

# Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Gesamtfakultät

für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

M.Sc. Kristina Falkenstein

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2023



**Charakterisierung einer neuen *SLC35A1*-Mutation  
bei einer Patientin mit Glykosylierungs- und  
Stoffwechseldefiziten**

Gutachter: Prof. Dr. Britta Brügger

PD Dr. Christian Thiel



# Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1	Zusammenfassung .....	1
2	Abstract.....	2
3	Einleitung .....	3
	3.1 Die Glykosylierung von Proteinen.....	3
	3.1.1 N-Glykosylierung .....	4
	3.1.2 O-Glykosylierung .....	7
	3.1.3 C-Mannosylierung .....	9
	3.2 Synthese nukleotidaktivierter Zucker durch den Hexosamin-Biosyntheseweg .....	10
	3.3 Die SLC35 Transporterfamilie .....	12
	3.3.1 Der CMP-Sialinsäure Transporter SLC35A1 .....	13
	3.4 Die Funktionen der Sialylierung.....	14
	3.5 Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) .....	15
	3.5.1 SLC35A1-CDG .....	18
4	Zielsetzung .....	21
5	Material und Methoden .....	22
	5.1 Material.....	22
	5.1.1 Material der Patientin.....	22
	5.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	22
	5.1.3 Geräte.....	23
	5.1.4 Chemikalien.....	25
	5.1.5 Enzyme und Puffer .....	26
	5.1.6 Oligonukleotide .....	27
	5.1.7 Kits, Standards und Reagenzien .....	28
	5.1.8 Puffer.....	29
	5.1.9 Antikörper .....	31
	5.1.10 Lektine.....	34
	5.1.11 Zellkultur .....	34
	5.1.12 Plasmide.....	35
	5.1.13 Bakterienstämme und Medien .....	37
	5.1.14 Programme, Online-Tools und Datenbanken.....	38

---

5.2	Methoden.....	39
5.2.1	CDG-Diagnostik .....	39
5.2.2	Analyse der lipidgebundenen Oligosaccharide (LLOs) .....	41
5.2.3	In silico Pathogenitätsanalyse .....	41
5.2.4	Zellkultur .....	41
5.2.5	(Molekular-) Genetische Methoden/ Klonierung.....	42
5.2.6	Transformation, Transfektion und Infektion.....	47
5.2.7	Sequenzierung .....	49
5.2.8	Proteinbiochemische Methoden .....	49
5.2.9	Generierung einer Knock-out-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9.....	52
5.2.10	Golgi-Transporteraktivitätsassay.....	54
5.2.11	Cyclohexamidassay zur Bestimmung der Protein-Halbwertszeit.....	56
5.2.12	Apoptoseassay.....	57
5.2.13	Proliferationsassay .....	57
5.2.14	Immunfluoreszenz .....	57
5.2.15	SLC35A1 ELISA-Kit.....	58
5.2.16	Färbung neutraler Lipide mit Oil Red O .....	59
5.2.17	Transkriptomische Analyse mittels nCounter .....	59
5.2.18	Proteomik-Analyse von Fibroblasten.....	60
5.2.19	Lipidomik-Analyse von Fibroblasten .....	60
5.2.20	Messung der Nukleotide und Energiemetabolite .....	60
5.2.21	Messung der Aminosäuren, Acylcarnitine und sehr langkettigen Fettsäuren.....	61
5.2.22	Statistik.....	61
6	Ergebnisse .....	62
6.1	Anamnese einer Patientin mit pathologischen Anomalien .....	62
6.2	Genetische Untersuchungen und in silico Analyse der Mutation .....	62
6.2.1	Threonin <sup>45</sup> ist konserviert und die Mutation potenziell pathogen .....	63
6.2.2	Potenzielle Auswirkungen des Aminosäureaustauschs auf die Proteinstruktur.....	66
6.3	CDG-Routinediagnostik.....	69
6.3.1	Isoelektrische Fokussierung von CDG-Markerproteinen führt bei der Patientin zu unauffälligen Ergebnissen .....	69
6.3.2	Leichte Veränderungen im N-Glykanprofil der Patientin.....	71

6.3.3	In den Patientenfibroblasten akkumuliert ein verkürztes lipidgebundenes Oligosaccharid.....	77
6.4	Analyse der Glykosylierungsmarkerproteine in Fibroblastenlysat .....	78
6.4.1	Überprüfen der Beeinträchtigung der O-Glykosylierung.....	80
6.5	Lektinfärbungen in Serum und Zelllysat.....	84
6.5.1	Das Signal sialinsäurebindender Lektine ist teilweise stark verändert .....	84
6.5.2	Signale von Lektinen, die nicht-sialylierte Strukturen erkennen sind in den Zellen der Patientin verändert und im Serum unauffällig.....	86
6.6	Endogenes <i>SLC35A1</i> -Expressionslevel in Fibroblasten.....	88
6.6.1	Expression des <i>SLC35A1</i> -Transkriptes ist unauffällig.....	88
6.6.2	Test verschiedener <i>SLC35A1</i> -Antikörper führt zu unspezifischen Ergebnissen ..	88
6.6.3	Verringerte <i>SLC35A1</i> -Proteinmenge in Patientenfibroblasten .....	89
6.7	Reduzierte Aktivität des <i>SLC35A1</i> -Transporters in Patientenzellen .....	90
6.8	HEK293 <i>SLC35A1</i> Knock-out-Zelllinie als Modell .....	93
6.8.1	Generierung und Bestätigung des <i>SLC35A1</i> K.o. in HEK293-Zellen.....	93
6.8.2	Expression des <i>SLC35A1</i> (WT)- oder <i>SLC35A1</i> (A133G)-Gens in HEK293-Zellen führt zu vergleichbaren Glykosylierungsmustern .....	98
6.9	Verkürzte Halbwertszeit des <i>SLC35A1</i> (Thr45Ala)-HA Proteins .....	102
6.10	Patientenfibroblasten zeigen eine verringerte Proliferation .....	103
6.10.1	Expression des mutierten Proteins verbessert die Proliferation von <i>SLC35A1</i> K.o.-Zellen nicht im gleichen Umfang wie das wildtypische Protein.....	105
6.11	Generelle Fehlregulation von glykosylierungsrelevanten Genen .....	107
6.11.1	Die Proteinexpression der deregulierten Gene ist teilweise verändert.....	109
6.11.2	Die Expression signifikant deregulierter Proteine in den Patientenzellen ist teilweise auch in HEK293 <i>SLC35A1</i> K.o.-Zellen verändert.....	115
6.12	Proteomik-Analyse von Fibroblasten zeigt eine Deregulation verschiedener zellulärer Prozesse .....	120
6.12.1	Die O-GlcNAcylierung ist in den Patientenfibroblasten reduziert, aber normal in HEK293 <i>SLC35A1</i> K.o.-Zellen .....	122
6.12.2	In den Patientenzellen sind mitochondriale Proteine dereguliert.....	125
6.12.3	Hinweise auf Beeinträchtigung des Lipidstoffwechsels.....	125
6.12.4	Leichte Veränderungen des Acylcarnitinprofils und der Menge sehr langkettiger Fettsäuren .....	127
6.13	Veränderung der Lipidverteilung in den Patientenfibroblasten .....	129

6.14	Analyse verschiedener Metabolite.....	132
6.14.1	Das Aminosäurenprofil der Patientin ist im Serum verändert und in Fibroblasten unauffällig .....	132
6.14.2	Erhöhte Menge nukleotidaktivierter Zucker in Patientenzellen und Akkumulation von CMP-Neu5Ac in HEK293 <i>SLC35A1</i> K.o.-Zellen .....	133
6.15	GlcNAc-Supplementierung hat geringfügigen Effekt auf die Glykosylierung und verbessert die Proliferation deutlich .....	135
6.16	Komplementierung der Fibroblasten mit <i>SLC35A1</i> -HA Konstrukten.....	141
6.16.1	Erhöhte <i>SLC35A1</i> -Transkriptexpression der infizierten Fibroblasten.....	141
6.16.2	Das <i>SLC35A1</i> (WT/Thr45Ala)-HA Protein colokalisiert mit Golgi-Markern .....	142
6.16.3	Teilweise verbesserte Glykosylierung in komplementierten Patientenzellen .....	145
6.16.4	Komplementierung der Patientenzellen mit dem wildtypischen <i>SLC35A1</i> -Protein verbessert die Proliferation minimal.....	150
7	Diskussion.....	152
7.1	In silico Analyse der Mutation deutet auf milde Auswirkungen hin.....	152
7.2	Geringfügige Auffälligkeiten bei Routinediagnostikverfahren .....	154
7.3	Erhebliche Veränderungen der allgemeinen Glykosylierung in den Patientenfibroblasten .....	156
7.3.1	Lektinsignale in den Patientenzellen entsprechen einem defekten <i>SLC35A1</i> -Transporter in HEK293-Zellen .....	159
7.4	Auswirkungen der Mutation auf Expression, Stabilität, Funktionalität und Aktivität des Proteins .....	160
7.5	Das mutierte <i>SLC35A1</i> -Protein lokalisiert ordnungsgemäß im Golgi-Apparat ..	164
7.6	Komplementierung der Patientenfibroblasten mit dem wildtypischen <i>SLC35A1</i> -Gen.....	165
7.7	Die beeinträchtigte Proliferation wird nur zum Teil vom mutierten <i>SLC35A1</i> -Protein verursacht .....	166
7.8	Beeinträchtigung verschiedener Bereiche des Glykosylierungsprozesses .....	168
7.9	Nukleotidmessung deutet auf Akkumulationen von Zuckersubstraten hin.....	175
7.10	Deregulation verschiedener zellulärer und hauptsächlich mitochondrialer Prozesse .....	176
7.11	Beeinträchtigung der Lipidhomöostase in den Patientenzellen.....	179
7.12	Behandlungsmöglichkeit durch GlcNAc-Supplementierung.....	181
7.13	Vergleichende Gegenüberstellung mit bekannten <i>SLC35A1</i> -CDG Patienten.....	183
7.14	Abschließende Bemerkungen und Ausblick.....	187

8	Referenzen.....	189
9	Anhang.....	201
10	Danksagung.....	223

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
3B-HSD	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
∞	Unendlich
A	Adenin
A.U.	Willkürliche Einheit (Arbitrary unit)
AAL	Aleuria Aurantia Lektin
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACOX3	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3
ADAMTS13	A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
Ala	Alanin
ALG1	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 14 Homolog
ALG11	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 11 Homolog
ALG12	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 12 Homolog
ALG13	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 13 Homolog
ALG14	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 14 Homolog
ALG2	Asparagine-Linked Glycosylation Protein 2 Homolog
ALG7	Dolichyl-Phosphate N-Acetylglucosaminophosphotransferase
Amp	Ampicillin
ANOVA	Varianzanalyse
ApoCIII	Apolipoprotein C-III
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial
B4GALT1	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
bp	Basenpaare

---

BSA	Bovine Serum Albumin
C	Kohlenstoff
C	Cytosin
Cas9	CRISPR-associated endonuclease Cas9
CD36	Leukocyte differentiation antigen CD36
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CHO-Lec2	Chinese hamster ovary Mutante Lec2
CHX	Cyclohexamid
cm <sup>2</sup>	Quadratzenrimeter
CMAS	N-acylneuraminate cytidyltransferase
CMP	Cytidinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
d	Tage
DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase
DHDDS	Dehydrodolichyl diphosphate synthase complex subunit DHDDS
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dol	Dolichol
Dol-P	Dolicholphosphat
Dol-P <sub>2</sub>	Dolicholdiphosphat
DPAGT1	Dolichyl-Phosphate N-Acetylglucosaminophosphotransferase 1
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
DPY19L1	Probable C-mannosyltransferase DPY19L1
DPY19L3	Probable C-mannosyltransferase DPY19L3
E. coli	Escherichia coli
EBP	3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase
ECL	Erythrina Cristagalli Lektin

---

ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoassay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
FCS	Fötale Kälberserum
FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
FLR	Fluoreszenz
FPGT	Fucose-1-phosphate guanylyltransferase
FPP	Farnesyldiphosphat
Fuc	Fucose
FUK	L-fucose kinase
FUT8	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase
Fw	Forward
G	Guanin
g	Gramm
g	Beschleunigungskraft (g-force)
G	Gauge
Gal	Galactose
GALE	UDP-glucose 4-epimerase
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFPT	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
GFUS	GDP-L-fucose synthase
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gly	Glycin
glyko.	Glykosyliert

---

GM130	Golgi matrix protein of 130 kDa
GMP	Guanosinmonophosphat
GMPPA/B	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha/ Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta
GNE	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
GNPNAT1	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase
GO	Gene Ontology
GOI	Gene of interest
Golgi	Golgi-Apparat
GP130	Interleukin 6 receptor subunit beta
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
gRNA	Guide RNA
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H2B	Histon 2B
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Human influenza hemagglutinin
HB	Hexosamin-Biosyntheseweg
HCl	Chlorwasserstoff/ Salzsäure
HDR	Homologie-basierte Reparatur
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich (Horseradish) Peroxidase
HSD17B7	3-keto-steroid reductase/17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 7
hypo.	Hypoglykosyliert
hypoglyko.	Hypoglykosyliert
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IDI1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Jacalin	Artocarpus integrifolia Lektin

---

K.o.	Knock-out
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Ktrl	Kontrolle
l	Liter
LB	Lysogeny broth
LCH	Lens Culinaris Lektin
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LLOs	Lipidgebundene Oligosaccharide ("lipid-linked oligosaccharides")
ln	Natürlicher Logarithmus
log	Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampere
MALI	Maackia amurensis Leukoagglutinin I
Man	Mannose
MAN1A1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA
MAN1A2	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB
MAN1B1	Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase
MAN1C1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IC
MAN2A1	Alpha-mannosidase 2
MAN2A2	Alpha-mannosidase 2x
ManNAc	N-Acetylmannosamin
MGAT1	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
MGAT2	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
MGAT3	Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
MGAT4	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase

---

MGAT5	Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOGS	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
MPI	Mannose-6-phosphate isomerase
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
n	Anzahl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAGK	N-acetyl-D-glucosamine kinase
NANP	N-acylneuraminat-9-phosphatase
NANS	Sialic acid synthase
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
NEU1-4	Sialidase-1-4
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure/ Sialinsäure
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (Non-homologous end joining)
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OGA	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc Transferase
OH	Hydroxygruppe
OST	Oligosaccharyltransferase
p	Signifikanzwert ("probabilitas")

---

P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Protospacer adjacent motif
Pat	Patient
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDSS1	All trans-polyprenyl-diphosphate synthase PDSS1
PFA	Paraformaldehyd
PGM1	Phosphoglucomutase-1
PGM2	Phosphoglucomutase-2
PGM3	Phosphoacetylglucosamine mutase
pH	Potential des Wasserstoffs
PI	Phosphatidylinositol
PIGQ	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit Q
PIGY	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit Y
PMM2	Phosphomannomutase 2
PNA	Peanut Agglutinin
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
PNK	Polynukleotidkinase
POMT1/2	Protein O-mannosyl-transferase 1/2
Puro	Puromycin
qPCR	Quantitative Echtzeit PCR
r	Wachstumsrate
RCAI	Ricinus communis Agglutinin I
Rev	Revers
RFT1	Oligosaccharid-Translocationsprotein RFT1 Homolog
RIPA	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung

---

Sd	Standard
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGK	Serine/threonine-protein kinase Sgk1
Sia	Sialinsäure
Sialyl-Le <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis x Antigen
SLC35	Solute carrier family 35
SLC35A1	CMP-sialic acid transporter
SLC35A2	UDP-galactose translocator
SLC35A3	UDP-N-acetylglucosamine transporter
SLC35A4	Solute carrier family 35 member A4
SLC35A5	Solute carrier family 35 member A5
SLC35B4	Solute carrier family 35 member B4
SLC35C1	GDP-fucose transporter 1
SNA	Sambucus Nigra Lektin
SRD5A3	Polyprenol reductase
SREBF1	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
ssOligo	Einzelstrang (single-strand) Oligonukleotid
ST3GAL	CMP-N-acetylneuraminat-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase
ST6GAL	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase
STT3A/B	Oligosaccharyl Transferase Subunit STT3A/B
Succ. WGA	Succinyliertes Weizenkeim Agglutinin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichlorsäure
T <sub>d</sub>	Verdopplungszeit
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tf	Transferrin
TGN46	Trans-Golgi network integral membrane protein 2
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TMTC1-4	Protein O-mannosyl-transferase TMTC1-4

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	Thrombospondin-Repeats
U	Unit
UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase
UDP	Uridindiphosphat
UGP	UDP-Glucose Pyrophosphorylase 2
UMP	Uridinmonophosphat
unglyko.	Unglykosyliert
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vh	Voltstunde
VLCFAs	Sehr langkettige Fettsäuren (very long chain fatty acids)
w/v	Gewichtsprozent
WGA	Weizenkeim Agglutinin
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
$\alpha$	Alpha
$\alpha$ -DG	$\alpha$ -Dystroglykan
$\beta$	Beta
$\Delta\Delta G$	Geänderte freie Gibbs-Energie
$\Delta\Delta S_{Vib}$	Geänderte Vibrationsentropie

**Lipide**

CE	Cholesterylester
Cer	Ceramid
Chol	Chloesterin
DAG	Diacylglycerol
Hex2Cer	Dihexosylceramid
HexCer	Hexosylceramid
LPC	Lysophosphatidylcholin
PA	Phosphatidsäure
PA O-	Alkylphosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PC O-	Alkylphosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE O-	Alkylphosphatidylethanolamin
PE P-	Phosphatidylethanolamin Plasmalogen
PG	Phosphatidylglycerin
PG O-	Alkylphosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PI O-	Alkyphosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
PS O-	Alkylphosphatidylserin
SM	Sphingomyelin
TAG	Triacylglycerol

**Acylcarnitine und VLCFAs**

C0	freies Carnitin
C2	Acetylcarnitin
C3	Propionylcarnitin
C4	Butyrylcarnitin
C5:1	Tiglylcarnitin
C5	Valerylcarnitin
C6	Hexanoylcarnitin
C8:1	Octenoylcarnitin
C8	Octanoylcarnitin
C10:2	Decadienoylcarnitine
C10:1	Decenoylcarnitin
C10	Decanoylcarnitin
C12	Dodecanoylcarnitin
C14:2	Tetradecadienoylcarnitine
C14:1	Tetradecenoylcarnitin
C14	Tetradecanoylcarnitin
C14OH	3-OH-Tetradecanoylcarnitin
C16:1	Hexadecenoylcarnitin
C16	Hexadecanoylcarnitin
C16:1OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitin
C16OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitin
C18:2	Octadecadienoylcarnitin
C18:1	Oleoylcarnitin
C18	Octadecanoylcarnitin
C18:2OH	3-OH-Linolylcarnitin
C18:1OH	3-OH-Oleoylcarnitin
C18OH	3-OH-Stearoylcarnitin
C20:0	Phytansäure
C22:0	Behenoylcarnitin
C24:0	Lignoceroylcarnitin
C26:0	Cerotoylcarnitin

**Aminosäuren**

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asa		Argininosuccinat
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cit		Citrullin
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
Hci		Homocitrullin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Orn		Ornithin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

## Zuckersymbole

	GlcNAc
	Mannose
	Glucose
	Galactose
	GalNAc
	Fucose
	Sialinsäure

# 1 Zusammenfassung

Die Glykosylierung ist eine wichtige co- und posttranslationale Modifikation von Proteinen, die für deren korrekte Faltung, Funktionalität und Interaktionen benötigt wird. Wird dieser Prozess durch Mutationen im Gen eines der beteiligten Proteine beeinträchtigt, führt dies zu einer seltenen Stoffwechselkrankheit, die als „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) bezeichnet wird. Der sehr seltene CDG-Typ SLC35A1-CDG wird durch einen Defekt des SLC35A1-Proteins hervorgerufen, das als Sialinsäuretransporter dafür verantwortlich ist, CMP-Sialinsäure vom Cytosol ins Golgi-Lumen zu transportieren. Bisher waren nur fünf SLC35A1-CDG Patienten bekannt, die Symptome wie neurologische Defizite und Gerinnungsstörungen aufwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die c.133A>G (p.Thr45Ala) Mutation im *SLC35A1* Gen einer weiteren Patientin charakterisiert, die unter anderem an einer allgemeinen Gedeihstörung, Mikrozephalie, Thrombozytopenie sowie Neutropenie leidet. Anhand einer in silico Analyse wurde zunächst ermittelt, dass die Mutation pathogene Eigenschaften, aber möglicherweise eher milde Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins haben könnte. Um die Mutation unabhängig vom genetischen Hintergrund der Patientin zu untersuchen, wurde eine HEK293 *SLC35A1* Knock-out-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9 generiert, durch die festgestellt werden konnte, dass das mutierte SLC35A1-Protein generell noch funktionsfähig war, aber eine verkürzte Halbwertszeit aufwies. In Fibroblasten lokalisierte es ordnungsgemäß im Golgi-Apparat, aber zeigte eine leicht reduzierte Aktivität, die möglicherweise auf die verringerte Stabilität zurückzuführen war. In den Fibroblasten der Patientin wurde neben einer leichten Störung der O-Glykosylierung eine stark beeinträchtigte N-Glykosylierung sowie eine reduzierte  $\alpha$ -2,3 Sialylierung festgestellt. Im Serum der Patientin waren dagegen kaum Glykosylierungsdefizite vorhanden, was auf organspezifische Unterschiede in der Bereitstellung von Sialinsäure für die Glykosylierungsprozesse hindeuten könnte. Durch transkriptomische und proteomische Analysen wurden Beeinträchtigungen weiterer Glykosylierungsprozesse, der O-GlcNAcylierung und C-Mannosylierung, in den Patientenfibroblasten entdeckt, sowie die Deregulation verschiedener Bereiche der N-Glykosylierung, die teilweise in direktem Zusammenhang mit einem SLC35A1-Defekt zu stehen scheinen. Auch die Lipidhomöostase war in den Zellen der Patientin verändert und es gab Hinweise auf eine Beeinträchtigung von grundlegenden zellulären Funktionen sowie dem Energiemetabolismus. Die beobachtete, verminderte Proliferation der Patientenfibroblasten konnte durch Supplementation mit GlcNAc verbessert werden, nicht jedoch die Glykosylierungsdefizienz, weshalb dieser Phänotyp vermutlich auf Probleme im Metabolismus zurückzuführen war. Ein Komplementierungsversuch der Patientenzellen mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Gen konnte den Glykosylierungsdefekt nur teilweise beheben, weshalb auch der individuelle genetische Hintergrund der Patientin zu den beobachteten Defiziten beitragen könnte. Letztendlich scheint die *SLC35A1* c.133A>G Mutation zu einer eher milden Form von SLC35A1-CDG zu führen, die vermutlich hauptsächlich auf die reduzierte Stabilität des mutierten Proteins zurückzuführen ist.

## 2 Abstract

Glycosylation is an important co- and post-translational modification of proteins which is required for various of their properties, like the correct folding, functionality and interactions. If this process is impaired due to mutations in the genes involved, this leads to a rare metabolic disease called “Congenital Disorders of Glycosylation” (CDG). A very rare type of CDG, SLC35A1-CDG, is caused by a defective SLC35A1 protein, a sialic acid transporter responsible for translocation of CMP-sialic acid from the cytosol into the Golgi-Lumen. To date, only five SLC35A1-CDG patients had been known. They were described to have symptoms such as neurological deficits and coagulation disorders. In this thesis, the c.133A>G (p.Thr45Ala) mutation in the *SLC35A1* gene of new patient was characterized, who suffers from general failure to thrive, microcephaly, thrombocytopenia and neutropenia, among other symptoms. First, an in silico analysis was performed which proposed that the mutation could have pathogenic properties, but might only mildly affect the functionality of the protein. To investigate the mutation independently of the patient’s genetic background, a CRISPR/Cas9 mediated *SLC35A1* Knock-out cell line was generated using HEK293 cells. By this cell line, it was determined that the mutated SLC35A1 protein was still functional but had a shortened half-life. In fibroblasts, the mutated SLC35A1 localized properly in the Golgi apparatus but showed a slightly reduced activity, possibly due to the decreased stability. The patient’s fibroblasts showed a severely impaired N-glycosylation and reduced  $\alpha$ -2,3 sialylation in addition to a slightly affected O-glycosylation. In contrast, almost no glycosylation deficits could be observed in the patient’s serum which might indicate organ specific differences in the provision of sialic acid for glycosylation purposes. A transcriptomic and proteomic analysis in the patient’s fibroblasts revealed a deregulation of the additional glycosylation processes O-GlcNAcylation and C-mannosylation as well as multiple dysregulations of genes involved in the N-glycosylation process, which might to some extent be directly linked to a SLC35A1 defect. Additionally, the lipid homeostasis was altered in the patient’s cells as well and there was evidence of an impairment of basic cellular functions and the energy metabolism. The observed reduced proliferation of the patient’s fibroblasts but not the glycosylation deficit could be increased by supplementation of the cells with GlcNAc, which is why this phenotype was probably due to metabolic impairments. Complementation of the patient’s fibroblasts with the wild-type *SLC35A1* could only partially rescue the glycosylation defect. Therefore, the patient’s individual genetic background may play a role in terms of the observed deficits. Finally, the *SLC35A1* c.133A>G mutation seems to cause a rather mild form of SLC35A1-CDG, probably mainly due to the reduced stability of the mutant protein.

### 3 Einleitung

Die co- und posttranslationale Modifikation von Proteinen ist einer der wichtigsten Mechanismen in pro- und eukaryotischen Zellen, da er für die Funktionalität von Proteinen essenziell ist. Dabei können verschiedene chemische Gruppen kovalent an einzelne Aminosäuren angeheftet werden, wodurch die physikochemischen Eigenschaften der Proteine verändert werden. Die Modifikationen nehmen dadurch Einfluss auf die Faltung, Stabilität und Aktivität der Proteine. Am häufigsten kommen die Phosphorylierung und die Acetylierung vor, die beispielsweise für die Signalweiterleitung und die Regulation der Transkription benötigt werden [1], [2]. Eine weitere, sehr wichtige co- und posttranslationale Modifikation, bei der Kohlenhydrate an spezifische Aminosäuren der Proteine gebunden werden, ist die Glykosylierung.

#### 3.1 Die Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung von Proteinen ist ein komplexer co- und posttranslatinaler Prozess, bei dem Mono- oder Oligosaccharide, sogenannte Glykane, mit funktionalen Gruppen oder einem Kohlenstoffatom bestimmter Aminosäuren verknüpft werden. Die biologische Wichtigkeit der Glykosylierung zeigt sich bereits darin, dass sie in allen phylogenetischen Gruppen, von Bakterien und Archaeen bis hin zu Eukaryoten, wie Pflanzen und Tieren, stattfindet [3], [4]. Beim Menschen sind fast alle sekretierten und membranständigen Proteine glykosyliert und es wird angenommen, dass 50-70 % des menschlichen Proteoms Glykoproteine sind [5]–[7]. Die Komplexität des Proteoms kann durch den Glykosylierungsprozess deutlich erhöht werden, da Glykoproteine, durch die unterschiedlichen, potenziellen Glykosylierungsstellen und zahlreichen Möglichkeiten wie ein Glykan aufgebaut sein kann, in verschiedenen Glykoformen vorliegen können [8]–[10]. Die korrekte Glykosylierung eines Proteins ist essenziell für dessen physikalische und biologische Eigenschaften. Die angehefteten Glykane sind wichtig für Zell-Zellinteraktionen, Signalweiterleitung, die Immunantwort, Hormonregulation sowie Differenzierung, Wachstum und Entwicklung [10]–[14].

Der Glykosylierungsprozess läuft hauptsächlich auf der cytosolischen und luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates (Golgi) ab, wobei manche der dazugehörigen Reaktionen auch im Cytosol oder dem Nukleus stattfinden [3], [4], [9]. Die Zuckersubstrate, die für die Generierung der Glykane im ER oder dem Golgi-Apparat benötigt werden, können entweder als nukleotidaktivierte Zucker durch Transporterproteine oder als Dolicholphosphat (Dol-P)-gebundene Zucker bereitgestellt werden [9]. Die Verknüpfung oder Spaltung des Glykans erfolgt durch spezielle Enzyme, die Glykosyltransferasen und Glykosidasen. Abhängig davon mit welcher funktionalen Gruppe die glykosidische Bindung gebildet wird und welche Oligosaccharide verknüpft werden, unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten der Proteinglykosylierung. Neben den bekanntesten Arten, der N- und O-Glykosylierung, gibt es auch die Verknüpfung von Proteinen mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankern (Glypiation) und die seltenere C-Mannosylierung. Außer an Proteine können Glykane auch an Lipide und Proteoglykane angeheftet werden [9]. Im Folgenden werden die N- und O-Glykosylierung sowie die C-Mannosylierung genauer erläutert.

### 3.1.1 N-Glykosylierung

Bei der N-Glykosylierung werden zunächst Vorläufer-Glykane gebildet, die an Dolicholdiphosphat (Dol-P<sub>2</sub>), ein Isoprenderivat, in der ER-Membran gebunden sind. Da die Vorläufer-Glykane noch nicht auf ein Protein übertragen wurden, sondern dolicholgebunden sind, werden sie als lipidgebundene Oligosaccharide („lipid-linked oligosaccharides“, LLOs) bezeichnet [13], [15]. Dolichol (Dol) wird dabei durch den Mevalonat-Signalweg, der auch für die Produktion von Cholesterol und Ubiquinon verantwortlich ist, bereitgestellt [16]. Damit die verschiedenen Zucker übertragen und verknüpft werden können, müssen diese zuvor nukleotidaktiviert werden. Dies geschieht hauptsächlich im Cytosol durch die Aktivität verschiedener Kinasen. Die gängigsten nukleotidaktivierten Zuckersubstrate sind UDP-Glucose (Glc), UDP-Galactose (Gal), UDP-N-Acetylglucosamin (GlcNAc), GDP-Mannose (Man), GDP-Fucose (Fuc) und CMP-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac/ „Sialinsäure“, Sia). Um die aktivierten Zucker nicht nur in freier Form im Cytosol, sondern auch für die Glykansynthese im ER- und Golgi-Lumen bereitzustellen, werden diese, im Fall von GDP-Man und UDP-Glc, auf Dol-P übertragen und ins ER-Lumen transloziert oder, im Fall von UDP-Gal, UDP-GlcNAc, GDP-Fuc und CMP-Sia, mithilfe verschiedener Transporterproteine der SLC35 Proteinfamilie ins Golgi-Lumen transportiert [13], [17].

Als erste Schritte der N-Glykan- bzw. LLO-Synthese werden auf der cytosolischen Seite des ER durch die Glykosyltransferasen DPAGT1 (*ALG7* in *Saccharomyces cerevisiae*) und ALG13/ALG14 zwei GlcNAc-Reste und durch ALG1, ALG2 und ALG11 fünf Mannose-Reste an Dol-P angehängt, wodurch das LLO Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> entsteht [13], [18]. Dieses wird für weitere Modifikationsschritte auf die luminalen Seite des ER transloziert, was u.a. durch die Flippase RFT1 katalysiert wird [19], [20]. Dort werden die dolicholgebundenen Zuckersubstrate Dol-P-Man und Dol-P-Glc schrittweise von den Glykosyltransferasen ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8 und ALG10 verwendet, um das Oligosaccharid bis zum finalen LLO Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> aufzubauen, welches anschließend als gesamte Einheit auf ein neu gebildetes Polypeptid oder Protein übertragen werden kann. Der erste GlcNAc-Rest wird dabei immer in  $\beta$ -Konformation durch eine N-glykosidische Bindung mit der Amidgruppe eines Asparagins verknüpft. Namensgebend für diese Bindung ist das Stickstoffatom (N) der Amidgruppe, an das das Glykan gebunden wird. Die N-Glykane können allerdings nur mit Asparagin-Resten verknüpft werden, die in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr vorliegen, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Der Proteinkomplex, der für die Übertragung des Glykans auf ein Protein verantwortlich ist, indem er dieses spezifische Aminosäurenmotiv erkennt und die N-glykosidische Bindung generiert, ist der Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex [13], [15], [18], [21]. Bei Säugetieren gibt es zwei OST-Komplexe, die jeweils aus sieben nicht-katalytischen sowie einer katalytischen Untereinheit (STT3A oder STT3B) bestehen [15], [21]–[23]. Der STT3A Komplex glykosyliert hauptsächlich neu synthetisierte Proteine cotranslational, wohingegen der STT3B Komplex Glykane posttranslational auf Polypeptide überträgt [21].

Nachdem das N-Glykan auf ein Protein übertragen wurde, folgen im ER-Lumen Modifikationsschritte durch die Glucosidasen MOGS und GANAB, welche die drei Glc-Reste des Glykans wieder entfernen. Danach wird durch eine Mannosidase (MAN1B1) ein Man-Rest abgespalten, wodurch das Protein das Glykan  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$  trägt und für die weitere Prozessierung in den Golgi-Apparat transportiert werden kann [21], [24] (siehe Abbildung 1).

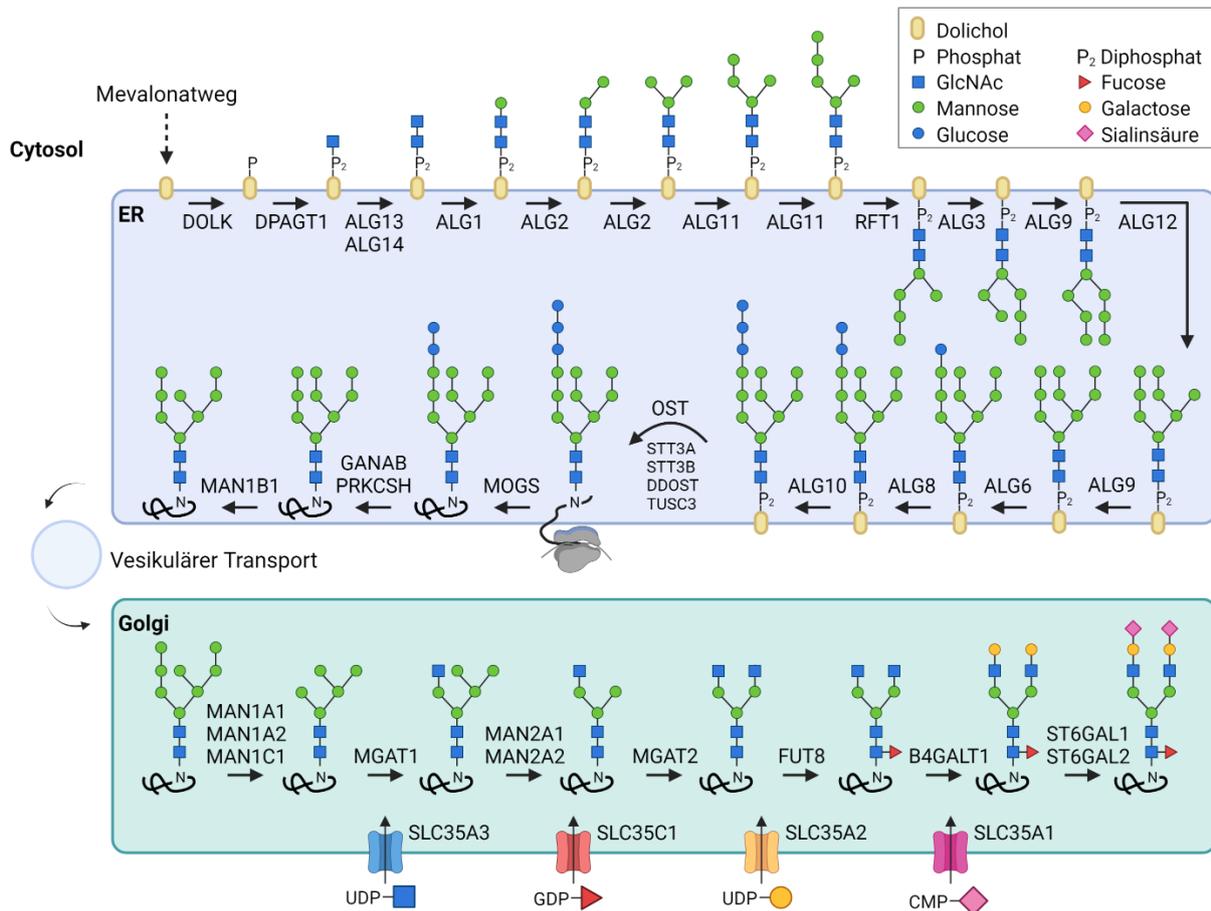


Abbildung 1: Schematische Übersicht des N-Glykosylierungsprozesses. Dargestellt ist der vereinfachte Ablauf zur Bildung eines N-Glykans vom Komplextyp und die daran beteiligten Proteine, beginnend durch die LLO-Synthese, Übertragung auf ein neu gebildetes Protein, Modifikationsschritte im ER und Golgi-Apparat sowie die Bereitstellung der nukleotidaktivierten Zuckersubstrate im Golgi-Apparat durch die verschiedenen SLC35 Transporter. Die Abbildung wurde auf Grundlage von Ng und Freeze [25] mit BioRender.com erstellt.

Im Bereich des cis-Golgi werden drei weitere Man-Reste durch die Enzyme MAN1A1, MAN1A2 und MAN1C1 entfernt, wodurch das Oligosaccharid  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$  entsteht. Dieses ist ein wichtiges Zwischenprodukt der N-Glykansynthese, da nun durch weitere Modifikationsschritte entschieden wird, welcher der verschiedenen N-Glykanten gebildet wird. Allen N-Glykanten gemeinsam ist die Kern- bzw. „Core“-Struktur  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ . Als komplexes N-Glykan werden Glykane bezeichnet, bei denen durch weitere enzymatische Reaktionen mindestens zwei der Antennae durch GlcNAc- und andere Zuckerrreste erweitert werden. Hybridtyp N-Glykane besitzen stattdessen sowohl „Zweige“, die dem komplexen Aufbau entsprechen, als auch solche, die nur Mannose-Reste tragen und nicht mit anderen Zuckern erweitert wurden. Der dritte mögliche N-Glykanten, der entstehen kann, ist der mannosereiche Typ, bei dem  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$  Glykane einer weiteren Prozessierung durch Glycosidasen und Glycosyltransferasen im ER oder Golgi-Apparat entgehen und somit neben der Core-Struktur nur Mannose-Reste tragen [21], [26] (siehe Abbildung 2).

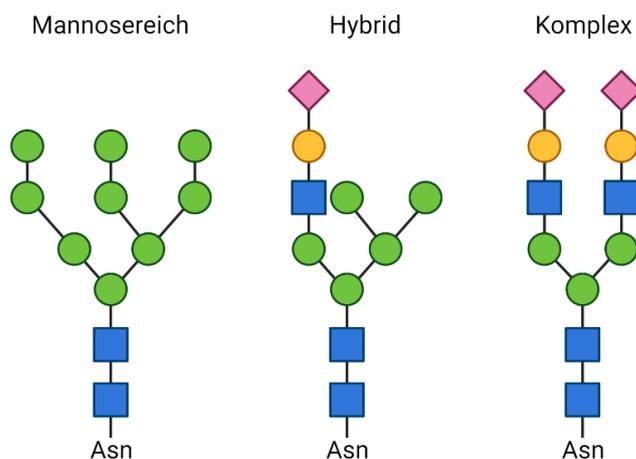


Abbildung 2: Typische Strukturen der drei unterschiedlichen N-Glykanten Mannosereich, Hybrid und Komplex. Eine Übersicht der Zuckersymbole befindet sich im Abkürzungsverzeichnis. Abbildung erstellt mit BioRender.com (basierend auf [21]).

Für die Generierung von komplexen N-Glykanen werden diese im medial-Golgi durch die GlcNAc-Transferase MGAT1, die Mannosidasen MAN2A1 und MAN2A2 und anschließend MGAT2 weiter verändert, was in dem biantennären Glykan  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  resultiert. Im Falle von N-Glykanen des Hybridtyps findet die Abspaltung der beiden Man-Reste im medial-Golgi nicht statt. Beim Komplextyp kann zudem die Bildung von bis zu zwei weiteren Antennae durch die Aktivität von MGAT4 und MGAT5 initiiert werden. Zusätzlich kann sowohl bei Komplex- als auch bei Hybridtypglykanen ein GlcNAc-Rest zwischen den Antennae („bisecting“) an die Core-Struktur durch MGAT3 angeheftet werden, das aber meist nicht durch weitere Zucker erweitert wird. Durch die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten weiterer Zuckerrreste, die im trans-Golgi stattfinden, können die Glykane sehr vielfältig aufgebaut werden. Typischerweise werden an die „Zweige“ der Komplextypglykane durch B4GALT1 je ein Gal-Rest und durch ein Enzym der Sialyltransferasen-Familien ST3GAL oder ST6GAL je eine terminale Sialinsäure in  $\alpha$ -2,3 oder  $\alpha$ -2,6 Konformation gebunden. Es sind allerdings auch andere Kombinationen möglich, beispielsweise kann die Core-Struktur durch FUT8 mit einem Fucose-Rest versehen werden und auch Fuc, Gal oder GlcNAc können die N-Glykane als terminale Zucker-Reste komplettieren [9], [21], [24], [26], [27] (siehe Abbildung 1).

### 3.1.2 O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung unterscheidet sich von der N-Glykosylierung zunächst darin, dass Glykane über die Hydroxygruppe (OH) eines Serins (Ser) oder Threonins (Thr) posttranslational an Proteine gebunden werden (O-glykosidische Bindung) und nur ein Zucker-Rest übertragen wird, der aber anschließend Schritt für Schritt mit weiteren Zuckern verknüpft werden kann [3]. Bisher wurde keine bestimmte Konsensussequenz der Aminosäureabfolge identifiziert, die für eine erfolgreiche O-Glykosylierung benötigt wird, stattdessen wird angenommen, dass die sterische Zugänglichkeit der Ser- und Thr-Reste aufgrund der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins den Ort der Glykosylierung beeinflusst [28]–[30]. Außerdem gibt es keine definierte Core-Struktur, die allen O-Glykanen gemein ist, sondern verschiedene Zuckermoleküle können initial an das Protein gebunden werden, wodurch eine Vielzahl an O-Glykosylierungstypen generiert wird. Diese umfassen unter anderem die im ER-Lumen stattfindende O-Fucosylierung, O-Glucosylierung und O-Mannosylierung (siehe 3.1.2.2) oder auch die O-GlcNAcylierung, auf die in Abschnitt 0 genauer eingegangen wird. Diese Glykosylierungsformen sind aber eher selten und oft spezifisch für bestimmte Gewebe oder Proteine. Die häufigste Art der O-Glykosylierung wird durch die O-glykosidische Bindung von N-Acetylgalactosamin (GalNac) an Ser oder Thr des Proteins definiert, die im Golgi-Apparat stattfindet und als Mucintyp bezeichnet wird [3], [9], [28], [31], [32] (siehe Abbildung 3).

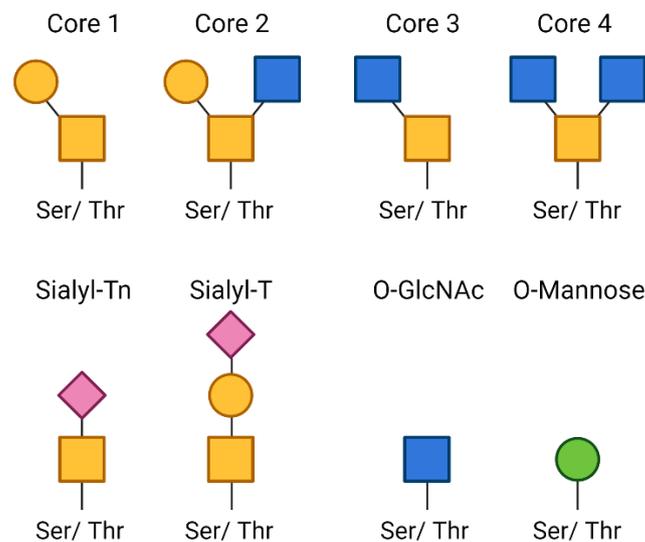


Abbildung 3: Beispiele verschiedener O-Glykanten. Dargestellt sind die Grundstrukturen der Core-1-4 O-Glykane des Mucintyps sowie das Sialyl-Tn und Sialyl-T-Antigen. Außerdem ist ein O-GlcNAc Glykan abgebildet, das nicht durch weitere Zuckerreste erweitert wird und ein O-gebundener Mannoserest, der bei O-mannosylierten Proteinen zu finden ist. Eine Übersicht der Zuckersymbole befindet sich im Abkürzungsverzeichnis. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt (basierend auf [29], [33]).

### 3.1.2.1 O-Glykosylierung des Mucintyps

Die Verknüpfung eines O-GalNAc Glykans mit einem Ser- oder Thr-Rest wird als O-Glykosylierung des Mucintyps bezeichnet und verdankt ihren Namen den Mucinen, da sie bei diesen Glykoproteinen besonders häufig vorkommt. Mucine sind der Hauptbestand von Schleimstoffen und können durch die vielen angehefteten Glykanketten eine große Menge Wasser binden. Beim Menschen kann man sie in Knorpelgewebe, den Atemwegen und auf den Schleimhäuten des Gastrointestinaltrakts oder des Mundes finden, wo sie vor allem eine Transport- und Schutzfunktion ausüben [32], [34]. O-GalNAc Glykane findet man aber auch auf anderen Proteinen, vor allem solche, die sekretiert werden oder membranständig sind [29], [34]. Die GalNAc-Moleküle werden im Golgi-Apparat posttranslational mit dem Protein verknüpft und können in den verschiedenen Bereichen des Golgi durch die Addition von weiteren GalNAc-, GlcNAc-, Gal-, Fuc- oder Sia-Resten erweitert werden [29], [31]. Abhängig davon, wie das initial übertragene GalNAc weiter verknüpft wird, unterscheidet man hauptsächlich zwischen vier Core-Strukturen (Core-1-4) des Mucintyps. Beim Core-1 Typ wird ein Gal-Rest durch eine  $\beta$ -1,3 Bindung mit GalNAc verknüpft. Wird dieses Glykan durch einen  $\beta$ -1,6 gebundenen GlcNAc-Rest erweitert, entsteht der Core-2 Typ. Alternativ kann das initial gebundene GalNAc auch durch eine  $\beta$ -1,3 Bindung mit einem GlcNAc-Rest verbunden werden, wodurch die Core-3 Struktur entsteht. Diese dient als Basis für die Bildung von Core-4, bei dem ein weiterer GlcNAc Rest über eine  $\beta$ -1,6 an GalNAc gebunden wird. Die verschiedenen Core-Strukturen können anschließend durch weitere Zuckermoleküle erweitert werden, sodass lineare oder verzweigte Glykane entstehen. Dabei werden allerdings ausschließlich die Zuckerreste GalNAc, GlcNAc, Gal, Fuc und Sia verwendet. Das O-gebundene GalNAc Glykan sowie Core-1 Strukturen können auch direkt durch die Sialyltransferasen mit einem Sia-Rest in  $\alpha$ -1,3 oder  $\alpha$ -1,6 Bindung versehen werden, wodurch die sogenannten Sialyl-T- bzw. Sialyl-Tn-Antigene entstehen [29] (siehe Abbildung 3).

### 3.1.2.2 O-Mannosylierung

Bei einem weiteren Typ der O-Glykosylierung, der O-Mannosylierung, wird initial ein Mannose-Rest an Ser oder Thr des Proteins gebunden (siehe Abbildung 3). Dieser Prozess findet im ER statt, wo die verantwortlichen O-Mannosyltransferasen Dol-P-Man als Substrat verwenden [31]. Bei Säugetieren sind nur wenige Proteine O-mannosyliert, darunter verschiedene Cadherine und Procadherine, die für Zell-Zell-Adhäsion benötigt werden und  $\alpha$ -Dystroglykan ( $\alpha$ -DG), welches eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Extrazellulären Matrix (ECM) herstellt. Die O-Mannosylierung von Cadherinen und Procadherinen wird durch die O-Mannosyltransferasen TMTC1-4 katalysiert, wobei das Glykan nicht durch weitere Zuckermoleküle verlängert wird. Dagegen sind die O-Man Glykane von  $\alpha$ -DG komplex aufgebaut, die Übertragung der Zucker-Reste beruht initial auf dem Proteinkomplex POMT1/2 und kann anschließend durch weitere Transferasen erweitert werden [9], [35], [36].

Eine verringerte Aktivität der Proteine, die für den Aufbau der O-Man Glykane von  $\alpha$ -DG verantwortlich sind, steht im Zusammenhang mit genetisch bedingten Muskelerkrankungen, die als  $\alpha$ -Dystroglykanopathien bezeichnet werden. Ursache des Krankheitsbildes ist eine unzureichende O-Mannosylierung von  $\alpha$ -DG, was dazu führt, dass dessen Bindung mit Dystrophin in den Muskelzellen und der ECM verhindert wird [9], [35], [36].

### 3.1.2.3 O-GlcNAcylierung

Eine besondere Form der O-Glykosylierung ist die O-GlcNAcylierung. Sie beschreibt einen dynamischen Prozess, der im Cytosol, Nukleus und den Mitochondrien stattfindet und bei dem ein einzelner GlcNAc-Rest O-glykosidisch auf ein Protein übertragen wird (siehe Abbildung 3). Diese Art der O-Glykosylierung kommt vor allem bei cytosolischen, mitochondrialen und nuklearen Glykoproteinen vor, statt bei sekretierten oder membranständigen Proteinen wie es beim Mucintyp der Fall ist. Ein weiterer Unterschied zu den O-GalNAc Glykanen des Mucintyps ist, dass das O-gebundene GlcNAc nicht durch weitere Zuckermoleküle erweitert wird. Die O-GlcNAcylierung wird von den beiden Enzymklassen O-GlcNAc Transferasen (OGTs), die UDP-GlcNAc als Substrat verwenden, und O-GlcNAcasen (OGAs), die das gebundene O-GlcNAc wieder vom Protein abspalten, reguliert. Die OGT-Aktivität hängt dabei stark mit der Verfügbarkeit des Substrates UDP-GlcNAc, das im Zuge des Hexosamin-Biosynthesewegs gebildet wird (siehe 3.2), zusammen und ist somit abhängig vom metabolischen Status der Zelle bzw. der Nährstoffverfügbarkeit [9], [31], [37]. Die O-GlcNAcylierung ist eine sehr wichtige Proteinmodifikation, da sie Einfluss auf viele fundamentale zelluläre Funktionen nehmen kann. Beispielsweise kann sie die Funktionalität von Proteinen, die mitochondriale Aktivität, die Signalweiterleitung sowie die Transkription regulieren. Letzteres wird durch die O-GlcNAc-Modifizierung von Transkriptionsfaktoren und Polymerasen erreicht und auch die Bildung des transkriptionalen Präinitiationskomplexes hängt von der korrekten O-GlcNAcylierung der RNA-Polymerase II ab. Außerdem ist O-GlcNAc auf Histonen zu finden und spielt eine Rolle bei der Regulation der DNA-Methylierung, wodurch ebenfalls die Genexpression beeinflusst werden kann. Der molekulare Mechanismus, der hinter dem Zusammenhang der O-GlcNAcylierung und der Genexpression steckt, ist bisher allerdings nicht vollständig verstanden [38], [39].

### 3.1.3 C-Mannosylierung

Die C-Mannosylierung ist eine seltene und noch nicht so weitreichend erforschte Art der Glykosylierung, bei der ein einzelner Mannose-Rest auf ein Protein übertragen wird. Dabei wird keine funktionale Gruppe einer Aminosäure benötigt, sondern die Bindung erfolgt C-glykosidisch zwischen einem Kohlenstoffatom (C) des Mannose-Restes und eines C-Atoms des Indolrings eines Tryptophans (Trp). Der Prozess findet im ER-Lumen statt, wobei dolicholgebundene Mannose (Dol-P-Man) als Donorsubstrat verwendet wird. Die auf ein Protein übertragene Mannose wird weder im ER, noch im Golgi-Apparat durch weitere Zuckerbindungen ergänzt [40], [41]. Die Konsensussequenz, die für eine erfolgreiche C-Mannosylierung benötigt wird, wurde als Trp-X-X-Trp/Cys identifiziert, wobei der erste Tryptophan-Rest durch die C-Mannosyltransferasen DPY19L1 und DPY19L3 glykosyliert wird [42]. Die C-Mannosylierung kommt vor allem bei sekretierten und membrangebundenen Proteinen vor, weshalb angenommen wird, dass diese Modifikation für die Faltung und Sekretion der Proteine von Bedeutung ist. Die Konsensussequenz kommt bei Thrombospondin-Repeats (TSR) besonders häufig vor, weshalb vor allem Proteine mit dieser Domäne C-mannosyliert werden. Dazu gehören beispielsweise auch die sekretierten Proteine ADAMTS13, eine Metalloprotease, und Properdin, das Teil des Komplementsystems ist [43].



Als zweiter Schritt wird Glucosamine-6-Phosphat unter Verwendung von Acetyl-CoA durch das Enzym GNPAT1 in GlcNAc-6-Phosphat konvertiert, woraufhin dieses durch PGM3 in GlcNAc-1-Phosphat umgewandelt wird. Der letzte Schritt erfolgt durch das Enzym UAP1, das aus GlcNAc-1-Phosphat und UTP das finale Produkt UDP-GlcNAc entstehen lässt [44]. Zum anderen kann UDP-GlcNAc aber auch durch Epimerisierung von UDP-Glucose oder UDP-GalNAc durch die Epimerase GALE gebildet werden. Außerdem kann UDP-GlcNAc auch durch die Wiederverwendung von GlcNAc-Molekülen, die nach dem lysosomalen Abbau von Glykokonjugaten durch die Kinase NAGK wieder phosphoryliert werden, hergestellt werden („Salvage Pathway“) [45].

UDP-GlcNAc wird als Vorläufer für die Produktion von CMP-Sia benötigt. Um letzteres zu bilden, wird UDP-GlcNAc zunächst durch die Epimerase GNE in ManNAc und anschließend in ManNAc-6-Phosphat umgewandelt. Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Sialinsäure-Synthese, da die Aktivität von GNE von dem Endprodukt CMP-Sia inhibiert wird. ManNAc-6-Phosphat wird als nächstes durch die Enzyme NANS und NANP über Neu5Ac-9-Phosphat zu Neu5Ac konvertiert. Der finale Schritt der CMP-Sia Synthese erfolgt im Nukleus, wo Neu5Ac durch CMAS mit dem Nukleotid CMP verknüpft wird. Alternativ kann CMP-Sia auch durch einen Salvage Pathway hergestellt werden, indem die Sialinsäure-Moleküle, die durch die Neuraminidasen NEU1-4 in den Lysosomen von Glykokonjugaten abgespalten werden, wiederverwendet und im Nukleus erneut mit CMP aktiviert werden [44].

Um die nukleotidaktivierten Zucker UDP-Glucose, UDP-Galactose und UDP-GalNAc zu bilden, wird Glucose-6-Phosphat durch PGM2 in Glucose-1-Phosphat und anschließend durch das Enzym UGP in UDP-Glc umgewandelt. Dieses kann durch GALE sowohl in UDP-Galactose als auch in UDP-GalNAc epimerisiert werden. UDP-Galactose und UDP-GalNAc können alternativ auch direkt durch die Verwendung freier bzw. recycelter Galactose- oder GalNAc-Molekülen mit anschließender Phosphorylierung und Verknüpfung mit UDP hergestellt werden [17], [46].

Damit das Zuckersubstrat GDP-Mannose bereitgestellt werden kann, muss zunächst Mannose-6-Phosphat gebildet werden. Dieses kann entweder durch die Phosphorylierung von freier Mannose oder durch die Umwandlung von Fructose-6-Phosphat in Mannose-6-Phosphat durch das Enzym MPI generiert werden. Mannose-6-Phosphat wird anschließend durch PMM2 in Mannose-1-Phosphat konvertiert, das durch den Enzymkomplex GMPPA/GMPPB unter Verwendung von GTP in GDP-Mannose umgewandelt wird. GDP-Mannose wird sowohl für den Aufbau von LLOs, als auch als Vorläufer für Dol-P-Man benötigt, das bei verschiedenen Arten der Glykosylierung Verwendung findet [17], [47]. GDP-Mannose kann außerdem dazu verwendet werden, um über mehrere Reaktionsschritte GDP-Fucose herzustellen. Alternativ kann dieser nukleotidaktivierte Zucker aber auch durch die direkte Verwendung von Fucose synthetisiert werden. Dafür wird Fucose durch die Kinase FUK in Fucose-1-Phosphat und danach durch FPGT in GDP-Fucose umgewandelt [48] (siehe Abbildung 4).

Die Bausteine, die vom HB für die Generierung der Nukleotidzucker verwendet werden, stammen von Glucose sowie dem Fettsäure-, Aminosäuren-, und Energiemetabolismus. Da der HB dadurch die Verfügbarkeit aller wichtigen Komponenten des zentralen Energiestoffwechsels erfassen kann, dient er als Sensor für den metabolischen Status der Zellen. Ändert sich die Verfügbarkeit der Nährstoffe, so ändert sich auch der Durchsatz des HB, wodurch allgemeine Prozesse, wie Stressantwort und zelluläres Überleben, aber auch die Glykosylierung und insbesondere die O-GlcNAcylierung direkt beeinflusst werden können. Dadurch kann auch die Funktion von Proteinen und die Signalübertragung verändert werden. Eine Deregulation dieses Signalweges kann demnach weitreichende Folgen für die zelluläre Homöostase haben und spielt auch bei Krankheiten wie Diabetes und Krebs eine Rolle [49]–[52]. Auch die Beeinträchtigung der am HB beteiligten Enzyme kann Auswirkungen auf den Metabolismus und damit auf die Gesundheit haben. So ist beispielsweise bei der häufigsten Form der Glykosylierungsdefekte („Congenital Disorders of Glycosylation“, CDG), PMM2-CDG, eine genetische Beeinträchtigung des PMM2-Enzyms krankheitsverursachend [53].

### 3.3 Die SLC35 Transporterfamilie

Die nukleotidaktivierten Zucker, die für die verschiedenen Glykosylierungsprozesse im ER und Golgi-Apparat benötigt werden, werden durch spezielle Transporterproteine in den Membranen vom Cytosol in das jeweilige Kompartiment transportiert, da sie durch ihren hydrophilen Charakter nicht durch Membranen diffundieren können [54]. Die verschiedenen Nukleotidzuckertransporter gehören zur Familie der SLC35 Proteine („solute carrier family 35“). Diese hochkonservierten Transporter sind durch ihre sechs bis zehn Transmembrandomänen äußerst hydrophob und werden in sieben Unterfamilien unterteilt (SLC35A-G). Alle SLC35 Proteine fungieren als Antiporter indem sie einen nukleotidaktivierten Zucker vom Cytosol ins ER oder Golgi-Lumen transportieren und das entsprechende Nukleotidmonophosphat vom Lumen zurück ins Cytosol abgeben [54]–[56]. Der Transport erfolgt dabei passiv ohne den Verbrauch von ATP [57]. Einige der SLC35 Proteine sind noch nicht vollständig charakterisiert, sodass noch nicht klar ist, welche Zucker sie transportieren oder ob sie auch andere Funktionen neben dem Zuckertransport haben könnten. Es wurde festgestellt, dass die meisten der bekannten SLC35 Transporter Homo- oder Heterodimere bilden oder auch mit Glykosyltransferasen interagieren [54]–[56]. Die bekanntesten Vertreter der SLC35 Proteine sind SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3 und SLC35C1, die auch für den grundlegenden Aufbau von N-Glykanen essenziell sind. Sie sind bekannt dafür, die nukleotidaktivierten Zuckersubstrate CMP-Sia, UDP-Gal, UDP-GlcNAc und GDP-Fuc zu transportieren, wobei die Möglichkeit besteht, dass sie auch weitere Funktionen oder Spezifitäten haben könnten [58]. Schließlich transportieren manche der SLC35 Proteine nicht nur einen bestimmten Nukleotidzucker, sondern können mehrere Zuckersubstrate binden. Die Spezifität scheint dabei eher durch das entsprechende, gekoppelte Nukleotid bestimmt zu werden als durch das Zuckermolekül selbst [59], [60]. Die meisten Proteine der SLC35 Familie transportieren UDP-gekoppelte Zucker und UMP. Eine Ausnahme bilden die Transporter SLC35C1, der GDP-Fucose und GMP transportiert und SLC35A1, der für den Transport von CMP-Sia und CMP verantwortlich ist [56]. Die bisher charakterisierten SLC35 Transporter befinden sich entweder

exklusiv in der Golgi oder der ER Membran, lediglich eine Spleißvariante des SLC35A2 Transporters wurde bisher in der Membran beider Kompartimente lokalisiert [54]. Mutationen in den *SLC35* Genen können zu verschiedenen Formen von CDG führen, bei denen durch das Fehlen der Zuckersubstrate oft ganze Glykangruppen reduziert sind oder komplett fehlen. Dadurch kommt es zu multisystemischen Symptomen wie Hypotonie, wiederkehrende Infekte, Verzögerung der psychomotorischen Entwicklung, verlangsamtes Wachstum und Blutgerinnungsstörungen [61].

### 3.3.1 Der CMP-Sialinsäure Transporter SLC35A1

Als SLC35A1 wird das Transporterprotein bezeichnet, das den nukleotidaktivierten Zucker CMP-Sialinsäure vom Cytosol ins Golgi-Lumen importiert und freies CMP aus dem Golgi ins Cytosol exportiert. Es stellt damit das Substrat für Sialyltransferasen im Golgi-Apparat, die Glykane mit Sialinsäureresten versehen, bereit. Das *SLC35A1* Gen besteht aus acht Exons, die für das SLC35A1-Protein mit seinen 337 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 37 kDa kodieren [62]. *SLC35A1* wird in allen Zelltypen ubiquitär exprimiert, wobei sich die intrazelluläre Lokalisation exklusiv auf den Golgi-Apparat und hier hauptsächlich auf den medial- und trans-Golgi beschränkt [61]. Der Transporter ist mit 10 Transmembrandomänen (TMDs) in der Golgi-Membran verankert, wobei der N- und C-Terminus auf der cytosolischen Seite liegen [63] (siehe Abbildung 5).

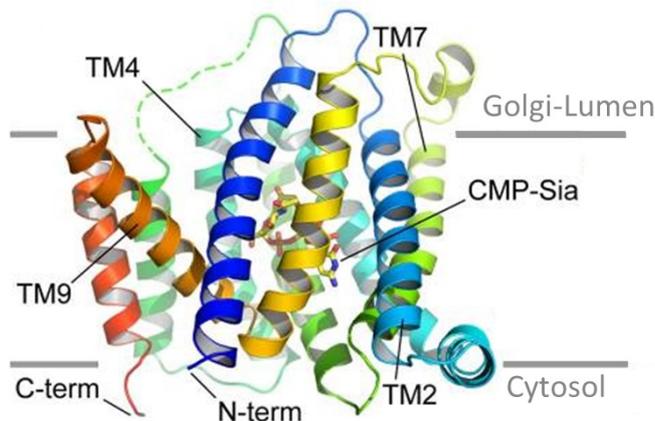


Abbildung 5: Struktur des murinen SLC35A1-Proteins im Komplex mit CMP-Sialinsäure. Markiert sind Transmembrandomänen (TM), der C- und N-Terminus (C-term, N-term) und das gebundene Substrat CMP-Sialinsäure (CMP-Sia). Abbildung verändert und angepasst nach Ahuja *et al.* [56].

In HEK293T-Zellen wurde festgestellt, dass der SLC35A1-Transporter *in vivo* Homodimere bilden kann, weshalb angenommen wird, dass eine Dimerisierung, die vermutlich über die TMDs 5 und 10 stattfindet, für die Funktionalität wichtig sein könnte [54], [64]. Aoki *et al.* fanden durch Experimente mit chimären Transporterproteinen heraus, dass die TMD 2 und 3 des SLC35A1-Proteins für den erfolgreichen Zuckertransport essenziell sind. Die Aminosäuren der TMD 7 sind dagegen für die Spezifität verantwortlich [65]. Besonders Tyr<sup>214</sup> und Ser<sup>216</sup> wurden als wichtige Bindungsstellen für den Sialinsäurerest des Substrats CMP-Sia identifiziert [55], [56]. Durch kristallographische Untersuchungen, die auf dem Maus-Homolog des Proteins basierten (91 % identisch zum humanen Protein), wurden zudem herausgefunden, dass einige konservierte Glycin-Reste in den TMDs 5-8 einen hydrophilen Kanal für die Freisetzung des Zuckersubstrates ins Golgi-Lumen bilden (Gly<sup>153</sup>, Gly<sup>154</sup>, Gly<sup>177</sup>, Gly<sup>179</sup>, Gly<sup>192</sup>, Gly<sup>256</sup>, Gly<sup>257</sup>). Wurden diese wichtigen

Aminosäuren verändert, kam es zu einer drastischen Verringerung der Transporteraktivität [57], [66]. Wie bereits in 3.3 erwähnt, scheint der Nukleotidanteil der Zucker eine große Rolle bei der Substratbindung zu spielen. Auch bei SLC35A1 kommt es zu deutlich weniger Interaktionen zwischen dem Protein und dem Sialinsäurerest als dem CMP-Anteil. Es wurde beobachtet, dass Sialinsäure allein nicht vom Maus-Homolog gebunden werden kann, im Gegensatz zu CMP und CMP-Sia [56]. Da hauptsächlich das gekoppelte Nukleotid vom Transporter erkannt wird, wurde vermutet, dass das Protein möglicherweise auch weitere Substrate binden könnte. Ury *et al.* fanden erst kürzlich heraus, dass SLC35A1 zwar vermutlich in erster Linie CMP-Sia transportiert, aber auch in der Lage ist, CDP-Ribitol ins Golgi-Lumen zu importieren. Dieser Zucker wird zudem von einem weiteren Mitglied der SLC35-Proteinfamilie, SLC35A4, transportiert [60]. Die essenzielle Rolle des SLC35A1-Proteins für die Sialylierung von N-Glykanen wurde anhand von mutierten CHO-Lec2 Zellen gezeigt, denen das Transporterprotein fehlte und bei denen daraufhin eine signifikante Verringerung von sialylierten Glykoproteinen festgestellt wurde [57]. Da freies CMP im Golgi-Lumen für eine Inhibierung der Sialyltransferasen sorgt, ist der rasche Export dieses Nukleotidmonophosphats ins Cytosol wichtig, um die optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten [61]. Kommt es durch Mutationen im *SLC35A1*-Gen zu einem defekten Transporterprotein, so führt dies zu der sehr seltenen, genetischen Erkrankung SLC35A1-CDG (siehe 3.5.1).

### 3.4 Die Funktionen der Sialylierung

Der Begriff “Sialinsäure” fasst eine Gruppe von etwa 40 verschiedenen Zuckerstrukturen zusammen, die jeweils aus einer Kette mit neun Kohlenstoffatomen bestehen. Allen gemeinsam ist, dass sie Derivate des Zuckers Neuraminsäure sind. Die beim Menschen am häufigsten vorkommende Sialinsäure, die auch bei der Glykosylierung von Bedeutung ist, ist die 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) [67], [68], die daher in dieser Arbeit allgemein als Sialinsäure (Sia) bezeichnet wird und auf deren Funktion in diesem Abschnitt eingegangen wird. Beim Glykosylierungsprozess wird die aktivierte Form von Sialinsäure, CMP-Sia, die durch den Hexosamin-Biosynthesewegs bereitgestellt wird (siehe 3.2), von spezialisierten Sialyltransferasen meist als terminaler Zuckerrest eines Glykans verknüpft [44]. Aufgrund dieser endständigen Position und ihrer negativen Ladung wird davon ausgegangen, dass Sialinsäurereste für die Stabilität der Glykoproteine eine Rolle spielen, indem sie sie vor Proteasen schützen [68]. Besonders sekretierte und membranständige Glykoproteine oder -lipide tragen endständige Sialinsäurereste, die für zelluläre Interaktionen und Kommunikation, Regulationen sowie Adhensions- und immunologische Prozesse von Bedeutung sind [59], [69], [70].

Die essenzielle Funktion der Sialylierung für die Entwicklung wurde durch Knock-out Experimente bei Mäusen von Schwarzkopf *et al.* verdeutlicht, bei denen das Schlüsselenzym der CMP-Sialinsäuresynthese *GNE* ausgeschaltet wurde, was einen embryonal letalen Phänotyp zur Folge hatte [71]. Für die Entwicklung von Neuronen und Synapsen im Gehirn ist ebenfalls die Modifikation mit Sialinsäure, in diesem Fall der selteneren Polysialylierung, bei der ein Homopolymer mit bis zu 100 Sialinsäureresten gebildet wird, wichtig [72].

Eine weitere wichtige Funktion von Sialinsäureresten ist deren Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen, die als Selektine bezeichnet werden. Diese werden vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert und erkennen sialylierte oder fucosylierte Strukturen. Durch die Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen gelangen die Leukozyten an ihren Einsatzort: Sie tragen das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis x (Sialyl-Le<sup>x</sup>) auf ihrer Oberfläche, welches als Selektinligand agiert. Durch die Bindung wird ihre Bewegung in den Blutgefäßen verlangsamt und sie können in das umliegende Gewebe eindringen [31], [73]. Allerdings nutzen auch Krebszellen diesen Mechanismus, wodurch die Bildung von Metastasen begünstigt wird. Entsprechend wurde festgestellt, dass Krebszellen eine erhöhte Anzahl an Sialyl-Le<sup>x</sup>-Antigenen exprimieren und dass die Menge der Sialinsäurereste auf ihrer Oberfläche mit der Malignität korreliert [31], [70], [73].

Auch für die Immunantwort ist eine korrekte Sialylierung von Bedeutung. Beispielsweise kann ein IgG-Antikörper unterschiedliche Funktion haben, abhängig von dessen Glykosylierung. Der entzündungsfördernde oder -hemmende Effekt wird dabei durch N-Glykane ohne Galaktose bzw. mit Sialinsäure bestimmt [31]. Außerdem interagieren auch B-Zellen mit Liganden über  $\alpha$ -2,6 gekoppelte Sialinsäurereste, was eine Rolle bei deren Aktivierung spielt [74].

Die endständigen Sialinsäurereste auf der Oberfläche von Zellen können auch von Pathogenen als Interaktionspartner ausgenutzt werden. Dies ist besonders bei Viren der Fall, z.B. bindet der Influenzavirus als ersten Schritt der Infektion an  $\alpha$ -2,6 gekoppelte Sialinsäurereste, die auf den Epithelzellen der Atemwege von Menschen besonders häufig vorkommen [75]. Das Bakterium *Vibrio cholerae*, der Erreger der Darmerkrankung Cholera, dagegen trägt im Genom das Gen für eine Sialidase, die Sialinsäurereste von der Zelloberfläche entfernt. Dadurch kann das Cholera-toxin an seinen Rezeptor binden und die Krankheit wird ausgelöst [76].

