgctttgct cccacacca
1321   gccccctgcg cgtgtccact ctgatcctgc atcccactcc ctgggagcca ataaagtgca
1381   ttttcacagg c
```

### ***GFUS* (NM\_003313) mRNA**

Die in Großschrift dargestellten Nukleotide kennzeichnen den codierenden Bereich der mRNA der zweiten Isoform von *GFUS*. Insgesamt umfasst der Genlokus 1345 Basenpaare.

```
1      acctggctcc gcgggcagcc ggagcgcacc cggccggaag ccgctgtcgg ggagccggcg
61     gtggggctgg acgcaggtgc aactgacATG GGTGAACCCC AGGGATCCAT GCGGATTCTA
121    GTGACAGGGG GCTCTGGGCT GGTAGGCAAA GCCATCCAGA AGGTGGTAGC AGATGGAGCT
181    GGACTIONCTG GAGAGGACTG GGTGTTTGTC TCCTCTAAAG ACGCCGATCT CACGGATAACA
241    GCACAGACCC GCGCCCTGTT TGAGAAGGTC CAACCCACAC ACGTCATCCA TCTTGCTGCA
301    ATGGTGGGGG GCCTGTTCGG GAATATCAAA TACAATTTGG ACTTCTGGAG GAAAAACGTG
361    CACATGAACG ACAACGTCCT GCACTCGGCC TTTGAGGTGG GCGCCCGCAA GGTGGTGTCC
421    TGCCGTGCCA CCTGTATCTT CCCTGACAAG ACGACCTACC CGATAGATGA GACCATGATC
481    CACAATGGGC CTCCCCACAA CAGCAATTTT GGGTACTCGT ATGCCAAGAG GATGATCGAC
541    GTGCAGAACA GGGCCTACTT CCAGCAGTAC GGCTGCACCT TCACCGCTGT CATCCCCACC
601    AACGTCTTCG GGCCCCACGA CAACTTCAAC ATCGAGGATG GCCACGTGCT GCCTGGCCTC
661    ATCCACAAGG TGCACCTGGC CAAGAGCAGC GGCTCGGCC TGACGGTGTG GGGTACAGGG
721    AATCCGCGGA GGCAGTTCAT ATACTCGCTG GACCTGGCCC AGCTCTTTAT CTGGGTCTTG
781    CGGGAGTACA ATGAAGTGGA GCCCATCATC CTCTCCGTGG GCGAGGAAGA TGAGGTCTCC
841    ATCAAGGAGG CAGCCGAGGC GGTGGTGGAG GCCATGGACT TCCATGGGGA AGTCACCTTT
901    GATACAACCA AGTCGGATGG GCAGTTTAAG AAGACAGCCA GTAACAGCAA GCTGAGGACC
961    TACCTGCCCG ACTTCCGGTT CACACCCTTC AAGCAGGCGG TGAAGGAGAC CTGTGCTTGG