Da die Sialylierung bei der Infektion mit vielen Pathogenen eine Rolle spielt und auch bei Krebszellen verändert ist, wird als mögliche Behandlungsform eine Regulation dieses Prozesses untersucht. Dabei konzentrieren sich die Studien nicht nur auf die Sialyltransferasen, sondern auch der CMP-Sialinsäuretransporter SLC35A1 könnte ein nützliches Ziel für Glycoengineering sein, da die Sialylierung generell auch auf Ebene der Substratverfügbarkeit reguliert werden könnte [59], [70].

### 3.5 Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)

Wie bereits beschrieben, ist die Glykosylierung ein essenzieller Prozess, der durch die korrekte Anheftung von Zuckerstrukturen die Funktionalität von Proteinen und Lipiden gewährleistet. Kommt es bei diesem Prozess zu Problemen, indem eines der verantwortlichen Proteine nicht richtig funktioniert, kann es zu metabolischen Störungen kommen, die als „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) bezeichnet werden. Darunter versteht man eine Gruppe seltener, genetischer Erkrankungen, die durch Glykosylierungsdefekte hervorgerufen werden. CDG entsteht dabei durch monogenetische Mutationen, die die Proteine der verschiedenen Glykosylierungsprozesse beeinträchtigen und meist autosomal-rezessiv vererbt werden [77].

Die verschiedenen CDG-Typen werden nach dem betroffenen Gen, dem die Abkürzung -CDG angehängt wird, benannt. Die Defekte der N-Glykosylierung werden zusätzlich in zwei verschiedene Gruppen geteilt: Die frühen Glykosylierungsdefekte, welche die LLO-Synthese und den Transfer des Oligosaccharids auf das Protein betreffen, werden als Typ I CDG bezeichnet (CDG-I) und die späten Defekte, bei denen die Prozessierung der N-Glykane im ER und Golgi-Apparat betroffen ist, werden Typ II CDG genannt (CDG-II) [21], [78]. Erstmals beschrieben wurde CDG 1980 von Jaeken *et al.*, die einen Defekt der Phosphomannomutase 2 (PMM2-CDG) entdeckt hatten [79]. Dieser CDG-Typ ist mit etwa 62 % aller CDG-Patienten in Europa nach wie vor der häufigste [80]. Die Zahl der Glykosylierungsdefekte ist seit der Entdeckung aber deutlich angestiegen und umfasst aktuell etwa 170 verschiedene CDG-Typen und beinhalten sowohl Defekte der N- und O-Glykosylierung aber auch der GPI-Anker Synthese und der Glykosylierung von Lipiden [81].

Da eine korrekte Glykosylierung von Proteinen und Lipiden für alle Bereiche der (embryonalen) Entwicklung wie Zellwachstum und -differenzierung sowie die Organentwicklung benötigt wird, kann ein Glykosylierungsdefekt weitreichende Auswirkungen und auch einen vorzeitigen Tod zur Folge haben. Meist zeigen die betroffenen Patienten einen multisystemischen Phänotyp, da schon die ursprüngliche Entwicklung vieler Organe, wie das Gehirn, die Leber, der Verdauungstrakt, die Augen und auch das hämatologische System sowie das Immunsystem beeinträchtigt werden. Die Symptome von CDG-Patienten sind sehr divers und können sich abhängig von dem betroffenen Gen, aber auch innerhalb der Patienten unterscheiden, je nachdem wie schwer der jeweilige Patient betroffen ist. Der Schweregrad der Erkrankung kann von sehr schwer mit pränatalem Tod bis zu milden Formen reichen, bei denen die Patienten das Erwachsenenalter erreichen. Die Symptome von CDG-Patienten beinhalten allgemein meist neurologische Defizite und eine verzögerte Entwicklung, aber auch Symptome wie Mikrozephalie, Epilepsie, Hypotonie, Hepatosplenomegalie, Strabismus, Dysmorphien, Gedeihstörung, Gerinnungsstörungen, Darmerkrankungen, invertierte Mamillen und dislozierte Fettpolster sind häufig [77], [80], [82], [83].

Die vielfältigen Symptome und phänotypische Heterogenität der CDG-Patienten machen es schwierig einen Glykosylierungsdefekt direkt zu erkennen. Um Auffälligkeiten in der Proteinglykosylierung zu identifizieren und CDG zu diagnostizieren, werden daher molekularbiologische Methoden eingesetzt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) des Serumproteins Transferrin war dabei lange Zeit der Goldstandard, wird inzwischen aber nicht mehr so häufig angewendet. Bei der IEF werden die verschiedenen Glykoformen eines Proteins anhand ihres isoelektrischen Punkts in einem Gel mit pH-Gradient elektrophoretisch aufgetrennt. Die Glykoformen wandern im Gel nicht mehr weiter, wenn sie den pH-Wert im Gel erreicht haben, an dem die Ladung des Moleküls Null beträgt (= isoelektrischer Punkt). Sialinsäurereste sind negativ geladen, weshalb deren Anzahl den isoelektrischen Punkt der Glykoformen eines Proteins und damit das Bandenmuster im Gel bestimmt [84], [85]. Transferrin trägt zwei biantennäre N-Glykane des Komplextyps mit terminalen Sialinsäureresten [86]. Daher können bei der IEF fünf Glykoformen des Proteins unterschieden werden: Die vollständig glykosylierte Form mit vier Sialinsäureresten, genannt „tetrasialo“, die Glykoformen mit reduzierter Anzahl an terminaler

Sialinsäure „tri-, di- und monosialo“ sowie die Glykoform ohne Sialinsäurereste „asialo“. Das spezifische Bandenmuster, das dabei entsteht, kann Aufschluss darüber geben, ob bei Patienten ein N-Glykosylierungsdefekt vorliegt und ob dieser dem CDG-I oder CDG-II Typ angehört [84], [85]. Bei CDG-I Patienten können bei der IEF von Transferrin eine geringere Menge der Tetrasialo- bei gleichzeitiger Erhöhung der Di- und Asialoglykoformen festgestellt werden, weil bei einem frühen Defekt die Bereitstellung des Oligosaccharids oder die Übertragung auf das Protein beeinträchtigt ist, wodurch komplette Glykanstrukturen fehlen. Bei CDG-II sind oftmals auch Monosialo und Trisialobanden zu erkennen, da bei einem späten Defekt die Prozessierung der Glykane im ER bzw. Golgi beeinträchtigt ist. Hierdurch sind eher verkürzte Strukturen statt komplett fehlender Glykanbäume zu beobachten [87], [88]. Weitere Proteine, die durch das Bandenmuster ihrer Glykoformen bei der IEF einen Hinweis auf Glykosylierungsdefekte geben können, sind beispielsweise  $\alpha$ 1-Antitrypsin und Apolipoprotein C-III (ApoCIII). Letzteres wird für die Diagnostik von O-Glykosylierungsdefekten verwendet, da es ein O-Glykan des Core-1 Mucintyps mit zwei Sialinsäureresten trägt [89], [90]. Demnach kann ein verändertes Bandenmuster der Glykoformen dieses Proteins auf einen O-Glykosylierungsdefekt hindeuten. Neben einer IEF können auch andere Methoden für die Untersuchung der Transferrin-Glykoformen verwendet werden, wie beispielsweise Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS) [91]–[93].

Die Verteilung der Transferrin-Glykoformen kann allerdings bei einigen CDG-Typen, wie z.B. solchen, die die Fucosylierung betreffen, normal ausfallen, was den Nachweis eines Glykosylierungsdefekts erschwert [94], [95]. Neuere Methoden, die für die Diagnostik von CDG eingesetzt werden, setzen daher eher auf die ganzheitliche Analyse der verschiedenen Zuckerketten im Serum oder Zelllysate - es werden also alle Glykane und nicht nur die, eines einzelnen Proteins untersucht. Die Analyse dieses spezifischen „Glykoprofiles“ erfolgt meist massenspektrometrisch. Um die Glykane von ihren Proteinen abzuspalten, werden die Proben zunächst enzymatisch behandelt und schließlich anhand ihrer Masse bestimmt. Dadurch können Auffälligkeiten im Aufbau einzelner Glykane, deren Verteilung oder auch Veränderungen der Verhältnisse der unterschiedlichen Glykantypen festgestellt werden [95]–[97].

Als Therapie für Patienten mit Glykosylierungsdefekten gibt es bisher nicht viele Optionen. Bei einigen CDG-Typen kann die Supplementierung mit spezifischen Monosacchariden zu einer Verbesserung der Symptome führen, indem das Produkt des betroffenen Enzyms mit der Nahrung zugeführt wird und so der normale Ablauf des Glykosylierungsprozesses teilweise wiederhergestellt werden kann. Beispiele hierfür sind MPI-CDG, das durch die Supplementierung von Mannose behandelt werden kann, GFUS-CDG, bei dem die Therapie mit Fucose zu einer Verbesserung führt oder SLC35A2- und PGM1-CDG, bei denen Galactose verabreicht werden kann [98]–[100]. An weiteren Therapiemöglichkeiten, wie die Neuverwendung von Arzneimitteln, die bisher für andere Krankheiten verwendet wurden [101]–[103], pharmakologischen Chaperonen, welche die Faltung und Stabilität der mutierten Proteine verbessern sollen [104], oder Gentherapie [99], [105] wird aktuell geforscht.

### 3.5.1 SLC35A1-CDG

SLC35A1-CDG ist eine Glykosylierungsstörung, die durch einen defekten SLC35A1-Transporter hervorgerufen wird, der CMP-Sialinsäure in den Golgi-Apparat transportiert (siehe 3.3.1). Nach der früheren Nomenklatur wurde dieser Defekt als CDG-IIif bezeichnet. Bisher wurden lediglich fünf Patienten, darunter ein Geschwisterpärchen, mit dieser sehr seltenen Form von CDG diagnostiziert.

Der erste SLC35A1-CDG Fall wurde von Martinez-Duncker *et al.* im Jahr 2005 beschrieben. Der zum Untersuchungszeitpunkt vier Monate alte Patient (Patient 1) hatte eine komplexe Kombination an Mutationen auf beiden Allelen des *SLC35A1* Gens: Das paternale Allel zeigte zwei Mikrodeletionen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens („Frameshift“) und frühzeitigem Stopp-Codon führten, das maternale Allel hatte eine Deletion von 130 Basenpaaren (bp) in Exon 6, was ebenfalls zu einem verfrühten Stopp-Codon führte (c.277\_280delGTGCinsTG, p.Val93Cysfs\*17; c.752-158\_752-157insCACT, p.Val208Phefs\*20). Durch Untersuchungen der Mutationen in CHO-Lec2 Zellen wurde angenommen, dass die beiden Varianten nicht funktional waren. Außerdem wurde im maternalen Allel eine Insertion von vier bp festgestellt, wodurch vermutet wurde, dass eine neue Spleißstelle entstanden sein könnte [106], [107]. Allerdings wurde im Rahmen einer späteren Publikation festgestellt, dass die verschiedenen Spleißvarianten auch in Zellen ohne die besagte Mutation vorkommen [62]. Die Mutationen im *SLC35A1* Gen führten bei dem Patienten zu einem multisystemischen Phänotyp mit einer unzureichenden Sialylierung. Der Patient zeigte Symptome wie eine verlängerte Blutungszeit und Einblutungen der Haut aufgrund einer schweren (Makro-)Thrombozytopenie, zudem Neutropenie, das vollständige Fehlen des Sialyl-Le<sup>x</sup> Antigens, akutes Atemnotsyndrom und opportunistische Infektionen (vor allem der Atemwege). Obwohl sialylierte Strukturen wie das Sialyl-Le<sup>x</sup> Antigen eindeutig reduziert waren, ergab die Untersuchung von Transferrin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin mittels IEF überraschenderweise ein normales Bandenmuster, wohingegen ApoCIII ein leicht auffälliges Muster durch verringerte Sialylierung zeigte. Der Patient starb nach einer Knochenmarkstransplantation im Alter von 37 Monaten aufgrund einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion sowie einer pulmonalen Virusinfektion, massiven pulmonalen Blutungen und Atemversagen [106]–[108].

Die zweite SLC35A1-CDG Patientin (Patient 2) wurde 2013 von Mohamed *et al.* beschrieben. Bei dieser wurde eine homozygote Missense-Mutation im *SLC35A1* Gen festgestellt (c.303G>C), die zu einem Aminosäureaustausch von dem hoch konservierten Glutamin an Position 101 zu Histidin (p.Gln101His) führte. Bei den Eltern der Patientin lag die Mutation jeweils heterozygot vor. Das mutierte Protein lokalisierte zwar normal im Golgi-Apparat und war noch funktional, aber es konnte eine Verringerung der Aktivität um 50 % festgestellt werden. Die Patientin zeigte neben geistiger Behinderung, Mikrozephalie, epileptischen Anfällen und Ataxie ebenfalls eine vorliegende Makrothrombozytopenie sowie Probleme mit Nieren und Herz und allgemein eine abnormale Sialylierung der N- und O-Glykane. Die Serum-Glykosylierungsmarkerproteine Transferrin und ApoCIII zeigten auffällige Bandenmuster, was für einen Glykosylierungs- und Sialyierungsdefekt sprach [109]. Die Position der betroffenen Aminosäure befindet sich in TMD 3 des Proteins unweit des aktiven Zentrums. Die Histidin-Seitenkette an dieser Position könnte

daher eine effektive Substratbindung behindern [55]. Außerdem wurde in einer späteren Studie festgestellt, dass das mutierte Protein nicht in der Lage war Dimere in der Golgi-Membran lebender Zellen zu bilden [54].

Der dritte SLC35A1-CDG Fall wurde 2017 von Ng *et al.* beschrieben. Die zum Publikationszeitpunkt 12 Jahre alte Patientin (Patient 3) zeigte einen schweren neurologischen Phänotyp mit Enzephalopathie, Krampfanfällen, Entwicklungsverzögerung, leichte Ataxie, Nystagmus und autistischen Zügen. Außerdem wurde muskuläre Hypotonie festgestellt und sie entwickelte eine thorakolumbale Skoliose. Im Gegensatz zu den bisher bekannten SLC35A1-CDG Fällen zeigte sie aber keine Probleme mit der Blutgerinnung oder wiederkehrenden Infektionen. Die Untersuchung des Serumproteins Transferrin deutete durch ein auffälliges Bandenmuster mit erhöhter Di- und Trisialobande auf einen CDG-II Defekt hin [72]. Allgemein wurde eine Verringerung von sialylierten N- und O-Glykanen sowie ein auf ca. 11 % reduzierter CMP-Sia Transport festgestellt [55], [72]. Die mittels Exom-Sequenzierung identifizierten, compound heterozygoten Missense-Mutationen betrafen die TMD 5 und 6 des Proteins (c. 467C>G, p. Thr156Arg; c.586G>A, p.Glu196Lys) [72]. In einer späteren Publikation wurde außerdem festgestellt, dass die Thr156Arg Variante nicht mehr in der Lage war zu dimerisieren, was zu der stark verminderten Aktivität beitragen könnte [54].

Der letzte bisher bekannte SLC35A1-CDG Fall, der im Jahr 2018 von Kauskot *et al.* publiziert wurde, betraf ein Geschwisterpärchen (Patient 4 + 5), die beide die gleiche homozygote c.439T>C Mutation im *SLC35A1* Gen trugen, welche zu einem Aminosäureaustausch in der TMD 5 des Proteins führte (p.Ser147Pro). Die konsanguinen Eltern waren beide heterozygot für diese Mutation und zeigten eine moderate Makrothrombozytopenie. Die beiden Patienten litten sowohl unter neurologischen Symptomen wie Epilepsie, Ataxie, Mikrozephalie und einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung als auch unter hämorrhagischen Problemen und ebenfalls Makrothrombozytopenie. Die Untersuchung des CDG-Markerproteins Serum Transferrin ergab ein auffälliges Bandenmuster mit erhöhter Tri- und Monosialoglykoform, was auf eine Hyposialylierung schließen ließ. Es wurde außerdem eine deutlich reduzierte Sialylierung der Blutblättchen festgestellt [110]. Eine *in silico* Analyse prognostizierte einen pathogenen Effekt der Mutation, da die Insertion von Prolin im Bereich einer TMD die Aktivität und Stabilität eines Proteins erheblich beeinträchtigen kann [55], [110].

Anhand der bisher beschriebenen SLC35A1-CDG Patienten kann man erkennen, dass es zwar teilweise Gemeinsamkeiten bei den Symptomen gibt, wie beispielsweise Makrothrombozytopenie, Ataxie, Krampfanfälle und Entwicklungsverzögerung, die klinischen Phänotypen aber dennoch sehr verschieden sind. Auch die Untersuchungen der Markerproteine der Routinediagnostik für CDG-Patienten zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. So lag bei einem Patienten ein normales Transferrinbandenmuster der Glykoformen vor, während bei anderen ein auffälliges Muster und ein eindeutiger Sialylierungsdefekt festgestellt werden konnte. Dies macht die Diagnose des SLC35A1-CDG Defekts sehr schwierig.

Eine Behandlung für diesen seltenen CDG-Typ ist bisher nicht bekannt. Es wurde getestet, ob eine Supplementierung von Patientenzellen mit Sialinsäure oder dem Vorläufermolekül ManNAc die reduzierte Sialylierung beheben kann, aber bisher leider ohne Erfolg [72]. Es könnte lediglich möglich sein, spezifische Symptome wie Makrothrombozytopenie zu verbessern, beispielsweise durch eine Knochenmarkstransplantation, wie sie bei Patient 1 durchgeführt wurde, oder durch eine Thrombozytentransfusion [99], [106], [110].

## 4 Zielsetzung

SLC35A1-CDG ist eine sehr seltene Stoffwechselkrankheit, bei der eine Mutation im *SLC35A1*-Gen zu einem Glykosylierungsdefekt führt. Die Glykosylierung gehört zu den wichtigsten co- und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, die für deren physikochemische sowie biologische Eigenschaften essenziell ist. Kommt es aufgrund von genetischen Veränderungen zu einer Beeinträchtigung des Glykosylierungsprozesses, führt diese zu der Erkrankungsgruppe „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) und damit meist zu einem multisystemischen Phänotyp der Patienten. Die bisher nur fünf bekannten SLC35A1-CDG Patienten zeigten eine große Varianz bei den klinischen Symptomen, aber auch bei den molekularen Untersuchungen. Beispielsweise war einer der Patienten zwar sehr schwer betroffen und verstarb im Alter von drei Jahren, zeigte aber keine deutlichen Auffälligkeiten in den Glykosylierungsmustern von Markerproteinen. Bei einem anderen Patienten konnte anhand der Serumproteine ein Glykosylierungsdefekt nachgewiesen werden, aber die Symptome waren weniger schwerwiegend, sodass dieser Patient das Erwachsenenalter erreichte.

Ziel dieser Arbeit ist es, die c.133A>G (p.Thr45Ala) Mutation im *SLC35A1*-Gen einer neuen Patientin zu charakterisieren und herauszufinden, welche Auswirkungen die Mutation auf das SLC35A1-Protein sowie generell den Glykosylierungsprozess hat. Dazu soll zum einen das vorhandene Patientenmaterial, Serum und Fibroblasten, verwendet werden, und zum anderen eine *SLC35A1* Knock-out-Zelllinie generiert werden, um die Mutation unabhängig vom genetischen Hintergrund der Patientin untersuchen zu können. Zusätzlich soll das Material der Patientin durch Anwendung verschiedener biochemischer und molekularbiologischer Methoden dazu verwendet werden, die zugrundeliegenden Stoffwechseldefizite genauer zu betrachten. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen dazu dienen, die Auswirkungen eines defekten SLC35A1-Proteins besser zu verstehen und weiteren Einblick in die Pathomechanismen dieses sehr diversen CDG-Typs geben.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Material der Patientin

Die Eltern stimmten schriftlich einer Nutzung des Materials der Patientin für biochemische, genetische und zellbiologische Analysen zu. Die Forschung an Patientenmaterial wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Serum und die primären Fibroblasten der Patientin wurden vom Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik des Universitätsklinikums in Tübingen bereitgestellt. Die primären Fibroblasten stammten von einer Hautbiopsie, die im Zuge einer Operation entnommen wurde.

#### 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
4-, 6-, 24-well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Blotting Papier 330 g/cm <sup>2</sup>	neoLab, Heidelberg
Deckgläser Stärke Nr. 1, rund, 12 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen 1 ml, 5 ml, 25 ml	Braun, Melsungen
Erlenmeyerkolben 100 ml, 500 ml	Schott, Mainz
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glasflaschen 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
IEF Electrode Strip	Amersham Biosciences, Freiburg
IEF/SDS Strip	Amersham Biosciences, Freiburg
Immersionsöl 518C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen Sterican (steril) 20 G, 22 G	Braun, Melsungen
Kryovials	Nunc, Wiesbaden
Leukotape classic	BSN medical, Hamburg
Microplatte, 96-Well, flacher Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Nitrocellulose Membran Hybond ECL	GE Healthcare, München
Objektträger mit Mattrand	Laborservice Brenzinger, Walldorf
Parafilm	American National, Neenah, USA
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 ("Eppis") 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
Super Polyethylene Vials, 20 ml	PerkinElmer, Waltham, USA
SW-40 Polyallomer Vials	Beckmann-Coulter, Brea USA
Thermo Fast 96-well PCR Platten	Applied Biosystems
Zellkulturflaschen T25, T75, T125	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 60 mm, 100 mm, 150 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zweikammer Zellzähler Slides	Bio-Rad, München

### 5.1.3 Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-Jet Pro	Eppendorf, Hamburg
Acquity UPLC TUV FLR System	Waters, Milford, USA
Autoklav VX-95	Systec, Linden
Blotting-Kammer PerfectBlue Semi-Dry SEDEC M	Peqlab, Erlangen
CFX Connect™ Real-Time PCR Cycler	Biorad, München
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-20A/C	Sanyo, Loughborough, UK
Dounce Homogenisator	Roth, Karlsruhe
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresis Power Supply EPS601	Bioscience, Amersham, UK
Feinwaage XP56	Mettler Toledo, Greifensee, CH
Fluoreszenzmikroskop DMI4000B	Leica Wetzlar

Gefrierschrank -80 °C	Ewald Innovationstechnik, Rodenberg
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr Bulle, CH
Geldokumentation Jet Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer (SDS) Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad, München
GeneAmp® PCR-System 2700	Applied Biosystems, Waltham, USA
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator HTMR-133 HLC	Haep Labor Consult, Bovenden
Kühlschränke 4 °C	Liebherr Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop AE2000	Motic, Carlsbad, USA
Mikrowelle R-233 (W)	Sharp, Osaka, Japan
Millipore GenPure Pro UV-TOC/UF	ThermoFisher, Waltham, USA
NanoDrop™ Lite Spectrophotometer	ThermoFisher, Waltham, USA
nCounter® SPRINT profiler	Nanostring, Seattle, USA
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Photometer SpectraMax Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Rotor SW 40 Ti	Beckman Coulter, Brea, USA
Rotor TLA100.3	Beckman Coulter, Brea, USA
Rotor Typ 45 Ti	Beckman Coulter, Brea, USA
Schüttler Rocky 1100	Labortechnik Fröbe, Lindau
Spülmaschine G7883CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank Klasse 2 SterilGard III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Stromgerät E835	Consort, Turnhout, BEL
T100 Thermal Cycler	Biorad, München
Tischzentrifuge Biofuge Pico	ThermoFisher, Waltham, USA
Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer	PerkinElmer, Waltham, USA
Ultraschall Sonifier 450 Konverter 102C; Becherresonator 101-147-047	Branson, Dietzenbach
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage PH204L Mettler	Mettler Toledo, Greifensee, CH

Wasserbad 1092	GFL, Burgwedel
Westernblot Imaging Fusion SL4	Peqlab, Erlangen
Zellzähler TC20™	Biorad, München
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26S XP	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Optima TLX120	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen

#### 5.1.4 Chemikalien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
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
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat, Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg
EDTA, $\geq$ 99 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Eisen-(III)-Citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
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 %	Appllichem, Darmstadt
Formaldehyd 4 %	Merck Darmstadt
Glycerin, wasserfrei, p.a.	neoLab, Heidelberg
Glycin, $\geq$ 99 %	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O, reinst für HPLC	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
Milchpulver	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
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend 37 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	neoLab, Heidelberg
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TEMED, 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan/Chloroform, $\geq 99\%$ , p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypan Blue Solution	Fluka, Buchs
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Ultima Gold Scintillations-Cocktail	PerkinElmer, Waltham, USA
UltraPure Agarose	ThermoFisher, Waltham

### 5.1.5 Enzyme und Puffer

Tabelle 4: Liste der verwendeten Enzyme, der dazugehörige Puffer und des Herstellers.

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
10 x Puffer R	ThermoFisher, Waltham, USA
10x Puffer O	ThermoFisher, Waltham, USA
CutSmart Puffer	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>EcoRI</i>	ThermoFisher, Waltham, USA
HF-Puffer für Phusion Polymerase (10x)	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>HindIII</i>	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>NotI</i>	New England BioLabs, Frankfurt
O-GlyZOR	Genovis, Lund, Schweden
<i>Pfu</i> turbo Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Phusion Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	ThermoFisher, Waltham, USA
PNGase F (500 U/Vial)	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon Rot
<i>T4</i> -DNA-Ligase	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>T4</i> -DNA-Ligase 10x buffer	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>Taq</i> Puffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10x)	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>XhoI</i>	ThermoFisher, Waltham, USA

## 5.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer und gRNAs mit der angewendeten Methode und Sequenz.

<b>Name</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Sequenz</b>
<i>SLC35A1</i> gRNA4_Fw	CRISPR	caccgggtatagactgcagccatca
<i>SLC35A1</i> gRNA4_Rev	CRISPR	aaactgatggctgcagtctataccc
<i>SLC35A1</i> PCR screen gRNA4_Fw	CRISPR/Sequenzierung	actaagtaatgtctttgttgacag
<i>SLC35A1</i> PCR screen gRNA4_Rev	CRISPR/Sequenzierung	tgttttagcagcatccttggct
pCI_ <i>XbaI</i> _h <i>SLC35A1</i> _Fw	Klonierung	gcgctcgaggccaccatggct
pCI_HA+ <i>HindIII</i> _Rev	Klonierung	ataaagcttttaagcatagctgggacgtc
cDNA_ <i>SLC35A1</i> _F1	Klonierung/Sequenzierung	gcttcgtctctatgaccacaagg
cDNA_ <i>SLC35A1</i> _R1	Klonierung/Sequenzierung	gttccacataaccgcactgatc
cDNA_ <i>SLC35A1</i> _F2	Klonierung/Sequenzierung	atggctgccccgagagacaa
cDNA_ <i>SLC35A1</i> _R2	Klonierung/Sequenzierung	ccttctgagattgacttaaggctct
Mut_ <i>SLC35A1</i> (133G-A)_Fw	Mutagenese/Klonierung	aactctacttttcaaccacagccgtg
Mut_ <i>SLC35A1</i> (133G-A) Rev	Mutagenese/Klonierung	cacggctgtggtgaaaagtagagtt
h <i>SLC35A1</i> _qPCR_F	qPCR	caaccacagccgtgtgtatca
h <i>SLC35A1</i> _qPCR_R	qPCR	tgctaagagctaggaaagccat
h $\beta$ - <i>Actin</i> _qPCR_F	qPCR	agagctacgagctgcctgac
h $\beta$ - <i>Actin</i> _qPCR_R	qPCR	agcactgtgtggcgtacag
h <i>SLC35A1</i> _F3	Sequenzierung	cagcccaagctacaaaagtg
h <i>SLC35A1</i> _R3	Sequenzierung	cactttgttagcttgggctg
h <i>SLC35A1</i> _Ex2_F1	Sequenzierung	cctgaactagaatcagtacgc
h <i>SLC35A1</i> _Ex2_R1	Sequenzierung	gccagtagcatctctcaagt
h <i>SLC35A1</i> _Ex2_F2	Sequenzierung	ggcactccctaggaacaaaa
h <i>SLC35A1</i> _Ex2_R2	Sequenzierung	gttgagaaactgaccag
pSpCas9_Seq_Fw	Sequenzierung	gagggcctatttcccatgat
pSpCas9_Seq_Rev	Sequenzierung	gcatatgatacattgatgtac

## 5.1.7 Kits, Standards und Reagenzien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits, Standards und Reagenzien sowie deren Hersteller.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Abnova™ Lipid (Oil Red O) staining Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
Ampicillin (Amp.)	Calbiochem, Frankfurt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
CMP-[ <sup>14</sup> C]-Neu5Ac (287 mCi/mmol)	GE Healthcare, München
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon Rot
dNTP Mix, 10 mM	ThermoFisher, Waltham, USA
ECL Plus Western Blotting Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford
Fluoromount™	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
GDP-L-[ <sup>14</sup> C]-Fucose (200 mCi/mmol)	GE Healthcare, München
GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
GeneRuler 1 kb/100 bp DNA Ladder	ThermoFisher, Waltham, USA
Genitcin/Neomycin (G418)	Life Technologies, Darmstadt
Human CMP-Sialic Acid Transporter (SLC35A1) ELISA-Kit	Abxexa, Cambridge, UK
NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagenz (Hoechst 33342)	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
peqGold Xchange Plasmid Midi Kit	Peqlab, Erlangen
PerfeCTa SYBR Green SuperMix	Quantabio, Beverly, USA
Phire Animal Tissue Direct PCR Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
Protease Inhibitor Mix cOmplete	Roche Diagnostics, Mannheim
Puromycin	Calbiochem, Frankfurt
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon Rot
RIPA-buffer Pierce™	ThermoFisher, Waltham, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sequa-brene	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
UDP-[ <sup>14</sup> C]-Galaktose (4,7 Ci/mmol)	GE Healthcare, München

## 5.1.8 Puffer

Tabelle 7: Liste der verwendeten Standardpuffer und deren Zusammensetzung.

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Anodenpuffer (Semi-Dry Blot)	20 % Methanol (v/v) 9 g/l Tris/HCl pH 7,4 In H <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer (Semi-Dry Blot)	5,2 g/l 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v) 3 g/l Tris/HCl pH 9,0 In H <sub>2</sub> O
Ladepuffer für DNA-Gelelektrophorese (4x)	40 % Saccharose (w/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v) In H <sub>2</sub> O
Ladepuffer für SDS-PAGE (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 In H <sub>2</sub> O
Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)	30,2 g/l Tris 10 g/l SDS 144 g/l Glycin In H <sub>2</sub> O
Lysepuffer für genomische DNA	50 mM EDTA 50 mM NaCl 100 mM SDS 0,5 % (w/v) Tris/HCl pH 8,0 In H <sub>2</sub> O
PBS (10x)	80 g/l NaCl 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2 g/l KCl 2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> In H <sub>2</sub> O
PBST 0,1 %	0,1 % Tween 20 (v/v) In 1x PBS

---

PFA	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 In H <sub>2</sub> O
Pierce™ RIPA-Puffer	25 mM Tris HCl pH 7,6 150 mM NaCl 1 % NP-40 (v/v) 1 % Natriumdeoxycholat (w/v) 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) In H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	0,1 % SDS (w/v) 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 In H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (50x)	EDTA 100 mM 2M Tris/Acetat pH 8,0 In H <sub>2</sub> O
TBS (10x)	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 30 g/l Tris/HCl pH 8,0 In H <sub>2</sub> O
TBST 0,1 %/ 0,5 %	0,1/0,5 % Tween 20 (v/v) Tris/HCl pH 7,4 In 1x TBS
Trenngelpuffer	0,1 % SDS (w/v) 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 In H <sub>2</sub> O

---

### 5.1.9 Antikörper

Die Primärantikörper wurden im Western Blot mit einer 1:1000 Verdünnung in PBST 0,1 % eingesetzt, außer bei abweichenden Herstellerangaben (siehe Tabelle 8). Die Sekundärantikörper wurden 1:10.000 in PBST 0,1 % verdünnt. Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Primärantikörper 1:400 und die Alexa Fluor-gekoppelten Sekundärantikörper 1:700 in PBS verdünnt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper, der angewendeten Verdünnung und des Herstellers.

<b>Name</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Primär-/ Sekundär- antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen anti-Human ACOX3	1:1000	Primär	Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden
Kaninchen anti-Human ADAMTS13	1:1000	Primär	ThermoFisher, Waltham, USA
Kaninchen anti-Human ALG12	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Human ApoCIII	1:1000	Primär	Biotrend, Köln
Kaninchen anti-Human Caspase 3	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human CD36	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human CYP1B1	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human DHDSS	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human DPAGT1	1:1000	Primär	Novus Biological, Centennial, USA
Kaninchen anti-Human DPY19L1	1:1000	Primär	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human DPY19L3	1:1000	Primär	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human GALE	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human GMPPA	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human GNE	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA

Kaninchen anti-Human GP130	1:1000	Primär	ThermoFisher, Waltham, USA
Kaninchen anti-Human H2B (GlcNAc S112)	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Human HA-Tag	1:1000/ 1:400	Primär	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human HIF-1 $\alpha$	1:1000	Primär	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen anti-Human Histone H2B	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Human ICAM1	1:1000	Primär	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-Human MAN1A1	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Human OGA	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human OGT	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human PGM2	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human Properdin	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human SLC35A1	1:1000/ 1:400	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human SLC35A1	1:1000	Primär	BIOZOL Diagnostica, Eching
Kaninchen anti-Human SLC35A1	1:1000	Primär	MyBiosource, San Diego, USA
Kaninchen anti-Human SLC35A2	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human SLC35A3	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human SLC35C1	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Human SRD5A3	1:1000	Primär	Novus Biological, Centennial, USA
Kaninchen anti-Human TGN46	1:1000/ 1:400	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Kaninchen anti-Human Transferrin	1:1000	Primär	BIOZOL Diagnostica, Eching

Kaninchen anti-Human $\alpha$ 1-Antitrypsin	1:1000	Primär	BIOZOL Diagnostica, Eching
Maus anti-Human ATP5H	1:1000	Primär	ThermoFisher, Waltham, USA
Maus anti-Human FUT8	1:1000	Primär	Proteintech, Manchester, USA
Maus anti-Human GAPDH	1:1000	Primär	Abcam, Cambridge, UK
Maus anti-Human GM130	1:400	Primär	BD, Franklin Lakes, USA
Maus anti-Human MAN2A1	1:1000	Primär	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus anti-Human SGK	1:1000	Primär	Abnova, Taipeh, Taiwan
Maus anti-Human $\beta$ -Aktin	1:10.000	Primär	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Maus anti-Human O-GlcNAcylation	1:200	Primär	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	1:700	Sekundär	ThermoFisher, Waltham, USA
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 555	1:700	Sekundär	ThermoFisher, Waltham, USA
Ziege anti-Kaninchen HRP	1:10.000	Sekundär	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 555	1:700	Sekundär	ThermoFisher, Waltham, USA
Ziege anti-Maus HRP	1:10.000	Sekundär	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

### 5.1.10 Lektine

Die Biotin-gekoppelten Lektine, die für die Bindung an verschiedene Zuckerstrukturen im Western Blot eingesetzt wurden, sowie HRP-gekoppeltes Streptavidin zur Detektion der gebundenen Lektine, wurden von Vector Laboratories (Burlingham, USA) erworben. Die gebrauchsfertigen Lösungen entsprachen einer 1:400 Verdünnung der Lektine und einer 1:10.000 Verdünnung des Streptavidins, jeweils in TBST 0,1 %.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Lektine und deren Abkürzungen.

<b>Lektin</b>	<b>Abkürzung</b>
<i>Aleuria Aurantia</i> Lektin	AAL
<i>Erythrina Cristagalli</i> Lektin	ECL
<i>Artocarpus integrifolia</i> Lektin	Jacalin
<i>Lens Culinaris</i> Lektin	LCH
<i>Maackia amurensis</i> Leukoagglutinin I	MALI
Peanut Agglutinin	PNA
<i>Ricinus communis</i> Agglutinin I	RCAI
<i>Sambucus Nigra</i> Lektin	SNA
Succinyliertes Weizenkeim Agglutinin	Succ. WGA
Weizenkeim Agglutinin	WGA

### 5.1.11 Zellkultur

Die Experimente wurden an primären Fibroblasten der Patientin durchgeführt, die durch eine Hautbiopsie gewonnen wurden. Als Kontrolle wurden primäre Fibroblasten von gesunden Menschen verwendet, die ebenfalls aus Hautbiopsien stammen. Für die Generierung einer Knock-out Modellzelllinie wurden HEK293-Zellen (humane, embryonale Nierenzellen) verwendet. Um primäre Fibroblasten mit einem Plasmid zu infizieren, benötigt man retrovirale Partikel. Für diesen Zweck wurden die retroviralen Verpackungszelllinien Pheonix-eco und PT67 verwendet, die ursprünglich mit dem Adenovirus E1a oder dem murinen Leukämievirus MLV transformiert wurden, um ihre Fähigkeit zur Bildung viraler Partikel zu erhalten.

Als Zellkulturmedium wurde DMEM (high glucose 4,5 g/l) von Gibco life science (ThermoFisher, Waltham, USA) verwendet, das mit 10 % FCS (Hitze-inaktiviert für 1 h bei 56 °C), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) und 1 % Amphotericin B (250 µg/ml) supplementiert wurde (Normalmedium). Für die Selektion von Zellen, transfiziert mit einem Vektor mit Neomycin-Resistenz, wurde das Medium mit 250 µg/ml Neomycin versetzt. Nach der Selektionsphase wurde auf ein Stabilmedium gewechselt, welches statt den 250 µg/ml Neomycin nur noch 25 µg/ml enthielt (siehe 5.2.6.2). Für die Selektion von HEK293-Zellen, die mit dem pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Plasmid transfiziert waren, wurde zur Selektion das Normalmedium mit 1 µg/ml Puromycin verwendet (siehe 5.2.9). Trypsin-EDTA 0,25 % zum Ablösen und DPBS zum Waschen der Zellen wurde gebrauchsfertig verwendet (Gibco life science, ThermoFisher, Waltham, USA).

### 5.1.12 Plasmide

Für Klonierungen wurde das mittels PCR amplifizierte Insert (siehe 5.2.5.6) in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Walldorf) eingebracht. Die vielen Restriktionsschnittstellen ermöglichten das Insert in einen Expressionsvektor, der für Säugetierzellen geeignet ist, umzuklonieren.

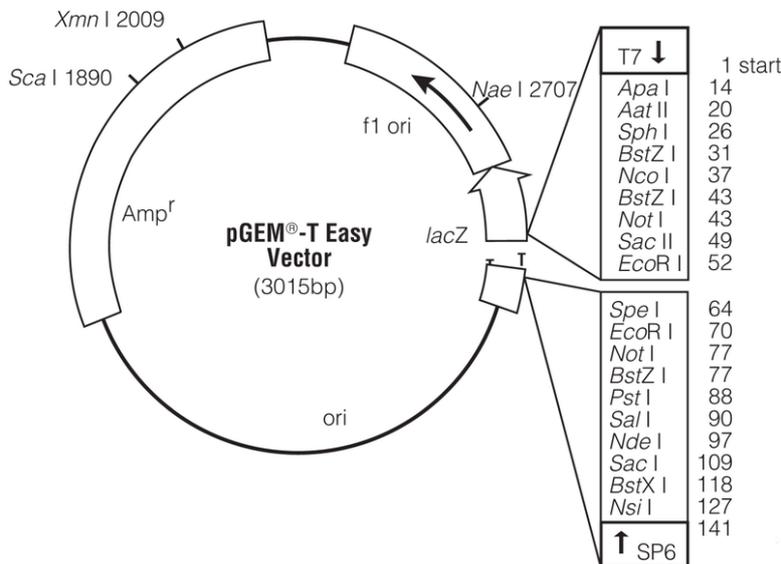


Abbildung 6: Vektorkarte des pGEM-T Easy Vectors von Promega (Quelle [www.promega.de](http://www.promega.de)). Als Selektionsmarker besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz sowie das lacZ Gen des lac-Operons, welches für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase codiert. Durch die Verwendung von X-Gal auf einer Ampicillin LB-Agarplatte können so die Bakterien ermittelt werden, welche ein Leerplasmid und damit die  $\beta$ -Galactosidase enthalten (blaue Kolonien) und solche, die das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthalten (keine  $\beta$ -Galactosidase, weiße Kolonien).

Als Expressionsvektor für HEK293-Zellen wurde das pCI-Neo Plasmid (Promega, Walldorf) mit Neomycin (G418) Resistenz verwendet (Beschreibung des Transfektionsablaufs siehe 5.2.6.1).

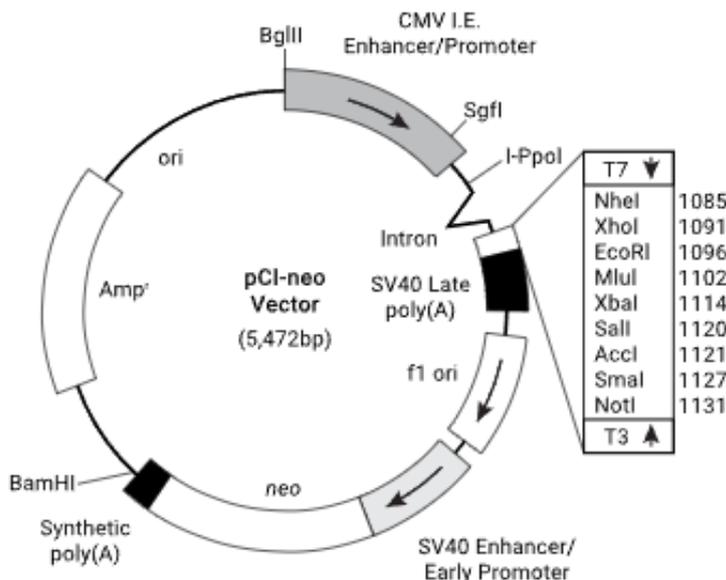


Abbildung 7: Vektorkarte des pCI-Neo Plasmids von Promega (Quelle [www.promega.de](http://www.promega.de)). Für die Vermehrung in Bakterien enthält das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz und als Selektionsmarker in Säugetierzellen eine Neomycin-Resistenz.

Da primäre Fibroblasten nur durch virale Partikel infiziert werden können, wurden Phoenix-Eco Zellen mit dem viralen Vektor pLNCX2 (Takara, Mountain View, USA) transfiziert. Die Zellen bilden virale Überstände, die dazu genutzt wurden, eine weitere Zelllinie zu infizieren (PT67-Zellen). Diese produzierten eigene retrovirale Partikel mit der Zielgenesequenz und die in der Lage waren, primäre Fibroblasten zu infizieren (Beschreibung des Infektionsablaufs siehe 5.2.6.3).

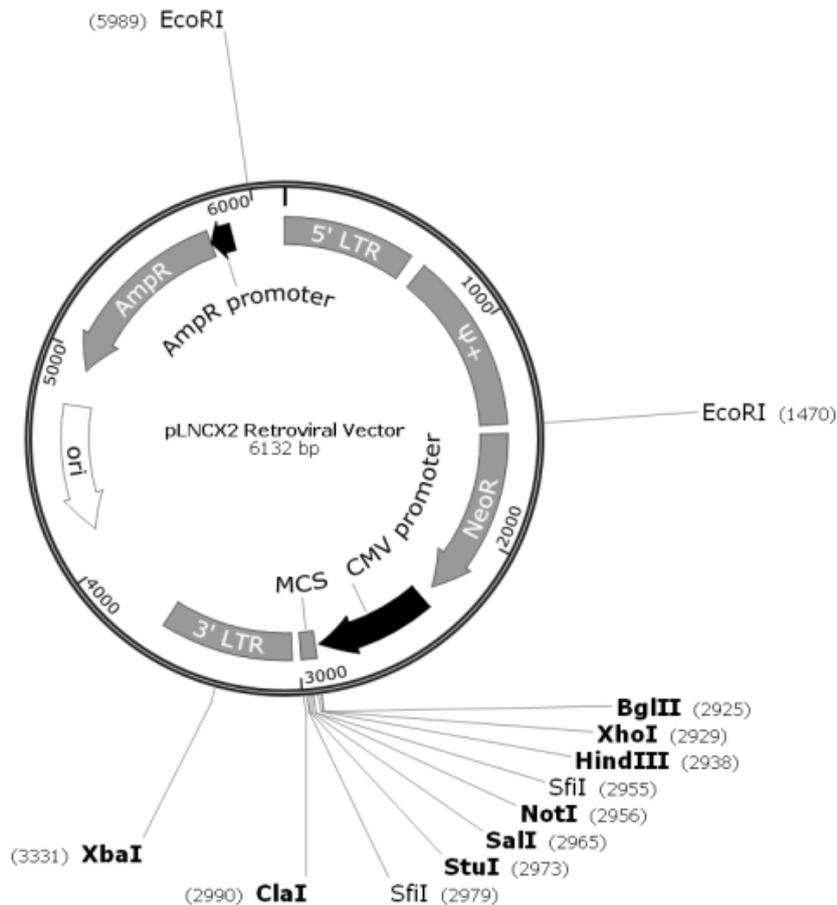


Abbildung 8: Vektorkarte des pLNCX2 Plasmids von Takara (Quelle [www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)). Der Vektor trägt eine Ampicillin und eine Neomycin-Resistenzkassette für die Selektion in Bakterien und Säugetierzellen. Außerdem enthält dieses Plasmid das retrovirale Psi-Verpackungssignal  $\Psi+$  und ist damit für die Übertragung mittels viraler Partikel geeignet.

Um eine *SLC35A1* Knock-out HEK293-Zelllinie zu generieren, wurden HEK293-Zellen mit dem pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Plasmid (Zhang Labor über Addgene, Watertown, USA) transfiziert. Dieses enthielt eine guide RNA (gRNA), welche das Cas9 Protein zu einer spezifischen Sequenz in Exon 2 des *SLC35A1*-Gens leitete (siehe 5.2.9).

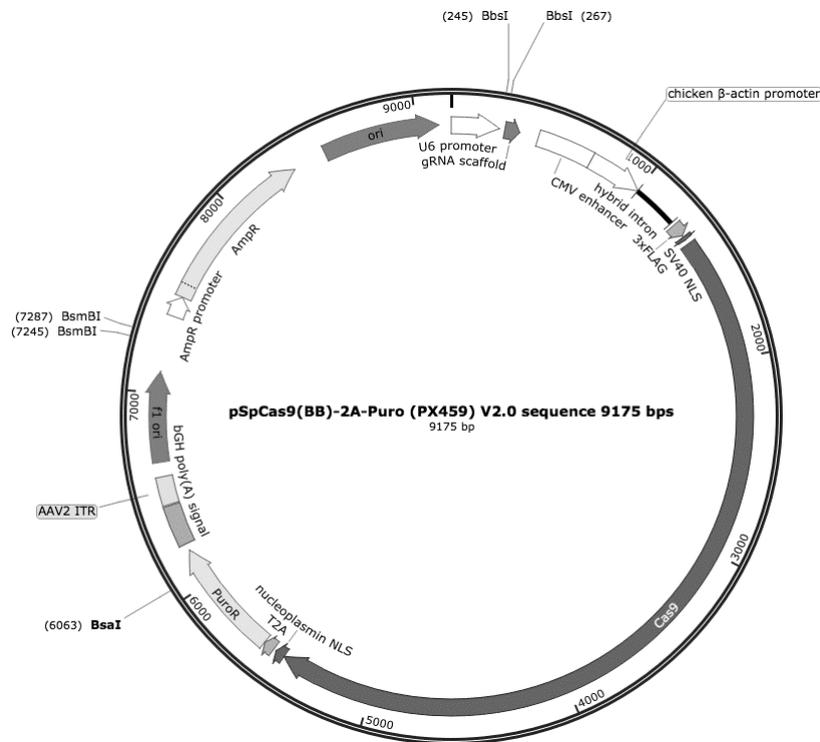


Abbildung 9: Vektorkarte des pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Plasmids des Zhang Labors (Quelle [www.addgene.org](http://www.addgene.org), Plasmid 62988). Als Selektionsmarker in Bakterien und Säugetierzellen enthält dieses Plasmid eine Ampicillin und Puromycin Resistenz. Außerdem trägt es das *Cas9* Gen, welches für die Endonuklease Cas9 codiert. Um das Cas9 Protein zielgerichtet einsetzen zu können, enthält das Plasmid einen gRNA scaffold Bereich, in den über die BbsI Schnittstellen die gewünschte guide RNA kloniert werden kann.

### 5.1.13 Bakterienstämme und Medien

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden die Bakterienstämme *E. coli* XL1-Blue (F- Tn10 proA+B+ lacI $\Delta$  (lacZ)M15/recAI endAI gyrA96(NaI) thi hsdR17 (rK-mK+) supE44 reIAI lac) und *E. coli* DH5 $\alpha$  (F- deoR recAI endAI hsdR1(rk-mk+) supE44 1-thi gyrA96 relAI) verwendet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Kulturmedien und Agar-Platten für *E. coli*, deren Anwendung und Zusammensetzung.

Name	Anwendung	Zusammensetzung
LB-Medium	Basismedium für LB-Platten und Übernacht-Kulturmedium	1 % (w/v) Trypton/Pepton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt In H <sub>2</sub> O Autoklaviert
LB-Amp	Medium für Übernacht-Kulturen von transformierten <i>E. coli</i>	LB-Medium 50 $\mu$ g/ml Ampicillin
LB-Amp-Platten	Agar-Platten zum Ausplattieren transformierter <i>E. coli</i>	LB-Amp 1,5 % (w/v) Agar

## 5.1.14 Programme, Online-Tools und Datenbanken

Tabelle 11: Liste der verwendeten Programme, Online-Tools und Datenbanken mit Angabe der jeweiligen Entwickler, Hersteller oder deren Online-Link.

<b>Name</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller/Entwickler/Link</b>
ApE	Programm	M. Wayne Davis
BioRender	Online-Tool	<a href="https://www.biorender.com/">https://www.biorender.com/</a>
CC-Top	Online-Tool	<a href="https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/index.html">https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/index.html</a>
CFX Manager	Programm	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Chromas 2	Programm	Technelysium
Clustal Omega	Online-Tool	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
dbNSFP V4.3A	Datenbank	<a href="http://database.liulab.science/dbNSFP">http://database.liulab.science/dbNSFP</a>
DTU Health Tech	Online-Tool	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/">https://services.healthtech.dtu.dk/</a>
DynaMut	Online-Tool	<a href="http://biosig.unimelb.edu.au/dynamut">biosig.unimelb.edu.au/dynamut</a>
Ensembl	Datenbank	<a href="http://ensembl.org">ensembl.org</a>
GraphPad PRISM 8	Programm	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	Programm	Wayne Rasband (NIH)
Microsoft Office	Programm	Microsoft
MutationAssessor	Online-Tool	<a href="http://MutationAssessor.org">MutationAssessor.org</a>
NCBI	Datenbank	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov">ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI BLAST	Online-Tool	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
NCBI Primer-BLAST	Online-Tool	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
nSolver 4.0	Programm	NanoString Technologies
Phyre2	Online-Tool	Creative Commons
Pisa Server	Online-Tool	<a href="http://ebi.ac.uk/pdbe/pisa/">ebi.ac.uk/pdbe/pisa/</a>
PolyPhen2	Online-Tool	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
PROTTER	Online-Tool	<a href="http://wlab.ethz.ch/protter/start/">http://wlab.ethz.ch/protter/start/</a>
UNIFI	Programm	Waters, Milford, USA
UniProt	Datenbank	<a href="http://uniprot.org">uniprot.org</a>

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 CDG-Diagnostik

#### 5.2.1.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) von Transferrin, $\alpha$ 1-Antitrypsin und Apolipoprotein C-III

Bei der Isoelektrischen Fokussierung werden die verschiedenen Glykoformen eines Proteins im Gel anhand ihres Isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Die endständige Sialinsäure der Glykane sorgt für eine negative Ladung des Proteins. Wenn durch einen vorliegenden Glykosylierungsdefekt die Glykane auf den Proteinen nur unvollständig oder gar nicht vorhanden sind, kommt es durch das Fehlen der Sialinsäure zu einer Veränderung des Isoelektrischen Punkts und damit zu einem veränderten Laufverhalten des Proteins in der IEF.

Die Transferrin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin IEF wurde nach Niehues et al. 1998 [111] und die ApoCIII IEF nach Wopereis et al. 2003 [108] adaptiert und von Simone Hengst aus der Routinediagnostikabteilung der Arbeitsgruppe für Glykosylierungsforschung durchgeführt.

Für die Transferrin IEF wurde die Serumprobe der Patientin 1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnt und für 20 min in einer 2,25 mM Eisen-(III)-Citrat Lösung inkubiert, um eine Sättigung aller eisenbindenden Stellen des Proteins zu erreichen. Zur Auftrennung wurde ein PhastGel<sup>TM</sup> mit einem pH-Gradient von pH 4-6,5 verwendet. Nach der Vorfokussierung des Gels für 10 min bei 2000 V und 15 °C im PhastSystem<sup>TM</sup> wurden 1  $\mu$ l des eisengesättigten Serums der Patientin und Kontrollen geladen. Die IEF der Proben erfolgte für 15 min bei 2000 V, 2,5 mA und 15 °C. Zur Fixierung der Transferrinbanden wurde das Gel für 40 min in einer Kaninchen anti-Human Transferrin Antikörper Lösung in 0,9 % NaCl inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde das Gel in H<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht in 0,9 % NaCl inkubiert. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt.

Die IEF von  $\alpha$ 1-Antitrypsin wurde mit einem PhastGel<sup>TM</sup> mit pH 4,2-4,9 durchgeführt, das für 15 min bei 73 Vh vorfokussiert wurde. Je 1  $\mu$ l der Serumproben von Patientin und Kontrollen (1:150 in H<sub>2</sub>O verdünnt) wurde geladen. Die Auftrennung erfolgte für 15 min bei 2000 V, 2,5 mA und 15 °C. Die Fixierung der  $\alpha$ 1-Antitrypsinbanden im Gel erfolgte wie bei der Transferrin IEF mittels Antikörperlösung und anschließender Silbernitratfärbung.

Bevor eine IEF von ApoCIII durchgeführt werden konnte, wurden der Proteingehalt im Serum der Patientin und den Kontrollen mittels des DC Proteinassays (Bio-Rad) bestimmt. Die Proben wurden mit 0,9 % NaCl auf eine Konzentration von 50 mg/ml Totalprotein angeglichen. Für die IEF wurde ein PhastGel<sup>TM</sup> mit pH 3-5 verwendet und die Vorfokussierung des Gels erfolgte für 15 min bei 73 Vh. Je 1  $\mu$ l Probe wurde geladen und die Auftrennung der Proteinbanden wurde wie bei der IEF für  $\alpha$ 1-Antitrypsin durchgeführt. Danach wurden die aufgetrennten Banden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (60 min, 60 °C). Um ApoCIII zu detektieren wurde die Membran für eine Stunde mit dem Primärantikörper Ziege anti-Human ApoCIII bei RT inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte mit PBST und die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Kaninchen anti-Ziege HRP. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Reagenz in dem Fusion SL4 Western Blot Dokumentationssystem.

### 5.2.1.2 N-Glykananalyse aus Serum und Fibroblastenlysat mittels UPLC mit FLR-Detektor

Die N-Glykananalyse mit dem BioAccord LC-MS System von Waters wurde von Simone Hengst aus der Routinediagnostikabteilung der Arbeitsgruppe für Glykosylierungsforschung durchgeführt. Für die N-Glykananalyse von Serumproben wurden 2 mg/ml Total-Protein verwendet. Dazu wurde die Serumprobe (ca. 60 mg/ml) 1:30 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. 7,5 µl der verdünnten Probe wurden mit 3 µl 5 % Rapi Gest SF und 3,3 µl LC-MS H<sub>2</sub>O bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlen der Probe auf Eis folgte die Abspaltung der N-Glykane, indem 1,2 µl GlycoWorks PNGase F (Waters) hinzugefügt und der Ansatz bei 50 °C für 30 min inkubiert wurde. Die Probe wurde auf Eis abgekühlt und anschließend die abgespaltenen Glykane mit 6 µl des GlycoWorks Rapi-Fluor-MS Reagenz (Waters) fluoreszent markiert (5 min, RT). Zum Fällen der Proteinreste wurden der Probe 179 µl Acetonitril hinzugefügt. Die markierten Glykane wurden mit Hilfe einer HILIC SPE Platte (Waters) von Verunreinigungen gereinigt und schließlich in 90 µl GlycoWorks SPE Elution Buffer eluiert. Das Eluat wurde mit 310 µl GlycoWorks Sample Diluent (Waters) gemischt und konnte mit dem BioAccord LC-MS System (Waters) analysiert werden. Hierbei wird die Probe zunächst durch eine Flüssigchromatographie (LC) aufgetrennt und danach mittels UPLC und Fluoreszenz (FLR)-Detektor analysiert.

Die Aufarbeitung von Fibroblasten für die N-Glykananalyse wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Andreas Hecker (CDG-Labor in Heidelberg) etabliert. Die Zellen wurden dafür zunächst wie in 5.2.8.1 beschrieben lysiert und die Proteinmenge bestimmt. Neben einen Proteinmarker wurden in drei Wells einer 10 % SDS-PAGE davon je 100 µg Gesamtprotein geladen und bei 100 V für ca. 10 min laufen gelassen, bis der Marker anfang sich aufzutrennen. Der Lauf wurde gestoppt, die drei Proteinbanden ausgeschnitten und für eine Stunde in Fixierlösung inkubiert (52,5 % H<sub>2</sub>O, 40 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure). Anschließend wurde das Gelstück zwei Mal für 10 min in H<sub>2</sub>O gewaschen, in ca. 2 x 2 mm Stückchen geschnitten und in ein 1,5 ml Eppi überführt. Die Gelstückchen wurden für 60 min bei 900 rpm in einem Eppendorf Thermomixer mit 500 µl Waschpuffer (50 % Methanol, 45 % H<sub>2</sub>O, 5 % Essigsäure) inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit verworfen, 500 µl Acetonitril (80 % Acetonitril, 20 % H<sub>2</sub>O) hinzugefügt (5 min, 900 rpm) und auch dieses wieder entfernt. Zum Trocknen der Gelstückchen wurde eine Lyophilie verwendet (ca. 45 min). Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56 °C und 900 rpm in 500 µl DTT (45 mM in H<sub>2</sub>O). Die DTT-Lösung wurde verworfen, 500 µl Acetonitril hinzugefügt (5 min, 900 rpm) und anschließend durch 50 mM ABC-Puffer ersetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 900 rpm wurde der Puffer entfernt, die Stückchen erneut in 500 µl Acetonitril inkubiert (5 min, 900 rpm) und danach ohne Flüssigkeit in der Lyophilie vollständig getrocknet. Die trockenen Gelstücke wurden mit 50 µl 0,1 U/µl (2 µl PNGase F (1:100 in H<sub>2</sub>O), 98 µl ABC-Puffer) PNGase F versetzt, nach 5 min mit 200 µl ABC-Puffer aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Flüssigkeit in ein neues 1,5 ml Eppi überführt. Die Gelstücke wurden für 10 min bei 1000 rpm mit 200 µl H<sub>2</sub>O inkubiert und der Überstand zur bereits gesammelten Flüssigkeit hinzugefügt. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt und die Probe in der Lyophilie getrocknet, um die enthaltenen N-Glykane zu konzentrieren.

## 5.2.2 Analyse der lipidgebundenen Oligosaccharide (LLOs)

Um die lipidgebundenen Oligosaccharide, die als Vorläufer der späteren proteingebundenen Glykane dienen, zu analysieren, wurden diese radioaktiv-markiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Markierung und HPLC-Messung wurden von Virginia Geiger des CDG-Labors in Heidelberg nach Körner *et al.* (1998) [112] durchgeführt.

## 5.2.3 In silico Pathogenitätsanalyse

Die Pathogenitätsanalyse der Patientenmutation erfolgte über die dbNSFP V4.3A Datenbank [113], bei der verschiedene Prognose-Tools wie SIFT, SIFT4G, Polyphen2, PROVEAN, VEST4, MetaSVM, M-CAP, REVEL, MVP und ClinPred hinterlegt sind. Es wurde die akademische Datenbankversion ausgewählt (Academic) und als Analyseparameter chr: 6, pos: 87477478, ref: A, alt: G, aaref: T, aaalt: A angegeben, was der chromosomalen Position der Punktmutation im *SLC35A1* Gen entsprach sowie der wildtypischen (ref) und mutierten (alt) Base bzw. Aminosäure (aaref, aaalt) an dieser Stelle. Die in silico Analyse der Aktivität des mutierten Proteins wurde durch das Prognosetool MutationAssessor (MutationAssessor.org) unter Angabe der Patientenmutation durchgeführt.

## 5.2.4 Zellkultur

### 5.2.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die primären Fibroblasten und HEK293-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM (high glucose 4,5 g/l) verwendet, das mit 10 % FCS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) und 1 % Amphotericin B (v/v) versetzt war (Normalmedium). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Als Kulturgefäße wurden T25, T75, T175, 10 cm und 150 cm Schalen verwendet. Sofern die Zellen noch keine Konfluenz erreicht hatten, wurde einmal pro Woche das Medium gewechselt. Hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht, wurden sie trypsinisiert und geteilt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS wurde eine 0,25 %-ige Trypsin-EDTA Lösung verwendet, um die Zellen enzymatisch von der Zellkulturflasche zu lösen. Nach etwa 5 min Inkubation wurde die fünffache Menge an Medium hinzugegeben, was die Reaktion stoppte und die abgelösten Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gegen die Flaschenseite vereinzelt. Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde dann in eine neue Flasche mit vorgelegtem Medium übertragen.

Zum Ernten der Zellen wurden diese zunächst kultiviert bis eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht war. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen drei Mal mit kaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 2 ml kaltem DPBS abgelöst und in ein 2 ml Eppi überführt. Die Zellen wurden bei 2000 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt oder direkt für Experimente verwendet.

#### 5.2.4.2 Kryokonservierung

Um bestimmte Zelllinien zu erhalten, wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen in je einer T75 Flasche bis zu ca. 80 %-iger Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen für 1 min mit DPBS gewaschen. Danach wurden sie mit 2 ml 0,25 % Trypsin-EDTA für ca. 5 min inkubiert, bis sie sich von der Flasche ablösten. Die Trypsin Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon übertragen. Die Zellen wurden bei 2000 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml eiskaltem Medium mit 8,51 % DMSO resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Kryo-Vial übertragen. Die Kryo-Vials wurden für 2-3 h bei -20 °C eingefroren und danach bei -80 °C gelagert. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Kryo-Vial aus dem Stickstofftank oder dem -80 °C Schrank entnommen und bei RT antauen lassen. Sobald nur noch ein kleiner Teil des Inhalts gefroren war, wurden die Zellen mit 1 ml warmem Medium in eine Pipette aufgenommen und in eine T25 Flasche mit 3 ml vorgelegtem Medium überführt. Nach etwa 1-2 Tagen, wenn die Zellen angewachsen waren, wurde das Medium gewechselt, um das verbleibende DMSO zu entfernen.

#### 5.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden Zellen wie in 5.2.4.1 beschrieben trypsinisiert. Nachdem der Trypsin-Lösung 8 ml Medium hinzugefügt worden waren, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Davon wurden wiederum 10 µl in eine Zellzählerplatte pipettiert und in den TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad) geschoben, welcher die Zellzahl pro ml automatisch bestimmte.

#### 5.2.4.4 Supplementierung von Zellen mit Zucker

Die Supplementierung von Fibroblasten mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc) erfolgte mit einer Endkonzentration von 10 mM GlcNAc in Normalmedium für 24 h bzw. 48 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Eine Stocklösung von GlcNAc wurde mit Wasser hergestellt und sterilfiltriert (0,45 µm Filter).

### 5.2.5 (Molekular-) Genetische Methoden/ Klonierung

#### 5.2.5.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Isolation von genomischer DNA wurde das Zellpellet je nach Größe in 250-500 µl Lysepuffer mit 10 mg/ml Proteinase K resuspendiert. Der Proteinverdau erfolgte über Nacht bei 56 °C im Schüttelblock. Am nächsten Tag wurde das gleiche Volumen Ethanol (100 %) dazu gegeben und gemischt, was zum Ausfallen der genomischen DNA führte. Falls die DNA gut sichtbar war, wurde sie mit einer abgerundeten Pasteurpipette aus der Lösung gefischt und kurz in ein Eppi mit Ethanol (70 %) gehalten, um die DNA zu waschen. Danach wurde sie an der Spitze der Pasteurpipette getrocknet. Anschließend konnte sie in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Falls die DNA nach der Ethanolfällung nicht sichtbar war, wurde für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in Ethanol (70 %) aufgenommen. Es folgte nochmal ein identischer Zentrifugationsschritt, woraufhin der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Die präparierte genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

#### 5.2.5.2 Isolation von Total-RNA

Die Isolation von Total-RNA aus pelletierten Zellen erfolgte mittels des RNeasy Mini Plus Kits von Qiagen. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 350  $\mu$ l RLT-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert, auf eine QIAshredder Säule überführt und für 2 min bei höchstmöglicher Umdrehung zentrifugiert. Die homogenisierte Lösung wurde für die weiteren Schritte des Kits nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde in 35  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration und Reinheit wurde photometrisch am NanoDrop<sup>TM</sup> bestimmt (siehe 5.2.5.3). Gelagert wurde die Total-RNA bei -80 °C.

#### 5.2.5.3 Messung von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von isolierter DNA und RNA wurde ein NanoDrop<sup>TM</sup> Lite Spectrophotometer (ThermoFisher) verwendet. Dieses misst die Absorption der Probe bei 260 nm und ermittelt daraus die Konzentration der gewünschten Nukleinsäure. Um die Reinheit der Probe zu beurteilen, wird das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm aufgeführt. Ein Wert von 1,8 wird bei DNA als rein angesehen, bei RNA sollte das Verhältnis bei 2,0 liegen. Ein niedrigerer Wert deutet auf einen erhöhten Gehalt an Proteinen hin, welche eine Absorption bei 280 nm aufweisen.

#### 5.2.5.4 Primer-Design

Standardprimer, die für PCR, Sequenzierung und genspezifische Reverse Transkription genutzt wurden, wurden so wählt, dass deren Länge etwa 15-25 Basen entsprach. Der G/C Gehalt sollte 40-60 % entsprechen und die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) lag, wenn möglich, zwischen 55-60 °C. Die  $T_m$  wurde mittels des NEB  $T_m$  Calculator ([www.tmcaculator.neb.com](http://www.tmcaculator.neb.com)) berechnet.

Primer, die für qPCR verwendet wurden, wurden mit Hilfe des NCBI Primer-BLAST Tools ausgewählt. Die Primer sollten eine Exon-Exon Verbindung überspannen und die Größe des zu amplifizierenden Produktes entsprach 150-350 bp. Als  $T_m$  wurde hier 50-65 °C bei einer Primer-Länge von ca. 20 bp gewählt.

#### 5.2.5.5 Reverse Transkription

Zur Herstellung von genspezifischer cDNA aus Total-RNA für spätere PCRs, wurde das Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet. Für die Reverse Transkription wurden die folgenden Komponenten in einem Eppi zusammen pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

3  $\mu$ l Total-RNA (200 ng/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l Reaction buffer (10x)

2  $\mu$ l dNTPs (5 mM)

2  $\mu$ l genspezifischer Revers-Primer (10  $\mu$ M)

1  $\mu$ l Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/ $\mu$ l)

0,5  $\mu$ l Ribolock (40 U/ $\mu$ l)

9,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Die erhaltene cDNA konnte anschließend dafür verwendet werden, das entsprechende Gen mittels PCR zu amplifizieren. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 5.2.5.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) wurde genutzt, um spezifische DNA-Fragmente zu vermehren. Im Allgemeinen wurde eine „nested“ PCR durchgeführt, um eine größere Genauigkeit der Amplifikation zu erreichen. Hierbei werden zwei Primerpaare in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen verwendet. Als Template für die zweite PCR dient 1 µl des Ansatzes der ersten PCR. Es wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet: Die Taq- und die Phusion-Polymerase. Letztere besitzt eine „Proof-reading“ Funktion und ist demnach genauer bei der Amplifikation. Deshalb wurde ein Phusion-PCR Ansatz stets genutzt, wenn das amplifizierte Produkt für Klonierungen verwendet werden sollte. Die Taq-Polymerase wurde eingesetzt, wenn generelle Überprüfungen wie beispielsweise Kolonie-PCRs durchgeführt wurden.

Tabelle 12: Reaktionszusammensetzung und PCR-Protokoll für Taq- bzw. Phusion-PCR

Reaktionsansatz	Protokoll		
1 µl DNA (50 ng)/ Pipettenspitze mit Bakterienkolonie	94 °C	10 s	} 35x
5 µl <i>Taq</i> Puffer + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10x)	94 °C	30 s	
4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	55 °C	30 s	
1 µl DMSO (100 %)	72 °C	1 min/kb	
0,5 µl dNTPs (10 mM)	72 °C	2 min	
1,25 µl Forward Primer (1 µM)	4 °C	∞	
1,25 µl Revers Primer (1 µM)			
0,2 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)			
Auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O			
1 µl DNA (50 ng)/ 5 µl cDNA	98 °C	30 s	} 35x
10 µl HF-Puffer (10x)	98 °C	10 s	
0,5 µl dNTPs (10 mM)	61 °C	30 s	
1,25 µl Forward Primer (1 µM)	72 °C	30 s/kb	
1,25 µl Revers Primer (1 µM)	72 °C	5 min	
1 µl DMSO (100 %)	4 °C	∞	
0,2 µl Phusion Polymerase (2 U/µl)			
Auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O			

#### 5.2.5.7 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmiden

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in ein Plasmid einzubringen müssen komplementäre Überhänge geschaffen werden, die schließlich in einem Ligationsschritt miteinander verbunden werden können. Dafür wird das DNA-Fragment mittels PCR und Primern mit Überhängen, die spezifisch für bestimmte Restriktionsenzyme sind, amplifiziert. Anschließend wird das PCR-Produkt, das Insert sowie das Plasmid mit den Restriktionsenzymen verdaut. Die Enzyme schneiden die DNA, so dass diese dann miteinander kompatibel sind. Als Ansatz für einen Restriktionsverdau wurde 1 µg Plasmid DNA, 1 µl 10x Reaktionspuffer (spezifisch für das verwendete Enzym) und 0,5 µl Restriktionsenzym mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Im Falle eines Doppelverdaus wurde von beiden Enzymen je 0,5 µl verwendet, wobei das Gesamtvolumen des Ansatzes auf 20 µl erhöht wurde. Sollte ein aufgereinigtes PCR-Fragment verdaut werden, so wurde ebenfalls 1 µg, oder bei einer geringeren Konzentration die maximal mögliche Menge als Volumen eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend per Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten und aufgereinigt.