1021   TTTACTGACA ACTACGAGCA GGCCCGAAG TGAagctgga agacaggatc aggtgccagc
1081   ggaccatcgg ctggcagagc ccagcggcca ccaccgtca accctgccag gagctgaggg
1141   caccaccag caacctgggc ctgcattcca tccgctctgc agccccaagc atctttccag
1201   tggggccccc attcacgttg gtcctcaggg aaaccagggc cccgggcagg cccggcgctt
1261   tgctccccac accagcccc tgcgctgtgc cactctgate ctgcatccca ctccctggga
1321   gccaataaag tgcattttca caggc
```

## Aminosäuresequenz von GFUS

Die Aminosäuresequenz der ersten Isoform (NP\_003304.1) ist nachfolgend dargestellt:

```

1      MGEPQGSMRI LVTGGSGLVG KAIQKVADG AGLPGEDWVF
41     VSSKDADLTD TAQTRALFEK VQPTHVIHLA AMVGGLFRNI
81     KYNLDFWRKN VHMNDNLVLS AFEVGARKVV SCLSTCIFPD
121    KTTYPIDETM IHNGPPHNSN FGYSYAKRMI DVQNRAYFQQ
161    YGCTFTAIVP TNVFGPHDNF NIEDGHVLPG LIHKVHLAKS
201    SGSALTVWGT GNPRRQFIYS LDLAQLFIWV LREYNEVEPI
241    ILSVGEEDV SIKEAAEAVV EAMDFHGEVT FDTTKSDGQF
281    KKTASNSKLR^TYLPDFRFTP FKQAVKETCA WFTDNYEQAR
321    K

```

### 9.3.2 Primersequenzen

#### Klonierungs- und Sequenzierprimer

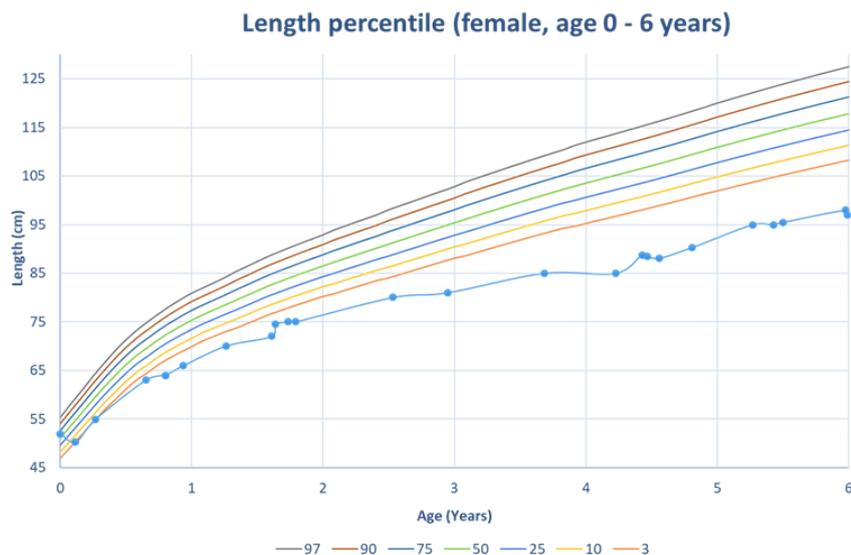
DNA Oligo Name	DNA Sequence (5' -> 3')
hTSTA3-L-F1	gcaggtgaggtggcaccgg
hTSTA3-L-F2	ctcagccgcgccctgggc
hTSTA3-L-NotI-Fw	GACGCGGCCGCGCCACCatgctccgtgcaactgacatgg
hTSTA3-NotI-Rev	tacgcggccgctcacttccggggcctgctcg
hTSTA3-NotI-o-St-Rev	tacgcggccgccttccggggcctgctcgtag
hTSTA3-kurz-F1	gccggaagccgctgtcgg
hTSTA3-kurz-F2	gctggacgcaggtgcaactg
hTSTA3-M-F2 B	GCTGGACGCAGGTGAGGTG
hTSTA3-kurz-NotI-Fw	GACGCGGCCGCGCCACCatgggtgaaccccagggatcca
hTSTA3-F3	gatgaggtctccatcaaggagg
hTSTA3-R1	gctgcagagcggatggaatg
hTSTA3-R2	gctctgccagccgatggtc