#### 5.2.5.8 Agarose Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNA einer PCR-Reaktion oder der Restriktionsverdau-Ansatz wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft und aufgetrennt. Dafür wurden der Probe 10 % (v/v) des Ladebuffers für DNA hinzugefügt und auf ein Agarosegel in 1x TAE-Puffer geladen. Als Größenstandard wurden je nach erwartetem Produkt ein 100 bp oder 1 kb Ladder als Marker neben die Proben geladen. Üblicherweise wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurden 4 g Agarose abgewogen, auf 400 ml mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt und aufgeköcht. Die Lösung wurde abgekühlt, bis sie handwarm war, um dann 10 µl einer 1 %-igen Ethidiumbromidlösung hinzuzugeben. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für ca. 1 h. Da Ethidiumbromid in DNA interkaliert konnten die DNA-Banden in der Geldokumentationsanlage durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die gewünschten DNA-Banden, die für spätere Sequenzierung oder Klonierung benötigt wurden, wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 2 ml Eppis überführt. Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurde das peqGold Gel Extraction Kit von Paqlab/VWR nach Herstellerangaben verwendet, wobei die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert und anschließend bei -20 °C gelagert wurde.

#### 5.2.5.9 Ligation

PCR-Produkte („Inserts“) können in Plasmide eingefügt werden, wenn diese vorher mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden und somit kompatible Enden aufweisen. Diesen Prozess bezeichnet man als Ligation und wird von speziellen Enzymen, den Ligasen, katalysiert. In dieser Arbeit wurde für Ligationen die T4 DNA-Ligase verwendet. Als Ligationsansatz wurden 80 ng Plasmid, X µl Insert (1:3 molares Verhältnis), 1 µl T4 Ligase-Puffer (10x), 1 µl T4 Ligase (5 U/µl) und 4 µl H<sub>2</sub>O für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und der komplette Ansatz anschließend in 50 µl kompetente Bakterien transformiert.

### 5.2.5.10 Site-directed Mutagenese

Die „ortsspezifische“ oder site-directed Mutagenese wird verwendet, um einzelne DNA-Basen eines Vektors gezielt zu verändern. Dafür werden bestimmte Primer gewählt, bei denen je ca. 12 Basen die zu verändernde Base auf beiden Seiten flankieren. Der Forward- und Revers-Primer sind in diesem Fall revers-komplementär zueinander. Diese Methode wurde angewendet, um Punktmutationen in den Inserts der Expressionsvektoren zu berichtigen oder einzufügen. Das komplette Plasmid wird während eines PCR-Protokolls amplifiziert, wodurch ein linearisierter Vektor als Produkt entsteht.

Tabelle 13: Reaktionsansatz und PCR-Protokoll für eine site-directed Mutagenese.

Reaktionsansatz	Protokoll		
1 µl Plasmid (50 ng/µl)	95 °C	30 s	} 18x
5 µl <i>Pfu</i> Puffer (10 x)	95 °C	30 s	
1,25 µl Forward Mutagenese-Primer (1 µM)	55 °C	1 min	
1,25 µl Revers Mutagenese-Primer (1 µM)	68 °C	2 min/kb	
1 µl dNTPs (10 mM)	4 °C	∞	
1 µl <i>Pfu</i> turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)			
39,5 µl H <sub>2</sub> O			

Nach der PCR-Amplifikation des Vektors wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 1 µl des Enzyms *DpnI* versetzt und für 1 h bei 37 °C verdaut. Dieser Schritt sorgt dafür, dass das ursprüngliche, nicht mutierte und demnach noch ringförmige vorliegende Plasmid abgebaut wird und nur das neu amplifizierte im Ansatz zurückbleibt. 5 µl des *DpnI* Verdau wurden zur Kontrolle neben 1 µl des ursprünglichen Plasmids auf ein 1 %-iges Agarose Gel geladen. Sofern die Mutagenese bisher erfolgreich war, sollte das Produkt des *DpnI* Verdau als linearisierte Bande höher laufen als das ringförmige Originalplasmid. Weitere 5 µl des *DpnI* Verdau wurden für die Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt und diese ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden „gepickt“ und sequenziert.

### 5.2.5.11 Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)

Die Quantitative Echtzeit PCR (qPCR) wird verwendet, um das Expressionslevel der gewünschten Gene auf Ebene der mRNA zu ermitteln. Dafür muss zunächst aus Total-RNA mittels randomisierter Primer cDNA von möglichst vielen Transkripten hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde das Revert Aid First Strand Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Konzentration der Total-RNA wurden 1-5 µg eingesetzt. Nach Abschluss des Kit-Protokolls wurde die cDNA mit RNase freiem Wasser auf 25 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Um die Menge eines bestimmten Transkriptes in der generierten cDNA mittels qPCR zu bestimmen, wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green verwendet (PerfeCTa<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green FastMix<sup>®</sup>, Quantabio). Dieser bindet an die amplifizierten, doppelsträngigen DNA-Fragmente, die während der PCR-Reaktion entstehen. Die Fluoreszenz der Probe wird nach jeder Wiederholung

des PCR-Zyklus gemessen, was dazu führt, dass das Signal mit jedem Zyklus zunimmt. Der Punkt, an dem ein festgelegter Grenzwert erreicht wird, wird als Ct Wert angegeben. Umso mehr Anfangsmaterial des amplifizierten Transkriptes sich in der Probe befand, desto schneller wird der Grenzwert erreicht und desto niedriger fällt der Ct Wert aus.

Die qPCR-Messungen wurden jeweils in biologischen Triplikaten durchgeführt. Jede einzelne Probe wurde zusätzlich pro spezifischer qPCR drei Mal geladen. Zur Normalisierung der Daten wurde für jede Probe ebenfalls drei Mal die  $\beta$ -Aktin Expression als Referenzgen gemessen. Außerdem wurde als Kontrolle jeder qPCR Mastermix drei Mal mit H<sub>2</sub>O statt cDNA gemessen, um Verunreinigungen mit DNA ausschließen zu können.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines qPCR-Reaktionsansatzes und das Programm für den qPCR Cycler.

Reaktionsansatz	Protokoll		
10 $\mu$ l PerfeCTa SYBR Green FastMix (2x)	95 °C	30 s	} 40x
0,4 $\mu$ l Forward qPCR Primer (1 $\mu$ M)	95 °C	4 s	
0,4 $\mu$ l Revers qPCR Primer (1 $\mu$ M)	55 °C	15 s	
1 $\mu$ l cDNA (25 ng/ $\mu$ l)	70 °C	10 s	
8,2 $\mu$ l H <sub>2</sub> O RNase-frei	+ Schmelzkurve		

Zur Auswertung der qPCR-Daten wurde zunächst der  $\Delta\Delta$ Ct Wert berechnet. Dieser beschreibt die Expression des gewünschten Gens (GOI) im Verhältnis zur Expression des Referenzgens  $\beta$ -Aktin der (Patienten-) Probe normalisiert auf die Expression in der Kontrollprobe. Daraus kann die X-fache Veränderung (fold change) der Expression des GOI in der Probe im Vergleich zur Kontrolle berechnet werden.

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-((\text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\beta\text{-Aktin}})_{\text{Probe}} - (\text{Ct}_{\text{GOI}} - \text{Ct}_{\beta\text{-Aktin}})_{\text{Kontrolle}})}$$

## 5.2.6 Transformation, Transfektion und Infektion

Nach erfolgreicher Klonierung, bei der das gewünschte Gen in ein Plasmid eingebracht wurde, wurden kompetente *E. coli* Zellen damit transformiert, um es zu vermehren. Das aus den Bakterien aufgereinigte Plasmid kann dann zur Transfektion von Säugetierzellen genutzt werden, damit diese das gewünschte Gen exprimieren. Primäre Fibroblasten bilden hier eine Ausnahme, da sie nur mittels viraler Partikel mit einem Vektor infiziert werden können.

### 5.2.6.1 Transformation von *E. coli*

Zur Vermehrung eines Plasmids wurden kompetente *E. coli* mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Dazu wurden 10  $\mu$ l Ligationsansatz oder 1  $\mu$ l reines Plasmid in einem Eppi vorgelegt und mit 50  $\mu$ l der kompetenten *E. coli* Stämme XL-1 oder DH5 $\alpha$  versetzt. Es wurde weder auf- und abpipettiert noch gevortext. Stattdessen wurde die Mischung für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Danach wurde das Eppi sofort wieder auf Eis gestellt und 650  $\mu$ l LB-Medium dazu pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C und leichtem Schütteln im Heizblock, während derer sich die Bakterien teilen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 5000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand

wurde verworfen und das Pellet in 50 µl LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) resuspendiert und auf LB-Ampicillin Agar ausplattiert. Die Agar Platte wurde über Nacht bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator gelagert. Nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten und demnach eine Ampicillin-Resistenz erlangt hatten, konnten auf der Platte wachsen. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit einer Pipettenspitze „gepickt“. Falls überprüft werden sollte, ob das transformierte Plasmid das gewünschte Insert enthielt, wurde die Pipettenspitze kurz in den entsprechenden PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR getaucht. Zur Vermehrung der positiven Kolonien wurde die Pipettenspitze in ein 15 ml Falcon mit 2 ml LB-Ampicillin Medium geworfen. Dieses wurde mit geöffnetem Deckel über Nacht bei 37 °C in einem Schüttel-Inkubator kultiviert (Übernacht-Kultur).

#### 5.2.6.1.1 Aufreinigung der Übernacht-Kultur mittels Mini-Prep Kit

Die Übernacht-Kultur wurde am nächsten Morgen entsprechend der Herstellerangaben des Plasmid Mini-Prep Kits (VWR/Peqlab) aufgearbeitet und das Plasmid isoliert. Eluiert wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O. Die Konzentration des aufgereinigten Plasmids wurde mit dem NanoDrop bestimmt (siehe 5.2.5.3) und die Sequenz anschließend mittels Sanger Sequenzierung überprüft (siehe 5.2.7).

#### 5.2.6.2 Transfektion von Säugetierzellen

Um das gewünschte Plasmid in Säugetierzellen, wie in HEK293-Zellen, einzubringen wurden diese transfiziert. Dazu wurden die Zellen in einer 6-Well Platte ausgesät, sodass diese am Tag der Transfektion eine Dichte von ca. 60-70 % erreichten. Unter sterilen Bedingungen wurden in einem Eppi zu 250 µl OptiMEM, 10 µl des Transfektionsreagenz Fugene HD gegeben, kurz gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden 2 µg des zu transfizierenden Plasmids in einem weiteren Eppi vorgelegt. Die Fugene-OptiMEM Lösung wurde durch sofortiges Auf- und Abpipettieren mit dem Plasmid vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das Medium auf den Zellen in der 6-Well Platte wurde auf 1 ml Volumen reduziert und anschließend der Transfektionsansatz tröpfchenweise darauf verteilt. So wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Im Falle einer transienten Transfektion wurden die Zellen nach dieser Zeit geerntet und lysiert. Falls die Zellen stabil transfiziert werden sollten, wurde nach den 48 h auf ein Selektionsmedium mit 250 µg/ml Neomycin gewechselt. Die Selektion wurde für ca. 10 Tage durchgeführt, wobei jeden zweiten Tag das Selektionsmedium erneuert wurde. Sie galt als abgeschlossen, wenn nicht-transfizierte Kontrollzellen abgestorben waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde auf Stabilmedium gewechselt, dass nur 10 % der vorherigen Antibiotikakonzentration enthielt.

#### 5.2.6.3 Virale Infektion von Fibroblasten

Da Fibroblasten nicht wie andere Säugetierzellen transfiziert werden können, müssen virale Partikel generiert werden, um einen Expressionsvektor in diese Art von Zellen einbringen zu können. Dafür wurde zunächst das *SLC35A1* Gen aus Kontroll- und Patientenfibroblasten mittels genspezifischer Reverser Transkription und PCR amplifiziert. Dabei wurden mit den verwendeten Primern *XhoI* und *HindIII* Überhänge geschaffen, die für den Restriktionsverdau und anschließende Ligation in den pLNCX2 Vektor genutzt wurden. Der fertig klonierte Vektor wurde, wie in 5.2.6.2 beschrieben, in Phoenix-Eco Zellen transfiziert. Nach 48 h Inkubation der Zellen

mit dem Transfektionsmix wurde das Medium erneuert und die Zellen bei 33 °C über Nacht inkubiert. Bei dieser Temperatur bilden die Zellen retrovirale Partikel, die sich im Medium sammeln. Das Medium wurde am nächsten Tag abgenommen, mit 1 µl/ml Polybrene versetzt und sterilfiltriert (0,45 µm Filter). Dann wurde es auf ausgesäte PT67 Zellen (200.000 Zellen/ 6-Well) gegeben, um diese mit dem pLNCX2 Vektor zu infizieren. Die Infektion wurde am nächsten Tag noch einmal wiederholt. Danach wurden die PT67 Zellen mit Neomycin-Selektionsmedium (250 µg/ml) für ca. 10 Tage selektiert und auf T75 Flaschen expandiert. Die Produktion der retroviralen Partikel erfolgte wie bereits für die Phoenix-Eco Zellen beschrieben für zwei aufeinanderfolgende Tage bei 33 °C. Das Medium wurde erneut sterilfiltriert, wobei dieses Mal nur 0,6 µl/ 10 ml Polybrene dazugegeben wurde und auf ausgesäte Fibroblasten (ca. 80 % konfluent in T75 Flaschen) übertragen. Die Fibroblasten wurden nach der Infektion ebenfalls mit Neomycin-Selektionsmedium selektiert und anschließend mit Stabilmedium (25 µg/ml Neomycin) weiter kultiviert.

### 5.2.7 Sequenzierung

Plasmide nach einer Mini-Prep oder aufgereinigte DNA einer PCR wurden von der Firma SeqLab Microsynth GmbH in Göttingen mittels Sanger Sequenzierung sequenziert. PCR-Produkte wurden dabei in einer Konzentration von 18 ng/100 bp und Plasmide mit einer Konzentration von 60 ng/µl in je 12 µl Gesamtvolumen abgeben. Falls keine Standardprimer der Firma verwendet werden konnten, wurden der Probe 3 µl von selbst entworfenem Forward oder Revers Primer (1 µM) hinzugefügt. Die Sequenzierungsergebnisse im FASTA Format wurden mit dem Programm ApE und die Elektropherogramme mit Chromas überprüft.

### 5.2.8 Proteinbiochemische Methoden

#### 5.2.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot aus den Zellen zu isolieren mussten diese lysiert werden. Dafür wurde je eine konfluente T75 Flasche an Zellen verwendet, entweder als bereits gefrorenes oder frisches Zellpellet (siehe 5.2.4.1). Die pelletierten Zellen wurden in RIPA-Puffer resuspendiert. Das Puffervolumen unterschied sich basierend auf der Zellmenge der verwendeten Zellen. Für ein Fibroblastenpellet aus einer T75 Flasche wurden 100 µl Puffer verwendet, wohingegen für die Zellmenge einer T75 Flasche an HEK293-Zellen 250 µl Puffer eingesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde für 30 min bei -80 °C eingefroren, um die Zellen durch den Temperaturunterschied zum Platzen zu bringen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 22 G Kanüle mit 15-20 Hüben weiter aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer vom Lysat zu trennen, folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt und konnte für die Proteinbestimmung verwendet werden.

### 5.2.8.1.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Da für jede Lysat-Probe, die auf die SDS-PAGE geladen wurde, die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, musste die Proteinkonzentration ermittelt und angeglichen werden. Dazu wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry vorgenommen [114]. Die Messung erfolgte photometrisch mit Hilfe des DC Protein Assay Kits (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers. In einer 96-Well Platte wurden pro Well 5 µl Lysat (unverdünnt bei Fibroblasten, 1:5 bei HEK293-Zellen), 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B zusammen pipettiert. Die Platte wurde für 15 min bei RT geschüttelt und anschließend die Absorption bei 750 nm am Photometer gemessen. Als Standardkurve diente eine BSA-Eichreihe, bei der 0-2 mg/ml BSA in RIPA-Puffer gelöst und wie beschrieben gemessen wurden. Anhand dieser Kurve konnte die Proteinkonzentration der Proben für die jeweilige Absorption abgelesen werden. Die Proben wurden auf 0,5 µg/µl Proteingehalt mit H<sub>2</sub>O angeglichen und mit 1x SDS-Ladepuffer (6x) versetzt. Nach der Denaturierung bei 95 °C für 5 min konnten die Proben auf die SDS-PAGE geladen werden.

### 5.2.8.2 Serumproben für SDS-PAGE

Bei Serumproben, die auf eine SDS-PAGE geladen werden sollten, wurden pro zu ladender Geltasche 0,5 µl Serum, 4 µl SDS-Ladepuffer (6x) und 15,5 µl H<sub>2</sub>O in einem Eppi vorbereitet und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde die Probe kurz gevortext, zentrifugiert und konnte anschließend auf die SDS-PAGE geladen werden.

### 5.2.8.3 SDS-PAGE und Western Blot

Mittels SDS-PAGE wurden die denaturierten Proteine der Proben (5.2.8.1, 5.2.8.2) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden selbst gegossen. Abhängig von der Größe des zu detektierenden Proteins können Acrylamidgele unterschiedlicher Prozentigkeiten gegossen werden. Meistens wurden 8, 10 oder 12,5 %-ige Gele verwendet (siehe Tabelle 15). 4,5 ml des noch flüssigen Trenngels wurde in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol bedeckt. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol mit Whatman-Papier aufgesogen und der Rest der Gießvorrichtung mit flüssigem Sammelgel gefüllt und ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen hineingeschoben, um die Probenaschen zu formen. Nach Aushärten des Sammelgels wurde das Gel mit den Proben beladen.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines 8, 10 oder 12,5 %-igen Trenngels und des Sammelgels.

	Trenngel (8 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel
Rotiphorese Gel 30	1600 µl	2000 µl	2500 µl	338 µl
Trenngelpuffer	1500 µl	1500 µl	1500 µl	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	338 µl
APS (10 %)	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	3 µl
H <sub>2</sub> O	2900 µl	2500 µl	2000 µl	1500 µl

Bei einem Gel mit 10 Taschen wurden pro Tasche 20 µl Probe geladen, bei 15 Taschen nur 15 µl. Neben den Proben wurde ein Marker (PageRuler Prestained, ThermoFisher) aufgetragen, der die Größe der aufgetrennten Proteine anzeigt. Die SDS-PAGE wurde bei 100 V gestartet, ab Auftrennung der Markerbanden im Trenngel wurde die Spannung auf 140 V erhöht und bei Austreten der Lauffront am unteren Ende des Gels gestoppt. Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine im Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Semi-dry Western Blot durchgeführt. Pro Gel wurden je drei zugeschnittene Whatman-Papiere mit Kathoden- oder Anodenpuffer getränkt. Die Membran und das Gel wurden für ca. 5 min in Kathodenpuffer gelegt, um die Übertragung beim Blotten zu unterstützen. Da die Proteine durch SDS im Gel negativ geladen sind, wandern sie aus dem Gel hinaus in Richtung der Anode auf die Membran. In die Blottingkammer wurde der Blot von unten (Anodenseite) nach oben (Kathodenseite) wie folgt zusammengesetzt: Drei Whatman-Papiere (Anodenpuffer), Membran, Gel, drei Whatman-Papiere (Kathodenpuffer). Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden. Der Deckel der Kammer wurde verschlossen und das Blotten der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 47 mA (1 mA/cm<sup>2</sup>) für 50 min. Danach wurde die Membran mit 5 % BSA in 1x PBST 0,1 % für 30 min geblockt, um freie Bindungsstellen zu besetzen und damit ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Die Membran wurde anschließend für 3 min mit 1x PBST 0,1 % gewaschen und dann mit einem primären Antikörper (meistens 1:1000 in 1x PBST 0,1 %, siehe 0) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot drei Mal mit 1x PBST 0,1 % für je 5 min gewaschen und dann für 1 h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (1:10.000 in 1x PBST 0,1 %) bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte. Aufgrund der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP), können die gebundenen Antikörper über eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert werden. Dafür wurde das ECL Plus Western Blotting Substrat (Pierce Biotechnology) nach Herstellerangaben angewandt und die Membran darin für 5 min schüttelnd inkubiert. Anschließend konnte die Chemilumineszenz mit dem Fusion SL4 Western Blot Dokumentationssystem detektiert werden. Um die Membran mit einem weiteren Antikörper als Ladekontrolle zu inkubieren, musste sie zuerst gestrippt werden, um den bereits gebundenen sekundären Antikörper mit 10 %-iger Essigsäure (15 min) zu entfernen. Danach wurde die Membran fünf Mal mit 1x PBST 0,1 % für 5 min gewaschen, bevor sie mit dem Ladekontrollen-Antikörper wieder über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Für Zellysate diente β-Aktin als Ladekontrolle, bei Serumproben GAPDH. Zum Detektieren der Ladekontrollen wurden die Schritte wie bereits beschrieben wiederholt. Nicht nur die Proteine an sich, sondern auch die daran gebundenen Zuckerstrukturen können mittels Western Blot sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden biotinkoppelte Lektine verwendet, die spezifisch an bestimmte Zuckerstrukturen binden. Nachdem die Ladekontrolle detektiert wurde, wurde der Blot ebenfalls gestrippt. Die darauffolgenden Waschschrte erfolgten in diesem Fall in 1x TBST 0,1 % und geblockt wurde die Membran mit 1x TBST 0,5 %. Die Inkubation mit dem Lektin erfolgte wie bei einem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C (0). Am nächsten Tag wurde wieder mit 1x TBST 0,1 % gewaschen und statt einem sekundären Antikörper wurde HRP gekoppeltes Streptavidin (1:10.000 in 1x TBST 0,1 %) verwendet, welches an Biotin bindet. Die Detektion erfolgte wie bei der bereits beschriebenen Vorgehensweise bei Antikörpern.

#### 5.2.8.4 Glykanverdau

Um Festzustellen, wie sich das Glykosylierungsmuster nach Abspalten bestimmter Glykane oder einzelner Zuckerreste in verschiedenen Proben verhält, wurden Lysate der Patienten- und Kontrollfibroblasten mit unterschiedlichen Enzymen behandelt.

##### 5.2.8.4.1 N-Glykanverdau

Zum Abspalten aller N-Glykanten (mannosereich, hybrid, komplex) wurde das Enzym PNGase F eingesetzt. Dieses Enzym spaltet die Bindung zwischen dem Asparaginrest des Proteins und des ersten GlcNAc-Restes des N-Glykans. Für den Verdau wurde 20 µl Zellysat (10 µg Protein) mit je 5 µl Denaturierungspuffer (5x) für 10 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurde die Probe auf Eis gestellt bis sie RT erreicht hatte. Nun wurden 5 µl Triton X-100 (10 %) hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. 0,4 µl PNGase F (20 ng/µl) wurden in 29,6 µl 0,1 M Tris angesetzt und zu der Probe gegeben. Parallel erfolgte ein Ansatz der gleichen Probe ohne PNGase F als Kontrolle. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 10 µl SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgeköcht. Anschließend konnten die Proben auf ein SDS-Gel geladen werden.

##### 5.2.8.4.2 Core-1 O-Glykanverdau

Eine O-Glykosidase wurde verwendet, um O-Glykane des Core-1 Typs von Proteinen zu entfernen. Dafür wurde das Enzym O-GlyZOR (Genovis) genutzt. Der Verdau erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 20 µl Zellysat (10 µg Protein) mit 20 mM Tris auf 60 µl aufgefüllt. Dazu kamen 2 µl SialEXO und 2 µl O-GlyZOR bzw. 4 µl H<sub>2</sub>O bei der Kontrollprobe ohne Enzyme. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 1x SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und konnten schließlich auf ein SDS-Gel geladen werden.

#### 5.2.9 Generierung einer Knock-out-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9

Um die Auswirkungen eines defekten SLC35A1-Transporters genauer untersuchen zu können, wurde eine *SLC35A1* Knock-out (K.o.) HEK293-Zelllinie mit CRISPR/Cas9 generiert.

Für das Design der guide RNAs (gRNAs) und die Angabe möglicher Bindestellen in anderen Genen (Off-target Sites) wurde CC-Top (<https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/index.html>) verwendet. Um eine gRNA zu finden, die zu effizientem Schneiden der DNA durch Cas9 führt, wurden zunächst drei verschiedene gRNA-Sequenzen als revers-komplementäre Oligonukleotide bei Microsynth-Seqlab bestellt. In einem ersten Schritt wurden diese mit einem PCR-Programm zu einem DNA-Stück verschmolzen (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Reaktionsansatz und PCR Cycler Protokoll zum Annealen der gRNA Oligonukleotide.

Reaktionsansatz	Protokoll	
1 µl gRNA Oligonukleotid Forward (100 µM)	37 °C	30 min
1 µl gRNA Oligonukleotid Revers (100 µM)	95 °C	5 min
1 µl T4 Ligase-Puffer (10x)	95°C - 25 °C	- 5 °C/min
0,5 µl T4 Polynukleotidkinase (PNK)		
6,5 µl H <sub>2</sub> O		

Anschließend wurden die verschmolzenen („annealed“) gRNAs in den pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektor (Cas9 Vektor) eingefügt. Dazu wurde dieser mit dem Restriktionsenzym *BbsI* verdaut, aufgereinigt (0) für die folgende Ligationsreaktion verwendet:

50 ng Cas9 Vektor (*BbsI* verdaut)  
 1 µl annealed gRNAs (1:200 in H<sub>2</sub>O)  
 1,5 µl T4 Ligase-Puffer (10x)  
 1 µl T4 DNA Ligase  
 Auf 15 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

Die Ligation erfolgte für 30 min bei RT. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden danach für die Transformation von *E. coli* verwendet (5.2.6.1). Über Kolonie-PCR mit dem pSpCas9\_Seq\_Fw Primer und der gRNA-Sequenz (Revers, 10 µM) wurde überprüft, ob die Ligation erfolgreich war. Es folgten Übernachtskulturen der positiven Kolonien und Mini-Preps (5.2.6.1.1).

Die Cas9-Vektoren mit den unterschiedlichen gRNAs wurden als Nächstes auf ihre Effizienz hin getestet. Dazu wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden in 6-Well Platten transient transfiziert. Zur Effizienzbestimmung wurde das GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben verwendet. Da die getesteten Konstrukte nur mit sehr geringer Effizienz zu DNA-Doppelstrangbrüchen führten, wurde für die Generierung der K.o.-Zelllinie eine gRNA Sequenz verwendet, die zeitgleich von Banning et al. [115] publiziert wurde (siehe gRNA4, Tabelle 17). Dafür wurden erneut HEK293-Zellen mit 2,5 µg des entsprechenden Plasmids transfiziert und nach 24 h Inkubation mit Puromycin (2 µg/ml) selektiert. Die Selektionsphase wurde so kurz wie möglich gehalten, um off-target Effekte durch das Verbleiben des Cas9 Vektors in den Zellen möglichst gering zu halten. Es dauerte ca. drei Tage, bis nicht-transfizierte wildtypische (WT) Zellen abgestorben waren. Danach wurden die transfizierten Zellen in Normalmedium kultiviert. Um Einzelzellklone zu erhalten, wurden die Zellen vereinzelt. Das Picken der Einzelzellkolonien erfolgte nach Dr. Iris Lindberg mittels Agarose Cloning [116]: 50-100 Zellen wurden pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und 7-10 Tage kultiviert, bis die Kolonien mit bloßem Auge sichtbar waren und am Boden eingekreist werden konnten. Eine 24-Well Platte wurde vorbereitet, indem 200 µl Medium pro Well vorgelegt wurde. 2 %-ige Agarose in DPBS wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und unter die Sterilbank gestellt. Das Medium der 10 cm Schale wurde abgesaugt und 3 ml heiße Agarose mit 3 ml DMEM in einem 50 ml Falcon gemischt. Die handwarme Mischung wurde in die Mitte der 10 cm Platte gegossen, wo sie sofort aushärtete. Die markierten Zellkolonien konnten mit einer abgeschnittenen 200 µl Pipettenspitze mitsamt der Agarose ausgestanzt werden. Sie wurden in je ein Well der 24-Well

Platte überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aus der Agarose gelöst. Die Wells wurden zur Hälfte mit Medium aufgefüllt und die Zellen darin bis zu ca. 70 %-iger Konfluenz weiter kultiviert. Das Screenen der Einzelzellklone erfolgte mit dem Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (ThermoFisher). Dafür wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren im Well abgelöst und 1/3 der Menge in ein Eppi überführt. Die restlichen 2/3 an Zellmaterial wurden auf eine neue 24-Well Platte übertragen und bis zum Ende des Screenings weiter kultiviert. Die Zellen im Eppi wurden bei 5000 rpm für 3 min pelletiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet nach Angaben des Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Dilution protocol) aufgearbeitet und 1:10 verdünnt. Die Kit PCR wurde mit den Screening Primern (siehe Tabelle 17) in 50 µl Volumen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 17: Sequenzen der verwendeten gRNA (nach Banning et al. [115]) und der Primer für das Screening der Einzelzellklone.

Name	Art	Sequenz
SLC35A1 gRNA4_Fw	gRNA	CACCGGGTATAGACTGCAGCCATCA
SLC35A1 gRNA4_Rev	gRNA	AAACTGATGGCTGCAGTCTATACCC
SLC35A1 PCR screen gRNA4_Fw	Screening Primer	ACTAAGTAATGTCITTTGTTGCACG
SLC35A1 PCR screen gRNA4_Rev	Screening Primer	TGTTTAGCAGCATCCTTGGTC

Das PCR-Produkt der Klone, die ausschließlich eine einzelne Bande im Agarose Gel zeigten, wurde ausgeschnitten, aufgereinigt (5.2.5.8) und sequenziert (5.2.7). Klone, die eine homozygote Veränderung der Sequenz aufwiesen, wurden anschließend auf mögliche Off-Target Effekte hin untersucht. Mittels CC-Top wurde ermittelt, dass die verwendete gRNA neben dem *SLC35A1*-Gen nur mögliche Off-Target Stellen mit mindestens vier Mismatches für andere DNA-Bereiche zeigte. Da dadurch ein Doppelstrangbruch voraussichtlich verhindert werden kann [117], wurden die drei wahrscheinlichsten Gene, bei denen eine Schnittstelle im Exonbereich liegen könnte durch PCR aus cDNA der entsprechenden Klone amplifiziert und sequenziert. Vielversprechende Klone, ohne Mutationen in den möglichen Off-Target Genen, wurden mittels qPCR und Western Blot weiter untersucht, um den erfolgreichen K.o. des *SLC35A1*-Gens zu bestätigen.

#### 5.2.10 Golgi-Transporteraktivitätsassay

Die Aktivität des Transporterproteins wurde mit einem Golgi-Transporteraktivitätsassay bestimmt. Dabei wurden intakte Golgi-Vesikel aus den Zellen isoliert und mit radioaktiv-markierten Zuckern inkubiert. Zuletzt wurden die Vesikel aufgeschlossen und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen.

### 5.2.10.1 Isolation von Golgi-Vesikeln aus Fibroblasten

Für die Isolation von Golgi-Vesikeln aus Fibroblasten wurden je 18 konfluente 15 cm Zellkulturschalen der Patienten- und Kontrollzellen benötigt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis mit sterilfiltrierten (0,45 µm) und eiskalten Puffern durchgeführt: Die Zellen wurden pro 15 cm Schale drei Mal mit 7 ml Hanks-Puffer gewaschen, anschließend in 4 ml Puffer A (Tabelle 18) abgeschabt und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2300 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde, ohne zu resuspendieren, in 750 µl Puffer A aufgenommen und in einen Dounce Homogenisator überführt. Darin wurden die Zellen mit einem Stößel der Größe A und 20 Hüben ohne Luftblasen aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2300 rpm, 10 min, 4 °C), bei dem nicht-aufgeschlossene Zellen und Zellkerne vom Zellüberstand getrennt wurden. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Tube überführt und das Pellet erneut mit 750 µl Puffer A im Dounce Homogenisator bearbeitet. Es wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand im Falcon-Tube gesammelt.

Um die Golgi-Vesikel vom Rest des Zellüberstands zu trennen, folgte eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden 5 ml Puffer B (Tabelle 18) in einem SW-40 Polyallomer-Röhrchen vorgelegt und der Zellüberstand vorsichtig darauf geschichtet. Die Röhrchen wurden mit Puffer A austariert und für 70 min bei 25.000 rpm (100.000 g) und 4 °C im SW-40 Rotor zentrifugiert. Durch die unterschiedlichen Sucrose-Konzentrationen in Puffer A und B entsteht im Röhrchen ein Dichtegradient. Die Golgi-Vesikeln sammelten sich als milchliche Schicht in der 0,25-1,3 M Interphase des Gradienten und wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 2 ml Eppi überführt. Die Proteinkonzentration des Membranfelds wurde wie in 0 beschrieben gemessen (Probe unverdünnt, BSA-Standard in H<sub>2</sub>O gelöst).

Tabelle 18: Zusammensetzung der Sucrose-Puffer für die Dichte-Gradientenzentrifugation.

<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
0,25 M Sucrose	1,3 M Sucrose
3 mM Imidazol, pH 7,4	3 mM Imidazol, pH 7,4

### 5.2.10.2 Messung des Zuckerimports

Der Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac (Sialinsäure) wurde, im Vergleich zum Import der Zucker GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose als Kontrollen, gemessen. Je 3 µM der radioaktiv-markierten Zucker wurden in 1200 µl Puffer C (Tabelle 19) aufgenommen. Pro Probe wurden davon 200 µl in Eppis vorgelegt. Das Eppi für die Nullwert-Bestimmung (T<sub>0</sub>) wurde auf Eis gestellt, wohingegen die Eppis für die Doppelbestimmungen für 1 min bei 37 °C vorgewärmt wurden. Für die Doppelbestimmungen wurden mit einer abgeschnittenen Spitze 70 µl Membranfeld (49 µg) zu den gelösten Zuckern pipettiert. Die Ansätze mit GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose wurden 10 min und die Reaktionen mit CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 800 µl kaltem Puffer C gestoppt. Zum T<sub>0</sub>-Ansatz wurde nun ebenfalls Membranfeld hinzugefügt und dann alle Proben bei 45.000 rpm für 20 min (4 °C) zentrifugiert (TLA-100 Rotor). Die Überstände wurden in Szinti Röhrchen mit 2 ml

Ultima Gold Szintillation-Reagenz übertragen. Die gemessenen Werte geben Aufschluss über die nicht-transportierte Radioaktivität bzw. bei  $T_0$  der tatsächlichen Start-Radioaktivität, da auch unspezifische Bindungen der Zucker an die Golgi-Vesikel zu einer geringfügigen Reduktion der für den Transport zur Verfügung stehenden Radioaktivität führen können. Die Pellets wurden drei Mal mit 500  $\mu$ l kaltem Puffer C gewaschen und bei 45.000 rpm für 20 min (4 °C) zentrifugiert. Um die Vesikel aufzuschließen, wurden die Pellets mit 300  $\mu$ l Lysepuffer (Tabelle 19) resuspendiert und mit Ultraschall (3 x 10 s) lysiert. Die Gesamtheit der radioaktiv-markierten Zucker, die sich in den Vesikeln befanden, wurde dadurch in der Lösung freigesetzt. Es folgte eine Proteinfällung über Nacht bei 4 °C durch Zugabe von 300  $\mu$ l TCA (20 %). Am nächsten Tag wurden die gefällten Proteine, und die daran gebundenen Zucker, bei 14.000 rpm für 20 min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand, der die importierten, aber nicht auf ein Protein übertragenen Zucker enthielt, wurde in ein Szintiröhrchen mit 2 ml Ultima Gold Szintillation-Reagenz überführt und mit dem Tri-Carb 2800 TR Flüssigszintillation-Analysegerät (Perkin Elmer, Waltham, USA) gemessen. Die Pellets wurden einmal mit 500  $\mu$ l 10 % TCA gewaschen und bei 14.000 rpm für 20 min und 4 °C erneut pelletiert. Danach wurden die Pellets in 200  $\mu$ l NaOH (2,5 M) resuspendiert und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden auf RT abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden sie mit 600  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 200  $\mu$ l Essigsäure versetzt, in ein Szinti Röhrchen mit 2 ml Ultima Gold Szintillation-Reagenz übertragen und die Radioaktivität am Tri-Carb 2800 TR gemessen. Die gemessene Radioaktivität entspricht hierbei den importierten radioaktiv-markierten Zuckern, die in Glykanstrukturen auf Proteinen eingebaut wurden.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Puffer für die Messung des Zuckerimports in Golgi-Vesikel.

<b>Puffer C</b>	<b>Lysepuffer</b>
10 mM Tris/HCl, pH 7,5	50 mM Tris/HCl, pH 8,8
150 mM KCl	5 mM EDTA Na <sub>2</sub>
1 mM MgCl <sub>2</sub>	2 % SDS

Aus den Messwerten wurde die spezifische Transporteraktivität für den Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure berechnet. Die Werte für den Import von GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose dienten als Kontrolle, dass die Golgi-Vesikel intakt waren und wurden als Normalisierungsparameter des spezifischen CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure Imports verwendet.

### 5.2.11 Cyclohexamidassay zur Bestimmung der Protein-Halbwertszeit

Um die Halbwertszeit und damit die Stabilität des SLC35A1-Proteins zu bestimmen, wurden HEK293 WT- und K.o.-Zellen in 6-Well Platten ausgesät, sodass die Zellen am nächsten Tag ca. 70-80 % konfluent waren. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie mit dem pCI-Neo His-HA Leervektor, dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-His-HA oder pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-His-HA Vektor transfiziert (siehe 5.2.6.2) und für ca. 30 h mit dem Transfektionsmix inkubiert. Danach wurde das Medium durch Normalmedium mit 100  $\mu$ g/ml Cyclohexamid (CHX) ersetzt, die Zellen darin für 0-24 h kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten abgeschabt und pelletiert. Die Zellpellets wurden lysiert (siehe 5.2.8.1) und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das HA-Tag-Signal im Western Blot wurde quantifiziert und auf das  $\beta$ -Aktinsignal normalisiert. Die

normalisierten Werte wurden dann wiederum auf die Expressionsstärke der Proteine ohne CHX-Behandlung normalisiert, wobei dieser Wert 100 % entsprach. Die resultierenden Werte wurden in einem Graph aufgetragen und eine Trendlinie angelegt. Anhand der Gleichung der Trendlinie konnte die Halbwertszeit des wildtypischen und des mutierten Proteins ermittelt werden, was der Zeit entspricht, zu der nur noch 50 % des jeweiligen Proteins vorhanden war.

### 5.2.12 Apoptoseassay

Um zu überprüfen, ob es in den Patientenzellen zu einer schneller eingeleitet Apoptose als in Kontrollzellen kommt, wurde ein Apoptoseassay durchgeführt. Hierfür wurden die Fibroblasten in T75 Flaschen ausgesät und bei 80 %-iger Konfluenz mit 1  $\mu$ M Staurosporin in Normalmedium behandelt. Die Inkubation mit dem Apoptose-induzierenden Staurosporin erfolgte für 0-24 h. Da Staurosporin als 1 mM Stock in DMSO angesetzt war, wurde als Kontrollkondition je eine Flasche mit dem gleichen Volumen an DMSO versetzt und 24 h damit kultiviert. Die Zellen wurden nach den Inkubationszeiten abgeschabt, lysiert (5.2.8.1) und mittels SDS-PAGE und Western Blot (5.2.8.3) analysiert. Es wurde das Protein Caspase 3 detektiert, welches bei eingeleitetem Zelltod in gespaltener Form vorliegt und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin.

### 5.2.13 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferation der Patientenzellen wurde ein WST-1 Assay durchgeführt. WST-1 ist ein stabiles Tetrazoliumsalz, welches durch die Produktion von NAD(P)H von lebensfähigen Zellen in Formazan reduziert wird. Der gebildete Formazanfarbstoff kann photometrisch gemessen werden und korreliert mit der Anzahl lebender Zellen. In eine 96-Well Platte wurden pro Well 750 Fibroblasten bzw. 4000 HEK293-Zellen, sowie ein Well ohne Zellen für die Hintergrundmessung in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l ausgesät. Die Zelllinien wurden für jeden zu messenden Zeitpunkt in Triplikaten ausgesät. Am darauffolgenden Tag, wenn die Zellen angewachsen waren, wurde in die erste Reihe der 96-Well Platte pro Well 10  $\mu$ l WST-1 Reagenz hinzu pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C konnte die Absorption bei 450 nm gemessen werden. Danach wurde im Falle einer Supplementierung der Zellen mit 10 mM GlcNAc das Medium der verbleibenden Wells für die weiteren Messtage gewechselt oder die Platte normal weiter kultiviert. Die Zellen in den verbleibenden Wells konnten weiterwachsen und zu den gewünschten Zeitpunkten mit WST-1 versetzt werden. Eine Wachstumskurve wurde geplottet indem die Absorption gegen die Zeit aufgetragen wurde. Zur Bestimmung der Wachstumsrate ( $r$ ) und der Verdopplungszeit ( $T_d$ ) wurde der Abschnitt der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) logarithmisch aufgetragen. Die Steigung der linearen Trendlinie entsprach hierbei der Wachstumsrate ( $r$ ). Daraus ließ sich die Verdopplungszeit ( $T_d$ ) wie folgt berechnen:  $T_d = \ln(2)/r$ .

### 5.2.14 Immunfluoreszenz

Bei einer Immunfluoreszenzfärbung werden spezifische Proteine in den Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht. Dadurch kann die intrazelluläre Lokalisation der Proteine bestimmt werden. In einer 24-Well Platte wurden 30.000 Fibroblasten auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen

und die Fibroblasten zwei Mal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Für alle Schritte wurden 200 µl Volumen pro Well verwendet. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 4 % PFA in DPBS für 20 min bei RT inkubiert. Darauf folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,5 % Triton X-100 (in DPBS) für 10 min bei RT, was dafür sorgte, dass die Antikörper ins Innere der Zellen gelangen konnten. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, wurden freie Bindestellen für 1 h mit 5 % BSA (in DPBS) bei RT blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den primären Antikörpern (meist 1:400 in 1 % BSA, siehe 0) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde drei Mal mit DPBS gewaschen, bevor die zweite Inkubation mit den sekundären, fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (1:700 in 1 % BSA, siehe 0) für 30 min bei 37 °C folgte. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 3-maliges Waschen mit DPBS entfernt. Um den Zellkern zu färben, wurden zwei Tropfen NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagenz (Invitrogen, ThermoFisher) pro benötigtem Milliliter in DPBS gelöst und die Zellen damit für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden danach kurz mit DPBS gewaschen und anschließend mit 10 µl Fluoromount™ (Sigma-Aldrich) auf Objektträgern eingebettet. Nach Lagerung über Nacht, konnten am Fluoreszenz-Mikroskop Aufnahmen der gefärbten Zellen gemacht werden. Die Objektträger mit eingebetteten Zellen wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

#### 5.2.15 SLC35A1 ELISA-Kit

Zur Quantifizierung der SLC35A1-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien wurde das Human CMP-Sialic Acid Transporter (SLC35A1) ELISA-Kit (Abbexa) verwendet. Für den ELISA-Assay wurden die verschiedenen Zelllinien lysiert und deren Gesamtproteingehalt angeglichen. Anschließend wurden die Proben auf die mit einem SLC35A1-Antikörper beschichtete Platte des Kits aufgetragen und inkubiert. Nach einigen Wasch- und Inkubationsschritten wurde ein Farbumschlag photometrisch gemessen. Die Farbe war umso intensiver, je mehr SLC35A1 in der Probe vorhanden war und binden konnte. Anhand einer Standardreihe des ELISA-Kits konnte somit die SLC35A1-Konzentration der Proben berechnet werden.

Von jeder Zelllinie wurden jeweils drei T75 Flaschen verwendet. Jede ca. 80 % konfluente T75 Flasche wurde drei Mal mit 5 ml DPBS gewaschen und anschließend in 2 ml DPBS abgeschabt. Die Zellen wurden bei 2000 rpm und 4 °C für 5 min durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl DPBS resuspendiert und durch 3 X 10 Pulse mittels Ultraschalls aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 13.000 rpm, 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt und für die Proteinbestimmung verwendet (siehe 0). Zu vergleichende Proben wurden auf den Proteingehalt der am geringsten konzentrierten Probe mit DPBS angeglichen (ca. 0,1-0,5 µg/µl) und anschließend 1:10 mit DPBS verdünnt. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die TMB Substrat Inkubation für 15 min erfolgte. Die Messung wurde in technischen Duplikaten durchgeführt.

### 5.2.16 Färbung neutraler Lipide mit Oil Red O

Neutrale Lipide (Di-/Triacylglycerol und Cholesterolester) können mit dem Farbstoff Oil Red O angefärbt und quantifiziert werden. Dazu wurde das Lipid (Oil Red O) staining Kit von Abnova verwendet. In einer 24-Well Platte wurden pro Well 30.000 Fibroblasten bzw. 100.000 HEK293-Zellen am Tag vor dem Experiment ausgesät. Für HEK293-Zellen wurden die Wells zusätzlich mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden 120 µl Poly-L-Lysin in je ein Well pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Wells zwei Mal vorsichtig mit DPBS gewaschen. Die Platte wurde zum Trocknen unter der Sterilbank stehen gelassen. Die Färbung der Lipidtröpfchen in den Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden am Lichtmikroskop mit 20x Vergrößerung gemacht. Danach wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen gelöst und konnte anschließend photometrisch gemessen und dadurch die Menge an neutralen Lipiden quantifiziert werden.

### 5.2.17 Transkriptomische Analyse mittels nCounter

Eine nCounter Analyse gibt Aufschluss über die gleichzeitige Expression von vielen verschiedenen Genen auf Transkriptebene. Es ist eine Hybridisierungsmethode, bei der durch Binden spezifischer Sonden die Menge an bestimmten Transkripten quantifiziert werden kann. Die Sonden tragen einen spezifischen Barcode, über den die Menge der einzelnen Transkripte ermittelt werden kann. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber z.B. qPCR ist, dass hier keine enzymatische Reaktion stattfindet, was zu zuverlässigen und replizierbaren Ergebnissen mit sehr geringen Schwankungen der technischen Replikate führt.

Total-RNA wurde wie in 5.2.5.2 beschrieben aus Zellpellets hergestellt und an Ralph Röth der nCounter Core Facility am Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg übergeben, welcher die Messung durchführte. Es wurde die Expression von 190 Genen gemessen, die für die verschiedenen Glykosylierungsprozesse von Bedeutung sind, inklusive 6 Housekeeping Genen (*ACTB*, *C1ord43*, *GAPDH*, *RAB7A*, *SNRPD3*, *ACADL*). Für die Auswertung wurde die nSolver™ 4.0 Software benutzt. Dabei wurden die Messwerte jedes Transkriptes zunächst auf die, der Housekeeping Gene normalisiert. Dann wurden die normalisierten Werte der Patientin auf den Mittelwert des jeweiligen Transkriptes in den Kontrollproben normalisiert. Zusätzlich wurden die einzelnen Kontrollen ebenfalls auf den Mittelwert aller Kontrollproben normalisiert, um Ausreißer ausschließen zu können.

### 5.2.18 Proteomik-Analyse von Fibroblasten

Um einen allgemeinen Einblick in mögliche deregulierte Signalwege in den Patientenzellen zu erhalten, wurde eine ungerichtete „Shotgun“-Proteomik-Analyse von Dr. Thomas Ruppert der Core Facility für Massenspektrometrie und Proteomik am Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Von Patienten- und Kontrollzellen wurden je drei konfluente T75 Flaschen geerntet und pelletiert. Aus den Pellets wurde mit einer Chloroform-Methanol Fällung Proteine isoliert. Die Analyse erfolgte mittels Flüssigchromatografie gekoppelt mit einem Orbitrap QE HF (Thermo Fisher) Massenspektrometer (LC-MS/MS). Aus den Triplikaten wurden Mittelwerte und Standardabweichung ermittelt. Die Werte der erkannten Peptide in den Patientenzellen wurden mit denen der Kontrollzellen verglichen und über einen Student'schen T-Test statistisch eingeordnet.

### 5.2.19 Lipidomik-Analyse von Fibroblasten

Die Messung und Quantifizierung verschiedener Lipidspezies in Patienten- und Kontrollfibroblasten wurde vom Labor von Prof. Dr. Britta Brügger des Biochemiezentrams der Universität Heidelberg durchgeführt. Die Methode basiert auf Nanoelektrospray-Ionisationstandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) und wurde wie von Liebisch et al. [118] und Özbalci et al. [119] beschrieben durchgeführt. Es wurden je 4 Replikate (jeweils vier Pellets konfluenter T75 Flaschen, geschabt und Zellzahl bestimmt) gemessen und aus den Werten Mittelwerte und Standardabweichung berechnet.

### 5.2.20 Messung der Nukleotide und Energiemetabolite

Die Aufarbeitung der gefrorenen Zellpellets sowie die Messung der Nukleotidzucker und Energiemetabolite und die Auswertung der Messdaten wurden von der Metabolomics Core Facility in Heidelberg unter der Leitung von Dr. Gernot Poschet durchgeführt. Die Zellpellets wurden nach Røst et al. [120] aufgearbeitet. Kurz zusammengefasst wurden die Zellpellets auf Eis mit 250 µl gekühltem Extraktionspuffer (Acetonitril : MeOH : 15 mM Ammoniumacetat in H<sub>2</sub>O (3:1:1), pH 10) extrahiert. Anschließend wurden die Proben in einem Ultraschallbad (Transsonic 460, Elma) für fünf Minuten bei höchster Frequenz auf Eis sonifiziert, um einen vollständigen Aufschluss aller Zellen sicherzustellen. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 13.000 g für 15 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues LC-MS-Autosampler-Vial überführt und sofort bei -80 °C eingefroren, falls die Messung nicht direkt durchgeführt werden konnte. Für die Trennung und den Nachweis der Metabolite wurde ein ACQUITY I-class PLUS UPLC-System (Waters) verwendet, das mit einem QTRAP 6500+ (AB SCIEX) Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) gekoppelt war. Die Datenerfassung erfolgte mit Analyst 1.7.2 (AB SCIEX) und wurde mit der OS-Software-Suite 2.0.0 (AB SCIEX) verarbeitet. Die von Dr. Glynis Klinke (Metabolomics Core Facility Heidelberg) bereitgestellten Daten waren als Konzentration in pmol/10<sup>6</sup> Zellen angegeben und wurden für die weiteren Berechnungen verwendet.

### 5.2.21 Messung der Aminosäuren, Acylcarnitine und sehr langkettigen Fettsäuren

Eine Messung der Aminosäuren und Acylcarnitine und sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs) mittels Elektronenspray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) wurde im Labor des Neugeborenenstübens des Dietmar-Hopp-Stoffwechselzentrums in Heidelberg durchgeführt. Hierfür wurde ein Quattro Ultima triple quadrupole Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) mit Elektronenspray-Ionenquelle (ESI) und Micromass MassLynx Datensystem verwendet. Die Menge an verschiedenen Aminosäuren, Acylcarnitinen und VLCFAs wurde in den Fibroblasten der Patientin sowie Kontrollen ermittelt. Es wurden je vier Kontroll- und Patientenzell-Pellets für die Messungen verwendet. Die Werte der Replikate wurden auf den Gesamtproteingehalt normalisiert und Mittelwerte und Standardabweichung berechnet.

### 5.2.22 Statistik

Sofern bei den einzelnen Experimenten nicht explizit angegeben, wurden alle Versuche mindestens in Triplikaten durchgeführt. Es wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem, zweiseitigen Student'schen T-Test oder einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) in GraphPad PRISM ermittelt. Als statistisch signifikant wurden diejenigen Ergebnisse erachtet, deren p-Wert  $\leq 0,05$  entspricht. Nicht signifikante Unterschiede entsprachen demnach einem p-Wert von  $> 0,05$ . Signifikante Unterschiede wurden in den Graphen durch Sternchen gekennzeichnet:  $p \leq 0,05$  \*,  $p \leq 0,01$  \*\*,  $p \leq 0,001$  \*\*\*,  $p \leq 0,0001$  \*\*\*\*.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Anamnese einer Patientin mit pathologischen Anomalien

Die inzwischen siebenjährige Patientin wurde ursprünglich am Universitätsklinikum Tübingen aufgrund eines multiorganischen Krankheitsbilds vorgestellt. Festgestellt wurden eine allgemeine Gedeihstörung (<P3), Mikrozephalie (P3-P10), Kleinwüchsigkeit (<P3) und mehrere Dysmorphien, wie eine zusätzliche Ohrmuschel am rechten Ohr und eine Pigmentstörung (Café au lait Fleck) an der linken Thoraxseite sowie oberhalb des Nabels. Die Patientin litt zudem an wiederkehrenden Infekten der oberen Atemwege, was zu einem einmaligen Fieberkrampf bzw. epileptischen Anfall führte. Durch Blutuntersuchungen konnte außerdem eine Autoimmunneutropenie sowie -thrombozytopenie diagnostiziert werden. Über den familiären Hintergrund der Patientin ist nichts bekannt. Allerdings wurde von Verwandten berichtet, dass die Patientin durch rasche Erschöpfung nur geringe Distanzen zu Fuß zurücklegen kann. Weitere Informationen über den Status der Skelettmuskulatur oder die intellektuellen Fähigkeiten der Patientin wurden nicht übermittelt.

### 6.2 Genetische Untersuchungen und in silico Analyse der Mutation

Durch Whole-Exome-Sequenzierung am Universitätsklinikum Tübingen wurde eine homozygote Missense-Mutation (c.133A>G) im zweiten Exon des *SLC35A1* Gens der Patientin identifiziert (ENSG00000164414, NM\_006416.5). Die veränderte Base führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin an Position 45 des SLC35A1-Proteins (p.Thr45Ala). Die Mutation wurde zunächst mittels Sanger Sequenzierung bestätigt (Abbildung 10).

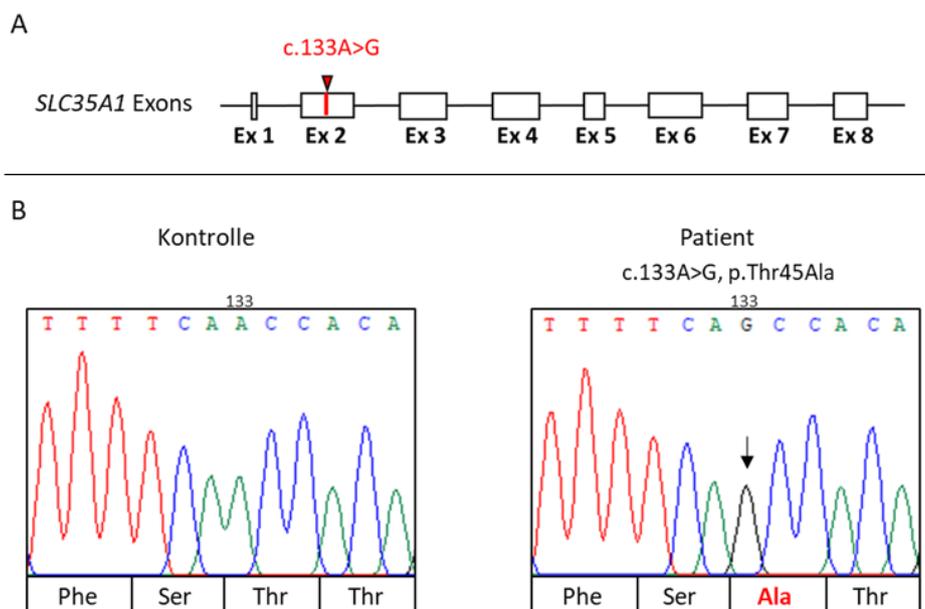


Abbildung 10: Bestätigung der homozygoten Mutation im *SLC35A1*-Gen der Patientin. **A)** Die identifizierte Mutation befindet sich in Exon (Ex) 2 des *SLC35A1*-Gens. Abbildung reproduziert aus Masterarbeit von Lukas Hoeren [121]. **B)** Durch Sanger Sequenzierung der cDNA des *SLC35A1*-Gens aus Kontroll- und Patientenfibroblasten wurde die homozygote Missense Mutation bestätigt. Dargestellt sind die Elektropherogramme der Sequenzierung der *SLC35A1* cDNA und die entsprechenden Aminosäuren. Der schwarze Pfeil markiert die veränderte Base im Gen der Patientin an Position 133. Die dadurch geänderte Aminosäure ist rot markiert.

### 6.2.1 Threonin<sup>45</sup> ist konserviert und die Mutation potenziell pathogen

Da die Mutation der Patientin noch nicht beschrieben war, wurde zuerst mittels *in silico* Analysen die Konservierung der ausgetauschten Aminosäure an Position 45 des Proteins überprüft und die Mutation auf ihre potenzielle Pathogenität hin untersucht. Dies diente dazu festzustellen, ob die veränderte Aminosäuresequenz Auswirkungen auf die Funktionsweise des Patienten-Proteins haben könnte. Zunächst wurde die topologische Anordnung der Aminosäuren mit dem PROTTER Online-Tool [122] visualisiert. Dadurch zeigte sich, dass das polare Threonin an Position 45 (Thr<sup>45</sup>) auf Seite des Golgi-Lumens positioniert ist. Es bildet die letzte Aminosäure des ersten luminalen Loops und befindet sich direkt am Übergang zum hydrophoben Bereich der zweiten Transmembrandomäne (TMD) (Abbildung 11).

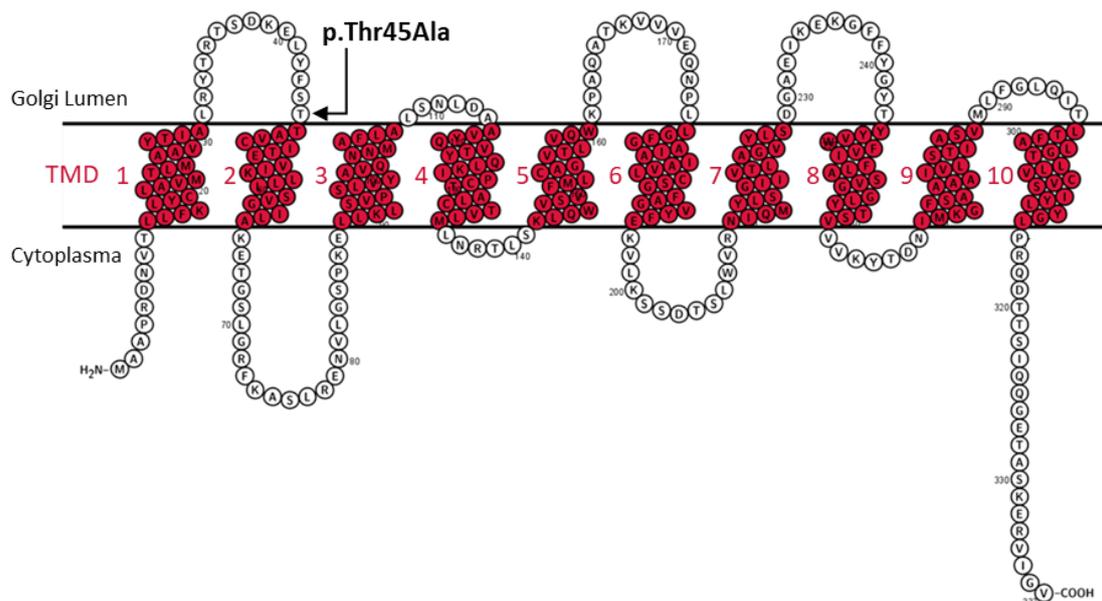


Abbildung 11: Die betroffene Aminosäure befindet sich unmittelbar vor der zweiten Transmembrandomäne am Ende des ersten luminalen Loops des Proteins. Schematische Darstellung des SLC35A1-Proteins. Die zehn Transmembrandomänen (TMD) des Proteins sind in Rot dargestellt und die Position des Aminosäureaustauschs aufgrund der Patientenmutation (Thr45Ala) ist durch einen Pfeil markiert. Struktur erstellt von PROTTIER, Darstellung wurde angepasst.

Um die Konservierung von Thr<sup>45</sup> zu überprüfen, wurde die Aminosäuresequenz des humanen SLC35A1-Proteins mittels NCBI Protein BLAST und Clustal Omega mit den entsprechenden Sequenzen aus anderen Spezies verglichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl Thr<sup>45</sup> (T<sup>45</sup>) als auch die unmittelbar angrenzenden Aminosäuren (Y<sup>42</sup>, F<sup>43</sup>, S<sup>44</sup>, T<sup>46</sup>, A<sup>47</sup>) über mehrere Spezies hinweg hoch konserviert sind (Tabelle 20).

Tabelle 20: Die Aminosäure Threonin an Position 45 sowie die angrenzenden Aminosäuren sind hoch konserviert. Vergleich der Aminosäuren-Abfolge des SLC35A1-Proteins aus verschiedenen Spezies im Bereich der Patientenmutation.

Patient	LFKLYCLAVMTLMAAVYTIALRYTRTSDKELYFSA <b>A</b> TAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Homo sapiens</i>	LFKLYCLAVMTLMAAVYTIALRYTRTSDKELYFSTTAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Gorilla gorilla</i>	LFKLYCLAVMTLMAAVYTIALRYTRTSDKELYFSTTAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Pan troglodytes</i>	LFKLYCLAVMTLMAAVYTIIVLRYTRTSDKELYFSTTAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Pongo abelii</i>	LFKLYCLAVMTLMAAAYTIALRYTRTSDKELYFSTTAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Capra hircus</i>	LFKLYCLAVMTLVAATYTIALRYTRTSDKELYFSTTAVCITEVIKLLLSV	60
<i>Mus musculus</i>	FFKLYCLTVMTLVAAAYTVALRYTRTTAEELYFSTTAVCITEVIKLLISV	60
<i>Danio rerio</i>	LFKLYCLTVMTLIAATYTVALRYTRTVSTELYFSTTAVCLAELI KLLLSL	58
<i>Xenopus laevis</i>	LFKLYCLLVMTLIAAAYTVVLRVTRTVTTEMYFSTTAVCVTEVIKLLLSV	59
<i>Gallus gallus</i>	LFKLYCLTVMTLVAATYTVALRYTRTVGAELYFSTTAVCITEVIKLFSLV	60
<i>Pogona vitticeps</i>	LFKLYCLTVMTLVAATYTVALRYTRTTETVLYFSTTAVCVTEVIKLFSL	60
	:***** *****:*.**.*:.****** :***:*****:.*:*****:.*:	

Um einen Eindruck zu bekommen, ob die Patientenmutation krankheitsverursachend sein könnte, wurde die Pathogenität der Mutation durch verschiedene Prognose-Algorithmen der dbNSFP V4.3A Datenbank bewertet [113]. Hierbei wurde die Bewertung der Vorhersage-Tools SIFT, SIFT4G, Polyphen2, PROVEAN, VEST4, MetaSVM, M-CAP, REVEL, MVP und ClinPred berechnet. Die Werte geben an, ob der Aminosäureaustausch Auswirkungen auf die Funktion und Struktur des Proteins haben könnte und somit die Veränderung potenziell schädlich ist. Daraus ergab sich, dass 7 der 10 genutzten Algorithmen die Patientenmutation als pathogen einstufen.

Tabelle 21: Die Mehrzahl der verwendeten Prognose-Algorithmen stufen die Mutation als pathogen ein. Bewertung des Pathogenitätspotentials der c.133A>G (p.Thr45Ala) Mutation durch verschiedene Prognose-Algorithmen. Dargestellt ist der jeweilige berechnete Wert der verschiedenen Algorithmen, deren spezifische Grenzwerte zur Bewertung der Pathogenität sowie die daraus folgende Prognose.

Algorithmus	Bewertung	Grenzwert Pathogenität	Prognose
SIFT	0,003	$\leq 0,05$	Pathogen
SIFT4G	0,009	$\leq 0,05$	Pathogen
Polyphen2	0,997	$\geq 0,85$	Pathogen
PROVEAN	-2,91	$\leq -2,5$	Pathogen
VEST4	0,774	$\geq 0,5$	Pathogen
MetaSVM	-0,4255	$\geq 0$	Nicht pathogen
M-CAP	0,032661	$\geq 0,025$	Pathogen
REVEL	0,540	$\geq 0,4$	Pathogen
MVP	0,66906	$\geq 0,75$	Nicht pathogen
ClinPred	0,37991	$\geq 0,5$	Nicht pathogen

Die theoretische Funktionalität des mutierten Proteins wurde zudem mit dem Prognose-Server MutationAssessor (MutationAssessor.org) ermittelt. Basierend auf der Konservierung der betroffenen Aminosäure berechnet dieser einen Wert, der angibt ob die Mutation potenziell einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben könnte [123], [124]. Die Werte reichen hierbei von -5,17 (niedrige Funktionalität) bis 6,49 (hohe Funktionalität). Die MutationAssessor Bewertung der Patientenmutation lag im Bereich der mittleren Funktionalität bei 2,79 (Abbildung 12).

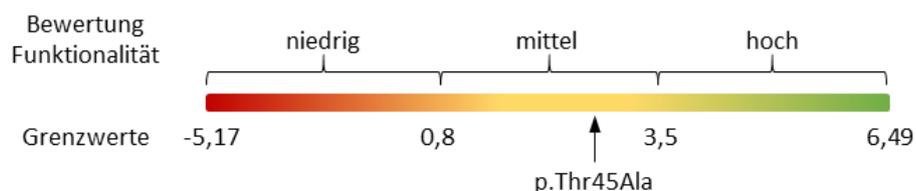
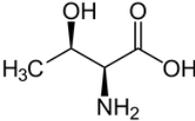
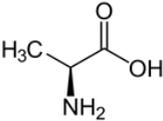


Abbildung 12: Die Bewertung der Funktionalität des Proteins mit Patientenmutation liegt im mittleren Bereich. Bewertung der Funktionalität des SLC35A1-Proteins mit p.Thr45Ala Mutation durch MutationAssessor. Mit einem schwarzen Pfeil ist die Bewertung von 2,79 für das Protein mit Patientenmutation markiert, die im oberen Bereich der mittleren Funktionalität auf der Werte-Skala des Servers liegt.

## 6.2.2 Potenzielle Auswirkungen des Aminosäureaustauschs auf die Proteinstruktur

Wie bereits in Abbildung 11 veranschaulicht, befindet sich die betroffene Aminosäure Thr<sup>45</sup> direkt am Übergang von einer hydrophilen Loop-Region zu einer hydrophoben Transmembrandomäne. Die Aminosäuren Threonin und Alanin haben unterschiedliche chemische Eigenschaften (Tabelle 22), was die Proteinstruktur beeinflussen könnte.

Tabelle 22: Chemische Eigenschaften der Aminosäuren Threonin und Alanin.

Aminosäure	Threonin	Alanin
Polarität	polar	unpolar
Strukturformel		
Molare Masse [g/mol]	119,12	89,10

Da ein Austausch des polaren Threonins zum unpolaren Alanin Auswirkungen auf die Faltung bzw. die Struktur des Proteins haben könnte, wurden die intramolekularen Wechselwirkungen und die Tertiärstruktur mit dem Onlinetool DynaMut [125] und dem Webserver Phyre2 [126] simuliert. Die Vorhersagen der möglichen Auswirkungen auf die Proteinstruktur basieren auf Kristallstrukturen des Slc35a1 Maus-Proteins (PDB: 6XBO, 6OH2). Mittels DynaMut wurde eine Änderung der freien Gibbs-Energie von  $\Delta\Delta G$ : 2,713 kcal/mol berechnet. Ein positiver  $\Delta\Delta G$  Wert deutet auf einen stabilisierenden Effekt der Mutation hin, was allerdings auch eine verminderte Beweglichkeit des Proteins zur Folge haben kann. In Bezug auf die Proteinflexibilität sagte DynaMut eine geänderte Vibrationsentropie von  $\Delta\Delta S_{\text{vib}} \text{ ENCoM}$ : -2,458 kcal·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup> zwischen dem wildtypischen und dem mutierten Protein voraus. Ein negativer Wert für die Änderung der Vibrationsentropie bedeutet, dass das mutierte Protein insgesamt an Flexibilität im Vergleich zum wildtypischen Protein verliert. Durch den Aminosäureaustausch zu Alanin kommt es aufgrund der fehlender Hydroxygruppe des Threonins zum Verlust einer Wasserstoffbrücke, die im WT-Protein zwischen der zweiten und siebten Helix bzw. TMD besteht (Abbildung 13 A). In diesem Bereich des Moleküls wurde eine Erhöhung der Flexibilität vorhergesagt (Abbildung 13 B, roter Bereich), während eine Versteifung mehrerer luminal-transmembraler Übergangsbereiche sowie des ersten und dritten luminalen Loops angegeben wurde (Abbildung 13 B, blaue Bereiche).

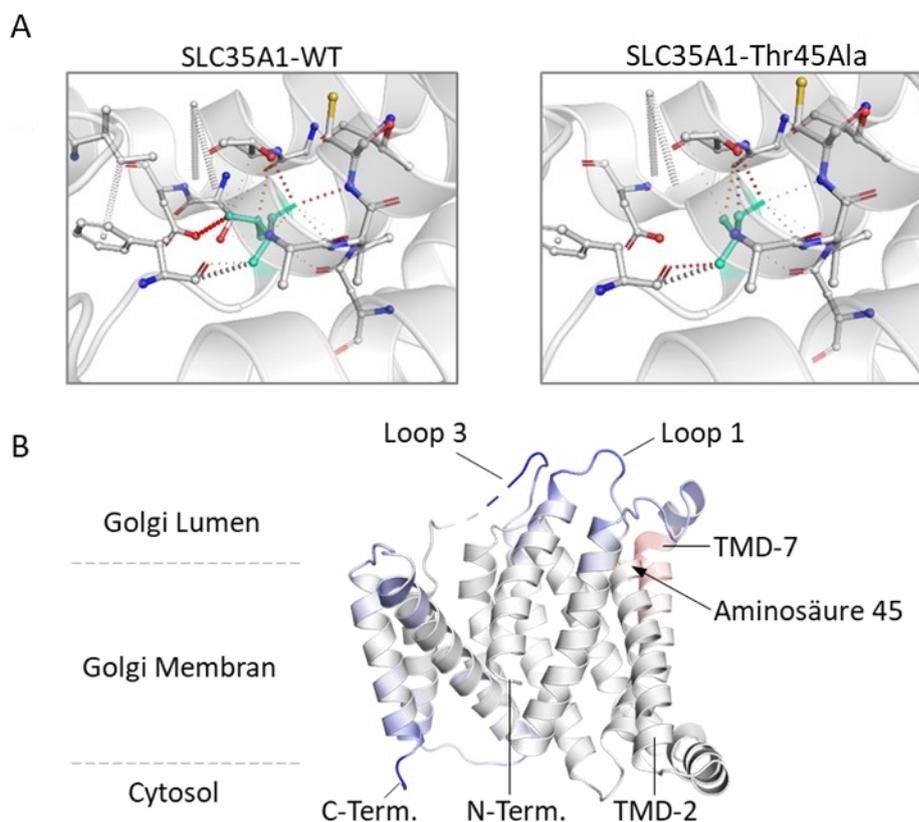


Abbildung 13: Durch den Aminosäureaustausch geht eine interhelicale Wasserstoffbrückenbindung verloren, was Auswirkungen auf die Molekül-Flexibilität haben könnte. Simulation der intramolekularen Wechselwirkungen bei wildtypischem (WT) SLC35A1 und im Falle des Aminosäureaustausch Thr45Ala, erstellt mit DynaMut (basierend auf der Kristallstruktur des Maus-Proteins, PDB: 6XBO). **A)** Durch den Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin geht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen zwei Helices (TMD-2 und TMD-7) verloren. Die wildtypische und veränderte Aminosäure ist jeweils in Cyan gefärbt. Rot gestrichelte Linien=Wasserstoffbrücken, gelb gestrichelte Linien=Ionenbindungen, grau gestrichelte Linien=Van der Waals Kräfte. **B)** Tertiärstruktur des WT SLC35A1-Proteins in Seitenansicht mit potenziellen Flexibilitätsänderung aufgrund eines Aminosäureaustauschs an Position 45 von Threonin zu Alanin. Die blauen Bereiche deuten auf eine Verringerung der Molekül-Flexibilität hin, der rötliche Bereich auf eine Erhöhung der Flexibilität. Angepasste Abbildung von DynaMut.