#### qPCR-Primer

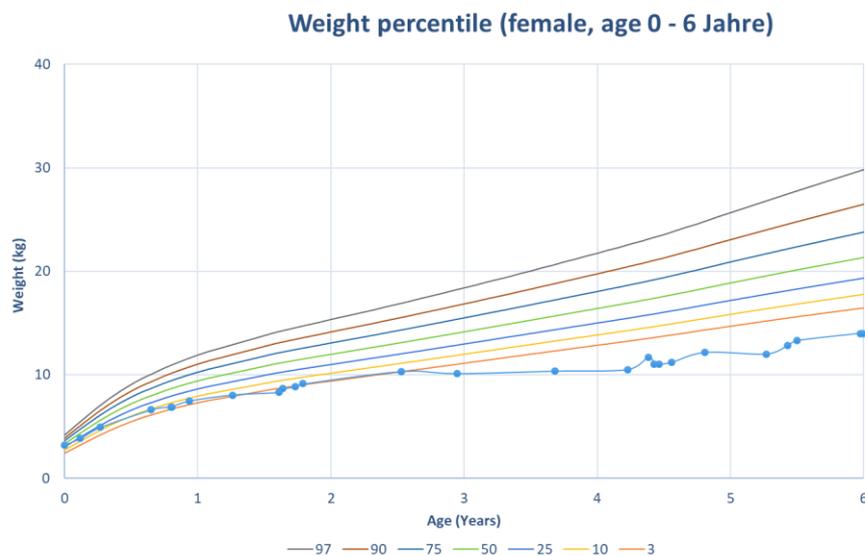
DNA Oligo Name	DNA Sequence (5' -> 3')
FUK_qPCR_Fwd	TACGGCAAACCTGAGGAGTGT
FUK_qPCR_Rev	GGGCCAGGACATCCATCATA
FPGT_qPCR_Fwd	TCACTCTGGTGGCTACAGTC
FPGT_qPCR_Rev	TCATCTGCACAGGTAACCAGA
GFUS_long_qPCR_F	CTGGCTCCGCGGGCAGCC
GFUS_long_qPCR_R	CTGTGCTGTATCCGTGAGATC
GFUS_shrt_qPCR_F	TGGACGCAGGTGCAACTGAC

GFUS_shrt_qPCR_R	CTGTGCTGTATCCGTGAGATC
GMDS_qPCR_Fwd	GTATCACAGGCCAGGATGGT
GMDS_qPCR_Rev	AGGCAGGTACTGTCAGTGAG
SLC35C1_qPCR_Fwd	CTTCAACGTGCTGCTCTCCT
SLC35C1_qPCR_Rev	GGAGCACCTTCGTGGTGTAG
SLC35C2_qPCR_Fwd	GTTCCACCTGCAGCCACTCA
SLC35C2_qPCR_Rev	CCAGGAGGAACTCAGAGAAGC
FUT1_qPCR_Fwd	TGTGAGTTCAGGTTGCCCTCT
FUT1_qPCR_Rev	GCCCAAAGCCAGATGTAGTG
FUT2_qPCR_Fwd	AGGTGAGAGAAGCCATGCTG
FUT2_qPCR_Rev	ATGTTGAGGCTAGCACTGGT
FUT3_qPCR_Fwd	TGAGCTGTCCTCATCCACTG
FUT3_qPCR_Rev	ACGACCGGCTCATATACGTT
FUT4_qPCR_Fwd	CAGAAGACGGTCTGACTTGC
FUT4_qPCR_Rev	GCTTCATCAAGGCCACAGAG
FUT5_qPCR_Fwd	CACACTAGCTACTCTGACCCA
FUT5_qPCR_Rev	CAGGTTCCACTGCCATAAGC
FUT6_qPCR_Fwd	AGGTGTATCCACAGGCAGAC
FUT6_qPCR_Rev	GCGGTAGGACATGGTGAGAT
FUT7_qPCR_Fwd	CCAGTACCGCTTCTACCTGT
FUT7_qPCR_Rev	AGCCAAAGTCATCCACATGC
FUT8_qPCR_Fwd	GGACACTGGTCAGGTGAAGT
FUT8_qPCR_Rev	AAACTGAGACACCCACCACA
FUT9_qPCR_Fwd	CTGGTGAACCATCCTGTCCT
FUT9_qPCR_Rev	ACTAGCAGGACACCAGAACC
FUT10_qPCR_Fwd	AACCAGGTTAGCCCTCTGTC
FUT10_qPCR_Rev	ACCATGACCTGGAGTGTGAC
FUT11_qPCR_Fwd	CATCCCGGTAGACTCCTACG
FUT11_qPCR_Rev	CGGGACAAGAAAGCCAAGAG
POFUT1_qPCR_Fwd	CTGCCTGACCTGAAGGAGAT
POFUT1_qPCR_Rev	ACCACCTTCACCTTCCCTTT
POFUT2_qPCR_Fwd	CGGATTCCCTGGTCTGAGTT
POFUT2_qPCR_Rev	TTCCCAGGTCCTTCTTTCC
GFUS_long_fwd B	AGAAGGTGGTAGCAGATGG
GFUS_long_rev B	GGGAAGATACAGGTGGACAG
FUT3_qPCR_fwd B	TTTCCCCCAATCTACCCCTCC
FUT3_qPCR_rev B	GCCAAGACCTAAGTTCACACC
FUT5_qPCR_fwd B	TGTGTGTGACCATCAGCAG
FUT5_qPCR_rev B	GCAATAAAACCACAAGCAAACC
FUT8_qPCR_fwd B	CCCCGTCTCCATATTTACC
FUT8_qPCR_rev B	GCTTCTGTTCCTTTGTC
FUT9_qPCR_fwd B	ACACACACACACACACAC
FUT9_qPCR_rev B	CCCATTTCTTCTGCTGAAC
Actin_qPCR_fwd	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
Actin_qPCR_rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
RAB7A_qPCR_fwd	TGGGAGATTCTGGAGTCGGG
RAB7A_qPCR_rev	CACACCGAGAGACTGGAACC

### 9.3.3 Wachstums- und Gewichtskurve der Patientin



**Abbildung 26 - Wachstumskurve der Patientin im Vergleich zu den Standardperzentilen.** Die unterste hellblaue Linie spiegelt den Verlauf der Patientin wieder. Man kann im Alter von 4 4/12 Jahren einen initialen Sprung erkennen, der nach Beginn der Fucosegabe stattfand. Diese Daten wurden von der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 27 - Gewichtskurve der Patientin im Vergleich zu den Standardperzentilen.** Die unterste hellblaue Linie spiegelt den Verlauf der Patientin wieder. Man kann im Alter von 4 4/12 Jahren einen initialen Sprung erkennen, der nach Beginn der Fucosegabe stattfand. Diese Daten wurden von der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg zur Verfügung gestellt.

### 9.3.4 $\Delta C_t$ -Werte der Genexpressionsanalyse des Fucosestoffwechsels

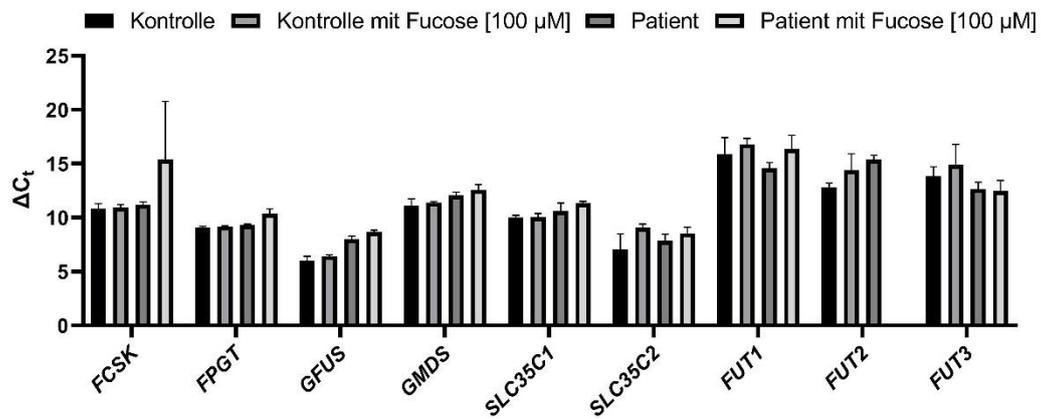


Abbildung 28 -  $\Delta C_t$ -Werte der Genexpressionsanalyse des Fucosestoffwechsels A. Für die statistische Auswertung in Kapitel 4.11 wurden diese Werte verwendet.