Weiterhin wurde die Tertiärstruktur des SLC35A1-Proteins mit und ohne Patientenmutation mit dem Phyre2 Webserver evaluiert. Das Homologie-Model basiert ebenfalls auf der Kristallstruktur des Maus-Transporters. Wie auch schon bei der Flexibilitätsanalyse durch DynaMut, ergab sich, dass es beim mutierten SLC35A1-Protein zu einer Veränderung der Tertiärstruktur im Bereich des dritten luminalen Loops kommen könnte (Abbildung 14 A). Die luminal Perspektive des Proteins zeigt, dass diese Veränderung die Unterseite des Proteins und damit auch den Austrittsweg des Substrates verengen könnte (Abbildung 14 B). Hier ist zu beachten, dass die Struktur im Bereich dieses Loops ein geringeres Konfidenzniveau aufweist als die restliche Proteinstruktur (siehe Abbildung 13 B, dargestellt durch gestrichelten Strukturbereich), die Kristallstruktur ist an dieser Stelle also nicht so präzise.

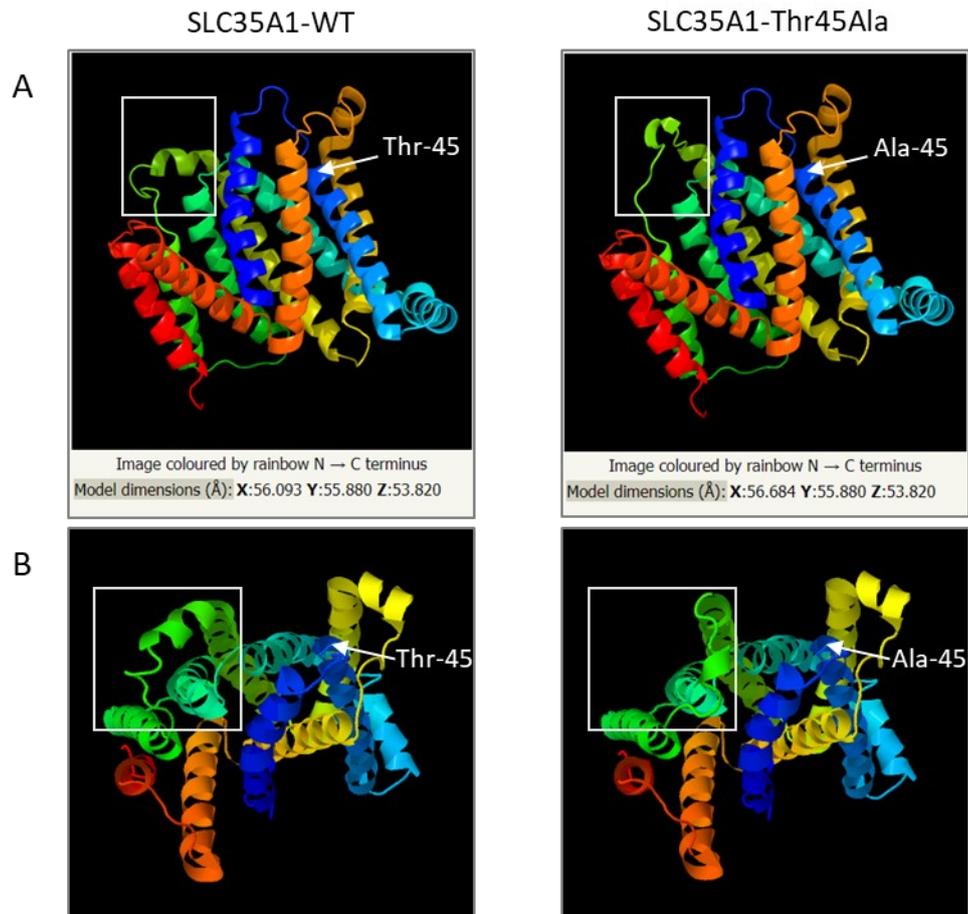


Abbildung 14: Beim SLC35A1-Protein mit Thr45Ala Mutation könnte es zu strukturellen Veränderungen kommen. Potenzielle Strukturveränderungen des SLC35A1-Proteins aufgrund des Aminosäureaustausch Thr45Ala, vorhergesagt durch Phyre2 (basierend auf der Kristallstruktur des Slc35a1 Maus-Proteins (SMTL ID: 6OH2A)). Links ist jeweils die Struktur des wildtypischen (WT) SLC35A1-Proteins dargestellt, rechts die des Proteins mit der Patientenmutation (Thr45Ala). **A)** Beim Protein mit Thr45Ala Mutation kommt es möglicherweise zu einer Veränderung der Struktur im Bereich des dritten luminalen Loops; Seitenansicht. **B)** Die veränderte Tertiärstruktur könnte die Öffnung für das Substrat des Proteins auf Seite des Golgi-Lumens verengen; luminalen Ansicht. Die Position der Aminosäuren an Position 45 ist durch einen weißen Pfeil markiert, der weiße Kasten deutet auf die potenzielle Strukturveränderung des dritten luminalen Loops hin.

## 6.3 CDG-Routinediagnostik

### 6.3.1 Isoelektrische Fokussierung von CDG-Markerproteinen führt bei der Patientin zu unauffälligen Ergebnissen

Das Serum der Patientin wurde mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) auf Veränderungen der CDG-Routinemarker hin untersucht. Die unterschiedlichen Glykoformen der Proteine wurden hierbei nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, was zu einem charakteristischen Bandenmuster führte. Das Muster und auch die Stärke der Banden der Patientenprobe wurde mit denen einer gesunden Kontrolle und eines bekannten CDG-II Patienten verglichen. Bei der IEF von Transferrin aus der Serumprobe der Patientin entsprachen die Banden dem klassischen Muster und waren somit vergleichbar mit der Kontrollprobe (Abbildung 15 A). Ein ebenso unauffälliges Ergebnis ergab sich bei der IEF eines weiteren CDG-Markerproteins für N-Glykosylierungsdefekte,  $\alpha$ 1-Antitrypsin. Die Glykoformen dieses Proteins sind anders aufgebaut als bei Serum Transferrin, weshalb das charakteristische Muster auch bei Kontrollproben mehr Banden aufweist. Bei einem vorliegenden Glykosylierungsdefekt verschiebt sich das Bandenmuster durch die fehlenden Zuckerreste deutlich nach unten (siehe Probe CDG-II). Bei der Patientin war dies allerdings nicht der Fall (Abbildung 15 B), sondern das Bandenmuster entsprach der Kontrolle. Auch eine möglicherweise beeinträchtigte O-Glykosylierung wurde mittels IEF des Markerproteins Apolipoprotein C-III (ApoCIII) überprüft. Dieses Protein trägt ein O-Glykan des Mucintyps (Core-1) und besitzt in der vollständig glykosylierten Form zwei Sialinsäurereste, wodurch sich die Glykoformen ApoCIII<sub>2</sub>, ApoCIII<sub>1</sub> und ApoCIII<sub>0</sub> ergeben. Bei gesunden Kontrollen zeigt die ApoCIII IEF ein Muster, bei dem die ApoCIII<sub>0</sub> Glykoform, je nach Alter des Kindes, nur sehr leicht oder gar nicht vorhanden ist. Das Bandenmuster der ApoCIII Glykoformen im Serum der Patientin entsprach denen der Kontrolle, die über 1 Jahr alt war (Abbildung 15 C). Somit konnte über die IEF von CDG-Markerproteinen weder eine Beeinträchtigung der N- noch der O-Glykosylierung von Serumproteinen der Patientin identifiziert werden.

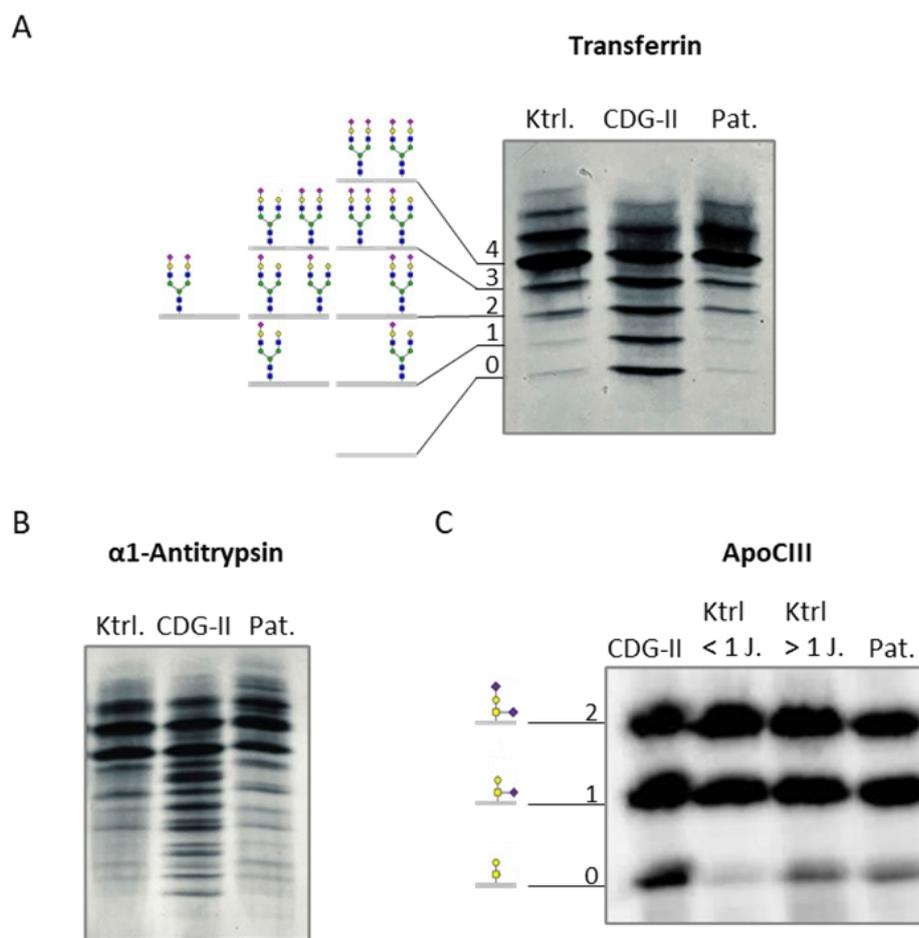


Abbildung 15: Isoelektrische Fokussierung (IEF) der verschiedenen CDG-Markerproteine aus Serum der Patientin entspricht den Kontrollen. Aufgetragen wurden jeweils Proben aus Serum einer Kontrolle (Ktrl.), eines bekannten CDG-II Patienten (CDG-II) und der neuen Patientin (Pat.). **A)** Transferrin IEF, bei der die Banden der Tetra- (4), Tri- (3), Di- (2), Mono- (1) und Asialoglykoformen (0) und mögliche Glykankombinationen markiert wurden. **B)**  $\alpha$ 1-Antitrypsin IEF. Das Muster der Patientin ist vergleichbar mit dem der Kontrolle. **C)** Bandenmuster der IEF des O-Glykosylierungsmarkers ApoCIII. Neben dem Serum eines bekannten CDG-II Patienten, bei dem auch die O-Glykosylierung beeinträchtigt ist (verstärkte ApoCIII<sub>1</sub> und ApoCIII<sub>0</sub> Banden), wurde in diesem Fall das Serum zweier Kontrollen unterschiedlichen Alters (jünger (< 1 J.) bzw. älter als ein Jahr (> 1 J.)) aufgetragen. Die Banden der ApoCIII<sub>2</sub>, ApoCIII<sub>1</sub> und ApoCIII<sub>0</sub> Glykoformen sind markiert und mögliche Glykanstrukturen daneben dargestellt.

### 6.3.2 Leichte Veränderungen im N-Glykanprofil der Patientin

Um nicht nur die Glykoformen einzelner Serum-Proteine, sondern das gesamte N-Glykanprofil der Patientin zu untersuchen, wurde eine N-Glykananalyse mittels des BioAccord LC-MS Systems von Waters (UPLC mit FLR-Detektor) durchgeführt. Analysiert wurden die N-Glykane sämtlicher Serumproteine sowie das Fibroblastenlysate der Patientin. Die Glykane und deren prozentualen Anteile wurden anschließend mit dem Kontrollpool, bestehend aus 127 Kontrollseren, des gleichen Messlaufs verglichen.

Das N-Glykanprofil des Patientenserums ergab im Vergleich zum Kontrollpool keine auffällige Glykanverteilung. Der Hauptpeak entsprach im Serum der Patientin dem biantennären N-Glykan des Komplextyps A2G(4)2S(6,6)2, das auch in Kontrollseren am häufigsten vorliegt (Abbildung 16).

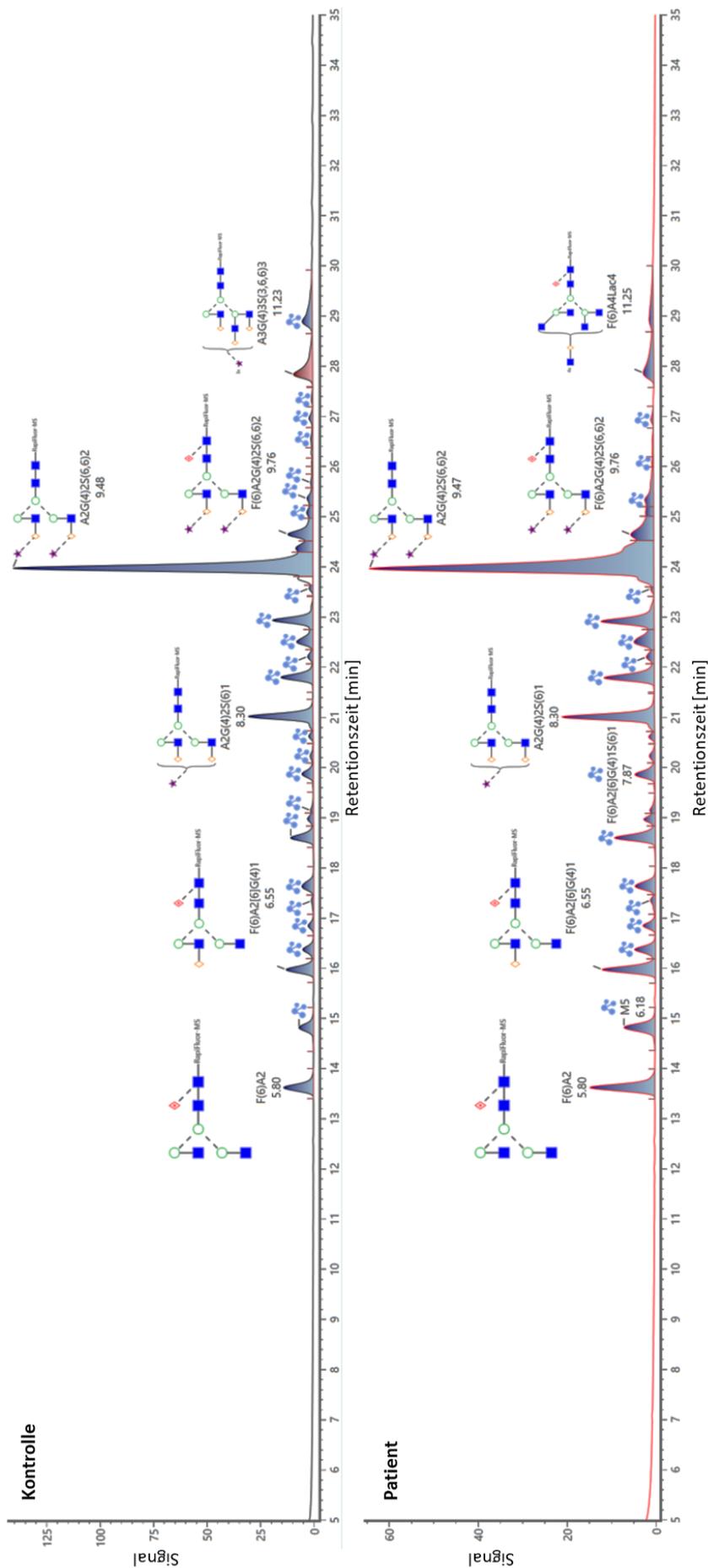


Abbildung 16: N-Glykanprofil in Kontroll- und Patientenserum ist vergleichbar. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Verteilung der verschiedenen N-Glykane der Kontrollprobe (Kontrollpool bestehend aus 127 Seren), im unteren Teil ist das N-Glykanprofil des Patientenserums dargestellt. Anhand der Peakverteilung und deren Verhältnisse zueinander konnten keine deutlichen Auffälligkeiten der Glykane im Patientenserum im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Analyse der N-Glykane erfolgte mittels des BioAccord LC-MS Systems von Waters.

Durch die von der Software UNIFI® (Waters) berechneten, prozentualen Anteile der verschiedenen Glykantypen, bezogen auf die Gesamtmenge der gemessenen Glykane (siehe Abbildung 17), konnten im Patientenserum leichte Veränderungen der Glykane im Bereich der Sialylierung festgestellt werden. Der prozentuale Anteil der nicht-sialylierten Strukturen war im Serum der Patientin leicht auf das 1,34-fache des Kontrollpools erhöht (Kontrolle: 22,79 %, Patient: 30,43 %). Die Menge an mono- und disialylierten Glykanen entsprach zwar mit der 1,08- bzw. 0,96-fachen Menge der Kontrollprobe (Kontrolle: 17,42 % bzw. 50,96 %, Patient: 18,84 % bzw. 49,03 %), allerdings waren trisialyierte Glykane im Serum der Patientin mit einem Anteil von 0,23 % im Vergleich zur Kontrolle mit 8,83 %, stark auf das 0,03-fache reduziert. De-fucosylierte Glykane konnten im Serum der Patientin zu einem Anteil von 61,78 % und bei der Kontrolle zu 70,52 % gefunden werden, was einer leichten Reduktion auf das 0,88-fache entsprach. Demnach gab es im Patientenserum etwas mehr fucosylierte Zuckerstrukturen als in der Kontrollprobe. Die Anzahl an Verzweigungen der Glykane war im Serum der Patientin nur leicht verändert. Es gab etwas mehr mono- und tetraantennäre Glykane in der Patientenprobe (1,74 % bzw. 2,88 %) im Vergleich zur Kontrolle (1,43 % bzw. 1,19 %). Dagegen entsprach die Menge an biantennären Glykanen im Patientenserum (84,92 %) der Kontrolle (80,46 %) und triantennäre Glykane waren auf das 0,4-fache reduziert (Kontrolle: 9,29 %, Patient: 3,70 %). Der Anteil an mannosereichen N-Glykanen war in der Patientenprobe (6,76 %) leicht auf die 0,89-fache Menge des Kontrollpools (7,63 %), reduziert. Demnach scheint es bei den Serumproteinen der Patientin vor allem zu einer unvollständigen Sialylierung von komplexeren Strukturen mit einer höheren Anzahl an Sialinsäureresten zu kommen.

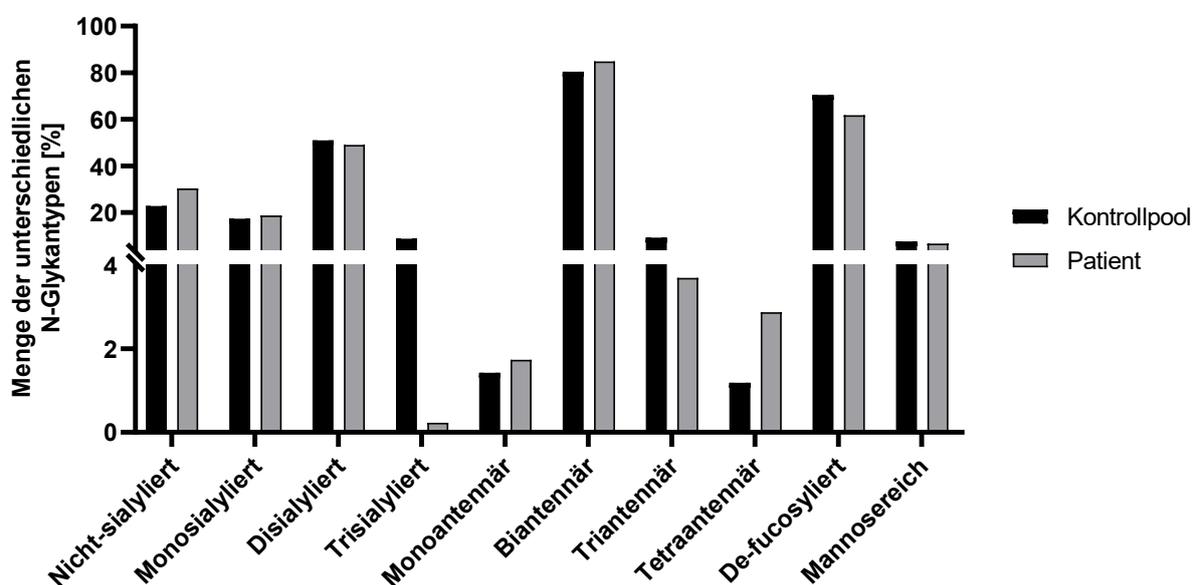


Abbildung 17: Leichte Abweichungen der prozentualen Verteilung unterschiedlicher N-Glykantypen im Patientenserum. Als Kontrollprobe wurde ein Pool bestehend aus 127 Kontrollseren verwendet. Die Mengen der N-Glykantypen wurde als prozentuale Anteile der insgesamt analysierten N-Glykane einer Probe durch die Software UNIFI® (Waters) ermittelt.

Die N-Glykananalyse aus Fibroblastenlysat ergab eine andere Glykanverteilung als bei dem Serumglykanprofil. Hier gab es auch bei der Kontrolle keinen eindeutigen Hauptpeak und es gab insgesamt eine höhere Anzahl an nicht-sialylierten Glykanen und mannosereichen Zuckerstrukturen als im Serum. Dagegen gab es weniger disialylierte Glykane und auch die Verteilung der mono- bis tetraantennären Strukturen unterschied sich von den Serumproben. Einzelne Peaks, die bei der Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle auffällig waren, und damit Glykosylierungsmarker für einen *SLC35A1*-Defekt sein könnten, waren die Folgenden: Die Menge an M2 war bei der Patientin mit 3,38 % im Vergleich zur Kontrolle mit 4,56 % reduziert, wohingegen das M3 Glykan erhöht war (Patient: 5,08 %, Kontrolle: 2,6 %). M2 und M3 entsprechen verkürzten Glykanen, die zwei bzw. drei Mannosereste tragen. M2 besteht demnach aus zwei GlcNAc- und zwei Mannoseresten und M3 aus der Core-Struktur für N-Glykane (zwei GlcNAc- und drei Mannosereste). Die beiden Glykane F(6)A2G(4)2 und F(6)A4G(4)4S(3)1 waren wiederum in der Patientenprobe mit 3,07 % und 2,29 % im Vergleich zur Kontrolle mit 5,01 % bzw. 3,59 % verringert. Diese sind Glykane des Komplextyps: Ein biantennäres Glykan mit zwei Galaktoseresten und einem  $\alpha$ -1,6 gebundenen Fucoserest bzw. ein tetraantennäres Glykan mit vier Galaktoseresten, einem  $\alpha$ -2,3 gebundenen Sialinsäurerest sowie ebenfalls einem  $\alpha$ -1,6 gebundenen Fucoserest (Abbildung 18).

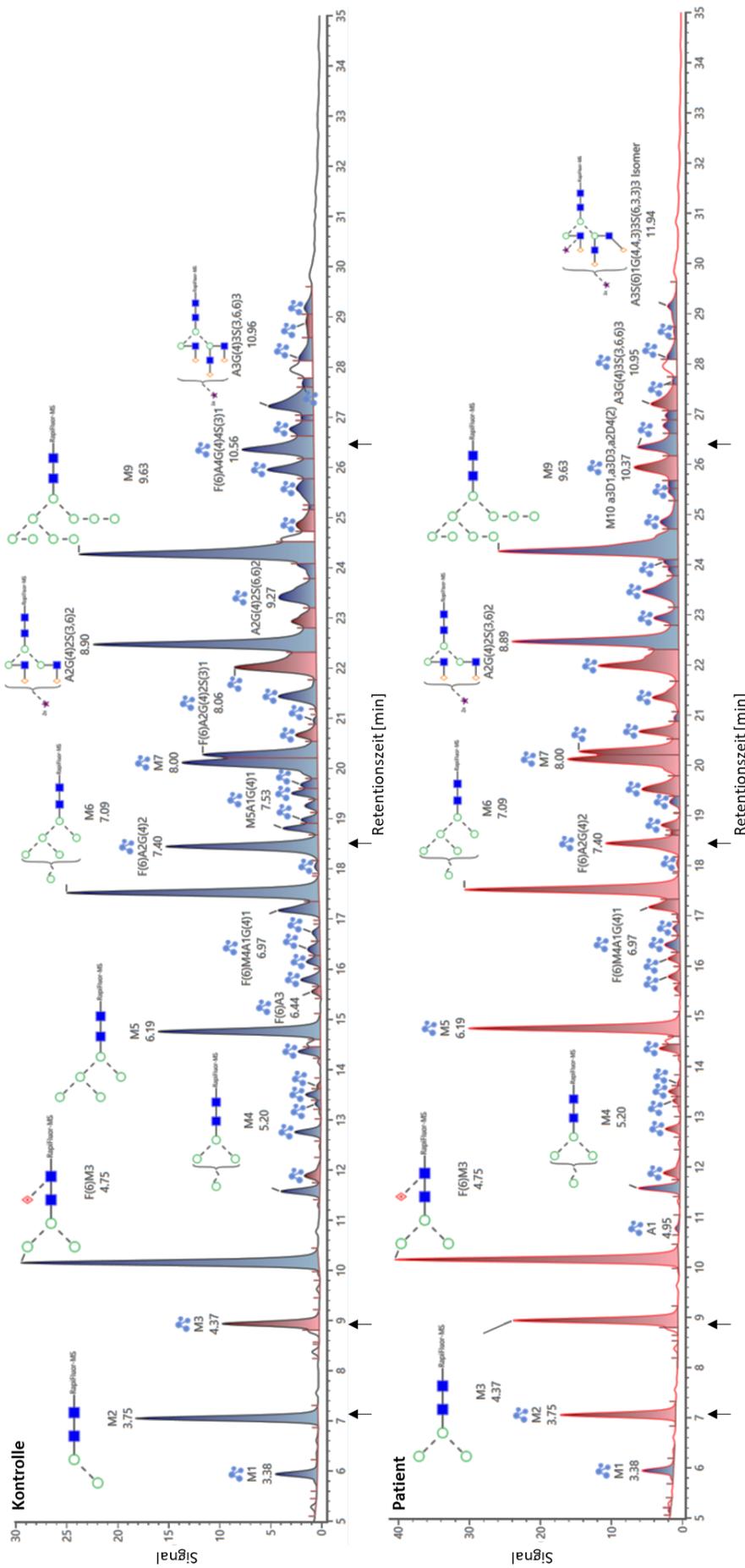


Abbildung 18: Im Lysat der Patientenzellen unterscheiden sich einzelne Glykane vom N-Glykanprofil aus Kontrollzellen. Im oberen Teil der Abbildung ist die Verteilung der verschiedenen N-Glykane im Lysat der Kontrollfibroblasten aufgeführt und der untere Teil zeigt das N-Glykanprofil aus dem Fibroblastenlysate der Patientin. Die Peaks einzelner Glykane, deren Menge in der Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle auffällig waren, wurden mit schwarzen Pfeilen unterhalb markiert. Die Analyse der N-Glykane erfolgte mittels BioAccord LC-MS Systems von Waters (UPLC mit FLR-Detektor).

Der Anteil an nicht-sialylierten Glykanen betrug im Lysat der Kontrollzellen 68,64 % und im Lysat der Patientenzellen mit 67,34 % die 0,98-fache Menge und war damit nur minimal verändert. Die mono- und trisialylierten Zuckerstrukturen waren in der Patientenprobe auf das 0,73 bzw. 0,55-fache verringert (Kontrolle: 13,52 % bzw. 6,56 %, Patient: 9,89 % bzw. 3,64 %), wohingegen die Menge an disialylierten Glykanen auf das 1,69-fache erhöht war (Kontrolle: 10,84 %, Patient: 18,33 %). Die dreifache Sialylierung war demnach, wie bereits im Serum, auch in den Fibroblasten der Patienten am deutlichsten reduziert. Allerdings war der Anteil an nicht-sialylierten Zuckerresten, anders als in den Serumproben, in den Zellen unauffällig und die Disialylierung war sogar etwas erhöht. Der Anteil an de-fucosylierten (Kontrolle: 61,23 %, Patient: 63,59 %) und mannosereichen Glykanen (Kontrolle: 35,04 %, Patient: 40,43 %) war im Lysat der Patientenfibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen minimal auf das 1,04 bzw. das 1,15-fache erhöht. Auffälliger war dagegen die veränderte Verteilung der mono- bis tetraantennären Glykane. Im Patientenzelllysate gab es eine erhöhte Anzahl mono- und diantennärer Glykane, wobei die Menge an tri- und tetraantennären Glykanen im Vergleich zur Kontrollprobe reduziert war: Monoantennäre Glykane waren im Zelllysate der Patientin mit 6,96 % der Gesamtglykane, um das 1,38-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Diantennäre Glykane entsprachen mit 25,44 % in der Kontrollprobe und 28,99 % in der Patientenprobe einer 1,14-fachen Erhöhung. Stattdessen waren die tri- und tetraantennären Glykane auf die 0,35 bzw. 0,85-fache Menge im Lysate der Patientenfibroblasten reduziert (Kontrolle: 14,09 % bzw. 5,18 %, Patient: 4,91 % bzw. 4,38 %). In den Zellen der Patientin scheint es demnach eine höhere Anzahl an weniger verzweigten Glykanen zu geben, was auf Probleme im Aufbau komplexerer Glykane schließen lässt.

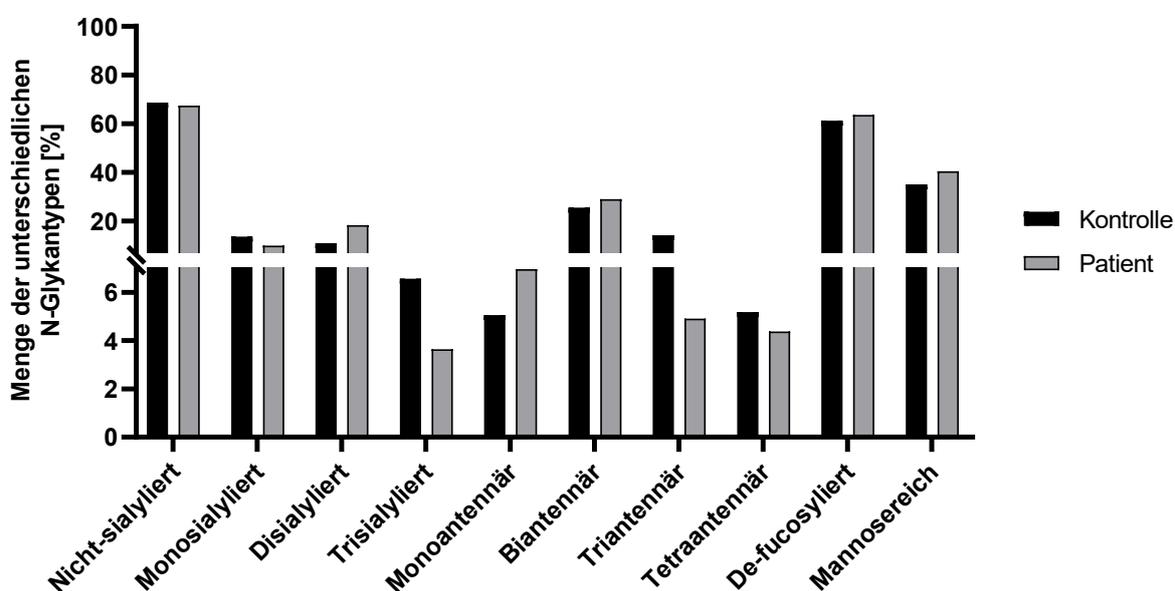


Abbildung 19: Leichte Veränderungen der prozentualen Verteilung unterschiedlicher N-Glykantypen im Lysate der Patientenfibroblasten. Dargestellt ist die Mengen der Glykantypen im Lysate von Kontrollzellen und den Fibroblasten der Patientin als prozentuale Anteile bezogen auf die Gesamtheit der analysierten N-Glykane einer Probe. Die Werte wurden durch die Software UNIFI® (Waters) ermittelt.

### 6.3.3 In den Patientenfibroblasten akkumuliert ein verkürztes lipidgebundenes Oligosaccharid

Als lipidgebundene Oligosaccharide (LLOs) werden Oligosaccharide bezeichnet, die an Dol-P<sub>2</sub> gebunden sind und demnach noch nicht auf ein Protein übertragen wurden. Um das Vorkommen der unterschiedlichen LLO-Typen zu untersuchen, wurden Fibroblasten der Patientin und einer Kontrolle nach einer kurzen Hungerphase mit radioaktiv-markierter Mannose behandelt. Durch den Einbau von 2-<sup>3</sup>H Mannose in die neu gebildeten LLOs wurden diese markiert und die Radioaktivität in verschiedenen HPLC Fraktionen gemessen. Die LLO-Analyse ergab, dass der Hauptpeak des Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> LLOs in den Patienten- und Kontrollzellen in gleicher Intensität vorhanden ist. Allerdings gab es bei der Patientenprobe einen auffälligen Peak in früheren HPLC Fraktionen, der dem LLO Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> zugeordnet wurde (Abbildung 20). Eine Anhäufung dieses kurzen Vorläufer-Glykans wird normalerweise mit einem Defekt der  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase ALG11 in Verbindung gebracht, die dieses LLO als Substrat erkennt und mit zwei weiteren Mannoseresten verknüpft. Das Ergebnis dieser LLO-Analyse konnte leider in weiteren Wiederholungen, die eine unauffällige Kurve zeigten, nicht mehr reproduziert werden.

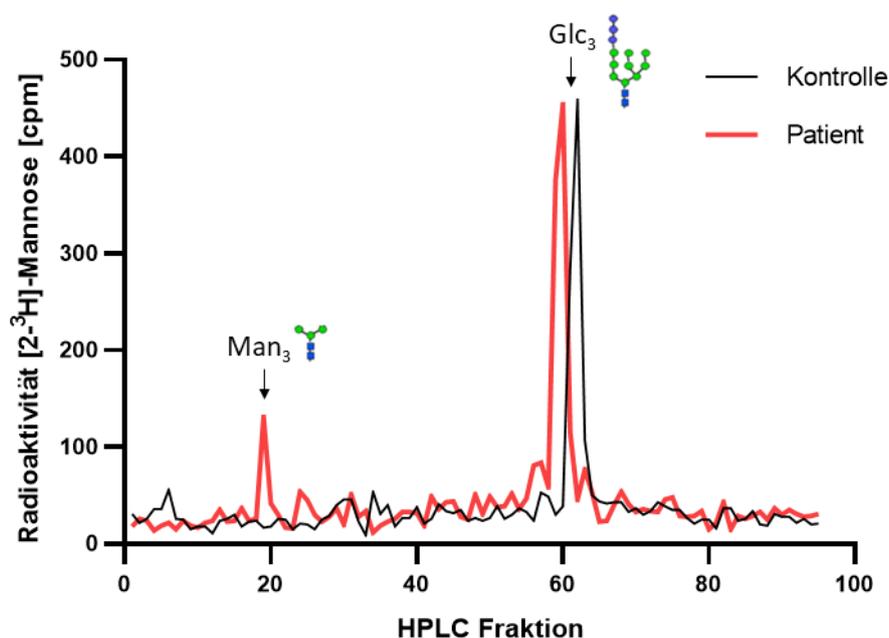


Abbildung 20: In den Patientenzellen akkumuliert das verkürzte LLO Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>. LLO-Analyse aus Patienten- und Kontrollfibroblasten. Gemessen wurde die Radioaktivität der in die Vorläufer-Glykane eingebauten [2-<sup>3</sup>H] Mannose über mehrere HPLC Fraktionen. Die Kurve der Radioaktivität aus der Patientenprobe ist in Rot dargestellt, die Kontrolle in Schwarz. Markiert wurden der Hauptpeak des Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> LLOs (Glc<sub>3</sub>), der sowohl bei der Kontrolle als auch der Patientin vorliegt, sowie der bei der Patientin auffällige Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> LLO Peak (Man<sub>3</sub>).

## 6.4 Analyse der Glykosylierungsmarkerproteine in Fibroblastenlysat

Indem hoch-glykosylierter Proteine in Zelllysat mittels Western Blot detektiert werden, kann untersucht werden, ob in den Zellen ein Glykosylierungsdefekt vorliegt. Durch eine unvollständige Glykosylierung kann es zu einer Verschiebung der Laufhöhe der Proteine im Western Blot oder zu einem verfrühten Abbau in den Zellen kommen. Um festzustellen, ob in den Zellen der Patientin eine verminderte Glykosylierung stattfindet, wurden Glykosylierungsmarkerproteine im Lysat der Patientenfibroblasten untersucht. Detektiert wurden die N-Glykosylierungsmarker Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) und Interleukin 6 receptor subunit beta (GP130) sowie das sowohl N- als auch O-glykosylierte Protein Trans-Golgi network integral membrane protein 2 (TGN46) (Abbildung 21 A-C).

Die Western Blots mit Kontroll- bzw. Patienten-Zelllysat bei denen ICAM1 oder GP130 detektiert wurden, zeigten bei der Patientenprobe eine deutlich hellere Bande als bei der Kontrolle (Abbildung 21 A, B). Bei TGN46 kam es im Patientenlysat zu einer Verschiebung der Laufhöhe, was auf unvollständig glykosylierte Formen des Proteins hindeutet (Abbildung 21 C). Die Menge der vollständig glykosylierten Form dieser Glykosylierungsmarkerproteine wurde quantifiziert und war im Lysat der Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (ICAM1:  $1,0 \pm 0,28 / 0,16 \pm 0,11$ ,  $p=0,016$ ; GP130:  $1,0 \pm 0,16 / 0,45 \pm 0,14$ ,  $p=0,022$ ; TGN46:  $1,0 \pm 0,02 / 0,77 \pm 0,07$ ,  $p=0,005$ ). Auch das unglykosylierte GP130-Protein war bei der Patientin reduziert, allerdings nicht signifikant ( $1,0 \pm 0,20 / 0,89 \pm 0,22$ ,  $p>0,05$ ). Im Gegensatz dazu waren die nicht- bzw. unvollständig glykosylierten Formen des ICAM1- ( $1,0 \pm 0,13 / 1,81 \pm 0,33$ ,  $p<0,016$ ) und TGN46-Proteins ( $1,0 \pm 0,18 / 3,70 \pm 0,27$ ,  $p<0,001$ ) deutlich signifikant erhöht. Das daraus berechnete Verhältnis der glykosylierten zur un- bzw. hypoglykosylierten Form war demnach bei der Patientin für alle Glykosylierungsmarker signifikant reduziert (ICAM1:  $1,0 \pm 0,19 / 0,08 \pm 0,05$ ,  $p=0,004$ ; GP130:  $1,0 \pm 0,05 / 0,49 \pm 0,05$ ,  $p<0,001$ ; TGN46:  $1,0 \pm 0,14 / 0,2 \pm 0,01$ ,  $p=0,001$ ), was auf eine verringerte Glykosylierung in den Patientenzellen schließen lässt.

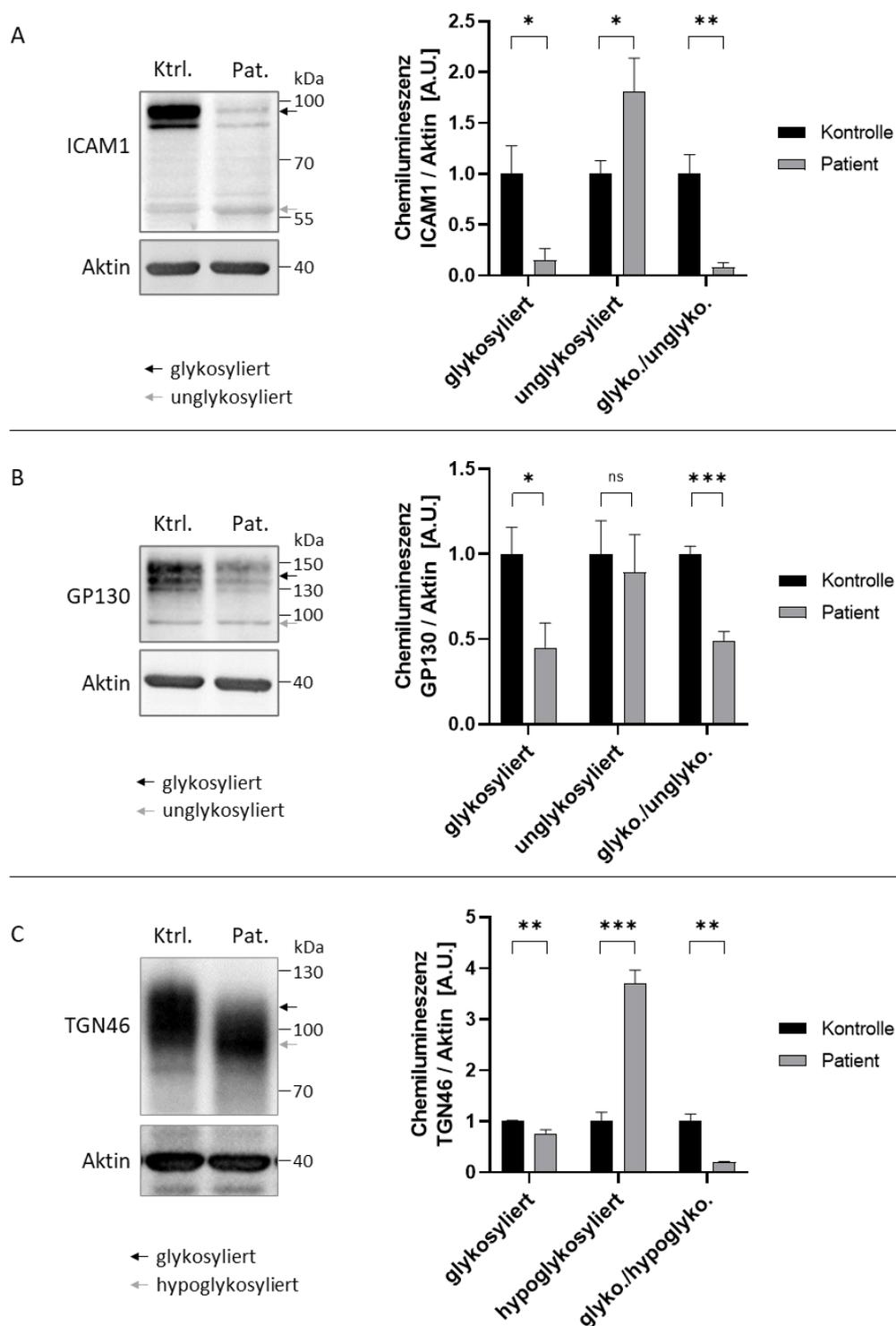


Abbildung 21: Stark beeinträchtigte Expression der Glykosylierungsmarkerproteine im Lysat der Patientenfibroblasten. Mit einem schwarzen Pfeil ist jeweils die vollständig glykosylierte Form des Proteins markiert, die grauen Pfeile weisen auf die Laufhöhe der nicht- bzw. hypoglykosylierte Form hin. Diese wurden jeweils quantifiziert und auf Aktin normalisiert. Anschließend wurde auch das Verhältnis der glykosylierten Form zur un- bzw. hypoglykosylierten Form berechnet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Triplikate  $\pm$  SD. **A)** Western Blot mit Kontroll- (Ktrl.) und Patienten-Zellysat (Pat.), bei dem das N-Glykosylierungsmarkerprotein ICAM1 detektiert wurde. **B)** N-Glykosylierungsmarker GP130 Western Blot mit Kontroll- (Ktrl.) und Patienten-Zellysat (Pat.). **C)** Western Blot des N- und O-glykosylierten Proteins TGN46 mit Kontroll- (Ktrl.) und Patienten-Zellysat (Pat.). Als hypoglykosyliert wurde der Bereich unterhalb des Signalbereichs der Kontrolle quantifiziert.

## 6.4.1 Überprüfen der Beeinträchtigung der O-Glykosylierung

### 6.4.1.1 Unvollständige N- und O-Glykosylierung der TGN46 Glykoformen

Die N-Glykosylierungsmarkerproteine ICAM1 und GP130 zeigten in 0 deutliche Auffälligkeiten weshalb ein N-Glykosylierungsdefekt in den Patientenzellen vermutet wurde. Um zu untersuchen, ob zusätzlich auch die O-Glykane in den Patientenzellen betroffen sein könnten, wurde Fibroblastenlysat von Kontroll- und Patientenzellen mit den Enzymen O-GlyZOR, das zur Abtrennung von O-Glykanen des Mucin-Typs genutzt wird, und PNGase F, welches die Entfernung von N-Glykanen katalysiert, inkubiert. Danach wurde erneut das Glykosylierungsmarkerprotein TGN46, welches im vollständig glykosylierten Zustand, laut DTU Health Tech, 7 N-Glykane, 8 O-Glykane des Mucin-Typs und 4 O-GlcNAcylierungen trägt, im Western Blot detektiert. Dadurch wurde überprüft, ob durch das gezielte Entfernen der Glykantypen die Verschiebung in der Laufhöhe des Proteins im Lysat der Patientenzellen erklärt werden kann. Es stellte sich heraus, dass das Laufmuster von TGN46 in den Patientenproben durch den Verdau noch weiter verändert werden konnte – es kam sowohl beim Verdau mit PNGase F als auch mit O-GlyZOR zu einer Verschiebung im Vergleich zur unverdauten Probe. Dies lässt darauf schließen, dass das Protein noch N- und O-Glykane trägt und nur unvollständig glykosyliert wird. Auffällig war, dass in den Patientenproben eine deutliche Bande auf Höhe von ca. 70 kDa vorhanden war, die in den Kontrollproben erst durch Abtrennen der Mucintyp O-Glykane hervorgerufen werden konnte (Abbildung 22 A). Die prozentuale Verteilung der verschiedenen TGN46 Glykoformen wurde berechnet, indem der obere Bandenbereich (jeweils bis zum Ende des Hauptsignals in den Kontrollproben) und der untere Bandenbereich (der Blotbereich darunter) quantifiziert wurden. In den unverdauten Proben wurde der obere Bereich in der Kontrollprobe als vollständig glykosyliert gewertet. Der Anteil dieses Bereichs betrug in der unverdauten Kontrollprobe  $65,37 \pm 4,94 \%$ , wohingegen in der Patientenprobe nur  $50,87 \pm 6,83 \%$  ( $p=0,041$ ) des Proteins vollständig glykosyliert vorlag. Folglich betrug die Menge an hypoglykosyliertem TGN46 in der Kontrollprobe  $34,63 \pm 4,94 \%$  und war in der Patientenprobe signifikant ( $p=0,041$ ) auf  $49,13 \pm 6,83 \%$  erhöht (Abbildung 22 B). Nach PNGase F-Verdau kam es in den Lysatproben zu einer Verschiebung der Laufhöhe im oberen Bereich des TGN46-Signals. Das Verhältnis betrug in der Kontrollprobe im oberen Bereich  $70,81 \pm 9,27 \%$  zu  $29,19 \pm 9,27 \%$  im unteren Bandenbereich und in der Patientenprobe  $62,93 \pm 4,53 \%$  zu  $37,07 \pm 4,53 \%$  und war im Vergleich nicht signifikant verändert ( $p>0,05$ ) (Abbildung 22 C). Nach O-GlyZOR-Verdau war die prozentuale Verteilung der Glykoformen in den Kontroll- und Patientenproben jedoch wieder signifikant verändert, was auf eine größere Beeinträchtigung der verbleibenden N-Glykane schließen lässt. Der Anteil der oberen Bande betrug in der Kontrollprobe  $61,40 \pm 4,88 \%$  und in der Patientenprobe  $47,44 \pm 3,88 \%$  ( $p=0,018$ ). Die untere Bande bei ca. 70 kDa war in der Patientenprobe stärker vorhanden und nahm einen Anteil von  $52,56 \pm 3,88 \%$  ein, während die Bande in der Kontrollprobe nur  $38,60 \pm 4,88 \%$  ( $p=0,018$ ) des Gesamtsignals entsprach (Abbildung 22 D).

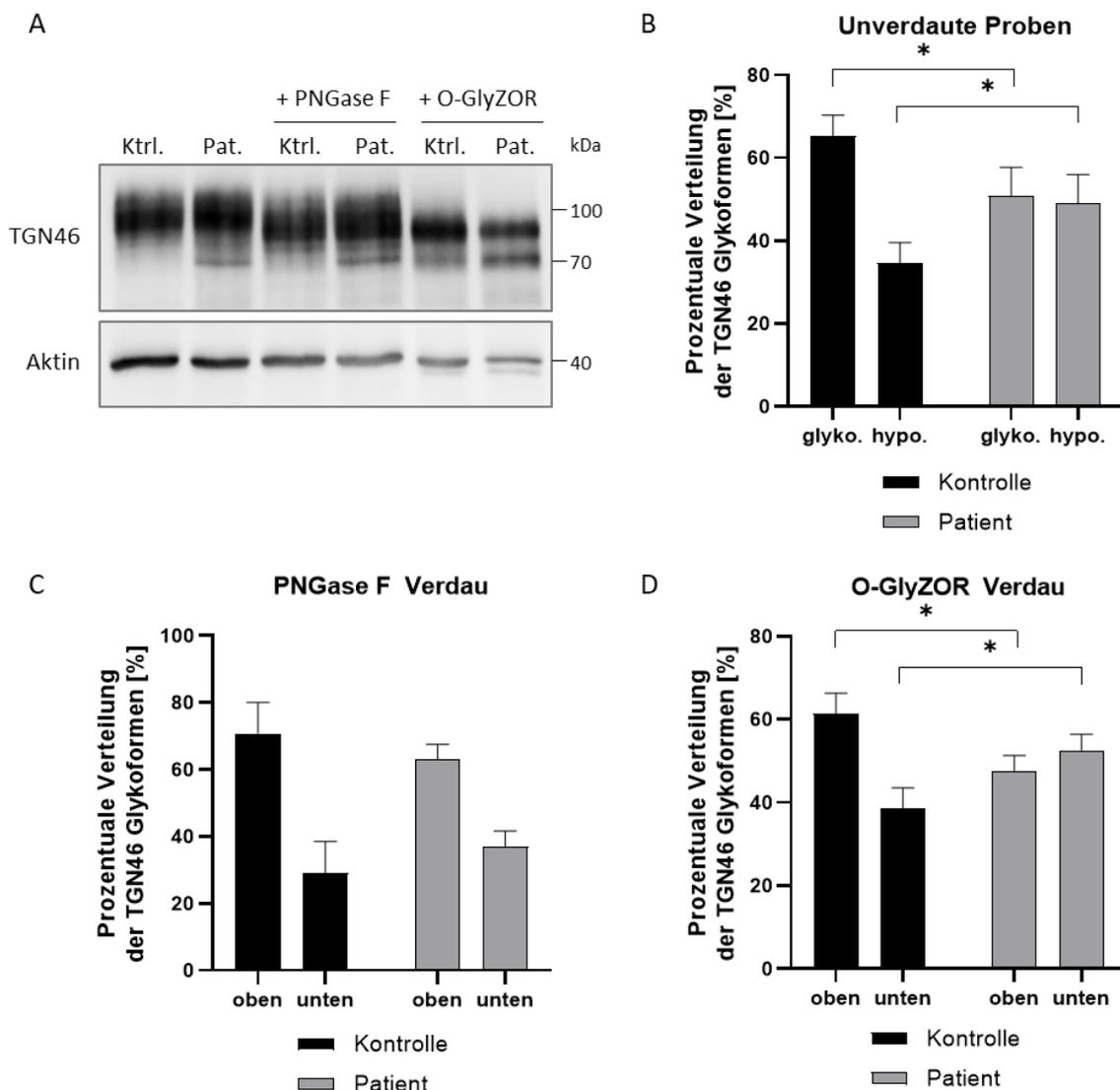


Abbildung 22: Detektion verschiedener TGN46 Glykoformen im Lysat der Patientenzellen zeigt eine unvollständige N- und O-Glykosylierung. **A)** Western Blot der unverdauten und mit PNGase F bzw. O-GlyZOR verdauten Lysat-Proben aus Kontroll- (Ktrl.) und Patientenfibroblasten (Pat.). Detektiert wurde das Glykoprotein TGN46 und als Ladekontrolle Aktin. **B)-D)** Quantifizierung der TGN46 Glykoformen in den unverdauten Proben, den Proben nach PNGase F-Verdau und den Proben nach O-GlyZOR-Verdau. Das TGN46-Signal wurde jeweils auf Aktin normalisiert und die prozentuale Verteilung der Glykoformen berechnet. Als vollständig glykosyliert (glyko.) wurde bei den unverdauten Proben der Bereich bis zum Ende der Hauptbande der Kontrollprobe quantifiziert, als hypoglykosyliert (hypo.) der Blotbereich darunter. Bei den verdauten Proben wurde ebenfalls die Verteilung der Signale bis zum Ende des oberen Bandenbereich der Kontrollprobe (oben) und Bandenbereichs darunter (unten) berechnet.

#### 6.4.1.2 Leichte Veränderungen der Lektinsignale von PNA und Jacalin

Die O-Glykosylierung in den Patientenzellen sowie im Patientenserum wurde zudem mit den Lektinen Peanut Agglutinin (PNA) und *Artocarpus integrifolia* (Jacalin) untersucht. Lektine binden je nach Spezifität an bestimmte Zuckerstrukturen. Die hier verwendeten Lektine binden an Gal $\beta$ -1,3-GalNAc-Reste, die typischerweise bei Core-1 O-Glykanen des Mucintyps vorkommen [64], [127]. Jacalin kann dabei auch die sialylierte Form des Glykans binden, wohingegen die Bindung von PNA durch eine Sialylierung verhindert wird, weshalb es zur Detektion von nicht-sialylierten O-Glykanen eingesetzt wird [128].

Das PNA-Signal war im Lysat der Patientenfibroblasten im Vergleich zu den Kontrollproben ( $1,0 \pm 0,27 / 1,38 \pm 0,18$ ,  $p > 0,05$ ) sowie im Patientenserum im Vergleich zum Serum Kontroll-Pool ( $1,0 \pm 0,26 / 1,33 \pm 0,07$ ,  $p > 0,05$ ) leicht, aber nicht signifikant, erhöht. Ein erhöhtes PNA-Signal deutet darauf hin, dass terminale Sialinsäurereste an den O-Glykanen fehlen und dadurch das Zielepitop für das Lektin besser zugänglich ist. Das Jacalin-Signal war dagegen im Lysat der Patientenzellen leicht verringert und im Patientenserum im Bereich der Kontrollproben (Lysat:  $1,0 \pm 0,16 / 0,68 \pm 0,19$ ,  $p > 0,05$ , Serum:  $1,0 \pm 0,03 / 0,91 \pm 0,10$ ,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 23). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gesamtzahl der Core-1 O-Glykane des Mucintyps im Material der Patientin minimal verringert ist und von den vorhandenen O-Glykanen vermehrt die nicht-sialylierte Form vorliegt.

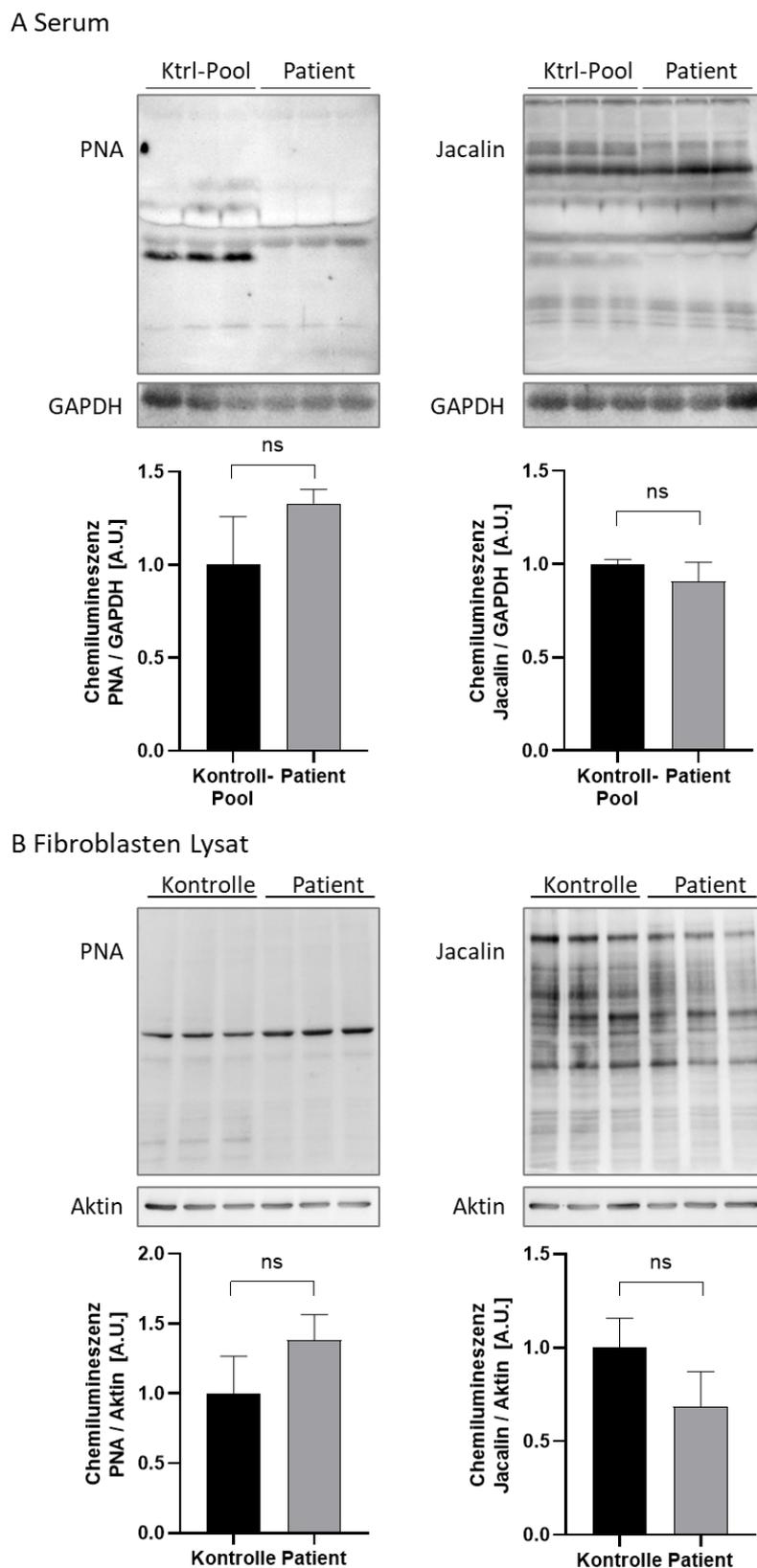


Abbildung 23: Leichte Veränderungen der Signalstärke von PNA und Jacalin im Serum und Fibroblastenlysat der Patientin. Überprüfung der O-Glykosylierung des Mucintyps in Patientenserum und -zelllysat mittels der Lektine PNA und Jacalin. **A)** Aufgetragen wurde ein Kontroll-Pool (Ktrl-Pool) aus 127 Kontrollseren und das Patientenserum. Das Signal der Lektine PNA und Jacalin wurde im Western Blot detektiert und auf GAPDH als Ladekontrolle normalisiert. **B)** Detektion des PNA- und Jacalin-Signals in Lysaten von Kontrollzellen und der Fibroblasten der Patientin. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet.

## 6.5 Lektinfärbungen in Serum und Zelllysate

Aufgrund der *SLC35A1*-Mutation der Patientin wurde vermutet, dass der Transport von CMP-Sialinsäure in den Golgi-Apparat mit geringerer Effektivität stattfindet und somit weniger Glykane mit endständiger Sialinsäure gebildet werden können. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Zusammensetzung der proteingebundenen Glykane im Serum und Zelllysate der Patientin durch verschiedene Lektinfärbungen untersucht.

### 6.5.1 Das Signal sialinsäurebindender Lektine ist teilweise stark verändert

Zunächst wurde das Signal von Lektinen überprüft, die Sialinsäurereste erkennen. Dazu zählen *Sambucus nigra* Lektin (SNA) und *Maackia amurensis* Lektin (MALI), die an  $\alpha$ -2,6 bzw.  $\alpha$ -2,3 gekoppelte Sialinsäure binden [129], [130]. Das Signal des SNA Lektins war im Serum der Patientin im Vergleich zum Kontroll-Pool leicht, aber nicht signifikant, reduziert ( $1,0 \pm 0,08 / 0,71 \pm 0,07$ ,  $p=0,053$ ). Im Fibroblastenlysate war das SNA-Signal unauffällig ( $1,0 \pm 0,24 / 1,17 \pm 0,21$ ,  $p>0,05$ ). Im Serum sowie im Lysate der Patientenzellen war das MALI-Signal, also  $\alpha$ -2,3 gebundene Sialinsäurereste, signifikant reduziert (Serum:  $1,0 \pm 0,08 / 0,64 \pm 0,09$ ,  $p=0,039$ , Lysate:  $1,0 \pm 0,03 / 0,40 \pm 0,002$ ,  $p<0,0001$ ). *Wheat Germ Agglutinin* (WGA), das an GlcNAc-Reste, aber auch an  $\alpha$ -2,3 gekoppelte Sialinsäurereste bindet und auch dazu verwendet wird einen generellen Eindruck über die Gesamtmenge an N-Glykanen zu erhalten [129], war zwar im Vergleich zum Kontroll-Pool im Serum der Patientin signifikant reduziert ( $1,0 \pm 0,07 / 0,57 \pm 0,06$ ,  $p=0,009$ ) aber im Fibroblastenlysate unauffällig ( $1,0 \pm 0,26 / 0,97 \pm 0,09$ ,  $p>0,05$ ). Demnach konnte eine Beeinträchtigung der Sialylierung in  $\alpha$ -2,3 Verknüpfung im Patientenserum und -zelllysate festgestellt werden sowie eine allgemeine Verringerung an GlcNAc-tragenden N-Glykanen im Serum der Patientin (Abbildung 24).

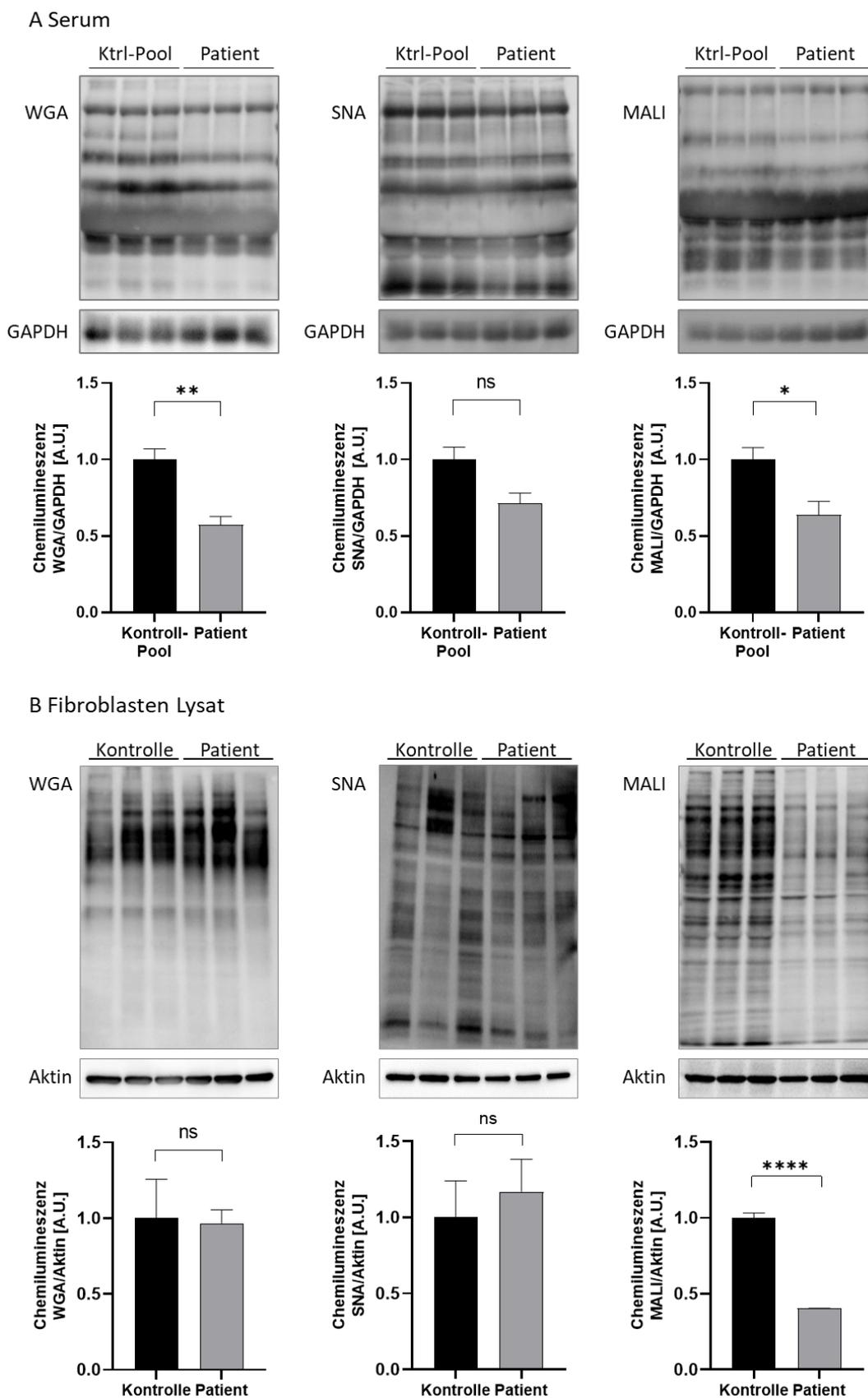


Abbildung 24: Teilweise starke Veränderung des Signals von sialinsäurebindenden Lektinen im Patientenserum oder -zelllysate. Dargestellt ist das Signal der Lektine WGA, SNA und MALI im Western Blot, wobei entweder ein Kontroll-Pool (Ktrl-Pool) aus 127 Kontrollseren und das Patientenserum aufgetragen wurde (**A**) oder Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten (**B**). Die Signalintensität wurde auf die jeweilige Ladekontrolle GAPDH im Serum oder Aktin im Zelllysate normalisiert.

### 6.5.2 Signale von Lektinen, die nicht-sialylierte Strukturen erkennen sind in den Zellen der Patientin verändert und im Serum unauffällig

Um Festzustellen, ob sich auch das Signal von Lektinen, die nicht-sialylierte Strukturen erkennen, in den Patientenzellen von den Kontrollen unterscheidet, wurden die Membranen mit *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL) und *Ricinus Communis Agglutinin I* (RCAI) inkubiert. ECL erkennt Galaktose und GlcNAc-Reste (Gal(NAc) $\beta$ 1,4GlcNAc) und kann nicht binden, falls diese Zucker mit Sialinsäure substituiert sind. Es wird daher verwendet, um terminale  $\beta$ -1,4 Galaktose oder  $\beta$ -1,4 GlcNAc zu detektieren und kann Auskunft über die Menge an nicht-sialylierten Strukturen geben. RCAI erkennt ebenfalls terminale Galaktose (Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc), aber kann zu einem geringen Teil auch an GalNAc- und Galaktosereste binden, an die  $\alpha$ -2,6 Sialinsäure gebunden ist [129].

Im Serum der Patientin waren die Signale beider Lektine unauffällig - sowohl das RCAI- ( $1,0 \pm 0,09 / 0,77 \pm 0,13$ ,  $p > 0,05$ ) als auch das ECL-Signal ( $1,0 \pm 0,10 / 0,92 \pm 0,04$ ,  $p > 0,05$ ) lag im Bereich des Kontroll-Pools (Abbildung 25 A). Im Zellysate der Patientin zeigte ECL in der Quantifizierung zwar ein kontrollgleiches Signal ( $1,0 \pm 0,15 / 0,88 \pm 0,44$ ,  $p > 0,05$ ), aber das beobachtete Bandenmuster unterschied sich von dem der Kontrolle. RCAI zeigte im Patientenzellysate ein signifikant erhöhtes Signal ( $1,0 \pm 0,17 / 1,96 \pm 0,57$ ,  $p = 0,049$ ), was für eine reduzierte  $\alpha$ -2,3 Sialylierung in den Zellen spricht (Abbildung 25 B).

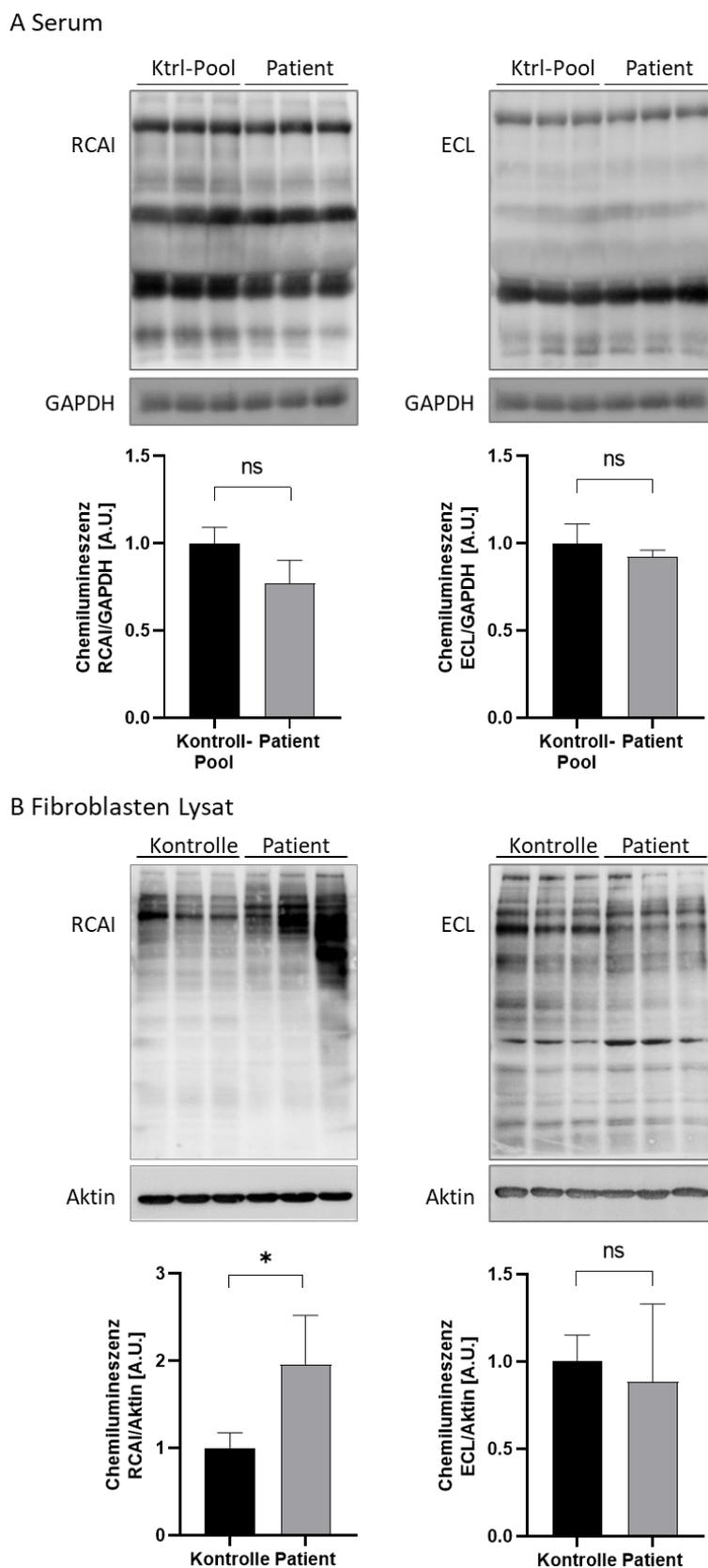


Abbildung 25: Die Signale von Lektinen, die nicht-sialylierte Strukturen binden sind im Serum der Patientin unauffällig und im Zelllysate deutlich verändert. Dargestellt ist das Signal der Lektine RCAI und ECL im Western Blot sowie die jeweiligen Quantifizierungen. **A)** Lektinblots, bei denen ein Kontroll-Pool (Ktrl-Pool) aus 127 Kontrollseren und Patientenserum aufgetragen wurde, GAPDH diente als Ladekontrolle. **B)** Lektinblots, bei denen Lysat aus Kontroll- und Patientenfibroblasten aufgetragen wurde, Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

## 6.6 Endogenes *SLC35A1*-Expressionslevel in Fibroblasten

Ob sich die Expression von *SLC35A1* in den Patientenzellen auf Transkript- und Proteinebene vom Expressionslevel in Kontrollfibroblasten unterscheidet, wurde mit qPCR, Western Blots und einem *SLC35A1*-ELISA ermittelt.

### 6.6.1 Expression des *SLC35A1*-Transkriptes ist unauffällig

Die Expression von *SLC35A1* in Kontroll- und Patientenfibroblasten wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCR untersucht. Die gemessenen Ct-Werte für das *SLC35A1*-Transkript wurden auf die Ct-Werte des  $\beta$ -*Aktin*-Transkripts als Kontrollgen normalisiert und die Werte anschließend mit denen der Kontrollproben verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge des *SLC35A1*-Transkripts in den Patientenzellen minimal und nicht signifikant, auf  $0,89 \pm 0,04$  verringert war und damit nur unwesentlich von der Expression in den Kontrollproben ( $1,0 \pm 0,06$ ,  $p > 0,05$ ) abwich (Abbildung 26).

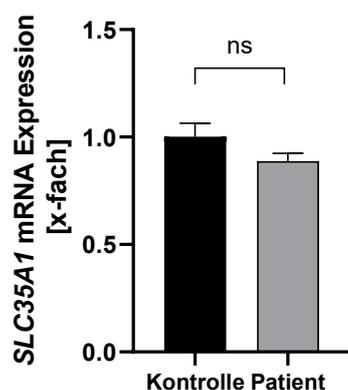


Abbildung 26: Die *SLC35A1* mRNA-Expression in den Patientenzellen ist unauffällig. Die Expression des *SLC35A1*-Transkripts wurde mit cDNA aus Fibroblasten-RNA gemessen und auf  $\beta$ -Aktin und das mRNA-Level der Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte von drei biologischen Replikaten, die jeweils in technischen Triplikaten gemessen wurden ( $\pm$  SD).

### 6.6.2 Test verschiedener *SLC35A1*-Antikörper führt zu unspezifischen Ergebnissen

Das endogene *SLC35A1*-Proteinlevel in den Patientenzellen sollte durch Detektion des Proteins über Western Blot erfolgen. Dazu wurden drei *SLC35A1*-Antikörper von unterschiedlichen Herstellern verwendet. Das Protein ist 37 kDa groß und sollte, sofern von den Herstellern angegeben, im Western Blot eine Laufhöhe von ca. 33 kDa besitzen. Zudem wurde als Positivkontrolle eine Probe des *SLC35A1*-Standards des in 6.6.3 verwendeten ELISA-Kits aufgetragen. Leider zeigte die Detektion der *SLC35A1*-Antikörper vielfältige Bandenmuster, wobei aber eine spezifische Proteinbande auf der zu erwartenden Höhe fehlte. Der *SLC35A1*-Standard konnte mit zwei der getesteten Antikörper detektiert werden, jedoch befand sich die Hauptbande auf einer Höhe von ca. 65 kDa, was einem Dimer des Proteins entsprechen könnte. Aber auch auf dieser Höhe befand sich keine eindeutige Bande in den Lysaten (Abbildung 27 A, B). Das spezifischste Ergebnis lieferte der Antikörper von MyBiosource mit einer Bande bei etwa 45 kDa, allerdings konnte kein Signal für den *SLC35A1*-Standard detektiert werden, weshalb auch hier die Spezifität des Antikörpers fragwürdig bleibt (Abbildung 27 C). Als Lysepuffer für die Zellen wurde entweder RIPA-Puffer, 0,75 % Sarkosyl oder 7,5 % Sarkosyl verwendet. Da auch die

unterschiedlichen Aufarbeitungen der Proben zu keiner eindeutig spezifischen Bande auf der erwarteten Höhe im Western Blot führten, wurde angenommen, dass die Antikörper, zumindest unter den gegebenen Bedingungen, unspezifisch binden, weshalb in weiteren Experimenten mit einem getaggten SLC35A1-Protein gearbeitet wurde.

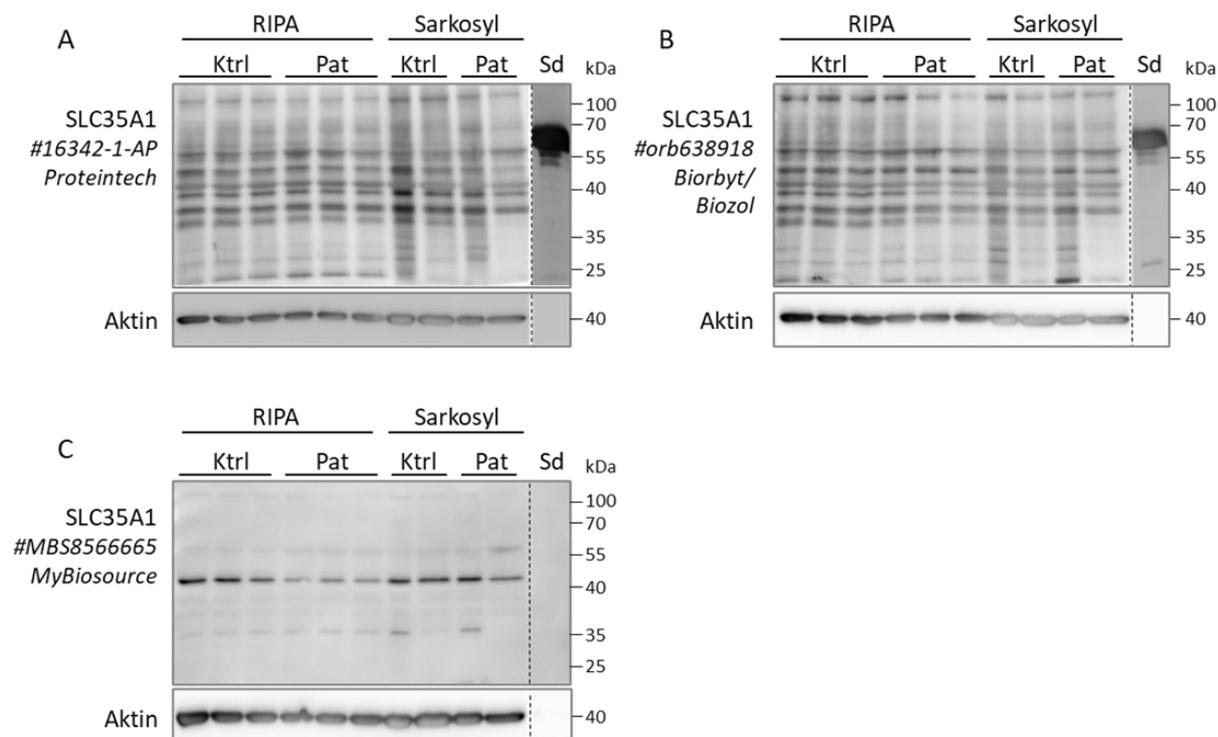
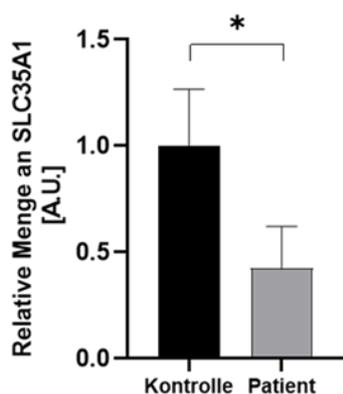


Abbildung 27: Verschiedene SLC35A1-Antikörper führen bei Western Blots mit Zelllysate zu unspezifischen Ergebnissen. Aufgetragen wurde Fibroblastenlysate von Kontroll- (Ktrl) und Patientenzellen (Pat), das entweder mit RIPA-Puffer oder 0,75 % bzw. 7,5 % Sarkosyl (jeweils nacheinander für Kontrolle und Patient aufgetragen) aufgearbeitet wurde. Zudem wurde ein SLC35A1-Standard (Sd) neben den Proben laufen gelassen. In **A**) - **C**) sind die Blots, bei denen die verschiedenen SLC35A1-Antikörper detektiert wurden sowie Aktin als Ladekontrolle dargestellt.

### 6.6.3 Verringerte SLC35A1-Proteinmenge in Patientenfibroblasten

Da die endogene Proteinmenge in den Patientenzellen aufgrund einer fehlenden, eindeutigen Bande nicht mittels Western Blot quantifiziert werden konnte, wurde stattdessen ein SLC35A1 ELISA-Kit verwendet, bei dem die SLC35A1 Menge photometrisch bestimmt wurde. Um die Proben besser miteinander vergleichen zu können, wurde die relative Menge an SLC35A1 in den



Lysaten berechnet, indem die Kontrolle auf 100 % bzw. 1 gesetzt wurde und die Patientenprobe darauf normalisiert wurde (Abbildung 28). So wurde ermittelt, dass die relative Menge des SLC35A1-Proteins in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,27$ ) signifikant auf  $0,42 \pm 0,19$  reduziert war ( $p=0,039$ ).

Abbildung 28: Das mit einem ELISA-Kit gemessene SLC35A1-Proteinlevel ist in den Patientenzellen signifikant reduziert. Dargestellt ist die relative Menge an SLC35A1 in den Kontroll- und Patientenproben, die anhand einer Standardreihe errechnet wurde.

## 6.7 Reduzierte Aktivität des SLC35A1-Transporters in Patientenzellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Aktivität des Sialinsäure-Transporters in den Patientenzellen verändert ist. Hierfür wurden Golgi-Vesikel durch eine Sucrose-Gradientenzentrifugation aus Lysat der Patienten- und Kontrollfibroblasten isoliert und der Import von radioaktiv-markierten Zuckern ermittelt. Die Radioaktivität, die sich in den Vesikeln befand, wurde gemessen und der Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac (Sialinsäure) auf die Kontrollzucker GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose normalisiert. Der Import der Kontrollzucker wurde als Referenz für die generelle Funktionalität der eingesetzten Vesikel und demnach auch als Normalisierungsparameter verwendet. Zusätzlich zur ungebundenen Radioaktivität wurde durch Proteinfällung und Messung dieser Fraktion auch die Radioaktivität gemessen, die auf Proteine übertragen wurde.

In die Vesikel aus Kontrollzellen wurden generell weniger Zuckermoleküle transportiert als in die Vesikel aus Patientenzellen, was an einer geringeren Funktionalität der Vesikel in der Kontrollprobe nach der Aufarbeitung liegen könnte. Das Verhältnis des Imports der unterschiedlichen Zucker war bei Kontrolle und Patient vergleichbar (Abbildung 29 A). In beiden Proben wurde hauptsächlich CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac transportiert (Kontrolle:  $0,958 \pm 0,323$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>, Patient:  $1,499 \pm 0,539$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>, n=2) und am wenigsten UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose (Kontrolle:  $0,042$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>, Patient:  $0,099$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>, n=1). Der Fucose Import betrug bei den Kontrollproben  $0,237 \pm 0,014$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> und bei den Patientenproben  $0,580 \pm 0,213$  pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> (n=2). Um die Aktivität der SLC35A1-Transporter in den Golgi-Vesikeln der Proben vergleichen zu können, wurde der Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac jeweils auf die Kontrollzucker GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose normalisiert. Dabei stellte sich heraus, dass der CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac Transport in den Vesikeln der Patientenzellen im Verhältnis zum GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose Import und normalisiert auf die Kontrollwerte ( $1,0 \pm 0,08$ ), auf  $0,64 \pm 0,13$  reduziert war (Abbildung 29 B). Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich auch aus dem Verhältnis von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac zu UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose Import. Hier war der Import von Sialinsäure bei der Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,01$ ) auf  $0,67 \pm 0,01$  verringert (Abbildung 29 C). Die Aktivität des SLC35A1-Transporters in den Patientenzellen wurde aus den Ergebnissen gemittelt, sodass eine Restaktivität von etwa 65,5 % vorhanden zu sein scheint.

Das Verhältnis von proteingebundener GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose zum Gesamtimport dieses Zuckers war in den Patientenproben leicht reduziert (Kontrolle:  $0,191 \pm 0,001$  dpm, Patient:  $0,154 \pm 0,027$  dpm) und die Menge an ungebundener GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose leicht erhöht (Kontrolle:  $0,809 \pm 0,001$  dpm, Patient:  $0,846 \pm 0,027$  dpm). Ähnlich verhielt es sich auch für die Übertragung von UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose auf Proteine. Hier ergab sich für die Kontrolle ein Wert von  $0,058$  dpm und für die Patientenprobe von  $0,047$  dpm. Die ungebundene UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose war dementsprechend in den Vesikeln aus Patientenzellen leicht erhöht (Kontrolle:  $0,942$  dpm, Patient:  $0,953$  dpm). Die Verknüpfung von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac war in den Patientenproben ebenfalls leicht reduziert. Hier wurden für die proteingebundene Sialinsäure  $0,041 \pm 0,014$  dpm berechnet, wobei in den Kontrollen  $0,071 \pm 0,011$  dpm übertragen wurde. Die ungebundene Sialinsäure betrug in den Kontrollzell-Vesikeln  $0,929 \pm 0,011$  dpm und in denen aus Patientenzellen  $0,959 \pm 0,014$  dpm. Um eine statistische Aussage über die Aktivität des Transporters und eine mögliche Beeinträchtigung der Übertragung von Sialinsäure auf Glykoproteine zu treffen, bräuchte es mindestens drei Wiederholungen des Experimentes. Leider war die Durchführung eines weiteren Replikates nicht möglich, da die verwendeten radioaktiv-markierten Zucker nicht mehr käuflich zu erwerben waren.

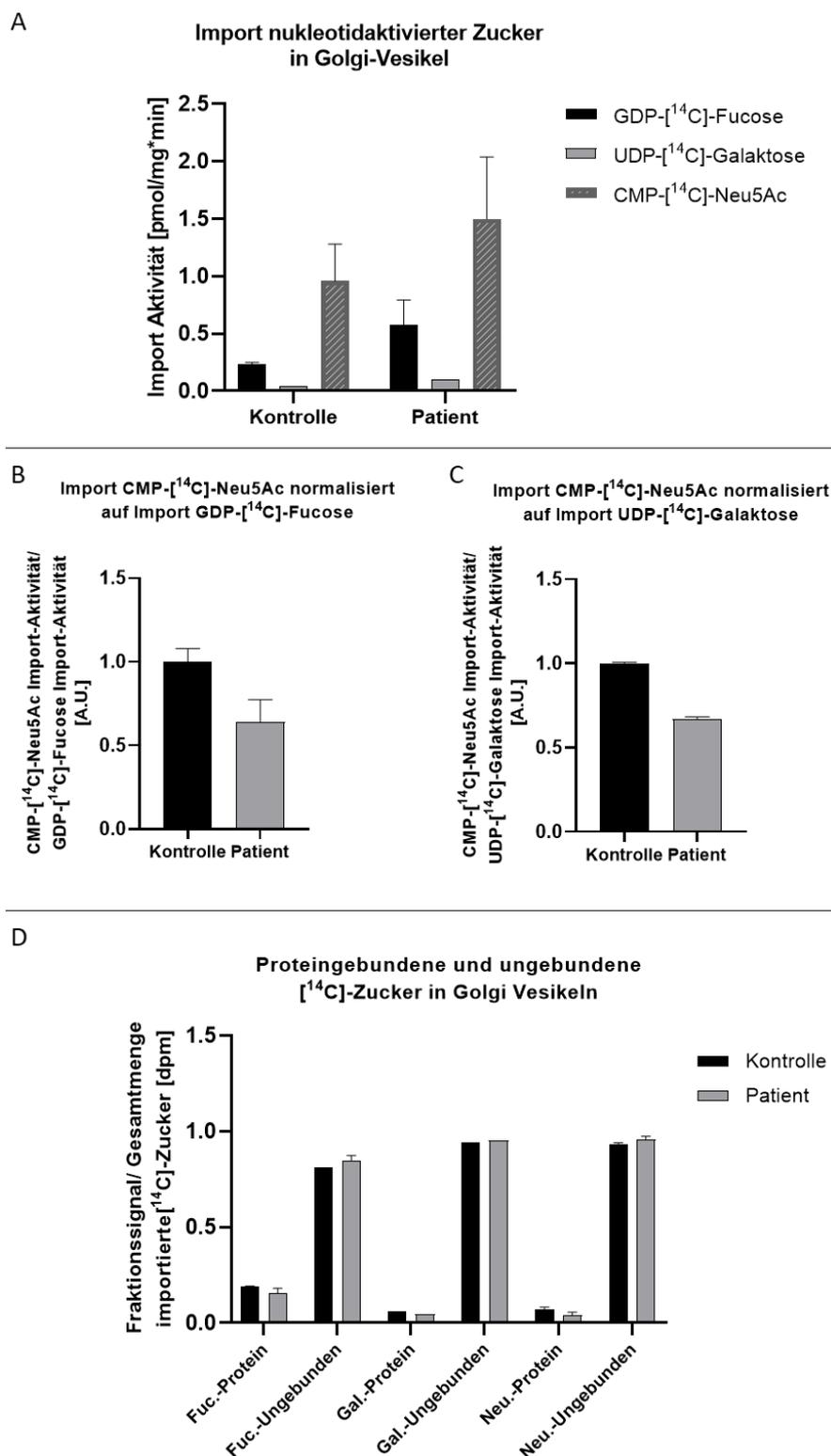


Abbildung 29: In Golgi-Vesikeln aus den Fibroblasten der Patientin ist der Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac reduziert. **A**) Import-Aktivität für die radioaktiv-markierten Zucker CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac (n=2), GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose (n=2) und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose (n=1) in pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> in Golgi-Vesikeln aus Kontroll- und Patientenfibroblasten. **B**) CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac Import normalisiert auf den Import des Kontrollzuckers GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose. **C**) CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac Import normalisiert auf den Import des Kontrollzuckers UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose. **D**) Anteil an proteingebundenen (-Protein) und ungebundenen (-ungebunden) Zuckern in den Golgi-Vesikeln aus Kontroll- und Patientenzellen. Fuc.=GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose, Gal.=UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose, Neu.=CMP-[<sup>14</sup>C]-Neu5Ac.

## 6.8 HEK293 *SLC35A1* Knock-out-Zelllinie als Modell

Zur gezielten Untersuchung der Auswirkungen der Patientenmutation im *SLC35A1*-Gen wurde eine HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9 generiert, die in späteren Experimenten dazu genutzt wurde, die Konstrukte pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA und pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA zu exprimieren. Dazu etablierte ich für das Labor zunächst den experimentellen Ablauf für die Verwendung von CRISPR/Cas9 zur Generierung von K.o. Klonen mit HEK293-Zellen.

### 6.8.1 Generierung und Bestätigung des *SLC35A1* K.o. in HEK293-Zellen

Die für den CRISPR/Cas9 Gen K.o. verwendete gRNA Sequenz wurde wie von Banning *et al.* [115] publiziert übernommen. Diese bindet in Exon 2 des *SLC35A1* Gens (Abbildung 30). Im Idealfall hätte eine *SLC35A1* K.o.-Zelllinie generiert werden sollen, sowie eine Zelllinie, die genetisch so verändert ist, dass sie die Patientenmutation trägt. Die gRNA wurde demnach nicht nur dafür verwendet eine K.o.-Zelllinie, sondern auch für den Versuch eine HEK293-Zelllinie zu schaffen, welche die Patientenmutation trägt. Dazu wurden ssOligos mit der mutierten Sequenz und entsprechenden Homologie-Armen an den Enden verwendet, die durch den zielgerichteten Mechanismus der Homologie-basierten Reparatur („Homolgy Directed Repair“, HDR) von der Zelle hätten eingebaut werden sollen. Leider blieb dieser Versuch ohne Erfolg, was daran liegen könnte, dass die Schnittstelle durch die verwendete gRNA zu weit (48 Basen) von der Insertionsstelle entfernt lag. Deshalb wurde zudem eine weitere gRNA zu diesem Zweck getestet, die sich unmittelbar neben Position c. 133 befand. Allerdings schien diese gRNA nur sehr ineffizient zu DNA-Schnitten durch Cas9 zu führen, da die Sequenzen der überprüften Einzelzellklone entweder wildtypisch waren, sodass vermutlich überhaupt kein Doppelstrangbruch stattgefunden hatte, oder heterozygot durch nicht-homologe Endverknüpfung („Non-homologous end joining“, NHEJ) repariert worden waren (Daten nicht gezeigt). Weitere gRNA Sequenzen kamen zu diesem Zweck nicht in Frage, da sie sich aufgrund der Positionen der erforderlichen PAM-Sequenzen zu weit von der gewünschten Stelle entfernt befanden. Demnach wurde dieser Ansatz verworfen und stattdessen nur die *SLC35A1* K.o.-Zelllinie generiert, die anschließend mit einem wildtypischen sowie einem *SLC35A1*(A133G) Konstrukt transfiziert werden konnte.

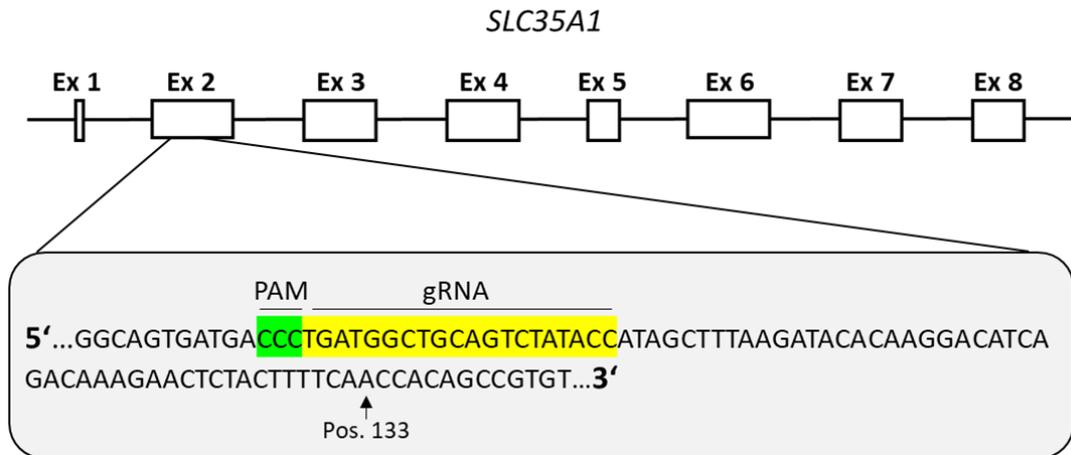


Abbildung 30: Die verwendete gRNA bindet in Exon 2 des *SLC35A1*-Gens. Sequenz und Lokalisation der verwendeten gRNA zur Generierung einer *SLC35A1* K.o.-Zelllinie. Die gRNA bindet an eine Sequenz in Exon (Ex) 2 des *SLC35A1* Gens. In grün ist die PAM-Sequenz und in gelb die Sequenz, an die die gRNA bindet, markiert. In Exon 2 befindet sich ebenfalls die Patientenmutation c. A133G, allerdings 48 Basen von der gRNA-Sequenz entfernt. Position c. 133 wurde mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Nachdem die WT HEK293-Zellen mit dem pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektor (Cas9 Vektor) mit der gRNA Sequenz transfiziert und anschließend vereinzelt worden waren, wurden die Einzelzellklone mit dem Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher) überprüft. Hierfür wurden Screening Primer verwendet, die das Exon 2 des *SLC35A1*-Gens flankierten (siehe 5.2.9). Bei Klonen, deren PCR-Produkt als einzelne Bande im Agarosegel zu erkennen war, wurde diese sequenziert. Im Gegensatz dazu wurden Klone, deren DNA nach der Phire PCR mehrere Banden aufwies, verworfen, da hier die Wahrscheinlichkeit für einen heterozygoten Genotyp sehr hoch war (Abbildung 31).

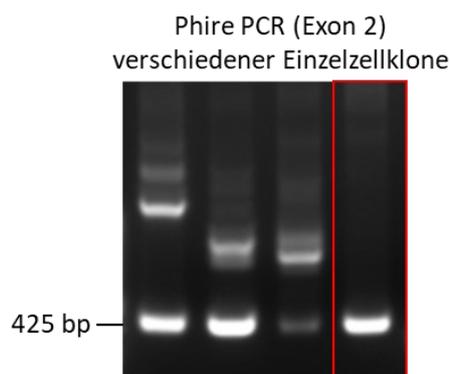


Abbildung 31: Einzelzellklone, die bei der Screening-PCR eine einzelne Bande zeigen, werden weiter untersucht. Screening verschiedener Einzelzellklone mit dem Phire Animal Tissue Direct PCR Kit. Amplifiziert wurde eine Region um Exon 2 (425 bp) des *SLC35A1* Gens mit den Screening Primern (siehe 5.2.9). Zur weiteren Überprüfung wurden einzelne Banden, wie bei dem rot markierten PCR-Produkt, sequenziert. Klone, deren PCR-Produkt mehrere Banden zeigte, wie in den ersten drei Lanes, wurden verworfen.

Auf diese Weise wurde schließlich ein Einzelzellklon mit einer homozygoten Insertion einer einzelnen Base gefunden. Diese führt zu einer Verschiebung des Leserahmens („Frameshift“) im *SLC35A1*-Gen und dadurch auch zu einem verfrühten Stopp-Codon (Abbildung 32). Um ungewollte Brüche der DNA (Off-Target Effekte) durch Cas9 und die verwendete gRNA auszuschließen, wurden potenziellen Schnittstellen sequenziert. Dadurch wurde bestätigt, dass diese bei dem gewählten Klon nicht mutiert waren (siehe Anhang Abbildung 1).

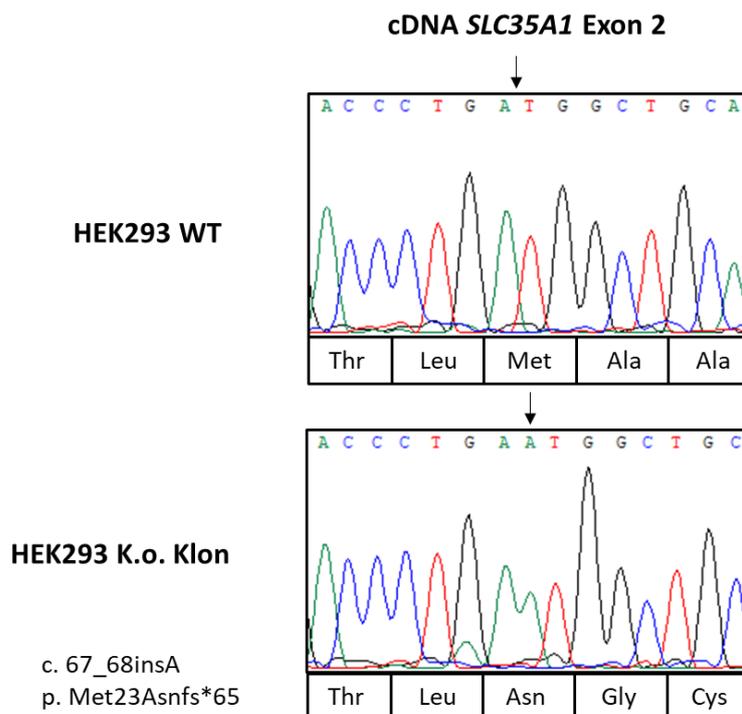


Abbildung 32: Der gewählte Knock-out (K.o.) Klon zeigt eine Sequenzveränderung im Vergleich zur wildtypischen (WT) Sequenz in HEK293-Zellen. Beim K.o. Klon wurde eine homozygote Insertion eines Adenins zwischen den Basen 67 und 68 der *SLC35A1* cDNA festgestellt, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und dadurch auch zu einem verfrühten Stopp-Codon führt. Die Stelle der Insertion ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Als nächstes wurde überprüft, ob der K.o. des *SLC35A1*-Gens in dem ausgewählten Klon erfolgreich war. Dazu wurde zunächst die *SLC35A1* Transkript-Expression mittels qPCR sowie die Proteinmenge durch das *SLC35A1* ELISA-Kit ermittelt. Die mRNA-Expression war im K.o. Klon deutlich signifikant auf  $3,2 \pm 1,3$  % ( $p < 0,0001$ ) reduziert (Kontrolle:  $100 \pm 9,4$  %), was für einen erfolgreichen K.o. spricht. Die Proteinmenge in den genetisch veränderten Zellen war im Vergleich zu WT-Zellen ( $100 \pm 28,3$  %) ebenfalls signifikant reduziert und es wurde eine verbleibende Proteinmenge von  $40,9 \pm 7,0$  % ( $p = 0,025$ ) berechnet (Abbildung 33).

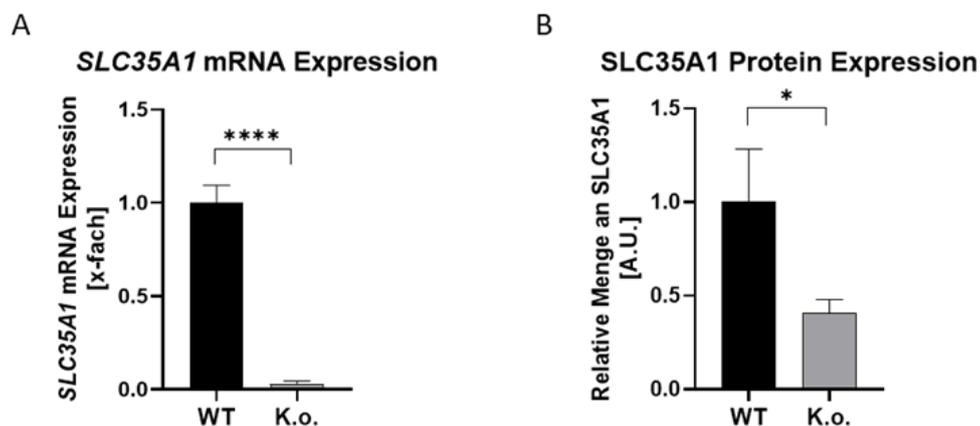


Abbildung 33: Bestätigung des *SLC35A1* K.o. auf Transkript- und Proteinebene. **A)** Überprüfung der *SLC35A1* mRNA-Expression mittels qPCR in wildtypischen (WT) HEK293-Zellen und dem HEK293 *SLC35A1* Knock-out Klon (K.o.). **B)** Messung der relativen Menge an SLC35A1 in WT und K.o.-Zellen durch ein SLC35A1 ELISA-Kit. Es wurden jeweils biologische Triplikate in technischen Triplikaten (qPCR) bzw. Duplikaten (ELISA) gemessen.

Zudem wurde der K.o. des *SLC35A1*-Gens durch Färbung von Zellysats mit verschiedenen Lektinen im Western Blot überprüft. Hier wurde ein reduziertes Signal von sialinsäurebindenden Lektinen (MALI, WGA) und eine erhöhte Bindung von Lektinen, die nicht-sialylierte Strukturen erkennen (ECL, RCAI) detektiert: Die gebundene Menge an WGA ( $1,0 \pm 0,29 / 0,49 \pm 0,09$ ,  $p=0,048$ ) und MALI ( $1,0 \pm 0,33 / 0,21 \pm 0,11$ ,  $p=0,017$ ) waren signifikant reduziert, während die Signale für ECL ( $1,0 \pm 0,38 / 18,34 \pm 1,70$ ,  $p<0,0001$ ) und RCAI ( $1,0 \pm 0,12 / 2,16 \pm 0,41$ ,  $p=0,001$ ) deutlich signifikant erhöht waren. Lediglich das SNA-Signal entsprach dem der WT HEK293-Zellen ( $1,0 \pm 0,28 / 1,0 \pm 0,18$ ,  $p>0,05$ ) (Abbildung 34). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der K.o. des *SLC35A1*-Gens im verwendeten K.o. Klon als bestätigt betrachtet und diese Zellen für weitere Experimente eingesetzt.

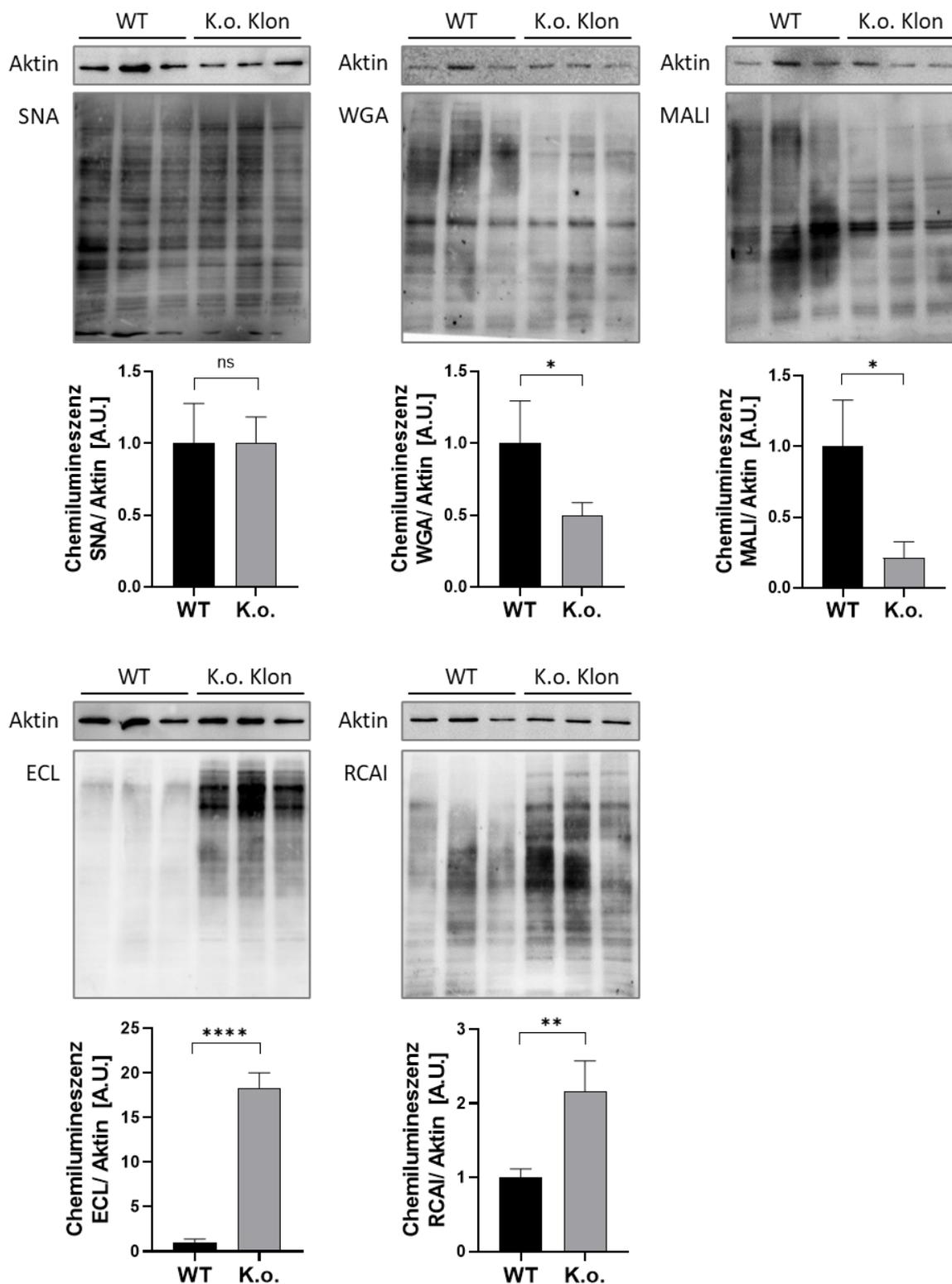


Abbildung 34: Im Lysat der HEK293 *SLC35A1* K.o. Zellen sind die Signale verschiedener Lektine stark verändert. Die Signale der Lektine wurden in Western Blots mit Lysat von HEK293 WT-Zellen und Zellen des *SLC35A1* K.o. Klon nachgewiesen. Die Lektine der oberen Reihe, SNA, WGA und MALI, erkennen Zuckerreste, die Sialinsäure enthalten, wohingegen die Lektine ECL und RCAI in der unteren Reihe Strukturen erkennen, denen Sialinsäure fehlt. Aufgetragen wurden jeweils biologische Triplikate und Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

## 6.8.2 Expression des *SLC35A1*(WT)- oder *SLC35A1*(A133G)-Gens in HEK293-Zellen führt zu vergleichbaren Glykosylierungsmustern

HEK293 WT- und *SLC35A1* K.o.-Zellen wurden mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock) oder den getaggtten pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA und pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA Plasmiden transient transfiziert, um die Funktionsfähigkeit des mutierten Proteins in einem kontrollierten genetischen Hintergrund zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Glykosylierungsmarkerproteine und Lektinsignale im Lysat der Zellen mittels Western Blot detektiert.

Als erstes wurde die Expression der transfizierten Konstrukte durch Detektion des HA-Tags überprüft. Der HA-Antikörper zeigte in den WT Mock- und K.o. Mock-Lysaten nur ein minimales, vermutlich unspezifisches oder endogenes Signal. In den Proben der K.o.-Zellen mit *SLC35A1*(WT)-HA (K.o. + WT) oder *SLC35A1*(A133G)-HA (K.o. + A133G) Konstrukt war der Proteintag bei etwa 33 kDa detektierbar, wodurch eine erfolgreiche Transfektion bestätigt werden konnte (Abbildung 35). Eine Liste mit allen Mittelwerten, Standardabweichung und p-Werten befindet sich in Anhang Tabelle 1.

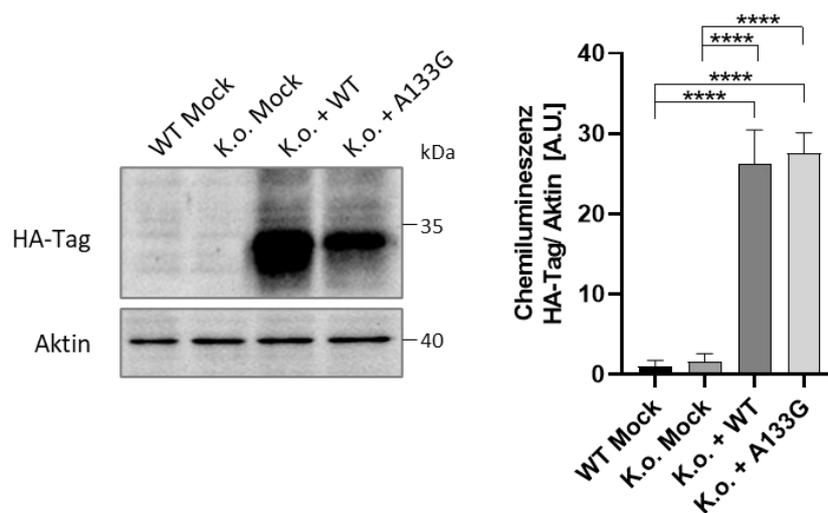


Abbildung 35: Erfolgreiche Expression der transfizierten *SLC35A1*-HA-Konstrukte in HEK293-Zellen. Für den Western Blot wurden Lysate von HEK293 WT- bzw. *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen aufgetragen, die entweder mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) oder dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G) Plasmid transient transfiziert waren. Die Expression der Konstrukte wurde durch Detektion des HA-Tags bestätigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mittels one-way ANOVA mit Tukey Test ermittelt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur die signifikanten Unterschiede im Diagramm markiert. Eine Liste mit allen p-Werten befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 1).

Als nächstes wurden die Glykosylierungsmarkerproteine GP130 und TGN46 im Lysat der transfizierten Zellen detektiert. Im Lysat der *SLC35A1* K.o. Mock-Zellen kam es zu einer Verschiebung in der Laufhöhe der vollständig glykosylierten Formen der Glykosylierungsmarkerproteine, was auf eine Hypoglykosylierung dieser Proteine durch den K.o. des *SLC35A1*-Gens schließen lässt (GP130: WT Mock  $1,0 \pm 0,37$ , K.o. Mock  $0,48 \pm 0,27$ ,  $p > 0,05$ ; TGN46: WT Mock  $1,0 \pm 0,60$ , K.o. Mock  $0,37 \pm 0,26$ ,  $p > 0,05$ ). Die Menge der un- oder hypoglykosylierten Formen der Proteine nahm in den K.o. Mock-Zellen stattdessen zu (GP130: WT Mock  $1,0 \pm 0,67$ , K.o. Mock  $1,28 \pm 0,71$ ,  $p > 0,05$ ; TGN46: WT Mock  $1,0 \pm 0,71$ , K.o. Mock  $1,81 \pm 0,85$ ,  $p > 0,05$ ). Die in den K.o. Mock-Zellen beobachtete Verschiebung der Protein-Laufhöhe konnte sowohl durch die Expression des wildtypischen (+ WT) als auch des Konstruktes mit der Patientenmutation (+ A133G) wieder der Höhe im Lysat der HEK293 WT Mock-Zellen angeglichen werden. Die Werte der glykosylierten und unglykosylierten Proteinform von GP130 betrug bei der K.o. + WT Probe  $0,94 \pm 0,51$  bzw.  $0,96 \pm 0,80$  und bei der K.o. + A133G Probe  $1,30 \pm 0,92$  bzw.  $1,07 \pm 0,10$  ( $p > 0,05$ ). Die Menge an glykosyliertem bzw. hypoglykosyliertem TGN46 betrug in den K.o. + WT Lysaten  $0,93 \pm 0,75$  bzw.  $0,59 \pm 0,41$  und in den K.o. + A133G Zellen  $1,13 \pm 0,71$  bzw.  $0,68 \pm 0,71$  ( $p > 0,05$ ). Die Quantifizierungen der Signale führte jeweils zu nicht-signifikanten Ergebnissen, die visuellen Unterschiede in der Laufhöhe waren aber deutlich zu erkennen (Abbildung 36).

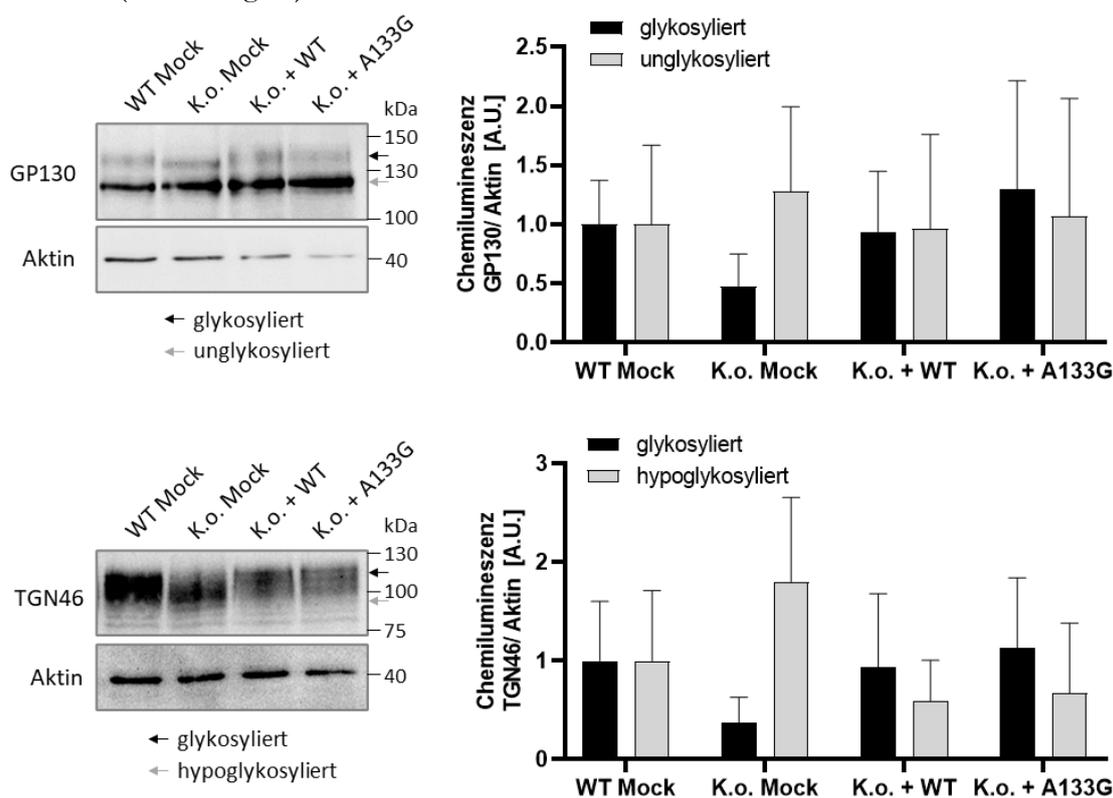


Abbildung 36: Die Expression des wildtypischen und des mutierten *SLC35A1*-Gens hat einen vergleichbaren Effekt auf die Glykosylierung von Markerproteinen. Detektion der Glykosylierungsmarkerproteine GP130 und TGN46 im Lysat transient transfizierter HEK293 WT- und *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen. Transfiziert wurden die Zellen mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) oder dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA (+A133G) Plasmid. Die Unterschiede der Signalintensitäten nach Quantifizierung waren nach one-way ANOVA mit Tukey Test nicht signifikant. Eine Liste mit allen Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 1).

Ähnlich verhielt es sich mit den Signalen der verwendeten Lektine. Auch hier konnten die in den K.o. Mock-Zellen, im Vergleich zu den WT Mock Proben, signifikant verringerten Signale der sialinsäure-bindenden Lektine MALI (WT Mock  $1,0 \pm 0,11$ / K.o. Mock  $0,63 \pm 0,15$ ,  $p=0,028$ ), SNA ( $1,0 \pm 0,35$ /  $0,51 \pm 0,004$ ,  $p=0,042$ ) und WGA ( $1,0 \pm 0,11$ /  $0,46 \pm 0,13$ ,  $p=0,028$ ) bzw. die signifikant erhöhten Signale der Lektine, die nicht-sialylierte Strukturen binden (ECL: WT Mock  $1,0 \pm 0,26$ / K.o. Mock  $3,82 \pm 0,67$ ,  $p<0,001$ ; RCAI:  $1,0 \pm 0,43$ /  $3,39 \pm 1,07$ ,  $p=0,034$ ), sowohl durch das *SLC35A1*(WT)-HA als auch das *SLC35A1*(A133G)-HA Konstrukt wieder angehoben bzw. reduziert werden (MALI: K.o.+ WT  $1,04 \pm 0,32$ / K.o. + A133G  $1,32 \pm 0,66$ ; SNA:  $0,64 \pm 0,04$ /  $0,78 \pm 0,04$ ; WGA:  $0,53 \pm 0,22$ /  $0,59 \pm 0,24$ ; ECL:  $2,45 \pm 0,41$ /  $2,49 \pm 0,39$ ; RCAI:  $2,79 \pm 0,93$ /  $2,95 \pm 0,80$ ). Die Signale der Lektine in den K.o. + WT und K.o. + A133G Proben waren zu den WT Mock und K.o. Mock Proben, bis auf das Ergebnis für ECL, nicht mehr signifikant verändert und konnten bei MALI sogar direkt dem WT Mock Niveau angepasst werden. Die ECL-Signale in den *SLC35A1*(WT) und *SLC35A1*(A133G) exprimierenden Proben zwar im Vergleich zur WT Mock-Kontrolle noch immer signifikant erhöht, allerdings waren sie auch im Vergleich zur K.o. Mock-Kontrolle signifikant gesunken (Abbildung 37). Dies zeigt, dass der Glykosylierungsdefekt der K.o. Mock-Zellen durch Expression der Konstrukte gemildert werden kann. Die mit den beiden Konstrukten transfizierten K.o.-Zellen zeigten insgesamt ähnliche Signalstärken für die verschiedenen Lektine. Dass die Expression des SLC35A1-Proteins mit der Patientenmutation zu einem ähnlichen Glykosylierungsmuster führte wie das wildtypische SLC35A1-Protein lässt außerdem darauf schließen, dass das Protein mit der Patientenmutation in den verwendeten HEK293-Zellen noch funktionsfähig ist. Eine Liste mit den für die Abbildungen verwendeten normalisierten Werten sowie die berechneten p-Werte können in Anhang Tabelle 1 eingesehen werden.

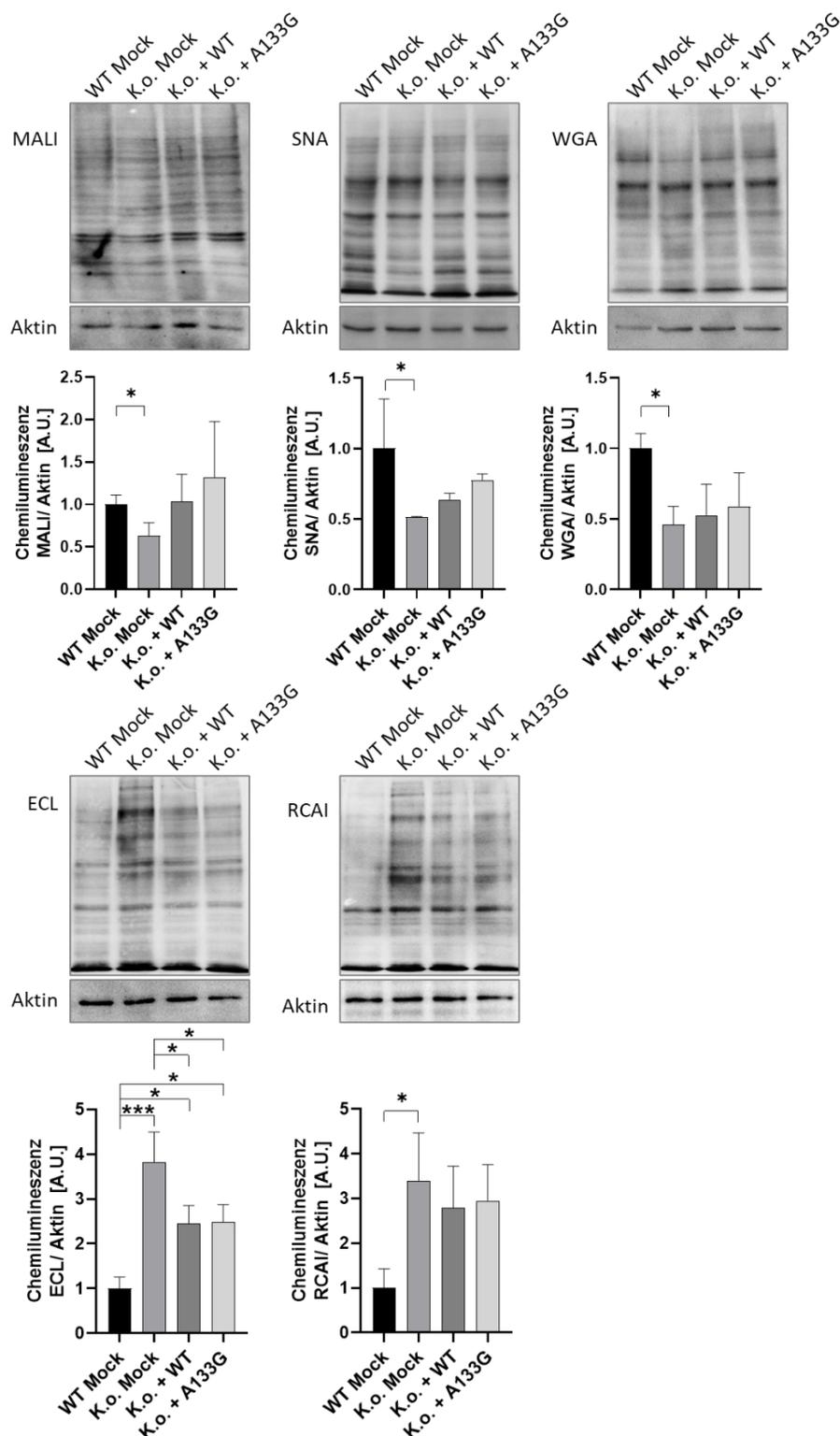


Abbildung 37: Die Expression des wildtypischen und des mutierten *SLC35A1*-Gens hat einen vergleichbaren Effekt auf die Veränderung von Lektinsignalen. Für die Lektinblots wurden Lysate von transient transfizierten HEK293 WT und *SLC35A1* Knock-out (K.o.) Zellen aufgetragen, die mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) oder dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA (+A133G) Plasmid transfiziert waren. Detektiert wurden die Signale von Lektinen, die sialylierte (MALI, SNA, WGA) oder nicht-sialylierte (ECL, RCAI) Glykane binden. Um die Werte der verschiedenen Proben statistisch zu vergleichen, wurde ein one-way ANOVA mit Tukey Test durchgeführt. Für eine möglichst übersichtliche Darstellung wurden nur signifikante Veränderungen markiert. Eine Liste mit allen Mittelwerten, Standardabweichung und p-Werten befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 1).

## 6.9 Verkürzte Halbwertszeit des SLC35A1(Thr45Ala)-HA Proteins

Da ein verminderter Sialinsäure-Import, wie er in 6.7 in den Patientenfibroblasten festgestellt wurde, auch damit zusammenhängen könnte, dass das Transporterprotein mit Mutation weniger stabil als das wildtypische Protein ist oder früher abgebaut wird, wurde die Protein-Halbwertszeit ermittelt. Um diese zu bestimmen, wurden HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen erneut mit den getaggten Konstrukten transient transfiziert, sodass die Zellen entweder das wildtypische SLC35A1-HA oder das SLC35A1(Thr45Ala)-HA Protein exprimierten. Die transfizierten Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 0-24 h mit dem Translationsinhibitor Cyclohexamid (CHX) behandelt, und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Durch Detektion und Quantifizierung des HA-Tag-Signals konnte der Abbau der getaggten Proteine beobachtet werden (Abbildung 38 A). Die HA-Signale jedes Zeitpunktes wurden auf den Anfangswert normalisiert, der auf 100 % gesetzt wurde. Anhand der dadurch entstehenden Kurve für die relative SLC35A1-HA Menge wurde die Halbwertszeit der Proteine, also der Zeitpunkt, zu dem nur noch 50 % des Proteins im Vergleich zum Startwert vorhanden war, berechnet. Dabei ergab sich für das SLC35A1(WT)-HA Protein eine Halbwertszeit von  $22,18 \pm 3,51$  h bzw.  $100 \pm 15,81$  %, wohingegen die Halbwertszeit des SLC35A1(Thr45Ala)-HA Proteins nur  $13,66 \pm 1,35$  h betrug. Dies entsprach einer signifikanten Verringerung der Proteinestabilität auf  $61,58 \pm 6,08$  % ( $p=0,017$ ) für das Transporterprotein mit der Patientenmutation (Abbildung 38 B).

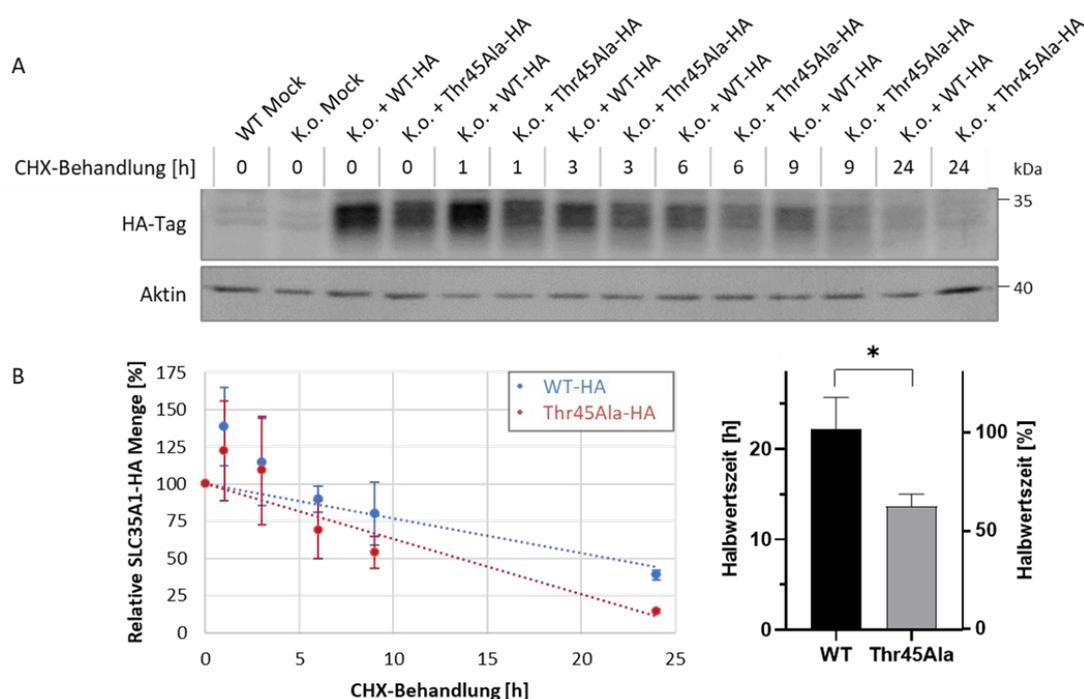


Abbildung 38: Das SLC35A1-Protein mit der Patientenmutation wird schneller abgebaut als das wildtypische Protein. **A)** Die Detektion des HA-Tags im Lysat transient transfizierter HEK293 Wildtyp (WT) und *SLC35A1* Knock-out-Zellen (K.o.) zeigt den Abbau des getaggten Proteins während zunehmender Länge der Cyclohexamid (CHX)-Behandlung. Die Zellen wurden mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock) transfiziert oder exprimierten das mit einem HA-Tag versehene wildtypische (WT-HA) bzw. das mutierte (Thr45Ala-HA) SLC35A1-Protein. **B)** Die relative Menge an SLC35A1-HA wurde anhand des HA-Signals im Western Blot ermittelt, wobei das Signal zum Startzeitpunkt der CHX-Behandlung 100 % entspricht. Die Trendlinien wurden verwendet, um die Halbwertszeiten ( $y=50$  %) des WT und des Thr45Ala Proteins zu berechnen.

## 6.10 Patientenfibroblasten zeigen eine verringerte Proliferation

Für die Untersuchung der Proliferation wurde das Tetrazoliumsalz WST-1 verwendet. Die Proliferation der Kontroll- und Patientenfibroblasten wurde unter normalen Kultivierungsumständen gemessen. Dafür wurden pro Well einer 96-Well Platte 750 Fibroblasten ausgesät, jeden Messtag mit WST-1 versetzt und der Farbumschlag, der durch die Reduktion des Tetrazoliumsalzes durch lebende Zellen entsteht, photometrisch gemessen (siehe 5.2.13). Die gemessenen Absorptionswerte der durchgeführten Triplikate unterschieden sich deutlich, was daran liegen könnte, dass bei dem Ablauf des Experiments kein geschlossenes System vorliegt, die Zellen nicht in ihrem Zellzyklus synchronisiert wurden und jeweils unterschiedliche Passagen der Zellen verwendet wurden. Dennoch war die generelle Tendenz der Wachstumskurven über die Triplikate hinweg ähnlich, sodass das Verhältnis der Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Patientenzellen zu den Kontrollzellen ermittelt wurde (Abbildung 39). Somit lässt sich keine Aussage über die tatsächliche Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Zellen treffen, sondern es wird ein Vergleich der Proliferation der Patienten- und Kontrollzellen betrachtet. Da hierbei die Kontrolle 100 % bzw. dem Wert 1 gleichgesetzt wurde und durch die Verhältnisrechnung keinen Fehler besitzt, konnte keine statistische Signifikanzbestimmung durchgeführt werden.

Aus dem Verhältnis der Wachstumsrate der Patientenfibroblasten zu den Kontrollzellen konnte entnommen werden, dass diese bei den Patientenzellen auf das  $0,39 \pm 0,13$ -fache reduziert war. Entsprechend war die Verdopplungszeit deutlich auf das  $2,97 \pm 1,18$ -fache erhöht (siehe Abbildung 39 D), was bedeutet, dass die Zellen der Patientin in etwa drei Mal länger brauchen sich zu teilen als Kontrollzellen. Demnach wurde eine verringerte Proliferation der Patientenfibroblasten festgestellt.

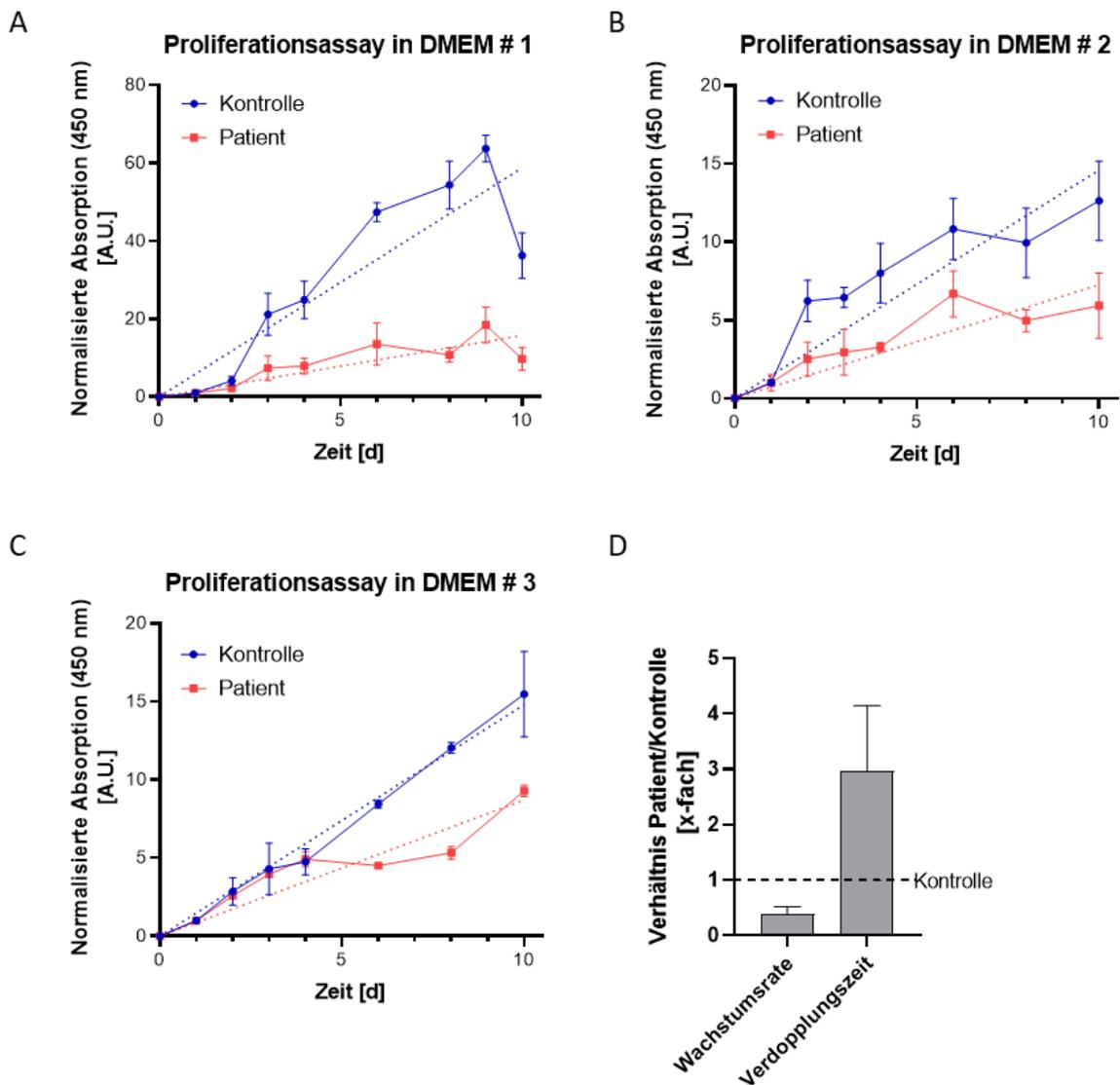


Abbildung 39: Die Proliferation der Patientenfibroblasten ist unter normalen Kultivierungsbedingungen reduziert. **A) - C)** Verschiedene Wiederholungen des Proliferationsassays. Pro Tag wurden je drei Wells gemessen und die Absorption gemittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Absorption, der auf den entsprechenden Startwert normalisiert wurde über die Zeit der Messung. Die Fehlerbalken entsprechen der normalisierten Standardabweichung pro gemessenem Zeitpunkt. Die gepunkteten Linien stellen jeweils die lineare Trendlinien der Wachstumskurven dar. **D)** Die Steigung der normalisierten Absorption über die Zeit wurde dazu verwendet die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit der Zelllinien zu berechnen. Das Diagramm stellt den Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses dieser Werte von Patienten- zu Kontrollzellen aus den Triplikaten dar. Die Kontrolle entspricht dabei einem Wert von 1.

### 6.10.1 Expression des mutierten Proteins verbessert die Proliferation von *SLC35A1* K.o.-Zellen nicht im gleichen Umfang wie das wildtypische Protein

Der direkte Effekt der Patientenmutation im *SLC35A1*-Gen auf die Proliferation wurde durch Bestimmung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit in HEK293 WT- und *SLC35A1* K.o.-Zellen, die mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1* (WT)-HA oder pCI-Neo *SLC35A1* (A133G)-HA Plasmid transfiziert wurden, untersucht. Die Zellen wurden für das Proliferationsassay mit dem WST-1 Reagenz, wie in 5.2.13 beschrieben, in 96-Well Platten ausgesät und der Farbumschlag pro Messtag in Triplikaten gemessen. Das Experiment wurde nur ein Mal durchgeführt (n=1), weshalb keine Standardabweichung für die berechnete Wachstumsrate und Verdopplungszeit berechnet werden konnte. Die Proliferation in den *SLC35A1* K.o. Mock (K.o. Mock)-Zellen war im Vergleich zu den HEK293 WT Mock (WT Mock)-Zellen stark reduziert: Das Verhältnis der Wachstumsrate von K.o. Mock zu WT Mock betrug lediglich 0,27, was zu einer Verdopplungszeit von 3,67 führte. Der Wert für Wachstumsrate und Verdopplungszeit für die WT Mock-Zellen wurde auf 1 gesetzt. Durch Expression der *SLC35A1*(WT/A133G)-HA Konstrukte konnte die stark verringerte Proliferation in den K.o. Mock-Zellen im Verhältnis zu WT Mock angehoben werden. Die K.o.-Zellen, die das *SLC35A1*(WT)-Gen exprimierten zeigten eine Wachstumsrate von 1,14 und eine Verdopplungszeit von 0,88. Für die K.o.-Zellen, die mit dem *SLC35A1* (A133G)-HA Konstrukt transfiziert worden waren, wurde im Verhältnis zu WT Mock eine Wachstumsrate von 0,61 und damit eine Verdopplungszeit von 1,63 ermittelt (Abbildung 40). Das Ergebnis dieses Experiments deutet darauf hin, dass sowohl die Expression des *SLC35A1*(WT)-Konstruktes als auch des Gens mit der Patientenmutation die reduzierte Proliferation in den K.o. Mock-Zellen wieder erhöht. Allerdings zeigten die K.o.-Zellen mit *SLC35A1*(WT)-Konstrukt eine kontrollähnlichere Wachstumsrate und Verdopplungszeit als die K.o.-Zellen, die mit dem *SLC35A1*(A133G)-Konstrukt transfiziert worden waren.