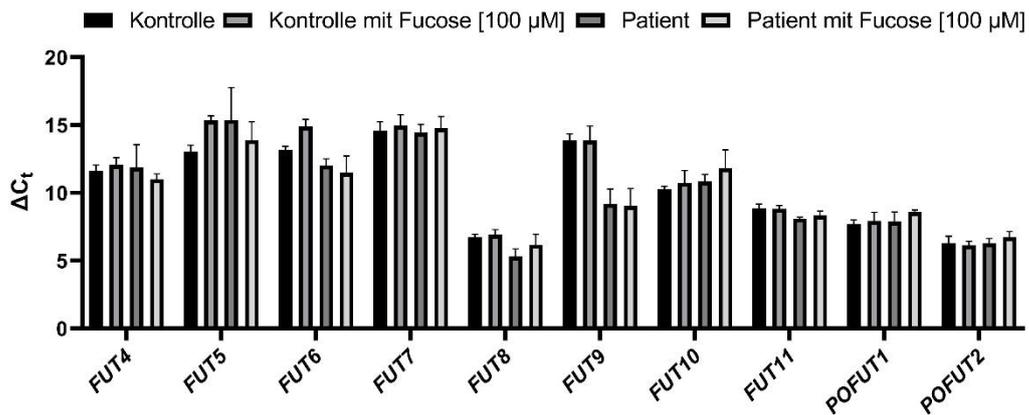


Abbildung 29 -  $\Delta C_t$ -Werte der Genexpressionsanalyse des Fucosestoffwechsels B. Für die statistische Auswertung in Kapitel 4.11 wurden diese Werte verwendet.

### 9.3.5 Messwerte der Acylcarnitine und Aminosäuren

Tabelle 4 - Zusammenfassung der Acylcarnitin- und Aminosäurenmesswerte

Parameter	unterer Grenzwert [ $\mu\text{mol/L}$ ]	oberer Grenzwert [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Patient [ $\mu\text{mol/L}$ ]
C0P	12,91	49,42	52,22
C2P	1,39	15,73	8,335
C3P	0,06	0,71	0,505
C3DCP	0	0,22	0,1
C4P	0	0,43	0,12
C4OHP	0	0,38	0,085
C5:1P	0	0,17	0,01
C5P	0	0,29	0,095
C5OH+HMBP	0	0,08	0,04
C6P	0	0,18	0,07
C8:1P	0	0,54	0,03
C8P	0	0,19	0,08
C10:1P	0	0,49	0,1
C10P	0	0,28	0,06
MMAP	0	0,17	0,065
GlutP	0	0,26	0,175
GlutMRMP	0	0,39	0,135
C12P	0	0,14	0,055
MeGlutP	0	0,17	0,04
C14:1P	0	0,2	0,04
C14P	0	0,09	0,04
C14OHP	0	0,1	0,01
C16:1P	0	0,07	0,02
C16P	0,03	0,26	0,13
C16:1OHP	0	0,04	0,005
C16OHP	0	0,05	0,01
C18:1P	0	0,21	0,07
C18P	0	0,14	0,05
C18:1OHP	0	0,03	0,01
C18OHP	0	0,06	0,01

C18:2P	0	0,13	0,05
3HMGP	0	0,03	0,005
GlyP	0	6208,65	352,74
OrnP	0	609,28	80,84
SUCCP	0	0,48	0,345
ArgP	0	305,04	138,1
CitP	0	55,39	28,32
HciP	0	4,65	1,465
AsaP	0	8,68	1,605
AlaP	0	392,61	201,74
ProP	0	2756,87	881,68
ValP	0	200,06	105,02
ThrP	0	217,19	72,84
Leu/IleP	0	256,42	81,03
MetP	0	27,56	11,815
HisP	0	706,91	669,235
PheP	0	78,01	49,41
TyrP	0	136,85	52,695
AspP	0	176,6	51,265
GluP	89,19	790,72	175,74
TrpP	44,45	190,87	57,955

### 9.3.6 Publikationsliste

**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, PMID: 31067009, 2019*

**Fatal outcome after heart surgery in PMM2-CDG due to a rare homozygous gene variant with double effects**

Görlacher, Panagiotou, Himmelreich, Hüllen, Beedgen, Dimitrov, Geiger, Zielonka, Peters, Strahl, Vázquez-Jiménez, Kerst, Thiel;

*Molecular Genetics and Metabolism Reports*, PMID: 33209585, 2020

**Missense variant c.1460T>C (p.L487P) in ALG9 enhances protein degradation of ER mannosyltransferase ALG9 in two new ALG9-CDG patients presenting with West-Syndrome and Hypsarrhythmia**

Himmelreich, Dimitrov, Geiger, Zielonka, Hutter, Hüllen, Beedgen, Hoffmann, Jünger, Müller, Lorenz, Marschall, Schlüter, Thiel

*Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2021 (in revision)