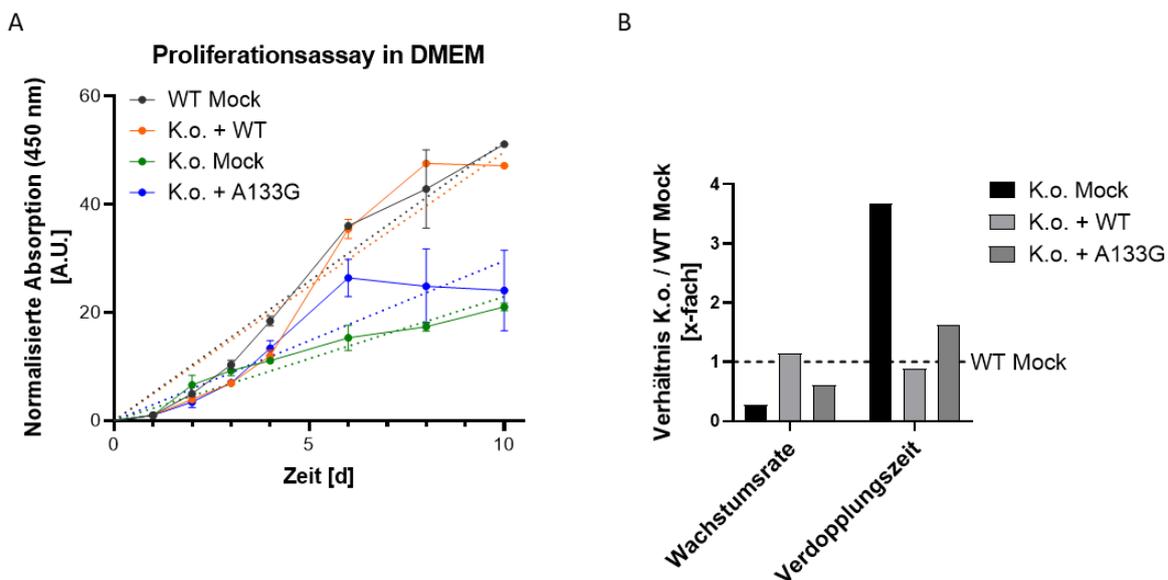


Abbildung 40: Die verringerte Proliferation der *SLC35A1* K.o. Zellen wird durch Expression des wildtypischen *SLC35A1*-Gens, nicht aber des mutierten, wieder vollständig auf Kontrollniveau angehoben. **A)** HEK293 WT (WT) und *SLC35A1* Knock-out (K.o.) Zellen wurden mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock) sowie K.o.-Zellen mit dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (K.o. + WT) oder dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA Plasmid (K.o. + A133G) transfiziert und ein Proliferationsassay unter normalen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Pro Tag und Zelllinie wurden je drei Wells gemessen und die Absorption gemittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Absorption, der auf den entsprechenden Startwert normalisiert wurde, über die Zeit der Messung. Die Fehlerbalken entsprechen der normalisierten Standardabweichung pro gemessenem Zeitpunkt. Die gepunkteten Linien stellen jeweils die linearen Trendlinien der Wachstumskurven dar. **B)** Die Steigung der normalisierten Absorption über die Zeit wurde dazu verwendet die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit der Zelllinien zu berechnen. Das Diagramm stellt das Verhältnis von Wachstumsrate und Verdopplungszeit in den transfizierten K.o.-Zellen zu dem jeweiligen Wert der WT Mock-Zellen dar. Die Wachstumsrate und Verdopplungszeit in den WT Mock-Zellen entspricht dabei einem Wert von 1.

## 6.11 Generelle Fehlregulation von glykosylierungsrelevanten Genen

Um zu untersuchen, welche Schritte der verschiedenen Glykosylierungsprozesse in den Patientenzellen beeinträchtigt sein könnten, wurde eine nCounter Analyse von 190 Genen durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag auf Genen, deren Produkte entweder direkt an den unterschiedlichen Glykosylierungswegen, wie N- und O-Glykosylierung, O-GlcNAcylierung und O- und C-Mannosylierung beteiligt sind oder eng mit diesen Prozessen verknüpft sind, wie beispielsweise Proteine des Mevalonat-Signalwegs, der GPI-Anker Synthese oder der Cholesterol- und Ubiquinon-Synthesewege. Die Werte, die für die Generierung von Abbildung 41 verwendet wurden, befinden sich im Anhang (Anhang Tabelle 2). Da in den Patientenzellen sehr viele Gene im Vergleich zu den Kontrollen hoch- oder runterreguliert waren, wird im Folgenden nur auf diejenigen eingegangen, die als signifikant dereguliert identifiziert wurden (siehe Abbildung 41).

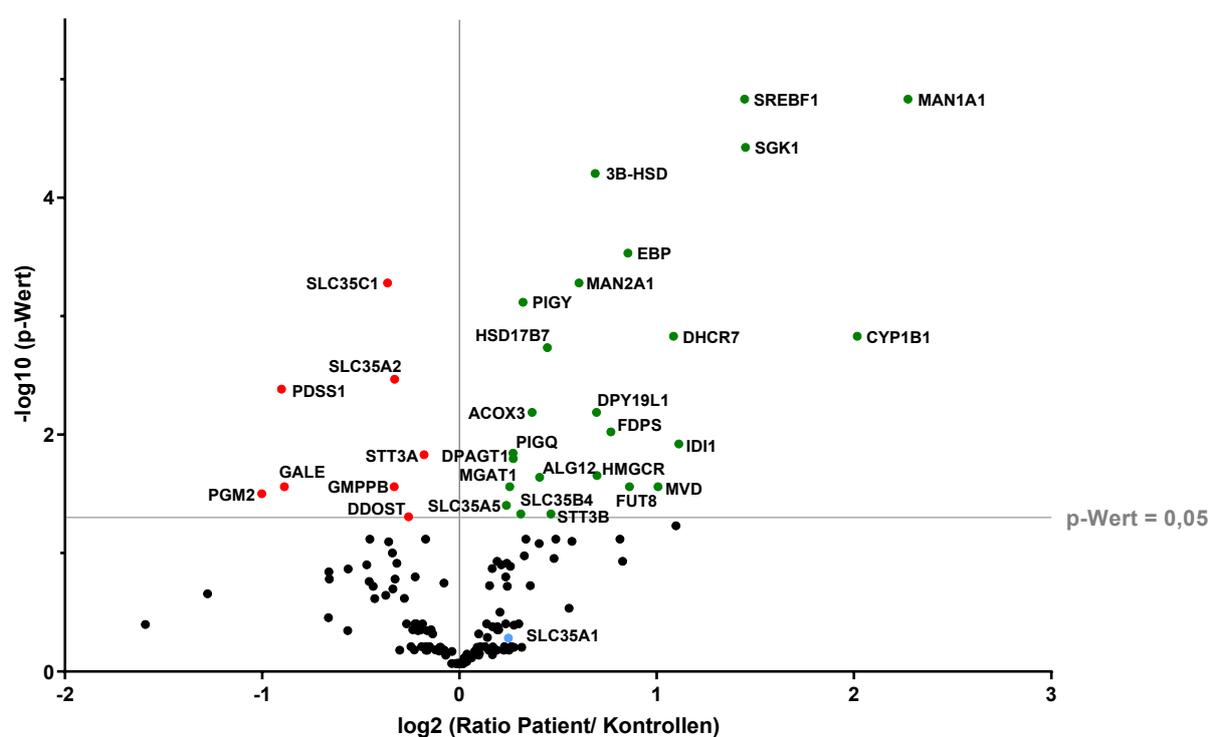


Abbildung 41: In den Patientenzellen ist die Expression einiger glykosylierungsrelevanter Gene dereguliert. Mittels nCounter Analyse wurde die Expression verschiedener Gene anhand der Transkriptmenge bestimmt. Der  $-\log_{10}(\text{p-Wert})$  ist über das Verhältnis der Transkriptmenge in Patienten- zu Kontrollproben in  $\log_2$  Skalierung aufgetragen. Die Linie bei  $x=0$  entspricht der Expression in den Kontrollproben. Die Linie bei  $y=1.301029$  stellt den Signifikanz-Grenzwert  $p=0,05$  dar. Die schwarzen Punkte entsprechen Genen, deren Expression in den Patientenzellen unauffällig war; die roten Punkte markieren Gene, deren Transkripte in den Patientenzellen signifikant reduziert vorlagen; die grünen Punkte stehen für die Werte der Gene, deren Transkriptmenge signifikant erhöht war. In hellblau ist der Wert des *SLC35A1*-Transkripts dargestellt.

Zuerst wurde die Expression des *SLC35A1*-Gens überprüft, das sich im unauffälligen Bereich befand. Unter den signifikant deregulierten Genen befanden sich 13, die direkt am N-Glykosylierungsprozess beteiligt sind. Darunter waren solche, die bereits für frühe Schritte des Prozesses wichtig sind, wie die LLO-Synthese (*DPAGT1*, *ALG12*) und den Transfer des Oligosaccharids auf das Protein (*DDOST*, *STT3A*, *STT3B*). Auch die Transkriptmengen von Genen, deren Produkte an späteren Schritten der N-Glykosylierung beteiligt sind, wie dem Transport von nukleotidaktivierten Zuckern (*SLC35A2*, *SLC35C1*, *SLC35A5*, *SLC35B4*) und Modifikationsschritten im Golgi (*MAN1A1*, *MAN2A1*, *MGAT1*), waren in den Patientenzellen verändert. Das mRNA-Level der Fucosyltransferase FUT8, welche den Transfer von Fucose in  $\alpha$ -1,6 Verknüpfung katalysiert, war ebenfalls signifikant erhöht. Außerdem war die Expression mehrerer Gene signifikant reduziert (*GALE*, *GMPPB*, *PGM2*), deren codierte Proteine wichtige Rollen im Hexosamin-Biosyntheseweg innehaben (siehe 3.2) und damit unmittelbar an der Bereitstellung von Zuckersubstraten beteiligt sind. Einige der signifikant deregulierten Gene stehen im Zusammenhang mit einem weiteren Signalwegs, dem Mevalonat-Signalweg. Dieser ist wichtig für verschiedene Glykosylierungsprozesse, da hier Dolichol gebildet wird, das als Anker in der ER-Membran für Vorläufer-N-Glykane aber auch für das Substrat Dol-P-Man benötigt wird. Zudem kann aus einem Zwischenprodukt des Mevalonatweges, Farnesyldiphosphat, Cholesterol gebildet werden, das für die Bildung von Steroidhormonen und Gallensäuren gebraucht wird. In einem späteren Schritt des Signalwegs kann aus Geranylgeranyldiphosphat neben Dolichol auch Ubiquinon, ein Hauptelement der Atmungskette, gebildet werden. Die signifikant deregulierten Gene, die am Mevalonat-Signalweg oder der Produktion von Cholesterol, Dolichol und Ubiquinon beteiligt sind, waren *HMGCR*, *MVD*, *IDI1*, *FDPS*, *HSD17B7*, *DHCR7*, *CYP11B1*, *EBP*, *3B-HSD*, *SREBF1* und *PDSS1*. Zudem wurden zwei Gene als signifikant hochreguliert identifiziert, die an der GPI-Anker Synthese beteiligt sind (*PIGQ*, *PIGY*). Mit diesem können Oberflächenproteine in der Zellmembran verankert werden. Interessanterweise war auch die Expression von *DPY19L1* signifikant erhöht, welches für eine C-Mannosyltransferase codiert. Zuletzt waren noch die Gene *ACOX3*, das am peroxisomalen Abbau von langkettigen Fettsäuren beteiligt ist, und *SGK1* dereguliert, welches für eine Serin/Threonin Kinase codiert, die eine Vielzahl von Enzymen und Transkriptionsfaktoren reguliert.

### 6.11.1 Die Proteinexpression der deregulierten Gene ist teilweise verändert

Die Expression von einigen Genen, deren Transkriptmengen bei der nCounter Analyse (siehe 6.11) in den Patientenzellen signifikant dereguliert waren, wurde auch auf Proteinebene mittels Western Blots überprüft.

Die Proteinmenge von DPAGT1 und ALG12, die an der LLO-Synthese von N-Glykanen beteiligt sind, wurde im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten ermittelt. Das Proteinlevel von DPAGT1 war im Vergleich zu den Kontrollproben ( $1,0 \pm 0,09$ ) in den Patientenzellen signifikant auf  $2,49 \pm 0,18$  erhöht ( $p < 0,001$ ). Dagegen war die ALG12-Expression in den Patientenzellen auf Proteinebene nur leicht und nicht signifikant auf  $1,27 \pm 0,14$  erhöht (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,23$ ,  $p > 0,05$ ). Allerdings unterschied sich hier die Proteinbande im Western Blot in den Proben der Patientin von denen der Kontrollen: Die Kontrollproben zeigten eine Doppelbande, wohingegen im Lysat der Patientenzellen nur eine einzelne Bande zu erkennen war. Für die Bestimmung der Proteinmenge wurden die beiden Banden der Kontrollproben jeweils zusammen quantifiziert (Abbildung 42).

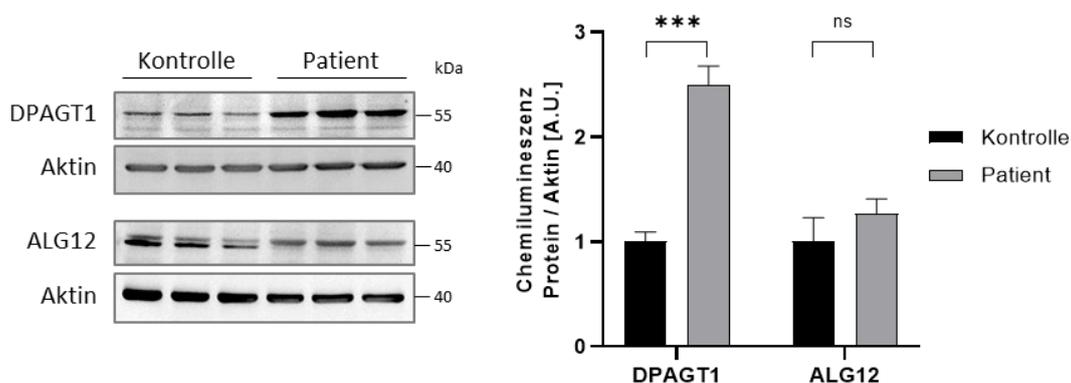


Abbildung 42: Die Expression von Proteinen, die an der LLO-Synthese beteiligt sind, ist in den Patientenzellen auffällig verändert. Mittels Western Blot wurden die Proteine DPAGT1 und ALG12 sowie Aktin als Ladekontrolle detektiert. Aufgetragen wurden jeweils drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine wurde auf die Aktinmenge und auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrolllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollzellen dem Wert 1 entsprach. Für die Bestimmung der ALG12 Proteinmenge wurden die beiden Banden, die bei den Kontrollproben zu erkennen waren, zusammen quantifiziert.

Bei der nCounter Messung war die Transkriptmenge von mehreren Genen dereguliert, die für Transporterproteine codieren, beispielsweise des GDP-Fucose Transporters SLC35C1 und des UDP-Galactose Transporters SLC35A2. Daher wurde die Proteinmenge von SLC35C1, SLC35A2 und zusätzlich auch SLC35A3, die zu den nukleotidaktivierten Zuckertransportern des Golgi-Apparates zählen, in den Zellen der Patientin überprüft. Das Proteinlevel von SLC35C1 war im Vergleich zu der Menge in Kontrollzelllysaten ( $1,0 \pm 0,04$ ) in den Fibroblasten der Patientin signifikant auf das  $0,88 \pm 0,02$ -fache reduziert ( $p = 0,034$ ). Die Menge des SLC35A2 und des SLC35A3 Proteins, welches UDP-GlcNAc in den Golgi-Apparat transportiert, war im Lysat der Patientenzellen ebenfalls reduziert, allerdings nicht signifikant. Das Proteinlevel von SLC35A2 bzw. SLC35A3 betrug in den Kontrollproben  $1,0 \pm 0,23$  bzw.  $1,0 \pm 0,30$  und in den Patientenzellen  $0,76 \pm 0,14$  bzw.  $0,60 \pm 0,03$  ( $p > 0,05$ ).

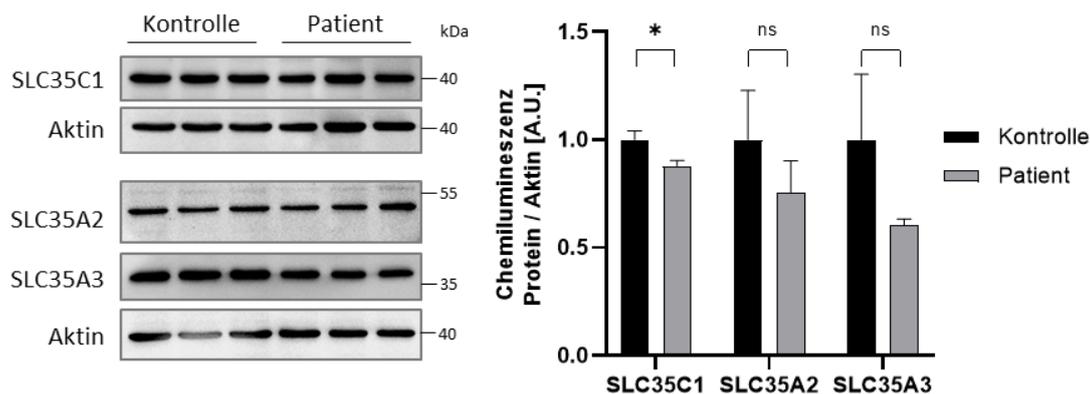


Abbildung 43: Die Proteinmengen verschiedener Transporterproteine sind in den Zellen der Patientin reduziert. Die Golgi-Transporter SLC35C1, SLC35A2 und SLC35A3 sowie Aktin als Ladekontrolle, wurden mittels Western Blot detektiert und quantifiziert. Aufgetragen wurden jeweils drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine wurde auf die Aktinmenge und auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrolllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollzellen dem Wert 1 entsprach. SLC35A2 und SLC35A3 wurden auf einem Blot detektiert, weshalb deren Quantifizierungen auf dieselben Aktin-Werte normalisiert wurden.

Die Menge der Proteine MAN1A1 und MAN2A1, deren Genexpression bei der nCounter Messung als signifikant erhöht ermittelt worden waren, wurden im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten ebenfalls durch Detektion im Western Blot überprüft. Das Proteinlevel von MAN1A1 betrug in den Kontrollproben  $1,0 \pm 0,28$  und im Lysat der Patientenzellen  $0,42 \pm 0,15$ , was einer signifikanten Reduktion entsprach ( $p=0,039$ ). Die Menge an MAN2A1 war dagegen in den Patientenproben ( $1,34 \pm 0,06$ ) im Vergleich zu den Kontrollen ( $1,0 \pm 0,14$ ) signifikant erhöht ( $p=0,039$ ) (Abbildung 44).

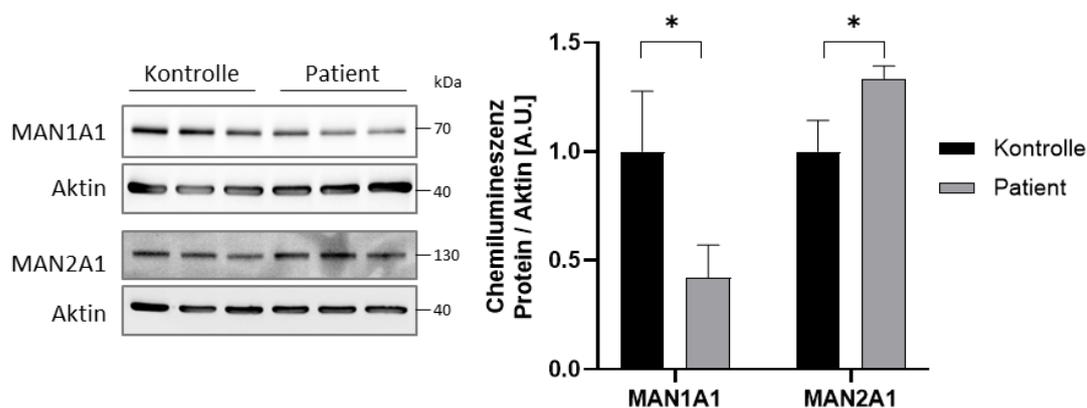


Abbildung 44: Die Expression der Golgi-Proteine MAN1A1 und MAN2A1 ist im Lysat der Patientenfibroblasten signifikant dereguliert. Aufgetragen wurden jeweils drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine wurde auf die Aktinmenge, die als Ladekontrolle diente und den jeweiligen Mittelwert der Kontrollzelllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollzellen dem Wert 1 entsprach.

Anhand der nCounter Messung wurde festgestellt, dass die Transkriptmenge des *FUT8*-Gens in den Fibroblasten der Patientin signifikant erhöht vorlag. Um festzustellen, ob auch die Proteinmenge der Fucosyltransferase oder die allgemeine Fucosylierung in den Patientenzellen verändert war, wurde das FUT8-Proteinlevel mittels Western Blot bestimmt und zusätzlich das Signal der fucosebindenden Lektine *Aleuria Aurantia Lectin* (AAL) und *Lens Culinaris* (LCH) quantifiziert. AAL bindet an  $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4 und  $\alpha$ -1,6 Fucose, wohingegen LCH  $\alpha$ -1,6 gebundene Fucose erkennt. Das Proteinlevel von FUT8 war in den Lysaten der Patientenzellen signifikant auf etwa die Hälfte der Proteinmenge in den Kontrollzellen reduziert (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,08$ , Patient:  $0,52 \pm 0,03$ ,  $p=0,002$ ). Die Fucosylierung in den Patientenzellen war eher unauffällig mit einer leichten, aber nicht signifikanten Verringerung des AAL-Signals (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,25$ , Patient:  $0,62 \pm 0,17$ ,  $p>0,05$ ) und einem LCH-Signal, das dem der Kontrollzelllysate entsprach (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,23$ , Patient:  $0,97 \pm 0,12$ ,  $p>0,05$ ) (Abbildung 45).

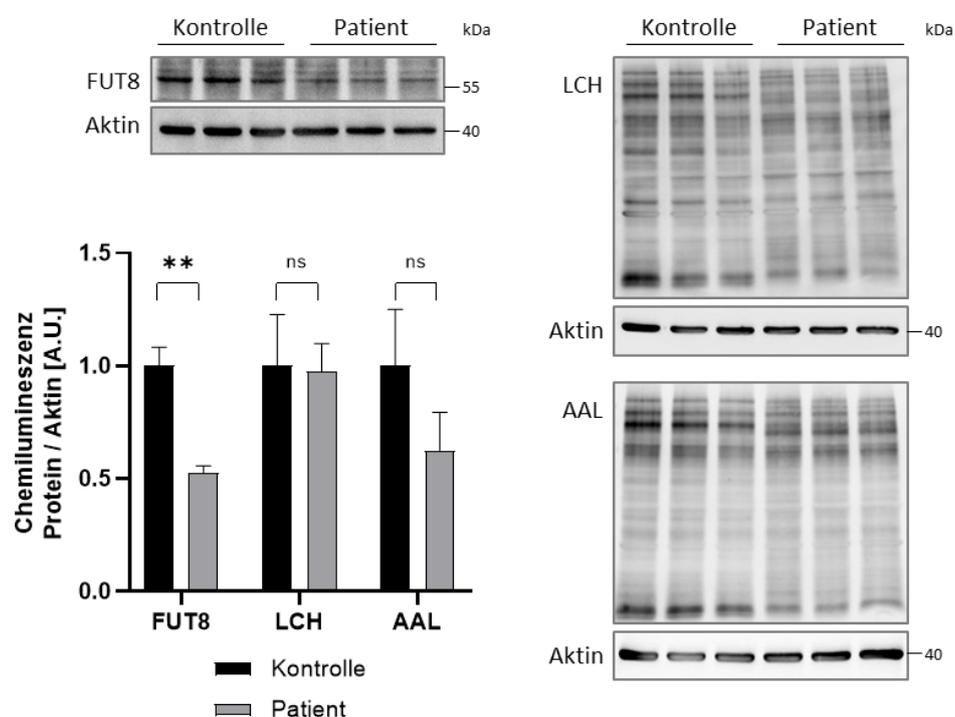


Abbildung 45: Im Lysat der Patientenzellen ist das FUT8-Level, nicht aber das Signal fucosebindender Lektine, signifikant reduziert. Mittels Western Blot wurde das FUT8-Protein, die Signale der Lektine LCH und AAL sowie Aktin als Ladekontrolle detektiert. Aufgetragen wurden jeweils drei Lysate von Kontrollfibroblasten und drei Lysate von Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine bzw. Signalstärke der Lektine wurde auf die Aktinmenge und den jeweiligen Mittelwert der Kontrollzelllysate normalisiert, sodass die Expression bzw. das Signal in den Kontrollzellen dem Wert 1 entsprach.

Die Expression verschiedener Gene (*GALE*, *GMPPB*, *PGM2*), deren Genprodukte Teil des Hexosamin-Biosynthesewegs sind, waren in den Patientenzellen dereguliert. Um weiter zu prüfen, ob dieser Signalweg bei der Patientin betroffen sein könnte, wurden die Proteine *GALE*, *GMPPA*, das einen Komplex mit *GMPPB* bildet [131], *PGM2*, sowie *GNE*, welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der CMP-Sialinsäure Synthese ist [132], mittels Western Blot detektiert und deren Menge quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression jedes dieser Proteine in den Patientenzellen signifikant reduziert war. Das normalisierte Proteinlevel von *GALE* betrug in den Kontrollproben  $1,0 \pm 0,04$  und in den Patientenzellen  $0,51 \pm 0,17$  ( $p=0,016$ ). *GNE* war in den Patientenproben auf  $0,88 \pm 0,03$  (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,05$ ,  $p=0,023$ ) und *GMPPA* auf  $0,57 \pm 0,03$  (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,13$ ,  $p=0,014$ ) verringert. Die Expression von *PGM2* war mit einem Proteinlevel von  $0,30 \pm 0,02$  in den Proben der Patientin im Vergleich zu den Kontrollzelllysaten ( $1,0 \pm 0,02$ ,  $p<0,0001$ ) deutlich signifikant reduziert (Abbildung 46).

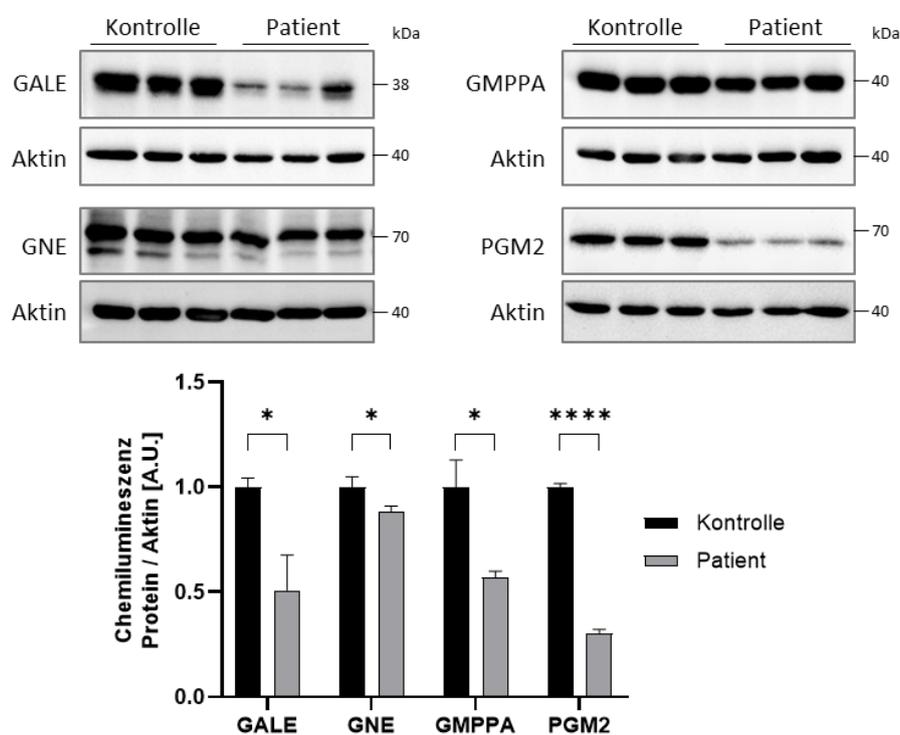


Abbildung 46: Die Proteinlevel von am Hexosamin-Biosyntheseweg beteiligten Proteinen sind in den Patientenzellen stark reduziert. Mittels Western Blots wurden die Proteine *GALE*, *GNE*, *GMPPA* und *PGM2* sowie jeweils Aktin als Ladekontrolle detektiert. Aufgetragen wurden je drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine wurde auf das Aktinlevel und den jeweiligen Mittelwert der Kontrollzelllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollen dem Wert 1 entsprach.

Außerdem waren bei der nCounter Messung auch eine Vielzahl an Transkripten dereguliert, deren zugehörige Proteine wichtige Rollen beim Mevalonat-Signalweg und damit bei der Produktion von Cholesterol, Dolichol und Ubiquinon spielen. Eine Beeinträchtigung dieses Signalwegs wurde durch Detektion und Quantifizierung der Proteine CYP1B1, SRD5A3 und DHDDS weiter untersucht. Das normalisierte Proteinlevel von CYP1B1 betrug in den Lysaten der Kontrollzellen  $1,0 \pm 0,20$  und war damit in den Patientenzellen mit  $1,98 \pm 0,65$  signifikant erhöht ( $p=0,006$ ). Das Proteinlevel von DHDDS war in den Patientenzellen stattdessen signifikant reduziert (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,05$ , Patient:  $0,29 \pm 0,06$ ,  $p<0,001$ ). Bei der Detektion von SRD5A3 fiel auf, dass in den Patientenzellen vermehrt eine andere Isoform als in den Kontrollproben vorzuliegen scheint, da eine zweite Bande bei ca. 38 kDa detektiert werden konnte. Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis der oberen (40 kDa) zur unteren (ca. 38 kDa) Proteinbande, deren Wert in den Patientenproben etwa 8-mal höher war als in den Kontrollen, berechnet. Dies führte für die Patientenproben zu einem berechneten Verhältnis von  $0,13 \pm 0,02$ , das im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen ein Banden-Verhältnis von  $1,0 \pm 0,24$  vorlag, signifikant verringert war ( $p=0,006$ ) (Abbildung 47).

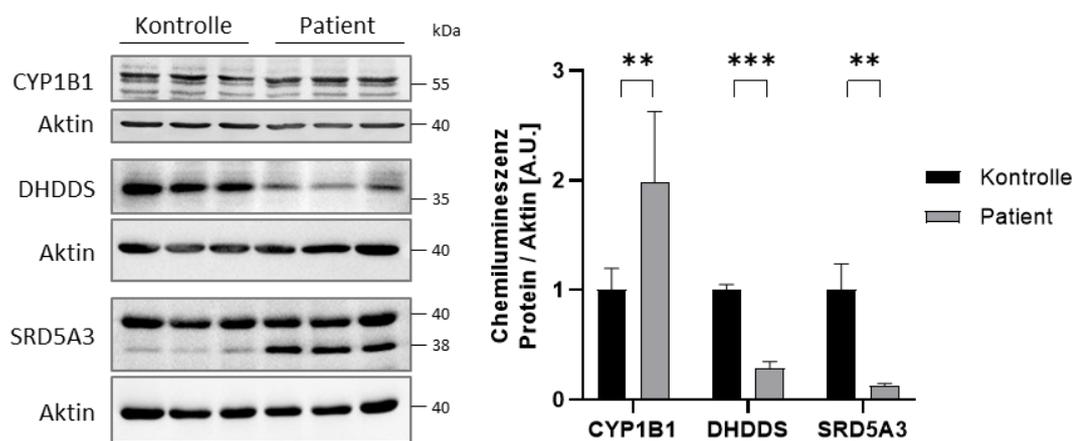


Abbildung 47: Verschiedene Proteine, die am Mevalonat-Signalweg beteiligt sind, zeigen im Zelllysat der Patientin eine signifikant deregulierte Expression. Detektiert wurden die Proteine CYP1B1, DHDDS und SRD5A3 sowie Aktin als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden je drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin. Die Menge der Proteine wurde auf das Aktinlevel und den jeweiligen Mittelwert der Kontrollzelllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollen dem Wert 1 entsprach. Für die Quantifizierung von SRD5A3 wurde in den Kontroll- und Patientenproben das Verhältnis der oberen zur unteren Proteinbande berechnet.

Interessanterweise wurde durch die nCounter Messung eine erhöhte Expression des *DPY19L1*-Gens in den Zellen der Patientin festgestellt, welches für eine C-Mannosyltransferase codiert. Um weiter zu untersuchen, ob die C-Mannosylierung in den Patientenfibroblasten dereguliert sein könnte, wurden die Proteine DPY19L1 und DPY19L3, von dem angenommen wird, dass es ebenfalls als C-Mannosyltransferase fungiert, im Western Blot detektiert und die Menge der Proteine quantifiziert. Das Proteinlevel der beiden C-Mannosyltransferasen war in den Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollen zwar erhöht, allerdings nicht signifikant. Die Menge an DPY19L1 betrug in den Kontrollen  $1,0 \pm 0,38$  und im Lysat der Patientenfibroblasten  $1,14 \pm 0,25$  ( $p > 0,05$ ). Der Wert für das DPY19L3-Proteinlevel entsprach in den Kontrollproben  $1,0 \pm 0,06$  und in den Proben der Patientenzelllysate  $2,19 \pm 0,76$  ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 48, oberer Bereich). Zudem wurde die Proteinmenge der C-mannosylierten Proteine ADAMTS13 und Properdin, deren Sekretion von einer vollständigen Glykosylierung beeinflusst wird, im Serum der Patientin und Kontrollen detektiert. Das ADAMTS13-Proteinlevel war im Serum der Patientin signifikant auf  $0,55 \pm 0,15$  im Vergleich zur Menge im Kontroll-Pool ( $1,0 \pm 0,14$ ,  $p = 0,018$ ) reduziert. Auch die Menge an Properdin war im Serum der Patientin signifikant reduziert. Die Expression betrug in den Kontrollproben  $1,0 \pm 0,14$  und im Patientenserum  $0,33 \pm 0,01$  ( $p = 0,002$ ) (Abbildung 48, unterer Bereich).

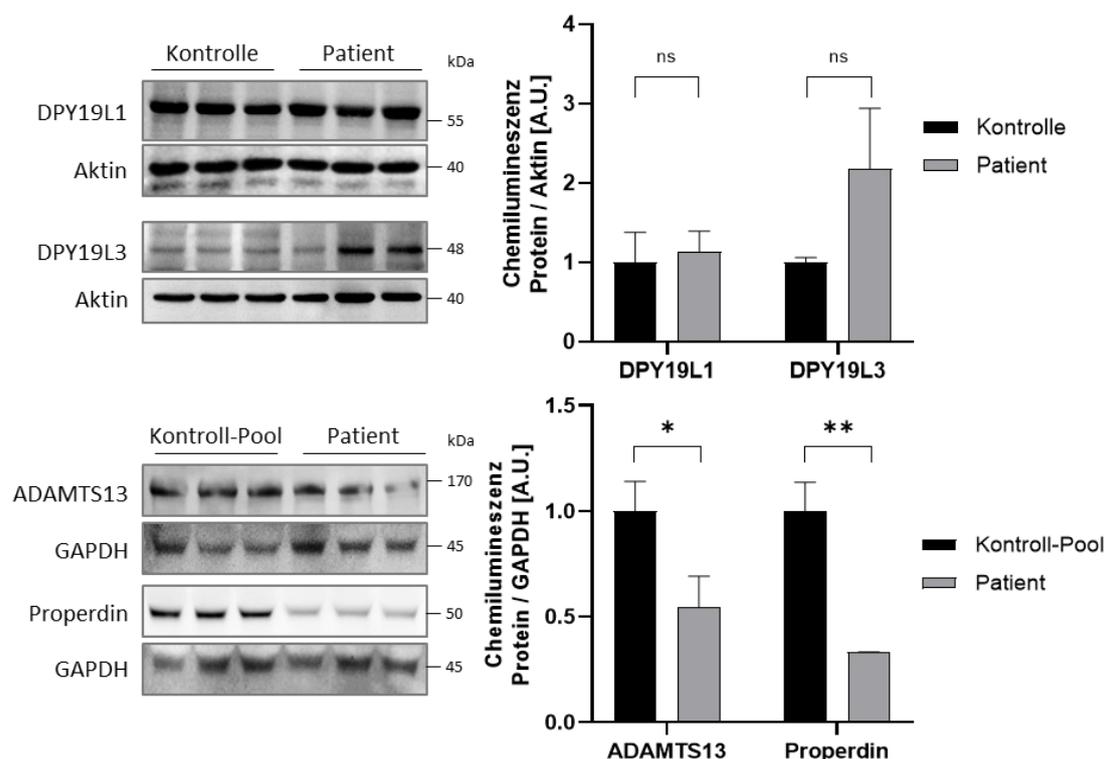


Abbildung 48: Bei der Patientin ist die Expression der C-Mannosyltransferasen im Zelllysate nicht signifikant verändert und die Menge C-mannosylierter Proteine im Serum auffällig reduziert. Quantifizierung des Proteinlevels der C-Mannosyltransferasen DPY19L1 und DPY19L3 in Fibroblastenlysate sowie der C-mannosylierten Proteine ADAMTS13 und Properdin im Serum. Als Ladekontrolle für die Zelllysate wurde Aktin detektiert, für die Serumproben diente GAPDH als Ladekontrolle. Aufgetragen wurden je drei Lysate von Kontrollfibroblasten sowie drei Lysate aus Zellen der Patientin oder je drei Lanes eines Kontroll-Pools, bestehend aus 127 Kontrollseren sowie drei Lanes des Patientenserums. Die Menge der Proteine wurde auf das Aktin- bzw. GAPDH-Level und den jeweiligen Mittelwert der Kontrollproben normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollen dem Wert 1 entsprach.

Zuletzt wurde durch die nCounter Messung noch festgestellt, dass die mit zellulärem Stress assoziierten Gene *ACOX3* und *SGK1* in den Patientenzellen signifikant dereguliert waren. Auf Proteinebene entsprach die Expression von *SGK1* in den Patientenzellen mit  $0,44 \pm 0,22$  dem Expressionsbereich der Kontrollzellen ( $1,0 \pm 0,36$ ,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 49). Die Quantifizierung der Proteinlevel von *ACOX3* und *HiF1alpha*, die Hinweise auf zellulären Stress geben können, aber auch als Markerproteine für die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren verwendet werden, wird in einem anderen Abschnitt dieser Arbeit betrachtet (siehe 6.12.3).

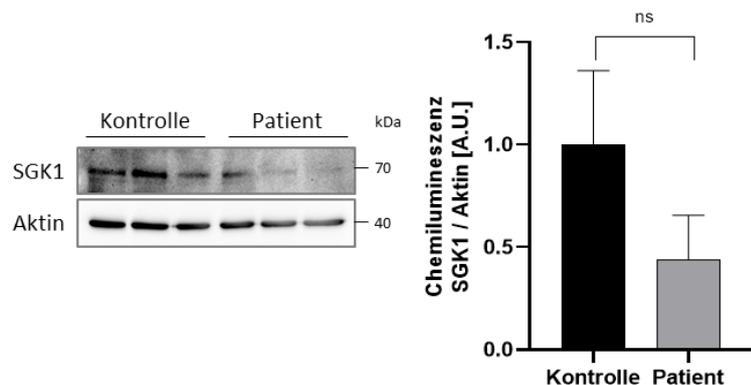


Abbildung 49: Das SGK1 Proteinlevel ist im Patientenfibroblastenlysat leicht reduziert. Aufgetragen wurden drei Lyse von Kontrollfibroblasten sowie drei Lyse aus Zellen der Patientin. Die SGK1 Proteinmenge wurde auf das Aktinlevel und den Mittelwert der Kontrollzelllysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollproben dem Wert 1 entsprach.

### 6.11.2 Die Expression signifikant deregulierter Proteine in den Patientenzellen ist teilweise auch in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen verändert

In Abschnitt 0 wurde die Expression von einigen Proteinen im Lyse der Patientenzellen als signifikant dereguliert identifiziert. Diese Proteine wurden zusätzlich im Lyse von HEK293 WT- und *SLC35A1* K.o.-Zellen mittels Western Blots detektiert, um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Proteine und einem defekten *SLC35A1*-Transporter geben könnte.

Die *DPAGT1*-Expression war im Lyse der HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen ( $6,25 \pm 1,27$ ) im Vergleich zur WT-Kontrolle ( $1,0 \pm 0,36$ ) signifikant erhöht ( $p = 0,002$ ) (Abbildung 50). Das Expressionsmuster dieses an der LLO-Synthese beteiligten Proteins entsprach damit der bereits überprüften, erhöhten Proteinmenge in den Patientenfibroblasten.

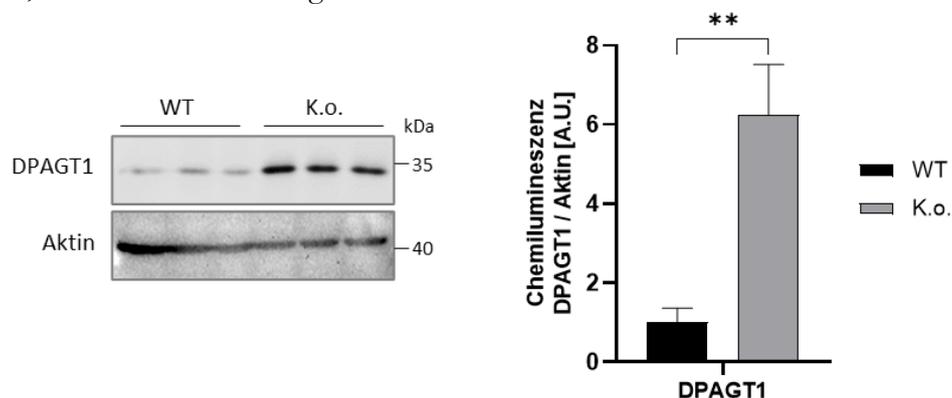


Abbildung 50: Die Proteinmenge von *DPAGT1* ist im Lyse von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen stark erhöht. Mittels Western Blot wurde *DPAGT1* und Aktin als Ladekontrolle detektiert. Aufgetragen wurden je drei Lyse von wildtypischen HEK293-Zellen (WT) und K.o.-Zellen. Die Proteinmenge wurde auf das Aktinlevel und den Mittelwert der WT Lyse normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollproben dem Wert 1 entsprach.

Im Gegensatz dazu war das Proteinlevel des GDP-Fucose Transporters SLC35C1, das im Lysat der Patientenfibroblasten signifikant reduziert war, in den K.o.-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen nicht signifikant verändert (WT:  $1,0 \pm 0,37$ , K.o.:  $1,19 \pm 0,20$ ;  $p > 0,05$ ) (Abbildung 51).

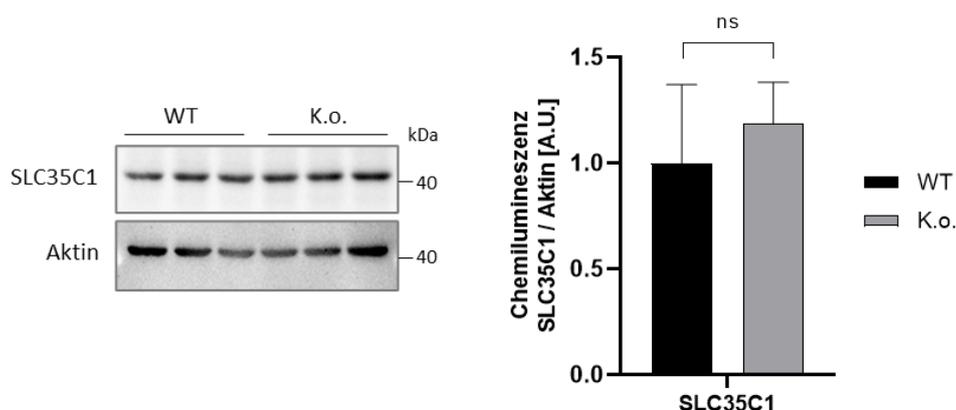


Abbildung 51: Das SLC35C1-Proteinlevel im Lysat von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen ist vergleichbar mit wildtypischen Zellen (WT). Aufgetragen wurden je drei Lysate von WT und K.o.-Zellen. Die SLC35C1-Proteinmenge wurde auf das Aktinlevel als Ladekontrolle und den Mittelwert der WT Lysate normalisiert, sodass die Expression in den Kontrollproben dem Wert 1 entsprach.

Als nächstes wurde die Proteinexpression der *MAN1A1*- und *MAN2A1*-Gene im Lysat der HEK293 WT- und K.o.-Zellen überprüft, die im Lysat der Patientenzellen signifikant reduziert bzw. erhöht waren (siehe 0). Im Lysat der K.o.-Zellen war die Menge der beiden Proteine nur leicht und nicht signifikant erhöht. Die *MAN1A1*-Menge betrug in den WT-Proben  $1,0 \pm 0,22$  und im Lysat der K.o.-Zellen  $1,17 \pm 0,17$  ( $p > 0,05$ ) und das *MAN2A1*-Level wurde mit  $1,0 \pm 0,08$  in den WT-Zellen und  $1,42 \pm 0,35$  ( $p > 0,05$ ) in den K.o.-Zellen quantifiziert (Abbildung 52).

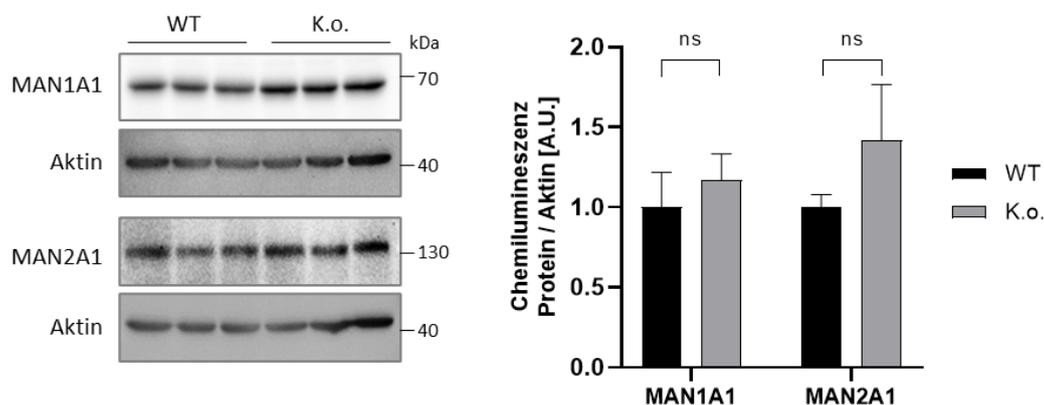


Abbildung 52: Die Proteinmenge von *MAN1A1* und *MAN2A1* ist im Lysat von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen minimal erhöht. Aufgetragen wurden je drei Lysate aus HEK293 WT- und K.o.-Zellen. Die detektierten Proteine wurden auf die jeweilige Aktinmenge, die als Ladekontrolle diente, und den Mittelwert der WT-Proben normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach.

Die Menge der Fucosyltransferase FUT8, die im Lysat der Patientenfibroblasten auffällig gewesen war, wurde mittels Western Blot auch im Lysat der HEK293-Zellen ermittelt. Die *FUT8*-Expression war in den *SLC35A1* K.o.-Zellen signifikant erhöht, anders als in den Fibroblasten-Proben der Patientin, in denen das FUT8-Proteinlevel signifikant reduziert war. In den HEK293 WT-Zellen betrug die normalisierte FUT8-Menge  $1,0 \pm 0,27$  und in den K.o.-Zellen  $1,62 \pm 0,66$  ( $p=0,025$ ) (Abbildung 53).

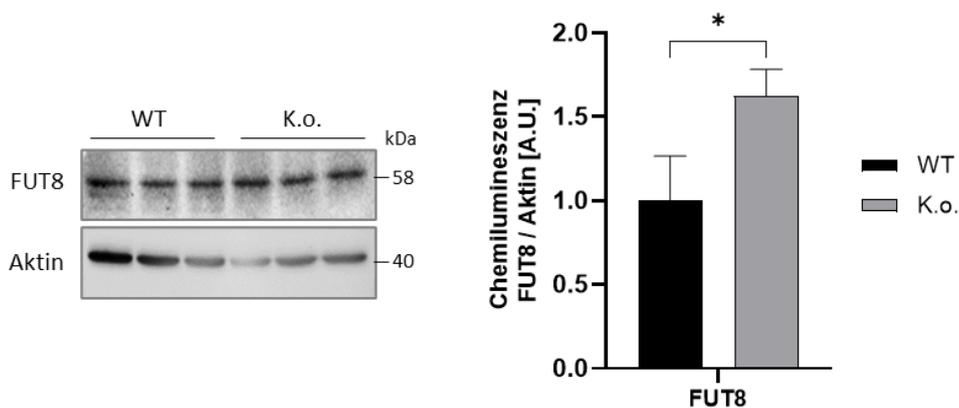


Abbildung 53: Die Menge der Fucosyltransferase FUT8 ist im Lysat von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen signifikant erhöht. Für den Western Blot wurden jeweils drei Lysate der beiden Zelllinien HEK293 WT und *SLC35A1* K.o. aufgetragen und Aktin als Ladekontrolle detektiert. Die FUT8 Proteinmenge wurde auf die Ladekontrolle und den Mittelwert der Kontrollproben normalisiert, sodass die Expression in den WT-Proben dem Wert 1 entsprach.

Weiterhin wurde die Expression der Gene *GALE*, *GNE*, *GMPPA* und *PGM2* im Lysat der HEK293 WT- und K.o.-Zellen auf Proteinebene untersucht, da die Menge dieser Proteine, die für die Synthese von Zuckersubstraten benötigt werden, in Abschnitt 0 im Lysat der Patientenfibroblasten signifikant verringert war. Im Lysat der *SLC35A1* K.o.-Zellen war die normalisierte Proteinmenge von *GALE* und *GMPPA* mit  $1,16 \pm 0,66$  und  $0,95 \pm 0,18$  vergleichbar mit den Kontrollproben ( $1,0 \pm 0,16$  bzw.  $1,0 \pm 0,48$ ;  $p > 0,05$ ), wohingegen *GNE* ( $0,36 \pm 0,02$ ) und *PGM2* ( $0,63 \pm 0,03$ ) im Vergleich zu den WT-Proben mit  $1,0 \pm 0,03$  ( $p < 0,0001$ ) bzw.  $1,0 \pm 0,22$  ( $p = 0,048$ ) signifikant reduziert waren. Auffällig war dabei, dass die 70 kDa Bande des *GNE* Western Blots in den K.o.-Zelllysaten kaum zu detektieren war. Für die Quantifizierung wurde jeweils auch die untere der beiden sichtbaren Banden verwendet (Abbildung 54).

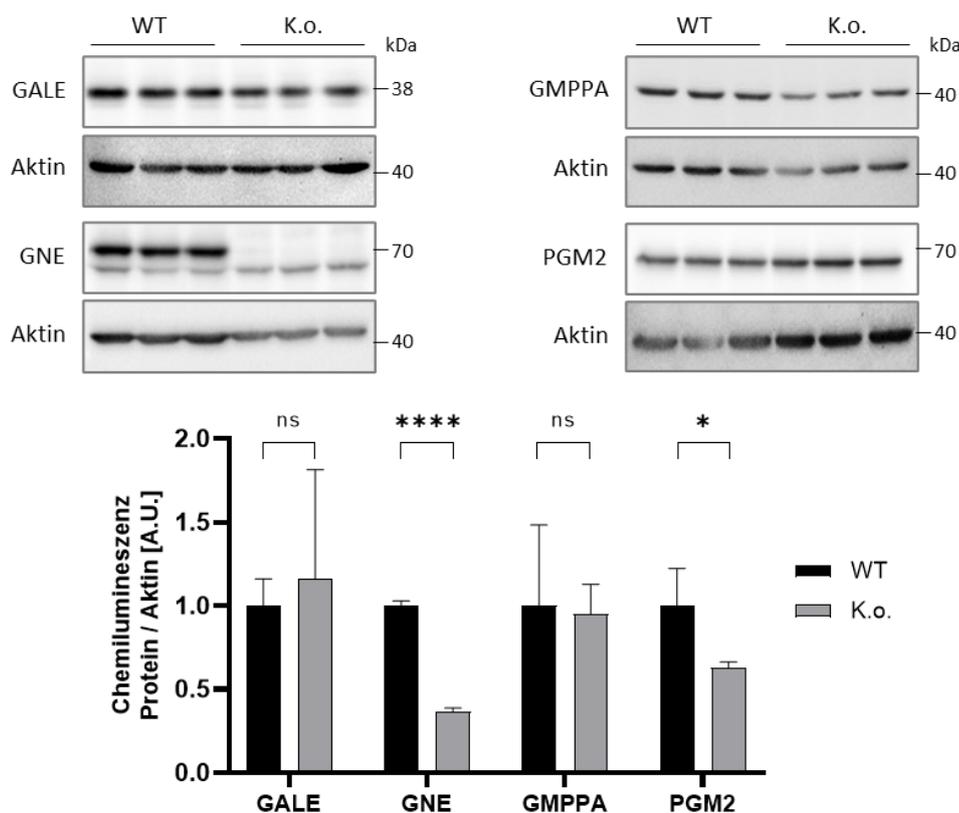


Abbildung 54: Die Expression verschiedener Proteine, die am Hexosamin-Biosyntheseweg beteiligt sind, ist im Lysat von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen zum Teil signifikant reduziert. Für die Western Blots wurden je drei HEK293 WT und K.o.-Zelllysate aufgetragen und die Proteine *GALE*, *GNE*, *GMPPA* und *PGM2* sowie Aktin als Ladekontrolle detektiert. Für die Quantifizierung wurden die Proteinwerte auf das Aktinlevel und anschließend auf den Mittelwert der Kontrollproben normalisiert, die dadurch dem Wert 1 entsprachen. Für die Quantifizierung von *GNE* wurden beide der detektierten Banden verwendet.

Schließlich wurde auch das Proteinlevel der am Mevalonat-Signalweg und damit der Dolichol-Synthese beteiligten Proteine CYP1B1, DHDDS und SRD5A3 in den HEK293 WT und *SLC35A1* K.o.-Zellen untersucht. Die Menge an CYP1B1 war in den K.o.-Zellen, wie auch in den Patientenfibroblasten, signifikant erhöht (WT:  $1,0 \pm 0,18$ , K.o.:  $2,69 \pm 0,60$ ;  $p=0,009$ ). Das DHDDS-Proteinlevel war in den HEK293 K.o.-Zellen mit  $3,11 \pm 1,19$  im Vergleich zu den WT-Proben ( $1,0 \pm 0,18$ ) ebenfalls signifikant erhöht ( $p=0,039$ ). Bei der Detektion von SRD5A3 im Lysat von Fibroblasten in Abschnitt 0 fiel auf, dass bei den Proben der Patientin eine zweite Proteinbande bei ca. 38 kDa zu erkennen war. Die gleiche Beobachtung konnte nun auch im Western Blot mit dem Lysat der HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen gemacht werden. Auch hier wurde daher für die Quantifizierung das Verhältnis der oberen 40 kDa zur unteren 38 kDa Bande berechnet, was zu einer signifikant reduzierten Expression von  $0,04 \pm 0,14$  in den K.o.-Zellen im Vergleich zu der normalisierten Menge  $1,0 \pm 0,28$  ( $p=0,006$ ) in den WT-Zellen führte (siehe Abbildung 55).

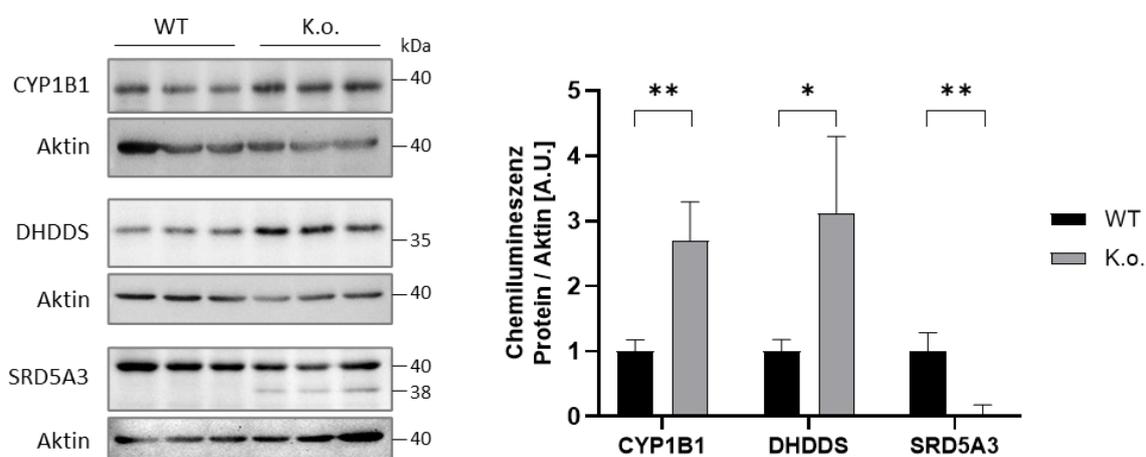


Abbildung 55: Die Proteinlevel von CYP1B1, DHDDS und SRD5A3 sind in Lysaten von HEK293 *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen signifikant dereguliert. Die Proteine wurden in biologischen Triplikaten der beiden Zelllinien HEK293 WT und K.o. detektiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Für die Quantifizierung wurde die Proteinmenge auf die jeweilige Aktinmenge normalisiert und anschließend durch den Mittelwert der Kontrollproben geteilt, sodass diese dem Wert 1 entsprachen. Für die Quantifizierung von SRD5A3 wurden das Bandenverhältnis berechnet, in dem die normalisierten Werte der Proteinbande bei 40 kDa durch die, der Bande bei 38 kDa geteilt wurden.

Die Proteine, deren signifikant deregulierte Expression direkt mit einem defekten *SLC35A1*-Protein zusammenhängen könnte, waren demnach die folgenden: Die Proteinmenge von DPAGT1 und CYP1B1 war sowohl in den Lysaten der Patientenfibroblasten als auch der HEK293 K.o.-Zellen erhöht. Reduziert war dagegen das Proteinlevel von GNE und PGM2. Die Detektion von SRD5A3 zeigte im Lysat der Patientenzellen, aber auch im Lysat der HEK293 K.o.-Zellen eine zweite Bande bei 38 kDa, sodass das Verhältnis der oberen zur unteren Bande in beiden Fällen auffällig reduziert war. In beiden Zelllinien dereguliert, aber im Fibroblastenlysat erhöht und in den HEK293 K.o.-Zellen verringert, war die FUT8- und DHDDS-Proteinmenge. Nicht signifikant, aber leicht erhöht war die Proteinmenge von MAN1A1 und MAN2A1 in den HEK293 K.o.-Zellen. Im Fibroblastenlysat der Patientin war die Menge an MAN2A1 ebenfalls erhöht, MAN1A1 dagegen signifikant reduziert.

## 6.12 Proteomik-Analyse von Fibroblasten zeigt eine Deregulation verschiedener zellulärer Prozesse

Um noch weitere Hinweise auf möglicherweise deregulierte Prozesse in den Patientenzellen zu erhalten, wurde durch das Labor von Dr. Thomas Ruppert am ZMBH Heidelberg eine „Shotgun“-Proteomik-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus Fibroblastenpellets isoliert und die Peptide mit einem LC-MS/MS Ansatz identifiziert. Die Werte der Peptide in den Patientenproben wurden mit denen der Kontrollen verglichen. Dadurch wurde die Menge von 91 Proteinen als signifikant hoch- oder runterreguliert ermittelt. Eine vollständige Liste aller Proteine befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 3). Im Folgenden wird nicht auf jedes der deregulierten Proteine einzeln eingegangen. Stattdessen wurden diese in Gruppen eingeteilt, um festzustellen, welche zellulären Prozesse in den Patientenzellen am ehesten betroffen sein könnten. Für die Einteilung wurden zutreffende KEGG-Signalwege oder GO („Gene Ontology“)-Terme für biologische Prozesse mithilfe der String Database ([string-db.org](http://string-db.org)) ausgewählt. Die Prozesse, die auf die meisten als dereguliert eingestuften Proteine zutrafen, sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Demnach sind die deregulierten Proteine an der Regulation von Transkription und Translation, der oxidativen Stressantwort, des Nucleotidzuckermetabolismus und der Proteinfaltung beteiligt. Besonders auffällig war, dass ein Großteil der als dereguliert eingestuften Proteine mitochondriale Proteine waren. Diese spielen zum einen bei der Atmungskette, dem Citratzyklus und dem Fettsäuremetabolismus eine Rolle, sind zum anderen aber auch am Aufbau der Mitochondrien und dem Transport von Molekülen beteiligt.

Tabelle 23: Mittels „Shotgun“-Proteomik-Analyse identifizierte und in den Patientenzellen signifikant deregulierte Proteine. Angegeben sind die Namen der Proteine, ihre intrazelluläre Lokalisation und der biologische Prozess, an dem sie hauptsächlich beteiligt sind. Die Pfeile neben den Proteinnamen geben an, ob die Menge des Proteins in der Patientenprobe erhöht oder reduziert war.

Protein	Intrazelluläre Lokalisation	Prozess
HSPA2 ↓	Cytosol	Proteinfaltung/ Stressantwort
HSPB1 ↑	Cytosol/ Nukleus	
FKBP4 ↑	Cytosol/ Nukleus	
ERO1L ↓	ER/ Golgi	
GNPDA1 ↓	Cytosol	Nucleotidzucker- metabolismus
UAP1 ↑	Cytosol	
HEXA ↓	Lysosom	
EIF4G2 ↑	Cytosol	Regulation Transkription und Translation
EIF6 ↑	Cytosol/ Nukleus	
EIF3G ↑	Cytosol/ Nukleus	
RPLP1 ↑	Cytosol	
GSPT1 ↑	Cytosol	
LRRFIP1 ↑	Cytosol/ Nukleus	

ABHD10 ↓ FKBP4 ↓ LONP1 ↓ SOD2 ↓	Mitochondrien	oxidative Stressantwort
AIFM1 ↓ PGRMC1 ↓ SFXN3 ↓ SLC25A11 ↓ SLC25A1 ↓ SQRDL ↓ TMEM14C ↓ VAT1 ↓ YWHAH ↑	Mitochondrien	Aufbau Mitochondrien/ Transport
AK2 ↓ AK3 ↓	Mitochondrien	Nukleotidhomöostase
ATP5F1 ↓ ATP5I ↓ COX6C ↓ CYC1 ↓ GSR ↓ NDUFA13 ↓ NDUFA9 ↓ NNT ↓ POR ↓ PPA2 ↓ SDHA ↓ SDHB ↓ UQCRC1 ↓	Mitochondrien	Atmungskette
ACO2 ↓ DLST ↓ IDH2 ↓ NNT ↓ SDHA ↓ SDHB ↓ SUCLG2 ↓	Mitochondrien	Citratzyklus
ACAT1 ↓ ALDH1B1 ↓ DECR1 ↓ ECH1 ↓ ETFA ↓ ETFB ↓ HADHA ↓ PGRMC1 ↓	Mitochondrien	Fettsäuremetabolismus

### 6.12.1 Die O-GlcNAcylierung ist in den Patientenfibroblasten reduziert, aber normal in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen

Durch die „Shotgun“-Proteomik-Analyse der Proteinexpression in Fibroblasten wurde festgestellt, dass auch die Regulation der Transkription und Translation bei der Patientin dereguliert zu sein scheint, was darauf schließen lässt, dass es in den Patientenzellen generelle Probleme mit der Genexpression geben könnte. Da die O-GlcNAcylierung eine Art der Glykosylierung ist, die Einfluss auf die Genexpression nimmt, wurde untersucht, ob diese Glykosylierungsform in den Patientenfibroblasten verändert ist. Kontrolliert wird diese Modifikation zum einen durch die Expression der benötigten Proteine OGT und OGA und zum anderen durch die Verfügbarkeit des Substrates UDP-GlcNAc. Um die O-GlcNAcylierung in den Zellen der Patientin zu überprüfen, wurden daher mittels Western Blot die Proteine OGT und OGA detektiert. Zudem wurde das Histon 2B (H2B) und die O-GlcNAcylierte Form (H2B O-GlcNAc) des Histons detektiert und quantifiziert. H2B ist ein wichtiger Bestandteil der Nukleosomen, die für die Organisation des Chromatins verantwortlich sind. Durch Modifikationen der Histone wird die Zugänglichkeit des Chromatins reguliert. Um die generelle O-GlcNAcylierung in den Zellen zu untersuchen wurde ein Antikörper verwendet, der an O-GlcNAcylierte Peptide bindet und das Signal des Lektins succinyliertes WGA (succ. WGA) detektiert, das spezifisch an GlcNAc- und besonders an  $\beta$ -gebundene GlcNAc-Reste bindet, die bei O-GlcNAcylierten Proteinen vorkommen [39], [133].

Es stellte sich heraus, dass die Expression von *OGT* (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,13$ , Patient:  $0,56 \pm 0,26$ ;  $p > 0,05$ ) und *OGA* (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,14$ , Patient:  $1,22 \pm 0,15$ ;  $p > 0,05$ ) in den Patientenzellen auf Proteinebene nur minimal und nicht signifikant reduziert bzw. erhöht war. Die Menge des Histons H2B war mit  $0,93 \pm 0,05$  im Lysat der Patientenzellen vergleichbar mit der Expression in den Kontrollen ( $1,0 \pm 0,19$ ;  $p > 0,05$ ), wohingegen die O-GlcNAcylierte Form von H2B in den Patientenzellen signifikant reduziert vorlag (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,06$ , Patient:  $0,68 \pm 0,07$ ;  $p = 0,023$ ). Auch die generelle Menge an O-GlcNAcylierten Proteinen war in den Patientenzellen signifikant verringert, was anhand der Quantifizierung der Signale des O-GlcNAc-Antikörpers (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,18$ , Patient:  $0,38 \pm 0,16$ ;  $p = 0,043$ ) und des Lektins succ. WGA (Kontrolle:  $1,0 \pm 0,21$ , Patient:  $0,65 \pm 0,13$ ;  $p = 0,043$ ) festgestellt wurde (Abbildung 56). Demnach deuten die Ergebnisse darauf hin, dass in den Patientenfibroblasten eine reduzierte O-GlcNAcylierung stattfindet.

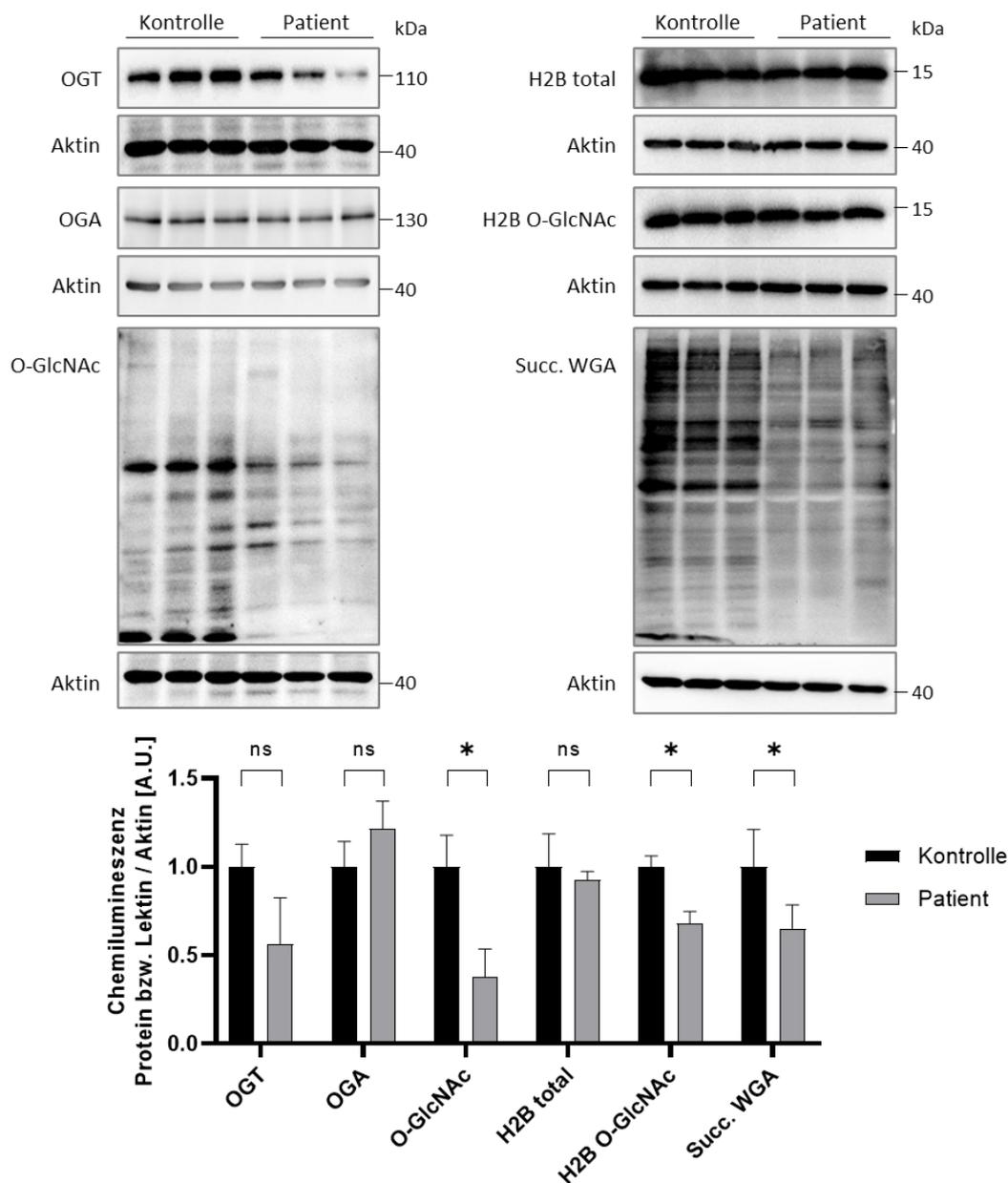


Abbildung 56: In den Patientenzellen ist die O-GlcNAcylierung von Proteinen stark reduziert. Überprüfung der O-GlcNAcylierung im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten durch die Detektion verschiedener Proteine und O-GlcNAcylierter Peptide mittels Western Blots. Aufgetragen wurden jeweils drei verschiedene Lysate aus Kontrollzellen und den Fibroblasten der Patientin. Als Ladekontrolle für die Normalisierung diente die Detektion von Aktin. Zudem wurde auf den Mittelwert der Kontrollproben normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprachen.

Um weiterhin zu untersuchen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen einem defekten SLC35A1-Transporter und einer verringerten O-GlcNAcylierung bestehen könnte, wurden die bereits aufgeführten Proteine und Lektinsignale ebenfalls im Lysat von HEK293 WT- und *SLC35A1* K.o.-Zellen detektiert. Es wurde eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der OGA- (WT:  $1,0 \pm 0,07$ , K.o.:  $0,56 \pm 0,17$ ;  $p > 0,05$ ) und H2B-Menge (WT:  $1,0 \pm 0,22$ , K.o.:  $0,61 \pm 0,01$ ;  $p > 0,05$ ) in den K.o.-Zellen festgestellt, wohingegen die restlichen detektierten Signale der wildtypischen Menge entsprachen. Die quantifizierten Werte für die WT-Proben betragen für OGT  $1,0 \pm 0,63$ , für O-GlcNAc  $1,0 \pm 0,36$ , für H2B O-GlcNAc  $1,0 \pm 0,12$  und für succ. WGA  $1,0 \pm 0,08$  wohingegen die jeweiligen Werte in den K.o.-Zelllysaten mit  $1,03 \pm 0,18$ ,  $1,18 \pm 0,09$ ,  $1,40 \pm 0,60$  und  $1,16 \pm 0,18$  (jeweils  $p > 0,05$ ) ermittelt wurden (Abbildung 57).