**A spoonful of L-fucose - An efficient therapy for GFUS-CDG, a new glycosylation disorder**

Feichtinger\*, Hüllen\*, Koller, Kotzot, Grote, Rapp, Hofbauer, Brugger, Thiel\*, Mayr\*, Wortmann\*

*EMBO Molecular Medicine*, 2021 (in revision) (Feichtinger & Hüllen contributed equally)

**Congenital disorders of glycosylation with defective fucosylation**

Hüllen, Falkenstein, Weigel, Huidekoper, Naumann-Bartsch, Spenger, Feichtinger, Schaefer, Frenz, Kotlarz, Momen, Khoshnevisan, Riedhammer, Santer, Herget, Rennings, Lefeber, Mayr, Thiel, Wortmann

*Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2021 (accepted, #BOLI-D-21-00112)

**A rapid and simple procedure for the isolation and cultivation of fibroblast-like cells from Medaka and Zebrafish embryos and fin clip biopsies**

Beedgen, Hüllen, Gücüm, Thumberger, Wittbrodt, Thiel

*Laboratory animals, 2021 (submitted)*

9.3.7 Konferenzteilnahmen

*11. Mai 2018: Glycokids Jahrestreffen, Hübingen, Deutschland*

*01. – 02. Juli 2018: IZN Neuroscience Retreat, Schöntal, Deutschland - **Posterpräsentation***

*15. – 16. November 2018: 1<sup>st</sup> Annual Meeting FOR2509 DFG, Hoechst, Deutschland - **Posterpräsentation***

*28. – 30. Januar 2019: GlycoBioTec 2019, Berlin, Deutschland - **Posterpräsentation***

*13. – 15. März 2019: APS Annual Meeting, Fulda, Deutschland - **Posterpräsentation***

*20. – 21. März 2019: Euro-CDG Meeting, Paris, Frankreich*

*02. Juli 2019: Teaching Workshop on Protein Glycosylation, Heidelberg, Deutschland*

14. – 17. Juli 2019: IZN Neuroscience Retreat, Schöntal, Deutschland - **Posterpräsentation**

26. – 27. September 2019: 2<sup>nd</sup> Annual Meeting FOR2509 DFG, Obernkirchen, Deutschland - **Posterpräsentation**

27. – 29. Oktober 2019: 30th Joint Glycobiology Meeting, Lille, Frankreich - **Posterpräsentation**

22. – 24. Januar 2020: Proteomics Workshop, Heidelberg, Deutschland

04. – 06. März 2020: APS Annual Meeting, Fulda, Deutschland - **Vortrag**  
(Konferenz wegen COVID-19 Pandemie kurzfristig abgesagt)

03. Dezember 2021: SSIEM, Virtual Symposium Day (Onlinekonferenz)

14. – 16. Mai 2021: 5th World Conference on CDG, Lissabon, Portugal - (Onlinekonferenz)

23. – 24. Juni 2021: Virtual Scientific CDG Symposium, **Kurzvortrag**  
(Onlinekonferenz)

30. Juni 2021: IZN Seminar SS 20201, **Vortrag** (Onlineseminar)