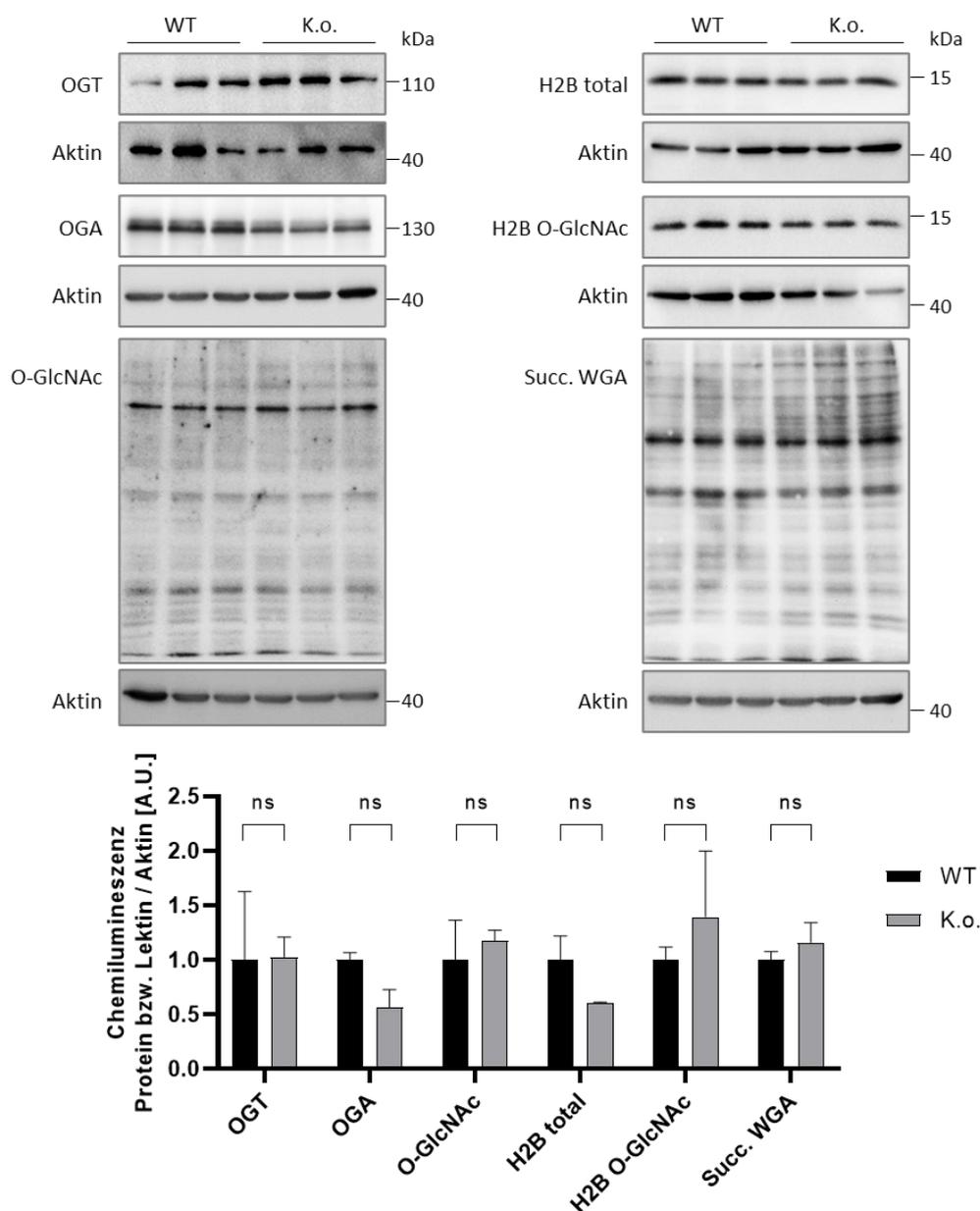


Abbildung 57: Die O-GlcNAcylierung in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen ist unauffällig. Überprüfung der O-GlcNAcylierung im Lysat von HEK293 WT (WT) und *SLC35A1* Knock-out-Zellen (K.o.) durch die Detektion verschiedener Proteine und O-GlcNAcylierter Peptide mittels Western Blot. Aufgetragen wurden jeweils drei verschiedene Lysate aus WT HEK293 und den K.o.-Zellen. Als Ladekontrolle für die Normalisierung diente die Detektion von Aktin. Zudem wurde auf den Mittelwert der Kontrollproben normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprachen.

### 6.12.2 In den Patientenzellen sind mitochondriale Proteine dereguliert

Da einige der deregulierten Proteine in Mitochondrien zu finden sind und die betroffenen Prozesse dazu beitragen ATP zu produzieren, wurde vermutet, dass der Energiemetabolismus der Patientin beeinträchtigt sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst ATP5H, eine Untereinheit der ATP-Synthase [134], die als mitochondriales Markerprotein verwendet wurde, im Fibroblastenlysat detektiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression dieses Proteins im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,06$ ) in den Patientenzellen signifikant auf  $0,40 \pm 0,07$  ( $p < 0,001$ ) reduziert war (Abbildung 58 A). Außerdem wurde das ATP-Level in den Zellen durch UPLC-UV Detektion von Dr. Gernot Poschet der Metabolomics Core Facility in Heidelberg gemessen. Auch dieses war in den Patientenzellen signifikant auf  $0,18 \pm 0,02$  im Vergleich zum Kontroll-Level von  $1,0 \pm 0,27$  ( $p = 0,004$ ) reduziert (Abbildung 58 B).

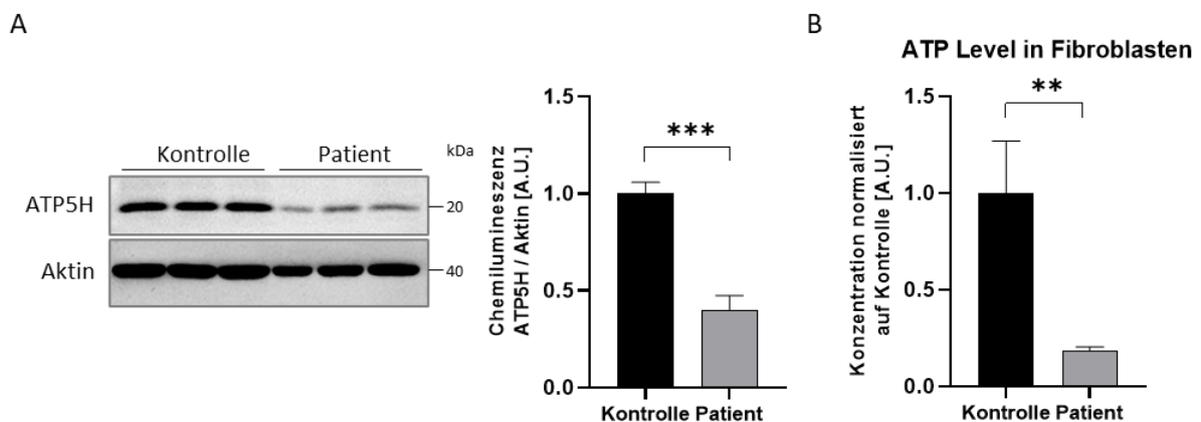


Abbildung 58: In den Patientenfibroblasten ist sowohl die Expression eines Mitochondrienmarkerproteins als auch die ATP-Menge signifikant reduziert. **(A)** Das Proteinlevel des mitochondrialen Markerproteins ATP5H ist in den Patientenzellen auf weniger als die Hälfte reduziert. Mittels Western Blots wurden ATP5H detektiert und auf Aktin als Ladekontrolle sowie die Proteinmenge in den Kontrollzellen normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entspricht. **(B)** Das ATP-Level wurde massenspektrometrisch ermittelt und auf die Zellzahl und die Kontrollprobe normalisiert.

### 6.12.3 Hinweise auf Beeinträchtigung des Lipidstoffwechsels

Um zu überprüfen, ob aufgrund der deregulierten, mitochondrialen Proteine auch ein Effekt auf den Abbau von Fettsäuren in den Patientenzellen festzustellen war, wurde zunächst eine Lipid Oil Red O Färbung der Fibroblasten durchgeführt. Dabei werden neutrale Lipide (Di- und Triacylglycerol sowie Cholesterolester) in den Zellen angefärbt und deren Menge anschließend durch Freisetzung des gebundenen Farbstoffs photometrisch gemessen. Die Quantifizierung der Lipid Oil Red O Färbung zeigte, dass eine signifikant größere Menge an neutralen Lipiden in den Patientenzellen ( $1,33 \pm 0,05$ ) im Vergleich zu Kontrollfibroblasten ( $1,0 \pm 0,18$ ,  $p = 0,039$ ) vorhanden war. Außerdem konnte durch das Aufnehmen der Zellen mit der gleichen Vergrößerung eine veränderte Morphologie der Patientenfibroblasten festgestellt werden. Diese waren deutlich größer als die Kontrollzellen. (Abbildung 59).

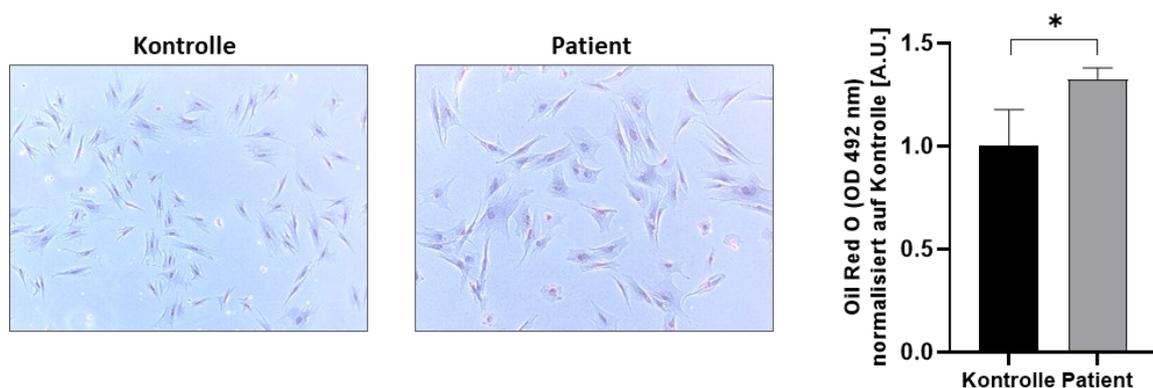


Abbildung 59: In den Fibroblasten der Patientin ist die Färbung neutraler Lipide erhöht. Färbung von neutralen Lipiden in Kontroll- und Patientenfibroblasten mit dem Farbstoff Oil Red O und dessen Quantifizierung. Die Intensität der Färbung von gleichen Zellzahlen wurde in Triplikaten photometrisch bestimmt und die Werte auf den Kontroll-Mittelwert normalisiert.

Des Weiteren wurden die  $\beta$ -Oxidationsmarker HiF1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ ) und ACOX3 (Acyl-CoA Oxidase 3, Pristanoyl) im Western Blot detektiert. HiF1 $\alpha$  diente dabei als Markerprotein für den mitochondrialen Abbau von kurzkettigen Lipiden, wohingegen ACOX3 als Marker für die  $\beta$ -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren, die in Peroxisomen stattfindet, verwendet wurde. Dabei stellte sich heraus, dass das Proteinlevel von HiF1 $\alpha$  in den Patientenproben signifikant auf  $0,73 \pm 0,12$  ( $p=0,032$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,08$ ) reduziert war. Die Menge das ACOX3-Proteins war in den Patientenzellen ebenfalls reduziert, allerdings nicht signifikant ( $0,78 \pm 0,08$ , Kontrolle  $1,0 \pm 0,13$ ,  $p=0,066$ ) (Abbildung 60).

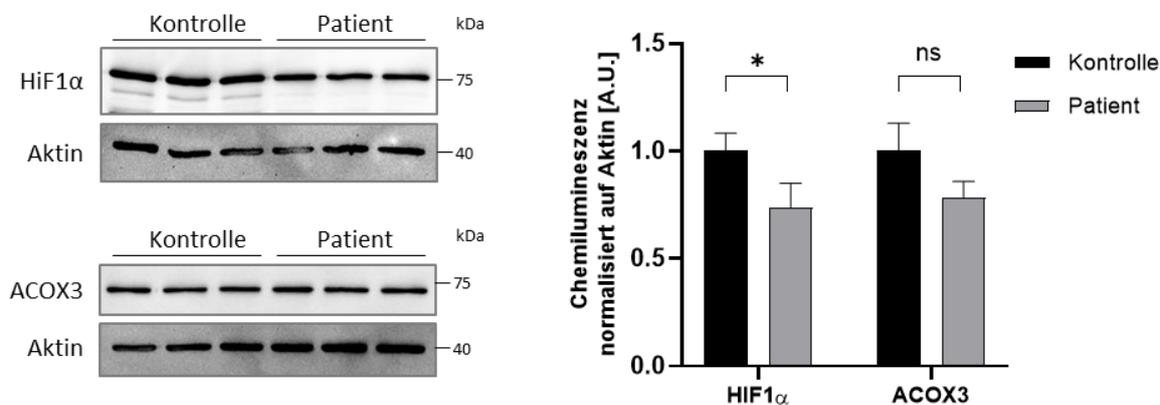


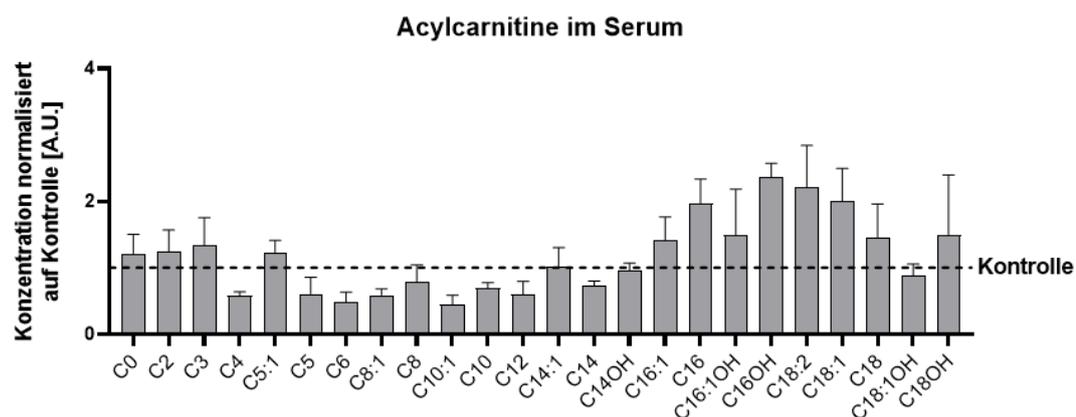
Abbildung 60: Das Proteinlevel der  $\beta$ -Oxidationsmarkerproteine HiF1 $\alpha$  und ACOX3 ist im Lysat von Patientenfibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert. Mittels Western Blots wurden die Proteine HiF1 $\alpha$  und ACOX3 sowie Aktin als Ladekontrolle in biologischen Triplikaten von Kontroll- und Patientenzelllysaten detektiert. Die Werte der Quantifizierung wurden auf den Mittelwert Kontrollproben normalisiert, sodass dieser dem Wert 1 entspricht.

#### 6.12.4 Leichte Veränderungen des Acylcarnitinprofils und der Menge sehr langkettiger Fettsäuren

Aufgrund der reduzierten Menge der  $\beta$ -Oxidationsmarkerproteine im Lysat der Patientenzellen wurde überprüft, ob auch eine Veränderung des Fettsäuren-Profiles bei der Patientin vorliegt. Dafür wurde die Konzentration von Acylcarnitinen im Serum und den Zellen der Patientin durch massenspektrometrische Analyse ermittelt. Außerdem wurde die Menge an sehr langkettigen Fettsäuren („very long chain fatty acids“, VLCFAs) in den Patientenfibroblasten bestimmt. Das Acylcarnitin-Profil im Serum der Patientin wurde dabei im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Hoeren gemessen [121] (unveröffentlichte Daten), während die Analysen in den Fibroblasten im Zuge dieser Arbeit stattfanden. Die vollständige Liste der gemessenen Konzentrationen der Acylcarnitine sowie der normalisierten Werte können für die Messung in Serum in Anhang Tabelle 4 und für die Messung in Fibroblasten in Anhang Tabelle 5 eingesehen werden.

Das Acylcarnitin-Profil im Serum der Patientin zeigte eine Reduzierung der kurz- bis mittelkettigen Acylcarnitine (C4-C10, C12, C14), wohingegen langkettigere Acylcarnitine von C16:1 bis C18 zu akkumulieren schienen. Durch die hohe Varianz und daraus resultierende hohe Standardabweichung der verschiedenen Proben konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 61 A). Im Lysat der Patientenfibroblasten wurden im Vergleich zu den Kontrollzellen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration der unterschiedlichen Acylcarnitine festgestellt, da es auch hier hohe Standardabweichungen in den Werten der Replikate gab. Das Profil war eher unauffällig mit einer leichten Reduktion von C2 und tendenziellen Erhöhungen von einigen kurz- (C3-C5:1), mittel- (C8:1, C8, C12, C14:2) und langkettigen (C16, C16:1OH, C18:2-C18) Acylcarnitinen (Abbildung 61 B). Das Acylcarnitin-Profil im Serum der Patientin war daher etwas auffälliger als das aus Fibroblastenlysat, da es sowohl verringerte als auch erhöhte Konzentrationen von Acylcarnitin-Gruppen gab, wohingegen beim Profil in Fibroblasten lediglich einzelne Acylcarnitine leicht erhöht waren und dabei hohe Standardabweichungen aufwiesen.

A



B

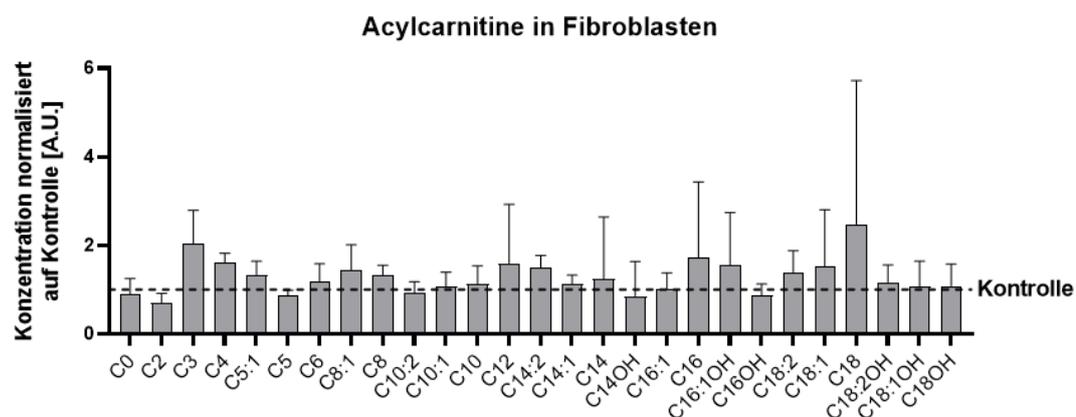


Abbildung 61: Das Acylcarnitin-Profil im Serum der Patientin ist etwas auffälliger als das Profil aus Fibroblastenlysat. Bestimmung des Acylcarnitin-Profiles im Serum und in Fibroblasten der Patientin und Kontrollen. Die gemessenen Konzentrationen wurden auf den Mittelwert der Kontrollen normalisiert, sodass dieser dem Wert 1 entsprach. Das Level der Kontrollen ist durch eine gestrichelte Linie bei  $y=1$  dargestellt. Die Abkürzungen der Acylcarnitine geben die Kettenlänge an (C0-18), bei ungesättigten Acylcarnitinen steht ein Doppelpunkt und die anschließende Zahl für die Anzahl an Doppelbindungen. **A)** Im Serum der Patientin waren kurzkettenige Acylcarnitine reduziert und langkettigen erhöht. Angepasste Grafik nach Masterarbeit von Lukas Hoeren [121]. **B)** Das Acylcarnitin-Profil im Fibroblastenlysat der Patientin war im Vergleich zu den Kontrollen eher unauffällig mit leichten Erhöhungen von kurz- und langkettigen Acylcarnitinen.

Zudem wurde die Konzentration an VLCFAs (Phytansäure (C20), C22:0, C24:0 und C26:0) im Lysat von Patienten- und Kontrollfibroblasten bestimmt, deren Abbau in Peroxisomen stattfindet. Dabei wurde eine erhöhte Konzentration der sehr-langkettigen Fettsäuren C22:0-C26:0 in den Patientenzellen festgestellt, wobei die Akkumulation von C22:0 (Kontrolle  $1,0 \pm 0,28$ , Patient  $1,64 \pm 0,38$ ;  $p=0,036$ ) und C24:0 (Kontrolle  $1,0 \pm 0,27$ , Patient  $1,66 \pm 0,37$ ;  $p=0,028$ ) signifikant war (Abbildung 62). Die vollständige Liste der Messwerte kann in Anhang Tabelle 6 eingesehen werden.

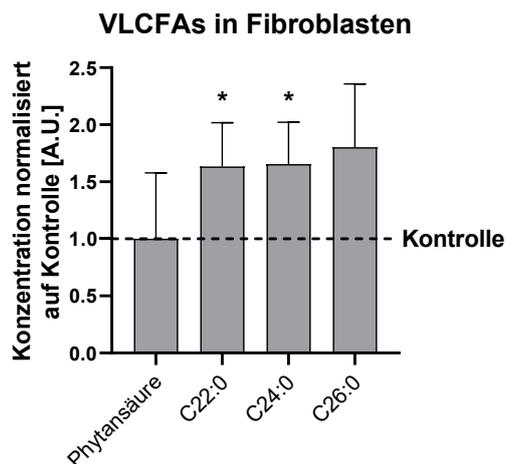


Abbildung 62: Die Konzentration der VLCFAs in den Patientenzellen ist im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Messung der sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs) im Lysat von Patientenfibroblasten normalisiert auf die Mittelwerte des Kontrollzelllysats.

### 6.13 Veränderung der Lipidverteilung in den Patientenfibroblasten

Da aufgrund der Daten des Proteomik Experimentes, des Lipid Oil Red O Ergebnisses sowie der Messung von Acylcarnitinen und VLCFAs eine Beeinträchtigung des Lipidstoffwechsels der Patientin vermutet wurde, folgte eine genauere Analyse verschiedener Lipidklassen in den Patientenfibroblasten durch das Labor von Prof. Dr. Britta Brügger in Heidelberg. Diese wurden massenspektrometrisch im Lysat von jeweils vier Kontroll- und Patientenfibroblastenpellets bestimmt. Gemessen wurde die Menge an Cholesterylester (CE) und Cholesterin (Chol) aus der Lipidkategorie der Steroide, Ceramide (Cer), Hexosylceramide (HexCer, Hex2Cer) und Sphingomyelin (SM), die zu den Sphingolipiden gehören, die Glycerolipide Diacylglycerol (DAG) und Triacylglycerol (TAG) sowie einige Glycerophospholipide (Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidsäure (PA), Alkylphosphatidsäure (PA O-), Phosphatidylcholin (PC), Alkylphosphatidylcholin (PC O-), Phosphatidylethanolamin (PE), Alkylphosphatidylethanolamin (PE O-), Phosphatidylethanolamin Plasmalogen (PE P-), Phosphatidylglycerin (PG), Alkylphosphatidylglycerin (PG O-), Phosphatidylinositol (PI), Alkylphosphatidylinositol (PI O-), Phosphatidylserin (PS) und Alkylphosphatidylserin (PS O-)). Die Verteilung der gemessenen Lipide aus Fibroblastenlysate der Patientin war für die meisten Lipidklassen ähnlich der Kontrolle. Dagegen waren die beiden Glycerolipide DAG und TAG in den Patientenzellen in größerer Menge vorhanden, wobei TAG signifikant auf das  $4,20 \pm 1,17$ -fache im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,49$ ,  $p=0,045$ ) erhöht war, was mit dem Ergebnis der Lipid Oil Red O Färbung übereinstimmte (siehe 6.12.3). Zudem waren die beiden Lipidklassen Cer und PE P- signifikant erhöht. Die Werte der Patientenzellen betragen für Cer  $7,74 \pm 1,41$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,08$ ,  $p=0,002$ ) und für PE P-  $2,26 \pm 0,23$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,08$ ,  $p=0,001$ , Abbildung 63). Die gemessenen und normalisierten Werte für alle Lipidklassen befinden sich im Anhang (Anhang Tabelle 7).

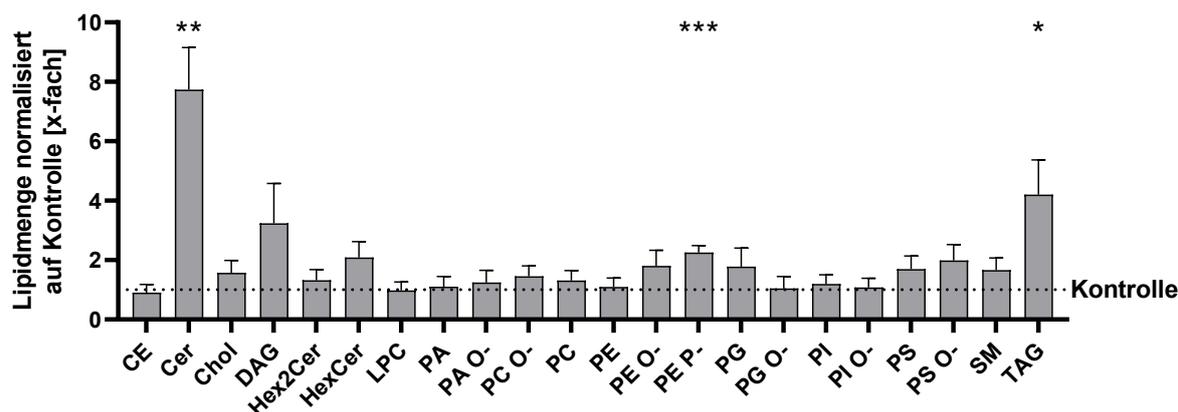


Abbildung 63: Die Verteilung verschiedener Lipidklassen ist in den Patientenzellen leicht verändert mit einer deutlichen Akkumulation von Ceramid (Cer). Massenspektrometrische Analyse verschiedener Lipidklassen im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten. Die gemessene Menge der einzelnen Lipide in den Patientenzellen wurde jeweils auf den Kontrollwert normalisiert, sodass dieser dem Wert 1 entsprach. Die genauen Werte können Anhang Tabelle 7 und die Lipidbezeichnungen dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

Da in den Patientenzellen eine erhöhte Menge an Ceramid vorhanden war, was laut Siskind *et al.* (2002) zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran führt und damit Auswirkungen auf die Apoptose haben kann [135], wurde ein Apoptoseassay durchgeführt (Abbildung 64, n=1). Dabei wurden die Kontroll- und Patientenzellen mit Apoptose-induzierendem Staurosporin für bis zu 24 h behandelt, um festzustellen, ob es bei den Patientenzellen zu einer verfrühten Einleitung der Apoptose unter Stressbedingungen kommt. Dazu wurde in den Proben Caspase 3 detektiert, die bei eingeleiteter Apoptose in gespaltenen Form vorliegt. Alle Werte wurden auf den Messwert der Kontrollprobe mit DMSO normalisiert, sodass dieser dem Wert 1 entsprach (Kontrolle: 1,35 (vollständig)/ 0,00 (gespalten), Patient: 0,65/ 0,00, Kontrolle + DMSO: 1,00/ 1,00, Patient + DMSO: 0,89/ 0,38). Die bei der Quantifizierung gemessene erhöhte Menge an gespaltenen Caspase 3 in den Proben Kontrolle 1 h, Patient 1 h und Kontrolle 3 h war höchstwahrscheinlich ein Artefakt aufgrund der dunklen Verfärbung der Membran an dieser Stelle (Kontrolle 1h: 1,20 (vollständig)/ 2,42 (gespalten), Patient 1h: 1,20/ 3,55, Kontrolle 3h: 1,93/ 1,67, Patient 3h: 0,74/ 0,20). Eine Induktion der Apoptose durch Detektion der gespaltenen Caspase 3 konnte ab 6 h Staurosporin-Behandlung festgestellt werden. In den Kontrollzellen lag die gespaltenen Form der Caspase 3 in größerer Menge vor als in den Patientenzellen (Kontrolle 6 h: 1,11 (vollständig)/ 17,19 (gespalten), Patient 6 h: 0,80/ 5,14, Kontrolle 16 h: 0,50/ 24,70, Patient 16 h: 0,76/ 10,62). Nach 24 h Staurosporin-Behandlung waren die Kontrollzellen bereits größtenteils abgestorben, weshalb im Zellysate kaum noch Aktin als Ladekontrolle detektiert werden konnte (Kontrolle 24 h: 2,90/ 45,84, Patient 24 h: 0,93/ 7,70). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in den Patientenzellen keine erhöhte Apoptose stattfindet und diese sogar eher weniger empfindlich auf die Behandlung mit Staurosporin reagieren als die Kontrollfibroblasten.

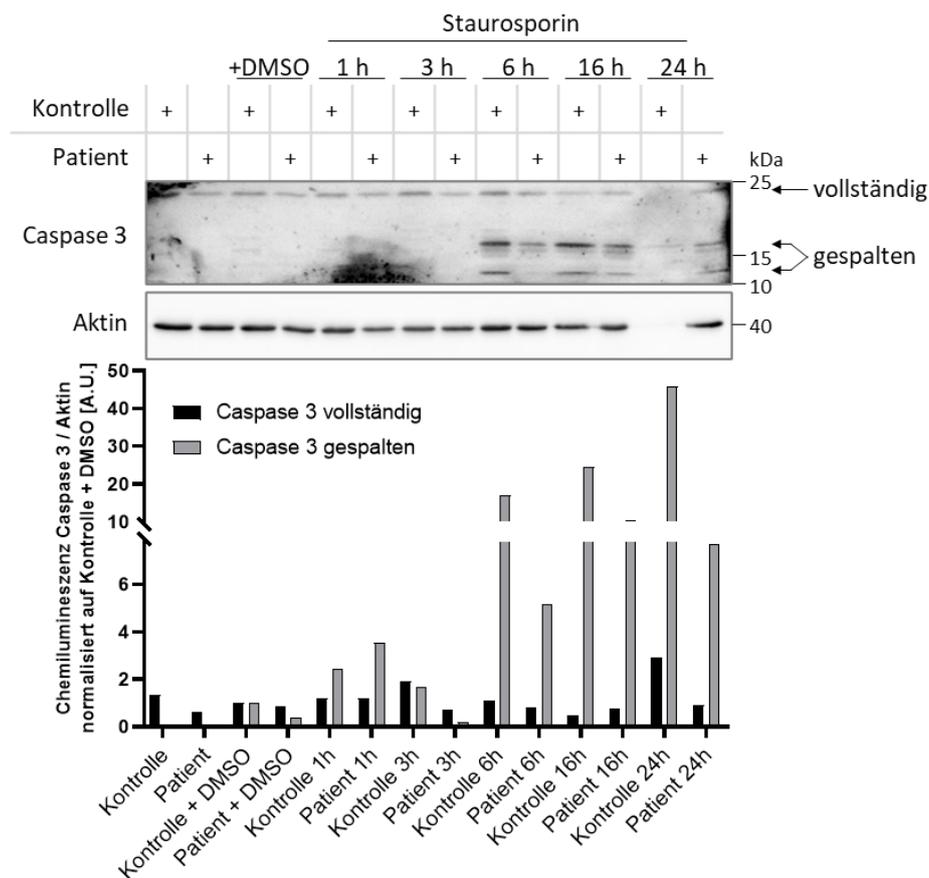


Abbildung 64: In den Patientenzellen kommt es nicht zu einer früheren Einleitung der Apoptose. Behandlung von Kontroll- und Patientenfibroblasten mit Staurosporin zur Untersuchung der Apoptose. Das Zellmedium wurde entweder mit DMSO als Kontrolle oder 1  $\mu$ M Staurosporin versetzt, dass durch Induktion der Apoptose eine Spaltung von Caspase 3 herbeiführt. Die gesplattene Form der Caspase 3 konnte nach 6 h Staurosporin-Behandlung detektiert werden und lag in den Kontrollzellen in größerer Menge vor als in den Patientenzellen. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experimentes (n=1).

Außerdem wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einem hohen Ceramidlevel und einer reduzierten Expression des Membranproteins CD36 publiziert [136]. CD36 ist ein Rezeptorprotein, das auch in den Lipidmetabolismus involviert ist. Um zu überprüfen, ob eine veränderte Menge an CD36 im Serum und den Fibroblasten der Patientin vorhanden ist, wurde dieses Protein mittels Western Blot detektiert und quantifiziert. Im Serum der Patientin war die Menge an CD36 im Vergleich zum Kontroll-Pool ( $1,0 \pm 0,11$ ) minimal auf  $0,90 \pm 0,09$  reduziert ( $p > 0,05$ , Abbildung 65 A). Im Fibroblastenlysat wurde dagegen in den Patientenzellen eine minimale Erhöhung auf  $1,19 \pm 0,41$  des CD36 Proteinlevels im Vergleich zu den Kontrollzellen ( $1,0 \pm 0,11$ ,  $p > 0,05$ ) festgestellt (Abbildung 65 B). Die Expression von CD36 ist demnach auf Proteinebene sowohl im Serum der Patientin als auch in den Fibroblasten unauffällig.

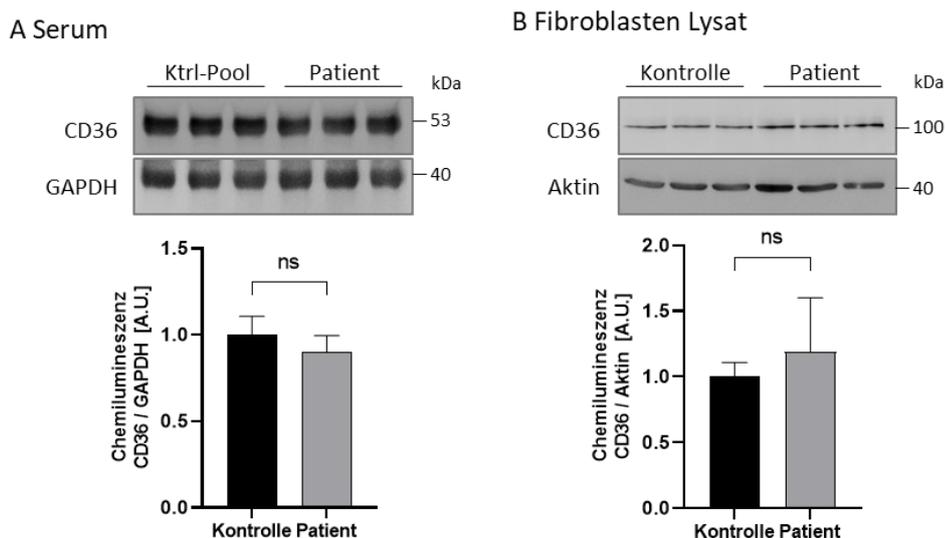


Abbildung 65: Die CD36-Proteinmenge in den Patientenproben ist vergleichbar mit den Kontrollen. Detektion von CD36 in Serum und Fibroblastenlysate. **A)** Aufgetragen wurde ein Kontroll-Pool (Ktrl-Pool) aus 127 Kontroll-Seren und Serum der Patientin. Die Menge an CD36 im Serum der Patientin entsprach dem Kontrolllevel. **B)** Die Quantifizierung von CD36 im Lysate von Kontrollfibroblasten und Zellen der Patientin ergab ein unauffälliges Ergebnis.

## 6.14 Analyse verschiedener Metabolite

### 6.14.1 Das Aminosäurenprofil der Patientin ist im Serum verändert und in Fibroblasten unauffällig

Die Konzentration der verschiedenen Aminosäuren wurde sowohl im Serum der Patientin als auch in den Fibroblasten massenspektrometrisch ermittelt. Die Messung im Patientenserum erfolgte dabei im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Hoeren [121] (unveröffentlichte Daten) wohingegen die Analyse der Fibroblasten während dieser Arbeit stattfand. Es wurde festgestellt, dass die Aminosäuren Alanin (Ala), Argininosuccinat (Asa), Ornithin (Orn) und Prolin (Pro) im Serum der Patientin signifikant erhöht vorlagen. Die normalisierten Messwerte betrug für Ala  $2,05 \pm 0,113$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,09$ ,  $p=0,004$ ), für Asa  $5,39 \pm 1,13$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,29$ ,  $p=0,041$ ), für Orn  $3,29 \pm 0,58$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,04$ ,  $p=0,039$ ) und für Pro  $2,02 \pm 0,03$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,14$ ,  $p=0,004$ ). Die Menge an Arginin (Arg) war dagegen signifikant auf  $0,30 \pm 0,02$  (Kontrolle  $1,0 \pm 0,05$ , ( $p<0,001$ ) reduziert (Abbildung 66 A). In den Fibroblasten der Patientin waren die Aminosäuren im Vergleich zu den Kontrollproben tendenziell leicht erhöht, abgesehen von Orn, dessen Menge reduziert war, allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 66 B). Die vollständigen Listen der Messdaten für die Konzentrationen der Aminosäuren im Serum und in Fibroblasten befinden sich in Anhang Tabelle 8 und Anhang Tabelle 9.

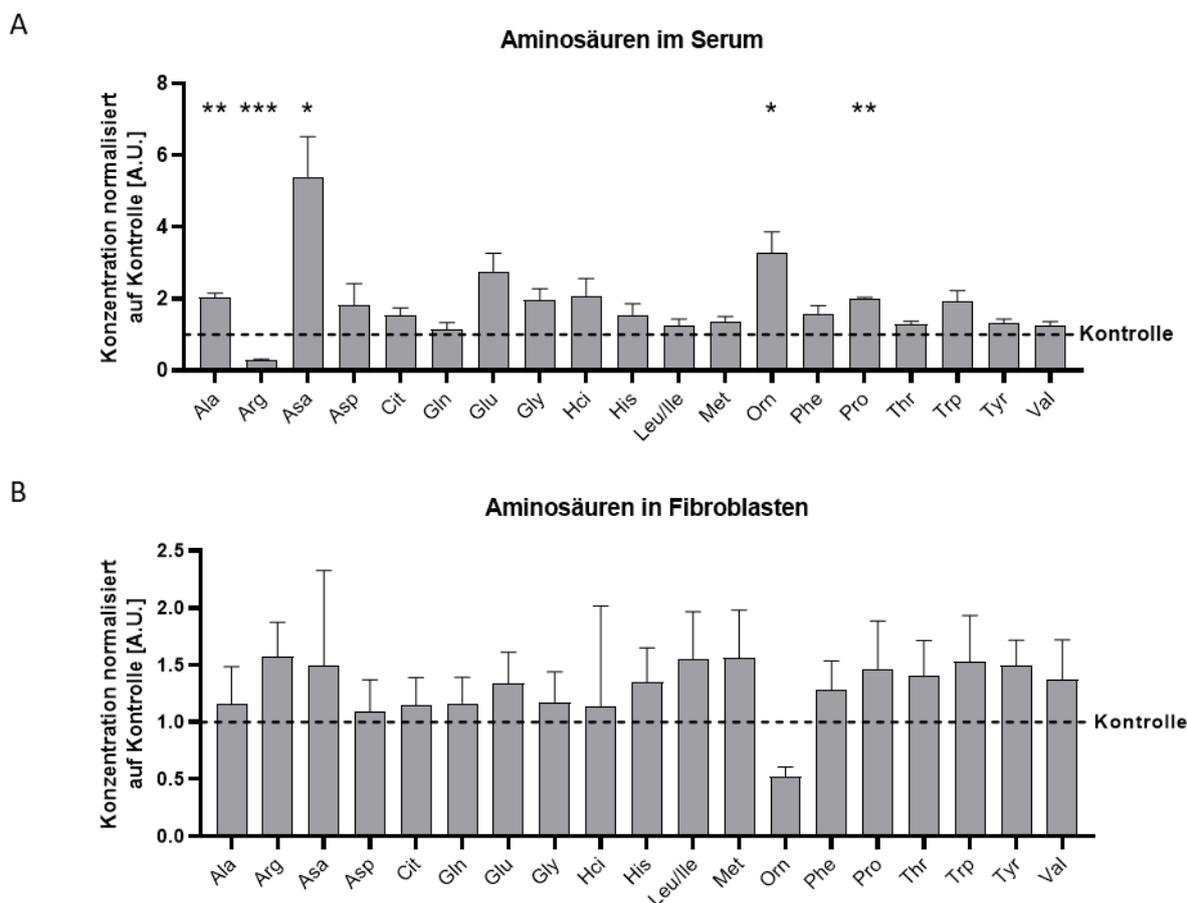


Abbildung 66: Die Menge einzelner Aminosäuren ist im Serum der Patientin verändert und in den Fibroblasten unauffällig. Gemessenes Aminosäurenprofil im Serum und in Fibroblasten der Patientin im Vergleich zu Kontrollen. Die Konzentrationen wurden auf den Mittelwert der Kontrollen normalisiert, sodass diese dem Wert 1 gleichgesetzt wurden (gestrichelte Linie bei  $y=1$ ). **A)** Im Serum der Patientin war die Menge der Aminosäuren Ala=Alanin, Asa=Argininosuccinat, Orn=Ornithin und Pro=Prolin auffällig erhöht und Arg=Arginin signifikant reduziert. Angepasste Grafik nach Masterarbeit von Lukas Hoeren [121]. **B)** Das Aminosäurenprofil in den Fibroblasten der Patientin zeigte tendenziell eine leicht erhöhte Menge der Aminosäuren, allerdings ohne signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen.

#### 6.14.2 Erhöhte Menge nukleotidaktivierter Zucker in Patientenzellen und Akkumulation von CMP-Neu5Ac in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Bereitstellung der nukleotidaktivierten Zucker in den Patientenzellen beeinträchtigt ist, wurden die Mengen der nukleotidaktivierten Zucker in Kontroll- und Patientenzellen durch die Metabolomics Core Facility in Heidelberg durch eine UPLC-gekoppelte ESI-MS/MS Messung bestimmt. Dabei wurde die Menge an CMP-Sialinsäure (Neu5Ac), GDP-Mannose, UDP-GlcNAc und UDP-Glucose bzw. UDP-Galactose gemessen. Zwischen UDP-Glucose und UDP-Galactose kann aufgrund der gleichen Masse bei dieser Analyse nicht unterschieden werden, weshalb die gemessenen Daten als Summe der beiden Zucker zu verstehen ist. Die verschiedenen nukleotidaktivierten Zucker waren in den Patientenzellen leicht, aber nicht signifikant erhöht: Die auf den Mittelwert der Kontrollzellen normalisierte Konzentration an CMP-Neu5Ac betrug in den Patientenzellen  $1,91 \pm 0,97$  und in den Kontrollzellen

$1,0 \pm 0,24$  ( $p > 0,05$ ). Die Menge an GDP-Mannose war auf  $2,45 \pm 1,18$  in den Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollproben ( $1,0 \pm 0,37$ ;  $p > 0,05$ ) erhöht. Die UDP-GlcNAc Konzentration betrug in den Kontrollzellen  $1,0 \pm 0,15$  während die Patientenzellen ein Level von  $2,76 \pm 1,17$  aufwiesen ( $p > 0,05$ ). Die Menge an UDP-Glucose/UDP-Galactose war in den Patientenzellen auf  $1,73 \pm 0,42$  im Vergleich zur Kontrolle mit  $1,0 \pm 0,32$  ( $p > 0,05$ ) leicht erhöht (Abbildung 67 A).

Zudem wurde die Menge der nukleotidaktivierten Zucker auch in HEK293 WT- und *SLC35A1* K.o.-Zellen gemessen, die mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) oder dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G) Konstrukt transfiziert worden waren. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an CMP-Neu5Ac in den K.o. Mock-Zellen sehr stark auf das  $2,86 \pm 0,65$ -fache im Vergleich zur Kontrolle (WT Mock:  $1,0 \pm 0,22$ ;  $p < 0,0001$ ) erhöht war. Diese Akkumulation konnte sowohl durch Expression des wildtypischen *SLC35A1* Konstruktes als auch des + A133G Vektors wieder reduziert werden. Die CMP-Neu5Ac Menge betrug in den K.o. + WT-Zellen  $1,07 \pm 0,12$  und in den K.o. + A133G-Zellen  $1,27 \pm 0,21$ , wodurch sich die Menge im Vergleich zu K.o. Mock signifikant änderte ( $p < 0,0001$  für K.o. + WT und  $p < 0,001$  für K.o. + A133G) und im Vergleich zu WT Mock nicht mehr signifikant erhöht war. Die Veränderungen der restlichen nukleotidaktivierten Zucker waren zwischen den unterschiedlichen Zelllinien nicht so deutlich ausgeprägt wie bei CMP-Neu5Ac, weshalb nur nicht signifikante Unterschiede festgestellt wurden. GDP-Mannose war in den K.o. Mock-Zellen leicht auf  $1,36 \pm 0,96$  im Vergleich zu WT Mock mit  $1,0 \pm 0,05$  ( $p > 0,05$ ) erhöht. K.o. + WT entsprach mit  $1,02 \pm 0,27$  dem Wert der WT Mock-Kontrolle und K.o. + A133G zeigte wiederum eine leichte Erhöhung auf  $1,33 \pm 0,47$  ( $p > 0,05$ ). UDP-GlcNAc war in den K.o. Mock-Zellen leicht auf  $0,74 \pm 0,14$  (WT Mock:  $1,0 \pm 0,18$ ,  $p > 0,05$ ) verringert und nahm in den mit den *SLC35A1*-Konstrukten transfizierten Zellen noch etwas weiter ab (K.o. + WT:  $0,50 \pm 0,07$ , K.o. + A133G:  $0,48 \pm 0,11$ ,  $p > 0,05$ ). Auch die Menge an UDP-Glucose/UDP-Galactose war in den K.o. Mock-Zellen mit  $0,85 \pm 0,59$  etwas niedriger als in den WT Mock-Zellen ( $1,0 \pm 0,13$ ,  $p > 0,05$ ). Die K.o. + WT- sowie die K.o. + A133G-Zellen zeigten ebenfalls eine minimale Verringerung der Zuckermenge auf  $0,72 \pm 0,17$  bzw.  $0,80 \pm 0,22$  ( $p > 0,05$ , Abbildung 67 B).

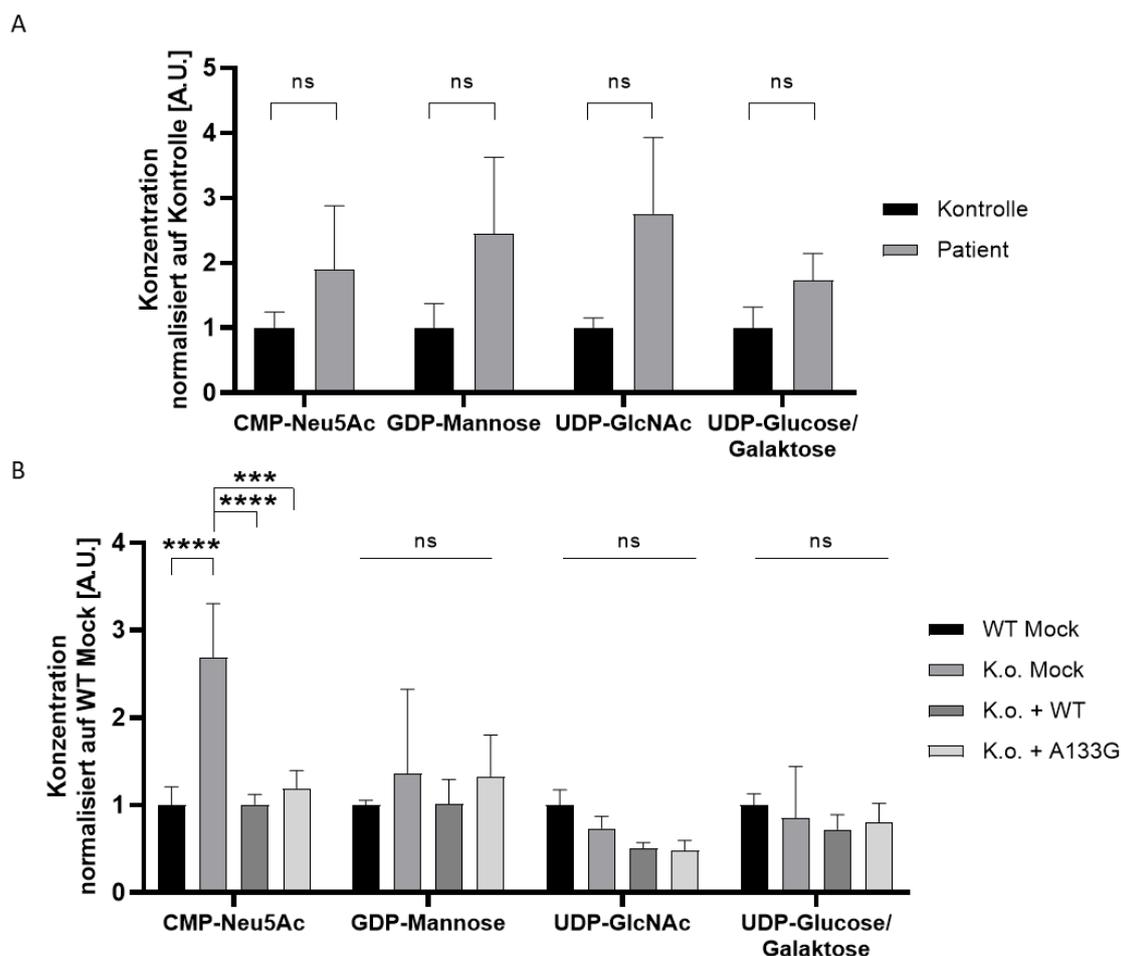


Abbildung 67: Leicht erhöhte Menge der nukleotidaktivierten Zucker in den Fibroblasten der Patientin und Akkumulation von CMP-Neu5Ac in den HEK293 *SLC35A1* K.o. Zellen. Messung der nukleotidaktivierten Zucker in **A**) Fibroblasten einer Kontrollzelllinie und der Patientin sowie in **B**) HEK293 WT (WT)- und *SLC35A1* Knock-out (K.o.)-Zellen, die mit dem pCI-Neo Leervektor (Mock), dem pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) bzw. dem pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G) Vektor transfiziert wurden. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden bei CMP-Neu5Ac nur die signifikanten Veränderungen durch Sternchen markiert.

## 6.15 GlcNAc-Supplementierung hat geringfügigen Effekt auf die Glykosylierung und verbessert die Proliferation deutlich

Da UDP-GlcNAc als Vorstufe für die Bildung von CMP-Sialinsäure benötigt wird, wurde getestet, ob eine Supplementierung der Patientenfibroblasten mit GlcNAc zu einer Veränderung im Glykosylierungsmuster oder der Proliferation führt. Dazu wurde dem Zellkulturmedium DMEM 10 mM GlcNAc hinzugefügt und die Zellen darin kultiviert. Nach 24 h bzw. 48 h in dem supplementierten Medium wurden die Zellen abgeschabt und lysiert. Durch Detektion im Western Blot wurden anschließend Glykosylierungsmarkerproteine und Lektinsignale untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Menge der vollständig glykosylierten Formen der Markerproteine durch die Zucker-Supplementierung im Vergleich zu den Proteinen aus unbehandelten Zellen nur unwesentlich veränderte (Abbildung 68 A-C). Allerdings konnte bei TGN46 eine signifikante Reduktion der hypoglykosylierten Glykoformen durch die GlcNAc-Supplementierung im Lysat

der Patientenfibroblasten beobachtet werden. Nachdem in den unbehandelten Patientenzellen die hypoglykosylierte TGN46-Form im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht war ( $2,87 \pm 0,34$ ;  $p < 0,0001$ ), befand sich das Proteinlevel der hypoglykosylierten Form nach 48 h GlcNAc-Supplementierung in den Patientenzellen mit  $1,11 \pm 0,24$  im Bereich der unbehandelten Kontrollzellen ( $1,0 \pm 0,11$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 68 C). Eine vollständige Liste mit allen berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10 und Anhang Tabelle 11.)

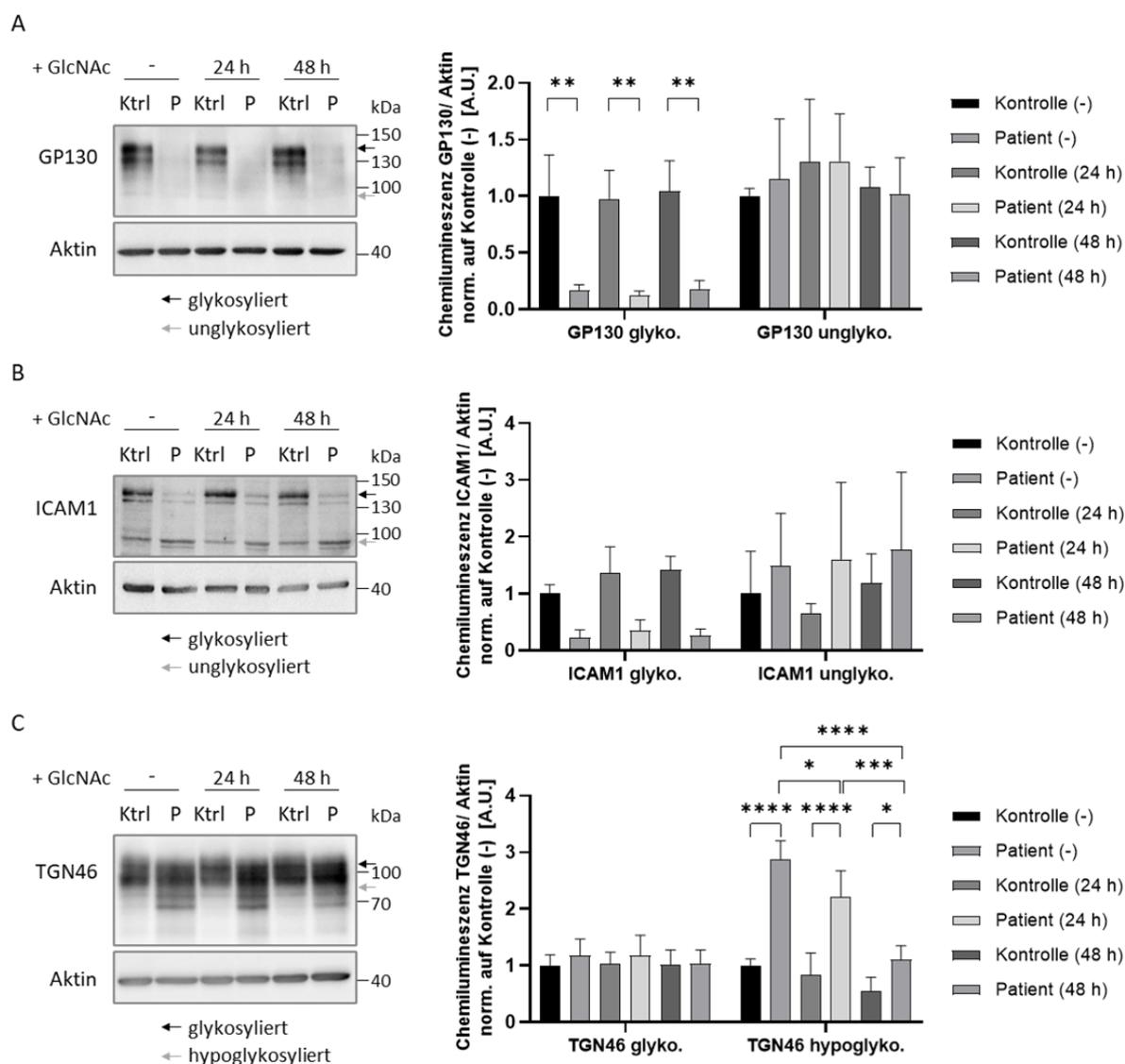


Abbildung 68: GlcNAc-Supplementierung der Patientenfibroblasten hat bei den Glykosylierungsmarkerproteinen nur einen Effekt auf die Menge der hypoglykosylierten Form von TGN46. Detektion der Glykosylierungsmarkerproteine GP130 (A), ICAM1 (B) und TGN46 (C) im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenfibroblasten (P), die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Kulturmedium supplementiert wurden. Für die Quantifizierung wurde die Menge der Proteine auf das Aktinlevel und anschließend auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle (-)) normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden lediglich signifikante Unterschiede in den Graphen markiert, die zwischen den Kontroll- und Patientenzellen der gleichen zeitlichen Kondition oder der Kontroll- bzw. Patientenzellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach GlcNAc-Supplementierung festzustellen waren. Eine vollständige Auflistung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 11).

Bei der Signaldetektion der sialinsäurebindenden Lektine WGA, SNA und MALI konnte im Lysat der Patientenfibroblasten nur bei WGA ein signifikanter Anstieg des Signals nach 24 h GlcNAc-Supplementierung festgestellt werden, der aber nach 48 h wieder etwas abnahm (Patient ohne GlcNAc:  $0,77 \pm 0,13$ , Patient 24 h GlcNAc:  $1,32 \pm 0,47$ , Patient 48 h GlcNAc:  $1,16 \pm 0,33$ ). Das SNA-Signal veränderte sich bei Kontroll- und Patientenzellen durch die GlcNAc-Supplementierung nur marginal, sodass keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Beim MALI-Signal konnte ein ähnlicher Effekt, wie bei WGA beobachtet werden. Auch hier nahm das Signal in den Patientenproben nach 24 h GlcNAc-Supplementierung etwas zu (Patient ohne GlcNAc:  $0,52 \pm 0,10$ , Patient 24 h GlcNAc:  $0,96 \pm 0,21$ ), aber verringerte sich nach 48 h Behandlung wieder (Patient 48 h GlcNAc:  $0,52 \pm 0,19$ ). Auch in den Kontrollzellen konnte nach 24 h ein deutlicher Anstieg des MALI-Signals festgestellt werden, der sich nach 48 h wieder dem Signal in den unbehandelten Zellen angleich (Kontrolle ohne GlcNAc:  $1,0 \pm 0,05$ , Kontrolle 24 h GlcNAc:  $1,59 \pm 0,47$ , Kontrolle 48 h GlcNAc:  $0,94 \pm 0,13$ ) (Abbildung 69). Eine vollständige Liste mit allen berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

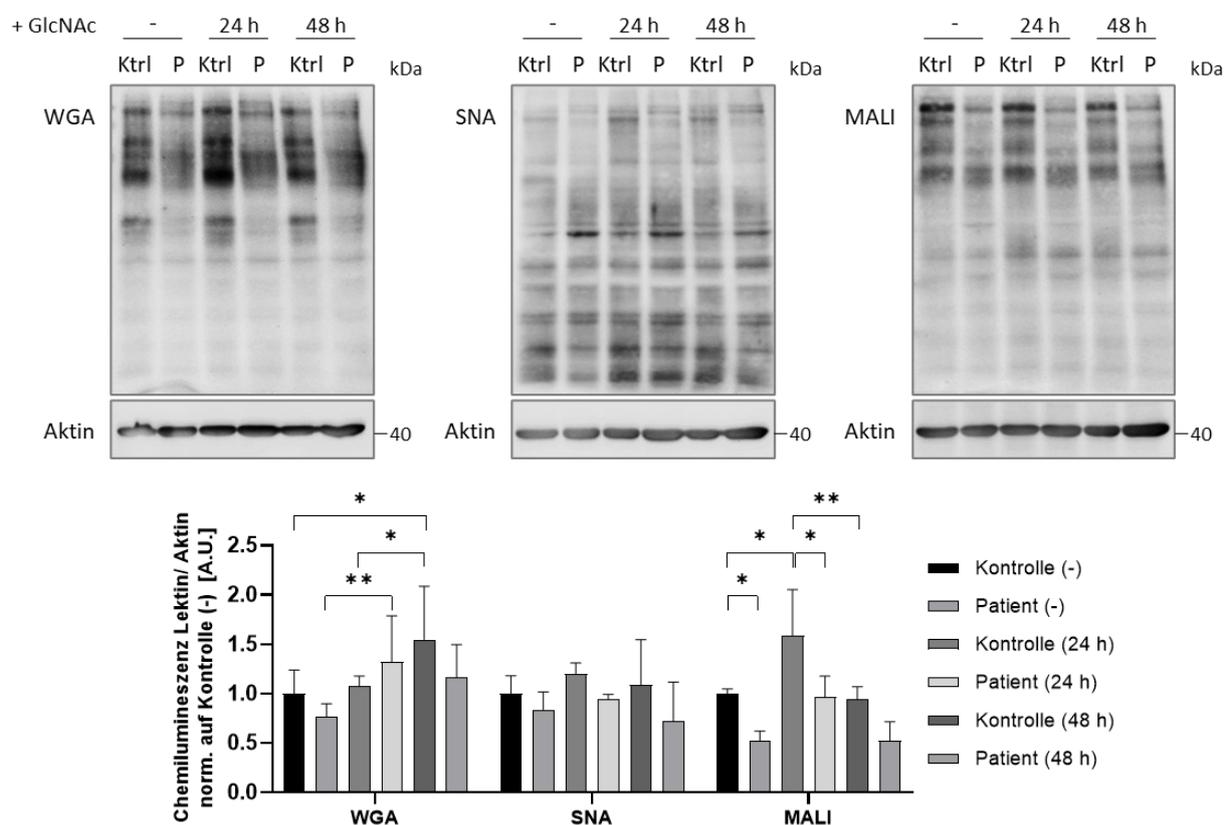


Abbildung 69: GlcNAc-Supplementierung der Patientenzellen hat kurzzeitige Effekte auf die Signale von WGA und MALI während das SNA-Signal unverändert bleibt. Detektion der Lektine WGA, SNA und MALI im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenfibroblasten (P), die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Kulturmedium supplementiert wurden. Für die Quantifizierung wurde das Signal der Lektine auf das Aktinlevel und anschließend auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle (-)) normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden lediglich signifikante Unterschiede in den Graphen markiert, die zwischen den Kontroll- und Patientenzellen der gleichen Kondition oder der Kontroll- bzw. Patientenzellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach GlcNAc-Supplementierung festzustellen waren. Eine vollständige Auflistung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

Das Signal des Lektins RCAI, welches vor allem nicht-sialylierte Strukturen bindet, nahm in den mit GlcNAc supplementierten Patientenproben im Vergleich zu der unbehandelten Patientenprobe leicht ab (Patient ohne GlcNAc:  $1,90 \pm 0,50$ , Patient 24 h GlcNAc:  $1,80 \pm 0,53$ , Patient 48 h GlcNAc:  $1,40 \pm 0,42$ ) und glich sich den jeweiligen Kontrollproben zu den verschiedenen Konditionszeitpunkten an, deren RCAI-Signal durch die GlcNAc-Supplementierung leicht anstieg (Kontrolle ohne GlcNAc:  $1,0 \pm 0,52$ , Kontrolle 24 h GlcNAc:  $1,57 \pm 0,72$ , Kontrolle 48 h GlcNAc:  $1,64 \pm 0,68$ ) (Abbildung 70). Das ECL-Signal nahm in den Patientenproben mit GlcNAc-Supplementierung ebenfalls leicht ab (Patient ohne GlcNAc:  $1,37 \pm 0,13$ , Patient 24 h GlcNAc:  $1,30 \pm 0,56$ , Patient 48 h:  $0,86 \pm 0,42$ ), während sich das Signal in den Kontrollzellen leicht erhöhte (Kontrolle ohne GlcNAc:  $1,0 \pm 0,18$ , Kontrolle 24 h GlcNAc:  $1,50 \pm 0,25$ , Kontrolle 48 h GlcNAc:  $1,46 \pm 0,42$ ), wodurch insgesamt lediglich nicht signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen festgestellt wurden. Eine vollständige Liste mit allen berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

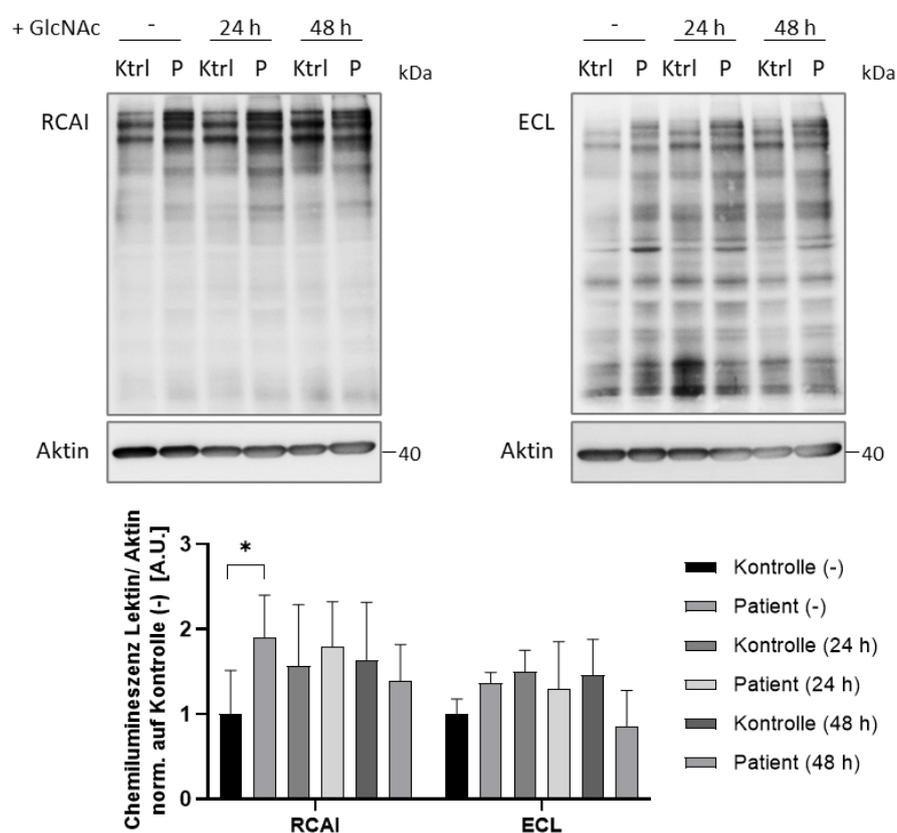


Abbildung 70: Leichte Veränderungen der Lektinsignale von RCAI und ECL durch GlcNAc-Supplementierung von Fibroblasten. Detektion der Lektine RCAI und ECL im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenfibroblasten (P), die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Kulturmedium supplementiert wurden. Für die Quantifizierung wurde das Signal der Lektine auf das Aktinlevel und anschließend auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle (-)) normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden lediglich signifikante Unterschiede in den Graphen markiert, die zwischen den Kontroll- und Patientenzellen der gleichen zeitlichen Kondition oder der Kontroll- bzw. Patientenzellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach GlcNAc-Supplementierung festzustellen waren. Eine vollständige Auflistung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

Um auch einen möglichen Effekt auf die O-Glykosylierung durch die GlcNAc-Supplementierung zu überprüfen, wurden die Signale der Lektine PNA und Jacalin im Lysat der behandelten Zellen detektiert. Hierbei kam es insgesamt zu minimalen, nicht signifikanten Veränderungen (Abbildung 71). Das PNA-Signal nahm in den Proben der Patientenzellen nach 48 h GlcNAc-Supplementierung leicht ab, wohingegen das Signal in den Kontrollproben etwas anstieg (Kontrolle ohne GlcNAc:  $1,0 \pm 0,15$ , Patient ohne GlcNAc:  $1,19 \pm 0,23$ , Kontrolle 48 h GlcNAc:  $1,33 \pm 0,55$ , Patient 48 h GlcNAc:  $0,85 \pm 0,16$ ). Das Jacalin-Signal nahm sowohl in den Kontroll- als auch in den Patientenproben nach 24 h bzw. 48 h GlcNAc-Supplementierung leicht ab (Kontrolle ohne GlcNAc:  $1,0 \pm 0,31$ , Kontrolle 24 h GlcNAc:  $0,82 \pm 0,25$ , Kontrolle 48 h GlcNAc:  $0,56 \pm 0,01$ , Patient ohne GlcNAc:  $0,86 \pm 0,21$ , Patient 24 h GlcNAc:  $0,73 \pm 0,29$ , Patient 48 h GlcNAc:  $0,53 \pm 0,15$ ). Eine vollständige Liste mit allen berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

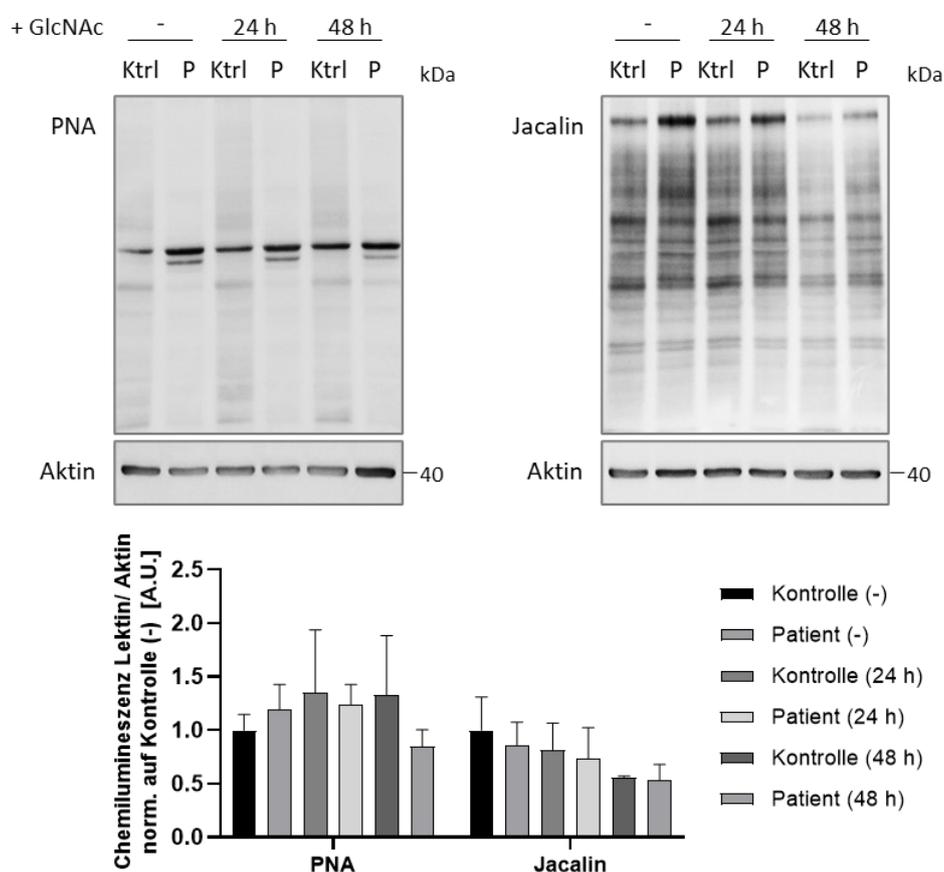


Abbildung 71: Minimale Änderungen der PNA- und Jacalin-Signale im Lysat von GlcNAc-supplementierten Fibroblasten. Detektion der Lektine PNA und Jacalin im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenfibroblasten (P), die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Kulturmedium supplementiert wurden. Für die Quantifizierung wurde das Signal der Lektine auf das Aktinlevel und anschließend auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle (-)) normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Die dargestellten Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede, weshalb keine Signifikanz-Markierungen vorgenommen wurden. Eine vollständige Auflistung der berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 12).