### 9.3.8 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 .....

Andreas Hüllen

## 9.4 Danksagung

Ich möchte mich ausgesprochen bei meinem Zweitgutachter und Betreuer Dr. Christian Thiel bedanken, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gab. Auch wenn mich die ein oder andere Ghost-Chili viele Nervenenden meiner Nozizeptoren kostete, oder auch mal ein Bierfass bei einer Wette verloren ging, konnte ich immer auf seine Unterstützung zählen. Nicht zuletzt ihm verdankt die Arbeitsgruppe das äußerst angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank geht ebenso an Prof. Dr. Britta Brügger, die die Aufgabe des Erstgutachters übernahm und mich mit ihrem weitreichenden Wissen unterstützte und in den TAC-Meetings stets einen ehrlichen und optimistischen Austausch ermöglichte. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Mack und Prof. Dr. Tobias Werner für die Teilnahme im Prüfungskomitee. Bei Dr. Saskia Wortmann möchte ich mich für die herausragende Kooperation in den vergangenen Jahren bedanken. Für die wissenschaftliche Unterstützung der N-Glykanmessungen bedanke ich mich bei Dr. Erdmann Rapp.

Die Laborarbeit wäre nicht halb so gut und auch nicht halb so schön gewesen ohne Virginia Geiger. Vielen Dank für deinen Einsatz, deine Geduld, deine Ratschläge und die zahlreichen Aldi-Touren. Außerdem weiß ich für immer zu schätzen, dass du deinen Kaffeevollautomaten direkt neben meinen Schreibtisch platziert hast. Irgendwann bekommst du auch ein Bild nach dem Triathlon!

Ebenfalls Dankbar bin ich für meine shoppingsüchtigen Doktoranden-Kollegen Kristina Falkenstein und Lars Beedgen. Unser Zusammenhalt und der Austausch werden mir sehr fehlen. Gemeinsam haben wir es immerhin fast ins Eckbüro geschafft. Maßgeblichen Anteil habt ihr auch an meinen diversen Errungenschaften wie: OLED-TV, PS5, Rudergerät, Kleidung, Gravel-Bike und natürlich dem Dreame V11. Ich wünsche euch für eure Zukunft nur das Beste und weiterhin eine frohe Konsumsucht.

Aber auch bei der restlichen Arbeitsgruppe und den Kollegen aus dem Analysezentrum möchte ich mich herzlichst bedanken: Bianca, Marlen, Nastassja, Dorothea, Simone und Andreas. Weiterhin möchte ich Dr. Jürgen Okun danken, der mir 11 Jahre lang im Stoffwechsellzentrum die Möglichkeiten

gab als Zivildienstleistender und HiWi zu arbeiten. Ich danke auch Katharina und Nadine mit denen ich 8 Jahre lang zusammenarbeiten durfte und immer Spaß bei der Arbeit hatte. Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei Kathrin und Tanja, die mir nicht nur als Kollegen, sondern auch als enge Freunde sehr ans Herz gewachsen sind.

Ich danke all den Studenten, die über die Jahre in unserer Gruppe waren. Vor allem Lisa Mutz, Anne-Marie Bühner, Lukas Hoeren und Caterina Schneider. Besonders hervorheben möchte ich Ann-Katrin Schlosser, die durch großartige Ideen und einen ausgesprochenen Fleiß maßgeblichen Anteil an der vorliegenden Arbeit hatte.

Einen ganz besonderen Dank geht auch an meine Freunde, die mir in allen Lebenslagen Rückhalt bieten. Nik, Joni, Claudio und Laura - ohne euch hätte ich es nie so weit geschafft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dieter und meiner restlichen Familie. Der größte, herzlichste Dank gilt meiner Mutter, die mich immer unterstützt hat und auf die ich immer zählen kann.

K. Thx. Bye.