Neben der Überprüfung der Glykosylierungsmuster wurde auch die Proliferation der Fibroblasten nach GlcNAc-Supplementierung untersucht. Die Fibroblasten wurden wie in 5.2.13 beschrieben in 96-Well Platten ausgesät, wobei sich die Zellen ab dem zweiten Messtag in DMEM mit 10 mM GlcNAc befanden (Abbildung 72 A-C). Das Verhältnis der Wachstumsrate der Patienten- zu den Kontrollzellen betrug  $0,79 \pm 0,07$  fache und die Verdopplungszeit das  $1,28 \pm 0,11$  fache der Kontrollzellen, wobei die Werte der Kontrolle jeweils auf den Wert 1 gesetzt wurden (Abbildung 72 D). Im Vergleich zu der gemessenen Proliferation unter normalen Kultivierungsbedingungen (siehe 6.10: Wachstumsrate  $0,39 \pm 0,13$ , Verdopplungszeit  $2,97 \pm 1,18$ ) verbesserten sich die Werte der Wachstumsrate und der Verdopplungszeit unter GlcNAc-Supplementierung damit um etwa das Doppelte bzw. die Hälfte. Die GlcNAc-Supplementierung scheint daher einen positiven Einfluss auf die Proliferation der Patientenzellen zu haben.

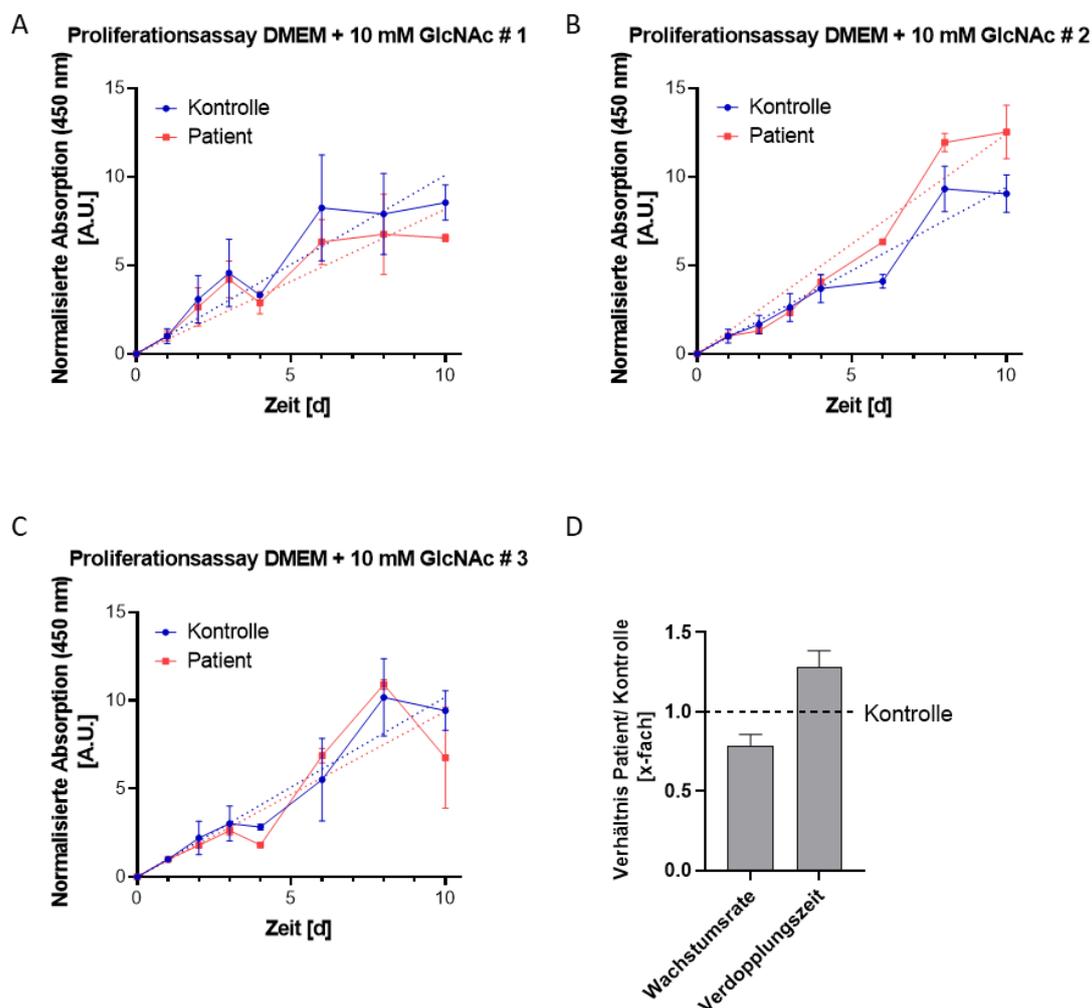


Abbildung 72: Die Proliferation der Patientenfibroblasten gleicht sich bei GlcNAc-Supplementierung den Kontrollzellen an. Proliferationsassay mit Patienten- und Kontrollfibroblasten unter GlcNAc-Supplementierung. **A) - C)** Verschiedene Wiederholungen des Experimentes. Pro Tag wurden je drei Wells gemessen und die Absorption gemittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Absorption, der auf den entsprechenden Startwert normalisiert wurde über die Zeit der Messung. Die Fehlerbalken entsprechen der normalisierten Standardabweichung pro gemessenem Zeitpunkt. Die gepunkteten Linien stellen jeweils die lineare Trendlinie der Wachstumskurve dar. **D)** Die Steigung der normalisierten Absorption über die Zeit wurde dazu verwendet die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit der Zelllinien zu berechnen. Das Diagramm stellt den Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses dieser Werte von Patienten- zu Kontrollzellen aus den Triplikaten dar. Die Kontrolle entsprach dabei einem Wert von 1.

## 6.16 Komplementierung der Fibroblasten mit *SLC35A1*-HA Konstrukten

Zuletzt wurden die Kontroll- und Patientenfibroblasten retroviral mit pLNCX2 Plasmiden infiziert, die das *SLC35A1*(WT)-HA bzw. das *SLC35A1*(A133G)-HA Gen trugen. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die Expression des wildtypischen Proteins in den Patientenzellen zu einer Verbesserung des bereits beschriebenen Glykosylierungs- und Proliferations-Phänotyps führte. Die Zellen, die mit dem pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA Konstrukt infiziert wurden, wurden dazu verwendet die intrazelluläre Lokalisation des Proteins mit Patientenmutation durch Anfärben des HA-Tags zu überprüfen.

### 6.16.1 Erhöhte *SLC35A1*-Transkriptexpression der infizierten Fibroblasten

Die Expression der *SLC35A1* Konstrukte in den Kontroll- und Patientenfibroblasten wurde zunächst mittels qPCR überprüft. Die Kontrollzellen, die mit dem pLNCX2 Leervektor infiziert worden waren (Mock) und dadurch nur das endogene *SLC35A1*-Gen exprimierten, wurden zur Normalisierung auf den Wert 1 gesetzt und zeigten eine Expression von  $1,0 \pm 0,20$ . Im Vergleich dazu war die endogene Transkriptmenge in den Patienten Mock-Zellen auf das  $0,65 \pm 0,13$ -fache nicht signifikant reduziert ( $p > 0,05$ ) und zeigte damit eine ähnliche Tendenz wie die nicht infizierten Fibroblasten (siehe 6.6.1). In den Zellen, die mit dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) bzw. pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G) Konstrukt infiziert worden waren, konnte eine deutlich erhöhte *SLC35A1*-Expression festgestellt werden, die aber in den Patientenzellen in etwa der Hälfte der Expression in den Kontrollzellen entsprach (Abbildung 73; Kontrolle + WT:  $47,01 \pm 7,55$ ,  $p < 0,001$ ; Kontrolle + A133G:  $45,89 \pm 7,80$ ,  $p < 0,001$ ; Patient + WT:  $19,60 \pm 4,37$ ,  $p = 0,003$ ; Patient + A133G:  $23,19 \pm 3,98$ ,  $p < 0,001$ ). Durch die in etwa mindestens 20-fach vorhandene Menge des *SLC35A1*-Transkripts wurde für die weiteren Experimente von einer erfolgreichen Expression der pLNCX2 *SLC35A1*-Konstrukte in den Fibroblasten ausgegangen.

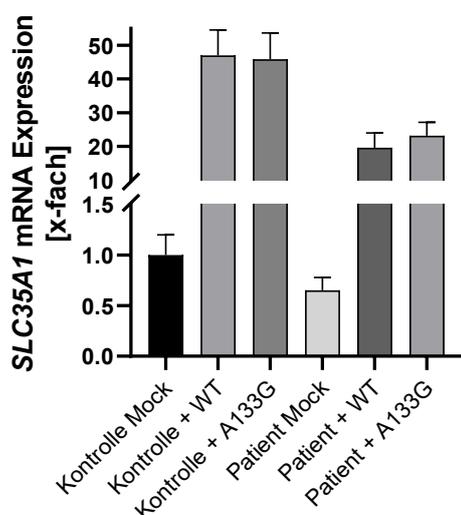


Abbildung 73: Bestätigung der Expression des *SLC35A1*-Gens durch Messung der Transkriptmenge in den infizierten Zellen mittels qPCR. Die Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock), dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) oder dem pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G) infiziert. Für eine übersichtliche Darstellung wurden die Signifikanzwerte in der Grafik nicht markiert. Der Unterschied in der Menge an *SLC35A1*-Transkript in den Kontroll- und Patienten-Mock-Zellen war nicht signifikant, wohingegen die erhöhte Expression in den Kontrollzellen + WT und + A133G im Vergleich zu den Kontroll Mock-Zellen ( $p < 0,001$ ) sowie in den Patientenzellen + WT ( $p = 0,003$ ) und + A133G im Vergleich zu den Patient Mock-Zellen ( $p < 0,001$ ) deutlich signifikant war.

### 6.16.2 Das SLC35A1(WT/Thr45Ala)-HA Protein colokalisiert mit Golgi-Markern

Durch Immunfluoreszenzfärbung wurde überprüft, ob die intrazelluläre Lokalisation des SLC35A1-Transporters aufgrund der Thr45Ala Patientenmutation verändert war. Dazu wurden die komplementierten Kontroll- und Patientenfibroblasten fixiert und der HA-Tag des eingebrachten Proteins sowie verschiedene Golgi-Markerproteine (GM130/cis-Golgi Marker und TGN46/trans-Golgi Marker) mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert (siehe 5.2.14). In den Zellen, die als Kontrolle mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) infiziert worden waren, konnten nur die Golgi-Markerprotein detektiert werden. Dagegen ließ sich in den mit den pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT-HA)- oder pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA (+ A133G-HA)-Konstrukten infizierten Kontroll- und Patientenfibroblasten der HA-Tag des SLC35A1-Proteins nachweisen. Allerdings konnte dieser in jeder der überprüften Konditionen nicht in allen Zellen detektiert werden, sondern nur in etwa 2/3 der aufgenommenen Fibroblasten. Falls vorhanden, colokalisierte sowohl der HA-Tag des wildtypischen als auch des SLC35A1-Proteins mit der Patientenmutation in allen Proben mit den Golgi-Markern (siehe Abbildung 74 und Abbildung 75). Demnach war sowohl die Lokalisation des HA-getaggten wildtypischen als auch des mutierten Proteins, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Zellen, nicht verändert. Es bleibt allerdings fraglich, weshalb der Proteintag nicht bei allen Zellen detektiert werden konnte.

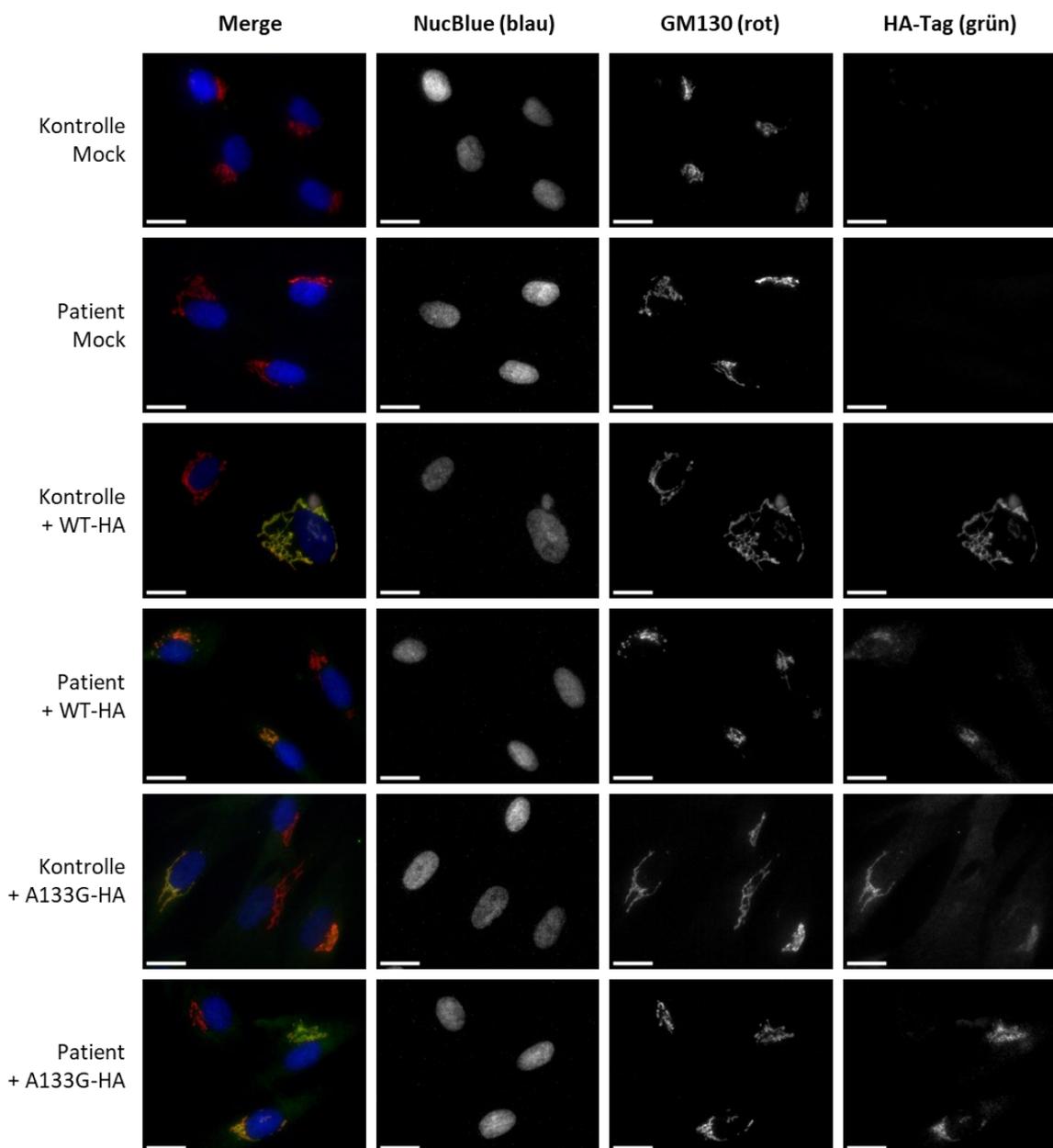


Abbildung 74: Falls vorhanden colokalisiert der HA-Tag des wildtypischen und des mutierten SLC35A1-Proteins in infizierten Fibroblasten mit dem Golgi-Marker GM130. Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten einer Kontrolle und der Patientin, die viral mit HA-getaggten Konstrukten mit wildtypischer *SLC35A1*-Sequenz oder mit der Mutation der Patientin infiziert wurden. Sowohl die Kontroll- als auch die Patientenzellen wurden jeweils mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) oder den HA-getaggten Konstrukten pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT-HA) oder pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA (+A133G-HA) infiziert. Angefärbt wurde der Zellkern in Blau (NucBlue), der Golgi-Apparat in Rot (GM130=cis-Golgi Marker) und der HA-Tag des SLC35A1-Proteins in Grün (HA-Tag). Der Skalenbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

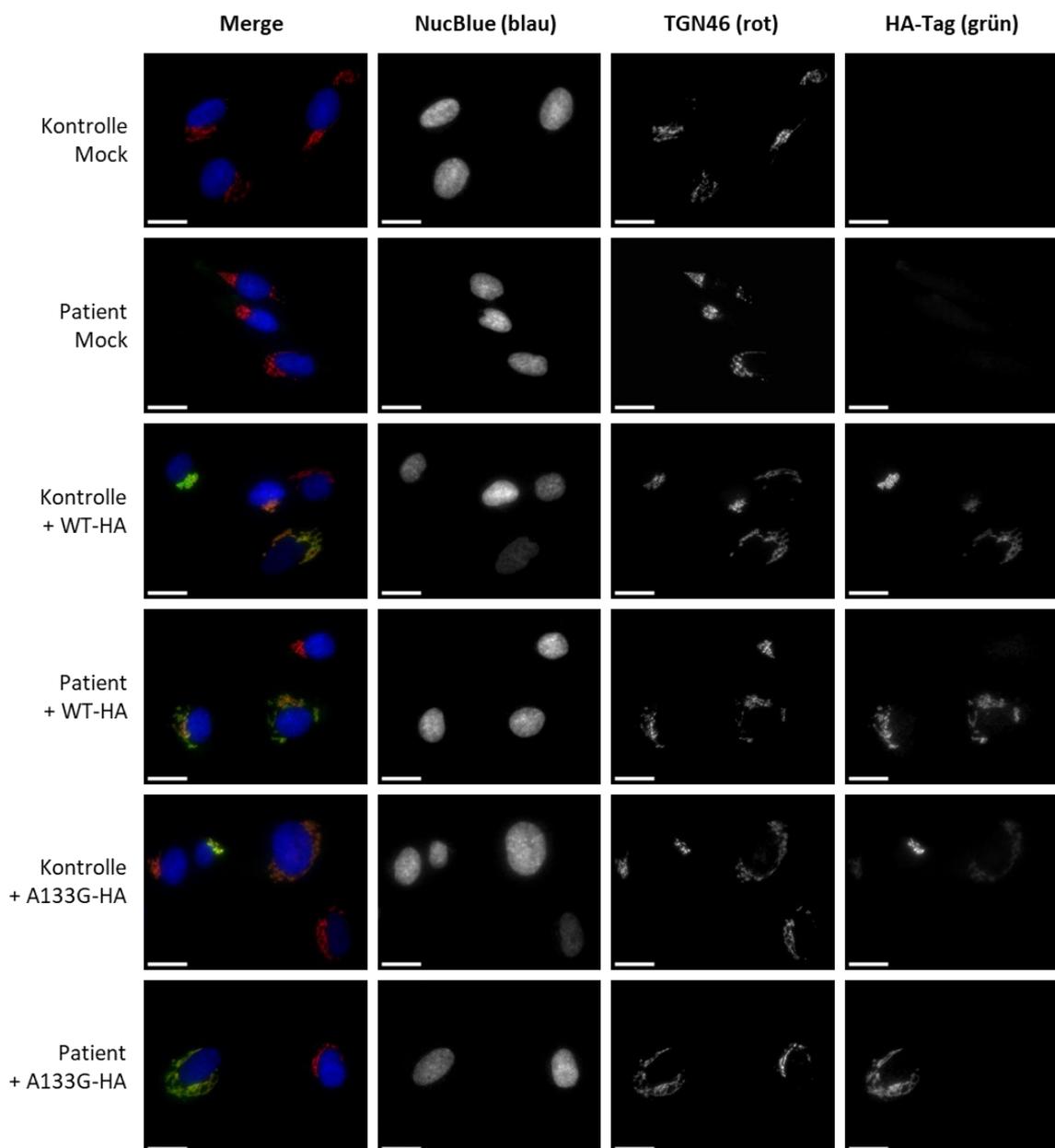


Abbildung 75: Falls vorhanden colokalisiert der HA-Tag des wildtypischen und des mutierten SLC35A1-Proteins in infizierten Fibroblasten mit dem Golgi-Marker TGN46. Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten einer Kontrolle und der Patientin, die viral mit HA-getaggtten Konstrukten mit wildtypischer *SLC35A1*-Sequenz oder mit der Mutation der Patientin infiziert wurden. Sowohl die Kontroll- als auch die Patientenzellen wurden jeweils mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) oder den HA-getaggtten Konstrukten pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT-HA) oder pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA (+A133G-HA) infiziert. Angefärbt wurde der Zellkern in Blau (NucBlue), der Golgi-Apparat in Rot (TGN46=trans-Golgi Marker) und der HA-Tag des SLC35A1-Proteins in Grün (HA-Tag). Der Skalenbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.16.3 Teilweise verbesserte Glykosylierung in komplementierten Patientenzellen

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 6.4 beobachtete, stark reduzierte Expression von Glykosylierungsmarkerproteinen und die auffällig veränderten Glykosylierungsmuster verschiedener Lektine (siehe 6.5) in den Patientenzellen direkt mit dem mutierten *SLC35A1*-Transporter zusammenhängen, wurden diese mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Gen komplementiert. Es wurde untersucht, ob durch Expression des wildtypischen *SLC35A1*-Proteins in den Patientenzellen eine kontrollähnliche Expression von Glykosylierungsmarkerproteinen bzw. unauffällige Glykosylierungsmuster bei Lektinfärbungen erreicht werden kann.

Zunächst wurde die Expression des wildtypischen *SLC35A1*-HA-Proteins in den Kontroll- und Patientenzellen auf Proteinebene durch Detektion des HA-Tags im Western Blot überprüft. Die Zellen waren zuvor mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) oder dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA Konstrukt viral infiziert und mit Neomycin selektiert worden. Allerdings konnte der HA-Tag im Lysat der Zellen nicht detektiert werden (Abbildung 76). Die Zellen wurden dennoch für weitere Experimente verwendet, da aufgrund der Neomycinresistenz der Zellen, des Ergebnisses der qPCR in 6.16.1 und der Immunfluoreszenzfärbung, bei der der HA-Tag zumindest teilweise detektiert werden konnte, von einer Expression des *SLC35A1*-Konstruktes in den Zellen ausgegangen wurde.

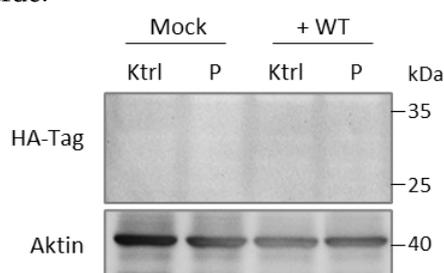
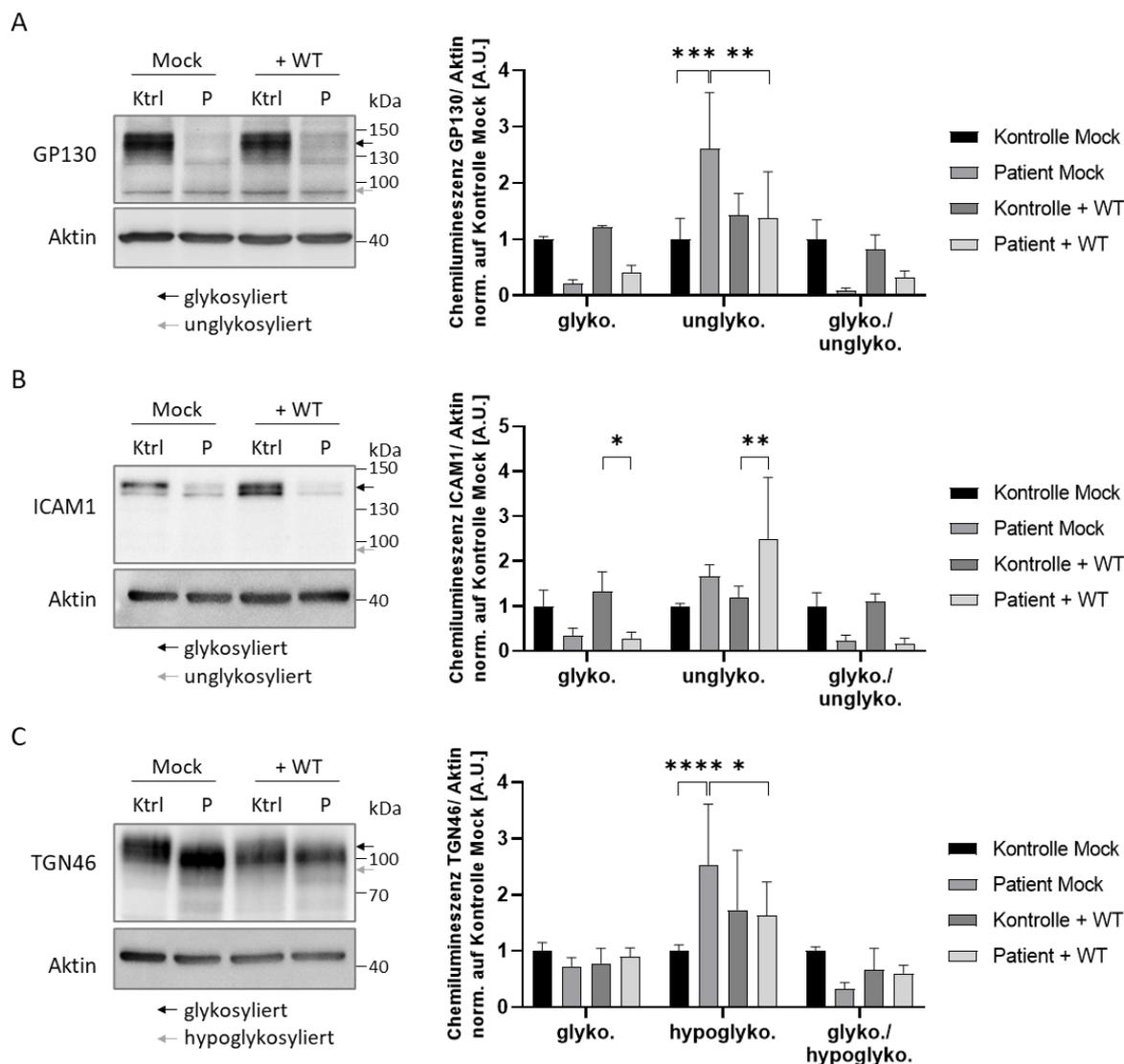


Abbildung 76: Der HA-Tag kann im Lysat viral infizierter Kontroll- und Patientenfibroblasten nicht detektiert werden. Aufgetragen wurden die Zellysate einer Kontrolle (Ktrl) und der Patientin (P), die mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) oder dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA Plasmid (+WT) viral infiziert und anschließend mit Neomycin selektiert wurden. Als Ladekontrolle diente Aktin.

Als nächstes wurde die Expression der Glykosylierungsmarkerproteine GP130, ICAM1 und TGN46 im Lysat der infizierten Zellen untersucht. Die Menge an vollständig glykosyliertem GP130 war in den Patientenzellen, die mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) infiziert worden waren, im Vergleich zur Kontrolle ( $1,0 \pm 0,05$ ) deutlich auf  $0,21 \pm 0,07$  reduziert ( $p > 0,05$ ). In den Zellen, die mit dem pLNCX2 *SLC35A1* (WT)-HA Konstrukt infiziert worden waren (+ WT), stieg die Menge des glykosylierten GP130 leicht auf  $1,22 \pm 0,02$  in den Kontrollzellen und auf  $0,42 \pm 0,12$  ( $p > 0,05$ ) in den Fibroblasten der Patientin an. Die unglykosylierte Form des Proteins war in der Mock-Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Kontrolle Mock:  $1,0 \pm 0,37$ , Patient Mock:  $2,61 \pm 0,99$ ;  $p < 0,001$ ). In den Kontrollzellen + WT nahm die unglykosylierte Form leicht zu ( $1,43 \pm 0,38$ ), wohingegen die Patientenzellen + WT im Vergleich zur Mock-Patientenprobe eine signifikante Reduktion auf  $1,38 \pm 0,82$  ( $p = 0,006$ ) zeigten. Das Verhältnis von glykosyliertem zu unglykosyliertem Protein betrug in den Mock-Kontrollzelllysaten  $1,0 \pm 0,35$  und in den Mock-Patientenproben  $0,09 \pm 0,05$  ( $p > 0,05$ ), wohingegen sich das Verhältnis in den Kontrollzellen + WT auf  $0,82 \pm 0,26$  und auf  $0,32 \pm 0,12$  ( $p > 0,05$ ) in den Patientenzellen + WT veränderte. Demnach erhöhte sich das Verhältnis von glykosyliertem zu unglykosyliertem GP130 in den komplementierten Patientenzellen im Vergleich zur Mock-Probe zwar auf etwa das 3-fache, aber kam dennoch nicht an ein kontrollähnliches Verhältnis heran (Abbildung 77 A).

Die Menge des glykosylierten ICAM1-Proteins betrug in der Mock-Kontrollprobe  $1,0 \pm 0,35$  und war in den Mock-Patientenzellen deutlich, aber nicht signifikant auf  $0,35 \pm 0,16$  ( $p > 0,05$ ) reduziert. Die unglykosylierte Form des Proteins war stattdessen in den Mock Proben der Patientenzellen auf  $1,66 \pm 0,26$  im Vergleich zur Kontrolle mit  $1,0 \pm 0,06$  ( $p > 0,05$ ) erhöht. Diese Tendenzen verstärkten sich in den Kontroll- und Patientenproben + WT noch weiter: Die Menge an glykosyliertem ICAM1 betrug bei Kontrolle + WT  $1,33 \pm 0,43$  und bei Patientin + WT  $0,28 \pm 0,14$  ( $p = 0,027$ ), dagegen nahm die Menge an unglykosyliertem Protein in den Kontroll- und Patientenzellen weiter auf  $1,20 \pm 0,24$  bzw.  $2,50 \pm 1,37$  zu ( $p = 0,003$ ). Damit wurde als Verhältnis von glykosyliertem zu unglykosyliertem ICAM1 für die Mock-Kontrollprobe ein Wert von  $1,0 \pm 0,30$  berechnet, der in den Kontrollzellen + WT auf  $1,09 \pm 0,18$  ( $p > 0,05$ ) minimal anstieg. Stattdessen nahm das Verhältnis der ICAM1-Glykoformen in den Patientenzellen + WT mit  $0,17 \pm 0,11$  im Vergleich zur Mock-Patientenprobe ( $0,23 \pm 0,12$ ,  $p > 0,05$ ) weiter ab (Abbildung 77 B).

Bei TGN46 war die Menge der vollständig glykosylierten Glykoformen in der Mock-Patientenprobe leicht auf  $0,73 \pm 0,15$  im Vergleich zur Mock-Kontrollprobe ( $1,0 \pm 0,15$ ,  $p > 0,05$ ) reduziert, wohingegen der Bereich der hypoglykosylierten Proteinform ein signifikant erhöhtes Signal in den Patientenzelllysaten zeigte (Kontrolle Mock:  $1,0 \pm 0,11$ , Patient Mock:  $2,54 \pm 1,07$ ;  $p < 0,0001$ ). Das Verhältnis von glykosyliertem zu hypoglykosyliertem TGN46 betrug in der Mock-Kontrollprobe somit  $1,0 \pm 0,07$  und in den Mock-Patientenzellen  $0,33 \pm 0,11$  ( $p > 0,05$ ). In den Zellen, die mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Konstrukt infiziert waren, veränderte sich die Proteinmenge leicht: In den Kontrollproben + WT nahm die Menge an glykosyliertem TGN46 im Vergleich zur Mock-Kontrollprobe etwas ab ( $0,78 \pm 0,26$ ,  $p > 0,05$ ), während die hypoglykosylierte Menge anstieg ( $1,73 \pm 1,06$ ,  $p > 0,05$ ), wodurch ein Verhältnis der TGN46-Glykoformen von  $0,66 \pm 0,38$  entstand. In den Patientenzellen + WT nahm die Menge des glykosylierten Proteins im Vergleich zur Mock-Patientenprobe dagegen etwas zu ( $0,90 \pm 0,16$ ,  $p > 0,05$ ) und die hypoglykosylierte Form nahm signifikant auf  $1,63 \pm 0,59$  ( $p = 0,028$ ) ab. Das Verhältnis des Signals von glykosyliertem zu hypoglykosyliertem Blotbereich nahm daher auf  $0,60 \pm 0,14$  zu und entsprach damit in etwa dem 1,8-fachen der Mock-Patientenprobe ( $p > 0,05$ ), was aber dennoch geringer war als die Verhältnisse in den Kontrollproben (Abbildung 77 C).



Als nächstes wurden die Signale der sialinsäurebindenden Lektine WGA, SNA und MALI in den Lysaten der viral infizierten Zellen untersucht. Teilweise zeigten sich hier bereits bei den Mock-Proben Veränderungen der Glykosylierungsmuster im Vergleich zu denen der unbehandelten Zellen in Abschnitt 6.5. Da sich die Ergebnisse dieser Experimente nicht entsprachen, muss davon ausgegangen werden, dass die virale Infektion per se den Stoffwechsel der Zellen bereits veränderte. Das Signal der Lektine WGA und MALI in den Mock-Patientenproben war im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen erhöht und blieb in den Patient + WT Proben auf einem ähnlichen Level, wohingegen in den Kontrollzelllysaten + WT im Vergleich zu den Mock-Kontrollproben ein leicht erhöhtes Lektinsignal festgestellt wurde (WGA: Kontrolle Mock:  $1,0 \pm 0,24$ , Patient Mock:  $1,68 \pm 0,54$ , Kontrolle + WT:  $1,24 \pm 0,44$ , Patient + WT:  $1,61 \pm 0,32$ ,  $p > 0,05$ ; MALI: Kontrolle Mock:  $1,0 \pm 0,15$ , Patient Mock:  $1,55 \pm 0,49$ , Kontrolle + WT:  $1,40 \pm 0,22$ , Patient + WT:  $1,50 \pm 0,18$ ,  $p > 0,05$ ). Das SNA-Signal entsprach dagegen in den Mock-Proben der Kontrollzellen dem der Patientenzellen ( $1,0 \pm 0,31 / 1,04 \pm 0,31$ ,  $p > 0,05$ ) und nahm in den komplementierten Zellen leicht ab, wobei es zwischen den Zelllinien vergleichbar blieb (Kontrolle + WT:  $0,85 \pm 0,20$ , Patient + WT:  $0,85 \pm 0,15$ ,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 78). Eine Auflistung aller berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte befindet sich in Anhang Tabelle 13.

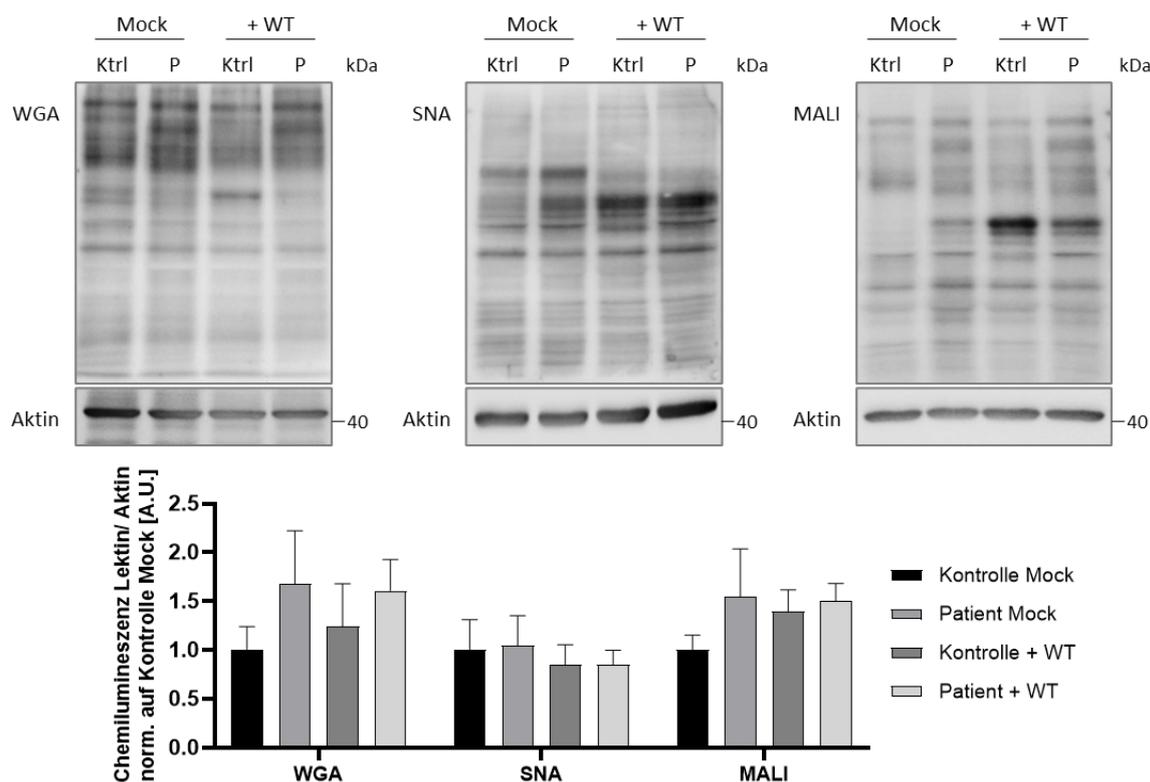


Abbildung 78: Die Signale sialinsäurebindender Lektine im Fibroblastenlysat werden bereits durch Infektion mit dem Leervektor verändert und Komplementierung mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Protein zeigt kaum Effekte. Überprüfung der Lektinsignale von WGA, SNA und MALI im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenzellen (P), die entweder mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) als Kontrolle oder dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) Vektor viral infiziert und anschließend mit Neomycin selektiert wurden. Die quantifizierten Lektinsignale wurden auf Aktin als Ladekontrolle und auf den Mittelwert der Mock-Kontrollprobe normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Die Ergebnisse waren nicht signifikant, weshalb keine Signifikanzmarkierungen vorgenommen wurden. Eine vollständige Liste der verwendeten Werte und berechneten p-Werte befindet sich in Anhang Tabelle 13.

Schließlich wurden auch die Signale der Lektine RCAI und ECL im Lysat der infizierten Fibroblasten untersucht, die Zuckerstrukturen erkennen, denen die terminale Sialinsäure fehlt. Dabei konnte eine Erhöhung der Lektinsignale in den Mock-Patientenproben im Vergleich zur Mock-Kontrollprobe festgestellt werden: Für RCAI betrug die Signalmenge in den Mock-Kontrollzellen  $1,0 \pm 0,22$  und war in der Mock-Patientenprobe signifikant auf  $2,79 \pm 0,59$  erhöht ( $p < 0,0001$ ). Bei ECL betrug die erhöhte Signalmenge der Mock-Patientenprobe  $1,95 \pm 0,92$  und in den Mock-Kontrollzellen  $1,0 \pm 0,50$  ( $p = 0,055$ ). Im Lysat der Fibroblasten mit wildtypischem SLC35A1 nahmen die Signale der Lektine in den Kontrollzellen im Vergleich zu den Mock-Kontrollproben leicht zu (RCAI:  $1,91 \pm 0,51$  ( $p > 0,05$ ), ECL:  $1,50 \pm 0,41$  ( $p > 0,05$ )) wohingegen in den Patientenzellen + WT ein geringeres Signal als in der Mock-Patientenprobe festgestellt werden konnte (RCAI:  $1,53 \pm 0,53$  ( $p = 0,005$ ), ECL:  $1,37 \pm 0,26$  ( $p > 0,05$ )). Dieses war damit vergleichbar mit dem der Kontrollzellen + WT (Abbildung 79). Eine vollständige Liste aller in diesem Abschnitt verwendeten Quantifizierungswerte und der berechneten p-Werte befindet sich im Anhang (siehe Anhang Tabelle 13).

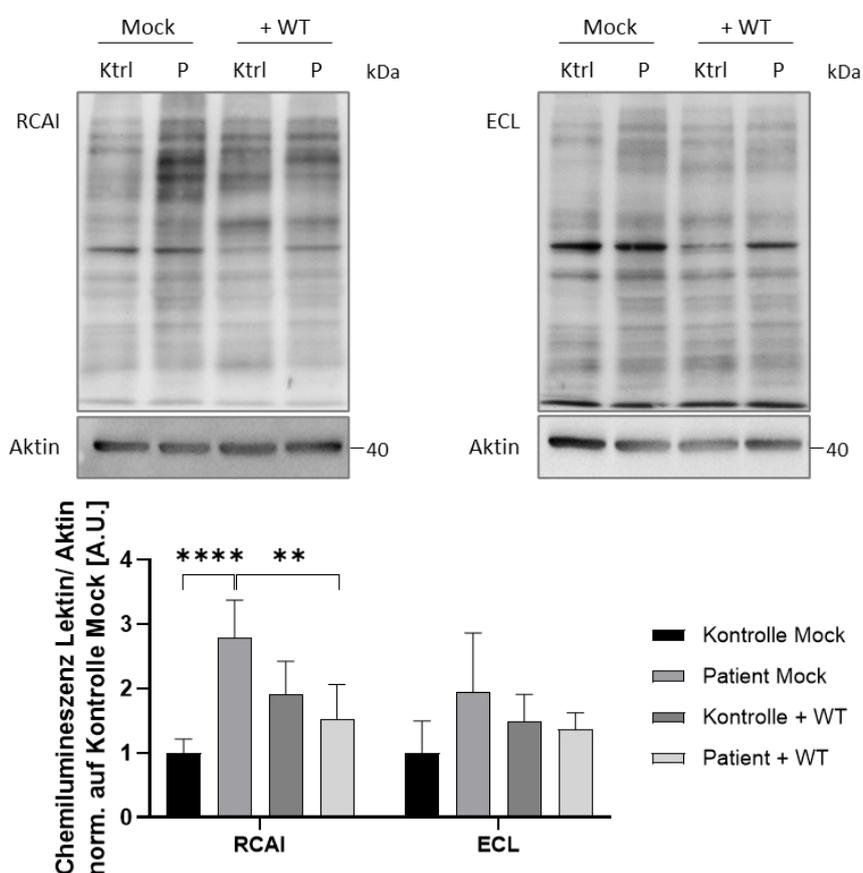


Abbildung 79: Durch Komplementierung mit dem wildtypischen SLC35A1-Protein kann ein kontrollähnliches Signal von nicht-sialinsäurebindenden Lektinen im Lysat der Patientenzellen erreicht werden. Überprüfung der Signale von RCAI und ECL im Lysat von Kontroll- (Ktrl) und Patientenzellen (P), die entweder mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) als Kontrolle oder dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA (+ WT) Vektor viral infiziert und anschließend mit Neomycin selektiert wurden. Die quantifizierten Lektinsignale wurden auf Aktin als Ladekontrolle und auf den Mittelwert der Mock-Kontrollprobe normalisiert, sodass diese dem Wert 1 entsprach. Für eine übersichtliche Darstellung wurden lediglich Signifikanzen zwischen den jeweiligen Mock- und + WT-Konditionen der gleichen Zelllinie oder den gleichen Konditionen (Ktrl Mock/P Mock bzw. Ktrl + WT/P + WT) der unterschiedlichen Zelllinien markiert. Eine vollständige Liste der verwendeten Werte befindet sich in Anhang Tabelle 13.

#### 6.16.4 Komplementierung der Patientenzellen mit dem wildtypischen SLC35A1-Protein verbessert die Proliferation minimal

Schließlich wurde auch die Proliferation der komplementierten Zellen durch das WST-1 Proliferationsassay erneut untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Expression des SLC35A1(WT)-Proteins in den Patientenzellen, die unter normalen Kultivierungsbedingungen in 6.10 eine verringerte Proliferation gezeigt hatten, zu einer höheren Wachstumsrate führt. Die Wachstumsrate der Kontrollzellen, die mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock) infiziert waren, wurde auf den Wert 1 gesetzt. Für die Kontrollzellen, die mit dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA Plasmid infiziert waren (Kontrolle + WT) wurde eine Wachstumsrate von  $1,13 \pm 0,23$  ermittelt, die damit der Wachstumsrate der Mock-Kontrollzellen glich. Die Verdopplungszeit der Kontrollprobe + WT betrug das  $0,91 \pm 0,16$ -fache der Mock-Kontrollzellen. Die Patientenzellen, die nur mit dem Leervektor infiziert waren, zeigten im Verhältnis zu den Mock-Kontrollzellen eine deutlich verringerte Proliferation mit einer Wachstumsrate von  $0,37 \pm 0,07$  und einer Verdopplungszeit von  $2,76 \pm 0,51$ . Waren die Patientenzellen mit dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA Plasmid infiziert (Patient + WT) und exprimierten somit das wildtypische SLC35A1-Protein, wurde eine Wachstumsrate von  $0,49 \pm 0,09$  und eine Verdopplungszeit von  $2,09 \pm 0,41$  im Verhältnis zu den Mock-Kontrollzellen ermittelt. Die Expression des wildtypischen SLC35A1-Proteins in den Patientenzellen führte demnach zu einer leichten Erhöhung der Proliferation, das Niveau der Kontrollzellen konnte aber nicht erreicht werden (Abbildung 80).

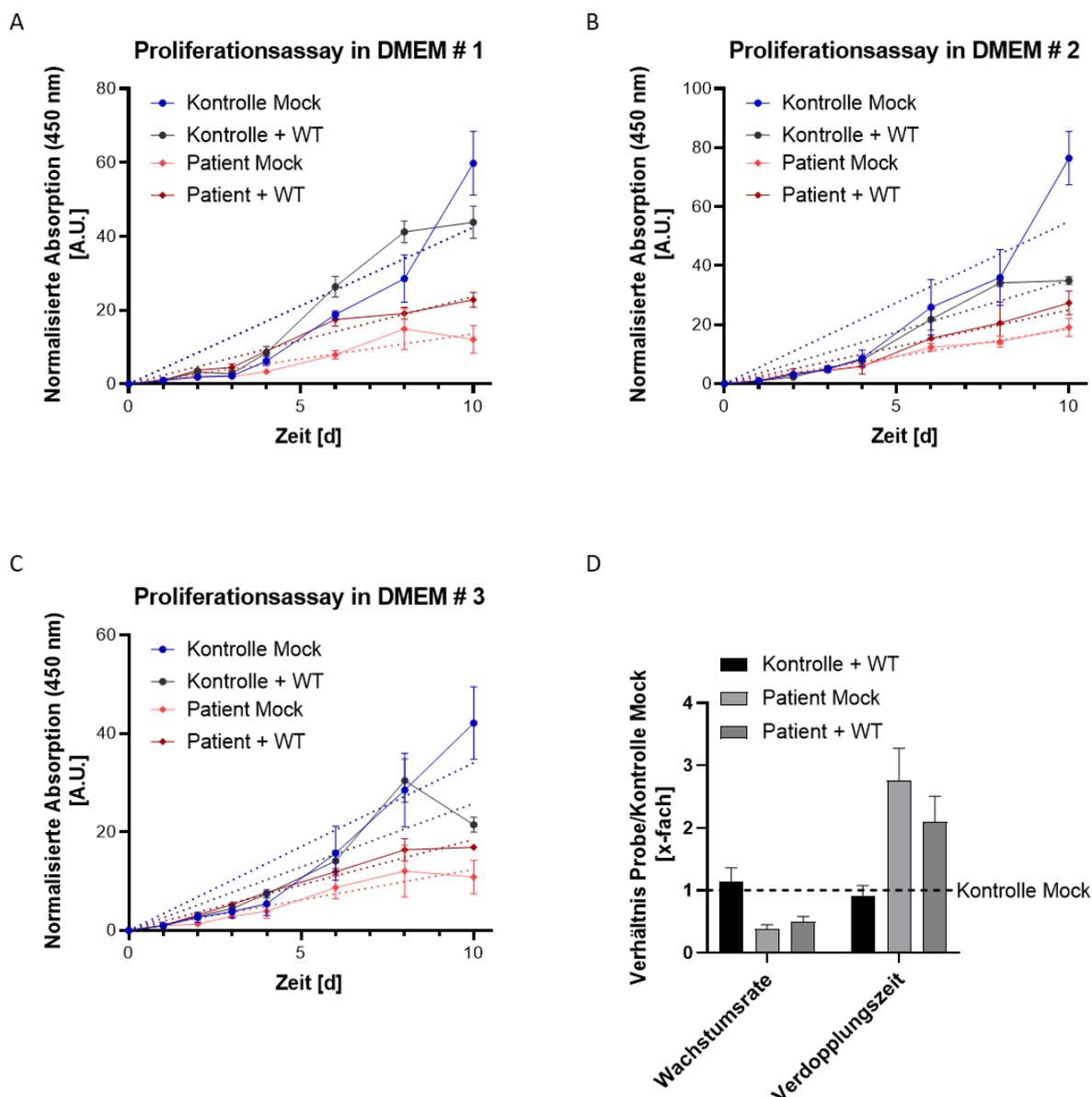


Abbildung 80: Komplementierung der Patientenfibroblasten mit dem wildtypischen SLC35A1-Protein verbessert die Proliferation minimal. Bestimmung der Proliferation von Kontroll- und Patientenfibroblasten, die durch virale Infektion entweder mit dem pLNCX2 Leervektor infiziert (Mock), oder zur Expression des wildtypischen SLC35A1-Proteins mit dem pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA Konstrukt komplementiert wurden. **A) - C)** Verschiedene Wiederholungen des Experimentes. Pro Tag wurden je drei Wells gemessen und die Absorption gemittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Absorption, der auf den entsprechenden Startwert normalisiert wurde über die Zeit der Messung. Die Fehlerbalken entsprechen der normalisierten Standardabweichung pro gemessenem Zeitpunkt. Die gepunkteten Linien stellen jeweils die lineare Trendlinie der Wachstumskurve dar. **D)** Die Steigung der normalisierten Absorption über die Zeit wurde dazu verwendet die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit der Zelllinien zu berechnen. Das Diagramm stellt den Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses dieser Werte der verschiedenen Zellen zu den Mock-Kontrollzellen aus den Triplikaten dar. Die Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Kontrollzellen mit Leervektor (Mock) entsprach dabei einem Wert von 1.

## 7 Diskussion

SLC35A1-CDG ist eine sehr seltene Glykosylierungsstörung, die auf einem genetischen Defekt des SLC35A1-Proteins beruht. Bislang waren lediglich fünf Patientenfälle mit diesem CDG-Typ bekannt, die durch vier verschiedene *SLC35A1*-Mutationen hervorgerufen wurden. Während dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer bisher noch nicht beschriebenen Mutation im *SLC35A1*-Gen bei einer neuen Patientin charakterisiert.

### 7.1 In silico Analyse der Mutation deutet auf milde Auswirkungen hin

Die homozygote Missense Mutation c.133G>A befindet sich in Exon 2 des *SLC35A1*-Gens, das insgesamt aus acht Exonen besteht [62]. Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin an Position 45 des SLC35A1-Proteins. Die Mutation befindet sich damit im vorderen Bereich des Gens und betrifft eine Aminosäure, die sich in der ersten Loopstruktur auf der luminalen Seite der Golgi-Membran, genau am Übergang zur zweiten Transmembrandomäne des Proteins befindet. Für Threonin<sup>45</sup> sowie die angrenzenden Aminosäuren wurde ein hohes Maß an Konservierung festgestellt, was vermuten lässt, dass diese Aminosäure für die Funktion und Struktur des Proteins von Bedeutung ist. Die Polarität ändert sich durch den Aminosäureaustausch an dieser Stelle von polar zu unpolar, was möglicherweise zu einer Internalisierung dieser Aminosäure in die Golgi-Membran führen könnte. Da Alanin aber eine kleine Aminosäure ist, mit lediglich einer Methylgruppe als Seitenkette, die eher zu keinen sterischen Behinderungen führen sollte, wurde zunächst vermutet, dass dieser Austausch zu keiner wesentlichen Veränderung in der Proteinstruktur führt. Um eine Vorhersage über die Auswirkungen des Aminosäureaustauschs zu treffen, wurde mittels in silico Analyse die Pathogenität der Mutation und potenzielle Strukturveränderungen des mutierten Proteins untersucht. Sieben der zehn verwendeten Prognose-Algorithmen für die Pathogenität der Mutation gaben an, dass diese krankheitsverursachend sein könnte. Allerdings befanden sich die Pathogenitätswerte teilweise nah an den angegebenen Grenzwerten zur nicht-pathogenen Bewertung. Die restlichen drei der verwendeten Vorhersagetools prognostizierten, dass die Mutation nicht pathogenen Charakters sei.

Die strukturelle Analyse erfolgte mittels Phyre2 und DynaMut und beruhte auf der Kristallstruktur des Mausproteins, da es aktuell noch keine kristallographischen Daten des humanen Proteins gibt. Das murine Protein weist 91 % Homologie zum humanen SLC35A1-Protein auf. Es wurde ermittelt, dass es durch die Mutation zum Verlust einer interhelicalen Wasserstoffbrückenbindung zwischen den TMDs 2 und 7 kommt, was zu Flexibilitätsänderungen sowohl im Bereich der TMD 7, der an das Golgi-Lumen angrenzt, als auch, möglicherweise als sekundärer Effekt, in weiteren Bereichen des Proteins zu führen scheint. In TMD 7 befinden sich die Aminosäuren Tyr<sup>214</sup> und Ser<sup>216</sup>, die für die Bindung von CMP-Sialinsäure sehr wichtig sind [55], [56]. Es könnte daher sein, dass die Bindung des Substrates durch die Änderung der Flexibilität in diesem Bereich nicht mehr so effizient stattfinden kann. Zudem gaben die Tools vor allem potenzielle Änderungen der Flexibilität in mehreren Loop-Bereichen des Proteins an. Loop-Strukturen befinden sich meist auf der Außenseite von Proteinen und tragen zu deren Form,

Dynamik und physikochemischen Eigenschaften bei [137]. Sie sind allgemein wichtig für z.B. Interaktionen mit anderen Proteinen oder Substraten [138]. Veränderungen in der Orientierung der Loop-Strukturen könnten daher die Funktionalität beeinträchtigen. Die berechneten Werte für die Änderung der freien Gibbs-Energie und Vibrationsentropie ergaben, dass die Mutation insgesamt stabilisierende Eigenschaften und eine reduzierte Molekülflexibilität zur Folge hat, was aufgrund der daraus resultierenden, potenziell verminderten Beweglichkeit bedeuten könnte, dass es zu einer Versteifung der Proteinstruktur kommt. Dadurch könnte die Funktion des Proteins, beispielsweise durch Behinderung der Konformationsänderung beim Transport des Substrates, beeinträchtigt werden. Die vom Phyre2 Webserver prognostizierte Proteinstruktur zeigte außerdem eine Veränderung im Bereich des dritten luminalen Loops, die zu einer Verengung des Substrat-Austrittskanals auf der luminalen Seite des Proteins führen und damit ebenfalls die Effizienz des Transports vermindern könnte (Abbildung 14 B). Zudem schließt dieser Loop an die TMD 5 an, in der sich die meisten der wichtigen Glycin-Reste, die für die Bildung eines hydrophilen Kanals für den Substrattransport essenziell sind, befinden [57], [66]. Eine Strukturänderung des Loops könnte möglicherweise auch die angrenzende TMD und damit den Transport des Zuckersubstrats beeinflussen. Allerdings zeigte die Kristallstruktur an der besagten Stelle ein geringeres Konfidenzniveau als bei der restlichen Struktur, was bedeutet, dass die Struktur bei der kristallographischen Untersuchung hier nicht genau entschlüsselt werden konnte. Daher ist die Möglichkeit, dass es an dieser Stelle zu einer Strukturveränderung kommen könnte kritisch zu betrachten. Die bei der Patientin betroffene Aminosäure an Position 45 befindet sich zwar unweit der Aminosäuren E<sup>52</sup> und K<sup>55</sup>, die an der Bindung von CMP beteiligt sind [139], aber nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums bzw. der weiteren Aminosäuren, die für die Substratbindung wichtig sind (Q<sup>101</sup>, N<sup>102</sup>, T<sup>260</sup>, K<sup>124</sup>, T<sup>128</sup>, S<sup>188</sup>, K<sup>272</sup> [139], Tyr<sup>214</sup> und Ser<sup>216</sup> [55], [56]). Es ist deshalb eher unwahrscheinlich, dass die Mutation zu einer vollständigen Inaktivierung des Proteins führt. Stattdessen könnte sie aber eine reduzierte Aktivität zur Folge haben. Dafür sprach auch die Bewertung der Mutation mit dem Prognosetool MutationAssessor, das die Funktionalität des mutierten Proteins einschätzte. Dieses Tool gab an, dass die Funktionalität des mutierten Proteins im mittleren Bereich liegt.

Die eher geringfügigen Änderungen der freien Gibbs-Energie und Vibrationsentropie sowie die nicht eindeutige Aussage der Vorhersagetools bezüglich der Pathogenität der Mutation lassen darauf schließen, dass die Mutation eher milde Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Proteins hat. Auch die Einschätzung des MutationAssessor-Tools, dass dem mutierten Protein eine mittlere Funktionalität zuschrieb, deutet darauf hin, dass die Transporterfunktion des SLC35A1-Proteins durch den Aminosäureaustausch vermutlich nicht so stark betroffen ist. Allerdings bleibt zu beachten, dass die strukturellen Vorhersagen auf Kristallstrukturen des Mausproteins beruhen und nicht auf dem humanen SLC35A1-Protein. Zudem ist das Protein in der Zelle in der Golgi-Membran verankert. Die Mutation könnte daher in vivo Auswirkungen auf die Proteinstruktur, Funktionalität oder Dynamik in der Membran haben, die anhand der Kristallstruktur nicht vorhergesagt werden können.

## 7.2 Geringfügige Auffälligkeiten bei Routinediagnostikverfahren

Die Analyse des Patientenserums mittels der Standardmethode der CDG-Diagnostik, IEF, zeigte sowohl bei den N-Glykosylierungsmarkerproteinen Transferrin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin als auch bei ApoCIII, das als O-Glykosylierungsmarker diente, ein unauffälliges Ergebnis: Die Banden der verschiedenen Glykoformen der Proteine entsprachen denen der Kontrolle. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da die Laufweite der Protein-Glykoformen vor allem durch die endständigen, negativ geladenen Sialinsäurereste bestimmt wird. Daher wurde angenommen, dass bei einer Patientin mit mutiertem Sialinsäuretransporter die Bandenmuster bei der IEF auffällig verändert sein müssten. Es wäre möglich, dass die Mutation der Patientin das SLC35A1-Protein nur geringfügig beeinflusst, worauf auch die *in silico* Analyse hindeutet, und die Aktivität ausreicht, um eine normale Sialylierung der Serumproteine zu gewährleisten. Allerdings wurde auch bei dem ersten, von Martinez-Duncker *et al.* beschriebenen und sehr schwer betroffenen, SLC35A1-CDG Patienten von einer normalen Transferrin-IEF berichtet [107]. Transferrin trägt im vollständig glykosylierten Zustand zwei biantennäre N-Glykane mit jeweils zwei terminale Sialinsäureresten, die über eine  $\alpha$ -2,6 Verknüpfung an Galaktose gebunden sind. Es wäre deshalb möglich, dass das unauffällige Bandenmuster aufgrund einer normalen  $\alpha$ -2,6 Sialylierung zu Stande kommt, wobei andere Arten der Sialylierung aber dennoch betroffen sein können. Hinweise darauf gab es durch eine auffällig veränderte  $\alpha$ -2,3 Sialylierung im Serum und dem Fibroblastenlysat der Patientin auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird (siehe 7.3). Dies könnte auf eine Regulation hindeuten, die dafür sorgt, dass bestimmte Verknüpfungen bevorzugt werden. Außerdem bleibt zu beachten, dass es nicht bei allen CDG-Typen zu eindeutigen IEF-Ergebnissen kommt. Manche Glykosylierungsstörungen sind nur sehr schwer oder gar nicht mit dieser Methode zu identifizieren. Dazu gehören beispielsweise andere Transporterdefekte wie SLC35A3- und SLC35A2-CDG, aber auch PMM2-CDG oder Defekte bei denen die Fucosylierung betroffen ist. Und auch SLC35A1-CDG wurde bereits in die Liste der CDG-Typen mit teilweise normalen Bandenmustern bei einer Transferrin-IEF aufgenommen [83].

Um einen Eindruck über die Gesamtheit der N-Glykane im Serum und den Fibroblasten der Patientin zu bekommen, wurde diese mittels UPLC mit FLR-Detektor analysiert. Auch hier war das Profil der N-Glykane im Serum vergleichbar mit der Kontrollprobe und zeigte keine Auffälligkeiten. Lediglich die prozentuale Menge an trisialylierten Glykanen war reduziert. Demnach scheint es bei der Patientin Probleme bei der vollständigen Sialylierung von Serumproteinen zu geben, die komplexere Glykanstrukturen mit mindestens drei Sialinsäureresten tragen. Das N-Glykanprofil des Fibroblastenlysats unterschied sich generell deutlich von dem der Serumproben, auch bei den Kontrollen. Dies verdeutlicht, dass Glykosylierungsmuster je nach Organ oder Zelltyp stark variieren können. Zudem konnten im Lysat der Patientenfibroblasten Auffälligkeiten bei der Menge einzelner Glykane festgestellt werden: Die Strukturen M2, F(6)A2G(4)2 und F(6)A4G(4)4S(3)1 waren in der Patientenprobe reduziert und M3 lag erhöht vor. Die veränderte Menge von M2 und M3 deutet darauf hin, dass es bei der Patientin bereits bei frühen Schritten des N-Glykosylierungsprozesses zu Beeinträchtigungen kommt. Dies könnte an deregulierten Proteinen liegen, die für die jeweiligen Schritte benötigt werden, oder an einer

mangelnden Verfügbarkeit von Zuckersubstraten. Die erhöhte bzw. reduzierte Menge dieser auffällig veränderten N-Glykane könnte in Zukunft möglicherweise als Marker für die Diagnostik von SLC35A1-CDG verwendet werden. Allerdings wurde die Glykanmessung bisher nur ein Mal durchgeführt, weshalb eine spezifische Veränderung noch nicht bestätigt werden konnte. Außerdem müssten auch die Glykanprofile der Fibroblasten weiterer SLC35A1-CDG Patienten untersucht werden, um festzustellen, ob diese ein ähnliches Muster aufweisen. Im Hinblick auf die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Glykane, wurde eine Reduktion von trisialylierten sowie triantennären Strukturen in den Zellen der Patientin ermittelt. Daraus lässt sich schließen, dass, wie auch bei den Serumglykanen, die Sialylierung aber auch der Aufbau von komplexeren Glykanen beeinträchtigt zu sein scheint. Möglicherweise ist bei der Patientin die Bereitstellung des Zuckersubstrats Sialinsäure durch das mutierte SLC35A1-Protein nicht effizient genug, um eine vollständige Sialylierung von Strukturen mit einer höheren Anzahl an Sialinsäureresten zu gewährleisten. Es könnte auch einen Mechanismus geben, durch den die Sialylierung bestimmter Glykanten oder Glykoproteine eine höhere Priorität hat. Schließlich befinden sich auch in den Kontrollproben weniger trisialylierte Glykane im Vergleich zur Menge an nicht-sialylierter bzw. mono- und disialylierter Zuckerstrukturen. Es könnte also sein, dass die ohnehin schon geringere Menge an trisialylierten Strukturen dazu führt, dass diese bei einer reduzierten Sialinsäureverfügbarkeit vernachlässigt und stattdessen die häufigeren Strukturen vervollständigt werden. Eine Erklärung für eine solche Regulation könnte eine mögliche Interaktion des Transporterproteins mit bestimmten Sialyltransferasen sein, die zusammen die Effizienz der Sialylierung steuern.

Durch die radioaktive Markierung von dolicholgebundenen Oligosacchariden und deren Auftrennung durch HPLC wurden die LLOs aus den Fibroblasten der Patientin analysiert. Dadurch wurde untersucht, ob es schon bei frühen Schritten der N-Glykansynthese zu Problemen bzw. Akkumulationen kommt. Tatsächlich wurde bei der Messung in der Patientenprobe eine erhöhte Menge des LLOs Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> festgestellt. Eine Anhäufung dieses Oligosaccharids steht normalerweise im Zusammenhang mit dem Glykosylierungsdefekt ALG11-CDG, da die  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase ALG11 dieses verkürzte LLO mit weiteren Mannoseresten verknüpft [140]. Ist dieses Enzym defekt, kann es zu einer Anhäufung des LLO-Substrates kommen. Allerdings trägt die Patientin laut der durchgeführten Whole-Exome-Sequenzierung keine Mutation im *ALG11* Gen und somit wäre auch keine Beeinträchtigung des ALG11-Proteins zu erwarten. Dennoch wäre es möglich, dass es durch einen sekundären Effekt zu einer Beeinträchtigung der LLO-Synthese in den Patientenzellen kommt. In diesem Fall könnte es sein, dass die LLO-Akkumulation nur in einem bestimmten metabolischen Zustand der Zellen auftritt, der von der Phase des Zellzyklus, der Zelldichte oder des Nährstoffzustandes zum Zeitpunkt des Experimentes abhängig sein könnte. Auch bei ALG11-CDG Patienten kann eine Akkumulation des Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> LLOs nur dann festgestellt werden, wenn die Zellen durch eine Reduktion des Glucosegehalts im Medium auf 20 % und eine längere Hungerperiode von bis zu 24 h gestresst werden [140]. Zudem fanden Beriault *et al.* heraus, dass eine erhöhte Menge an zellulärem Glucosamin ALG11 zu inhibieren scheint und zu einer Akkumulation des LLOs Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> führte [141]. In den Zellen der Patientin wurde eine erhöhte Menge

an UDP-GlcNAc gemessen (siehe 0), was möglicherweise durch eine Art Rückstau aufgrund einer Akkumulation von CMP-Sialinsäure durch die reduzierte Transporteraktivität hervorgerufen werden könnte. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch in den Zellen der Patientin ein erhöhtes Level an Glucosamin für die Akkumulation des Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> LLOs verantwortlich ist.

Leider konnte das Ergebnis der LLO-Analyse bei weiteren Wiederholungen des Experimentes mit den Patientenzellen nicht mehr reproduziert werden. Es wäre möglich, dass der auffällige Dol-P<sub>2</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> Peak der Patientenprobe in diesem Experiment lediglich ein Mess-Artefakt war. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass sich die äußeren Bedingungen bei der Durchführung der Wiederholungen unterschieden, sich die Zellen beim ersten Experiment in einem Wachstumszustand befanden oder länger im Hungermedium verblieben (normalerweise 16 h) als bei den folgenden Wiederholungen und schließlich nur dadurch der Effekt beobachtet werden konnte. Diese Theorie könnte durch eine weitere Wiederholung des Experiments überprüft werden, bei dem die Zellen der Patientin für unterschiedlich lange Zeiten mit dem Hungermedium inkubiert werden, um festzustellen, ob eine längere Hungerphase wieder zur Akkumulation des LLOs führt. In Bezug auf den möglichen Zusammenhang mit einem erhöhten Glucosamin-Level wäre es möglich, dass dieser in den Zellen je nach metabolischem Status schwankt. Es wurde berichtet, dass es erst ab einem bestimmten Grenzwert der Glucosamin-Menge zu einer Akkumulation des LLOs kommt [141]. Es wäre daher denkbar, dass dieser Grenzwert bei den Patientenzellen nur unter bestimmten Bedingungen überschritten wird.

### 7.3 Erhebliche Veränderungen der allgemeinen Glykosylierung in den Patientenfibroblasten

Die allgemeine Glykosylierung wurde im Serum und den Fibroblasten der Patientin durch Signaldetektion verschiedener Lektine sowie die Proteinexpression der Glykosylierungsmarker ICAM1, GP130 und TGN46 untersucht. Die Menge der vollständig glykosylierten Markerproteine ICAM1 und GP130 war im Lysat der Patientenzellen stark reduziert und bei TGN46 konnte eine Verschiebung der Laufhöhe beobachtet werden, was für einen N-Glykosylierungsdefekt bei der Patientin spricht. Des Weiteren wurde die Bindung verschiedener Lektine im Serum und dem Lysat der Patientenzellen untersucht, die entweder Glykokonjugate mit Sialinsäure (WGA, SNA, MALI) erkennen oder Galaktosereste binden, die freiliegen, wenn die endständige Sialinsäure fehlt (ECL, RCAI). Im Serum waren das Lektinsignal von WGA, mit dem generell N-Glykane, aber auch solche mit Sialinsäure, nachgewiesen werden können, signifikant reduziert. Dass laut dieses Ergebnisses die Gesamtmenge der N-Glykane im Serum der Patientin verringert war, die bereits beschriebene N-Glykananalyse aber unauffällig (siehe 0), kann damit begründet werden, dass zwar die generelle Menge der N-Glykane, nicht aber deren Verteilung beeinträchtigt ist. Dadurch konnte ein kontrollgleiches Profil bei der N-Glykananalyse beobachtet werden, die Signalstärke der einzelnen Peaks war bei der Patientenprobe aber geringer als beim Kontrollpool. Auch das Signal des Lektins MALI, das an  $\alpha$ -2,3 gekoppelte Sialinsäure bindet, war im Serum der Patientin signifikant reduziert. Die Menge an  $\alpha$ -2,6 gebundenen Sialinsäureresten war aufgrund des nicht signifikanten, leicht reduzierten SNA-Signals nur leicht verändert. Demnach ist bei den Serumproteinen der Patientin

hauptsächlich die Sialylierung in  $\alpha$ -2,3 Verknüpfung vermindert. Die  $\alpha$ -2,6 Sialylierung ist dagegen kaum reduziert, was wiederum auf eine Regulation der verschiedenen Arten der Sialylierung hindeuten könnte. Zudem könnte dies eine Erklärung für das unauffällige Bandenmuster der Transferrin-IEF sein (siehe 0), da dieses Protein nur  $\alpha$ -2,6 gekoppelte Sialinsäurereste trägt. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch im Lysat der Patientenfibroblasten gemacht werden. Das WGA und SNA-Signal war hier vergleichbar mit der Kontrollprobe, aber die Bindung von MALI war signifikant reduziert. Demzufolge sind auch in den Zellen der Patientin besonders die Glykokonjugate mit  $\alpha$ -2,3 gebundenen Sialinsäureresten betroffen. Dies könnte daran liegen, dass  $\alpha$ -2,6 gekoppelte Sialinsäure häufiger vorkommt als die anderen möglichen Verknüpfungen  $\alpha$ -2,3 und  $\alpha$ -2,8 [142], sodass die weniger prominente  $\alpha$ -2,3 Sialylierung bei einem Mangel an Zuckersubstrat möglicherweise vernachlässigt wird. Ederveen *et al.* stellten ebenfalls fest, dass ein SLC35A1-Defekt größere Auswirkungen auf die  $\alpha$ -2,3 Sialylierung von Plasmaproteinen hat als auf die  $\alpha$ -2,6 verknüpften Sialinsäurereste [142]. Dies könnte auf einer Regulation der Sialylierungstypen durch direkte Interaktionen des SLC35A1-Transporters mit verschiedenen Sialyltransferasen beruhen. Bisher wurde bereits die Interaktion von SLC35A1 und der  $\alpha$ -2,3 Sialyltransferase ST3Gal4 experimentell bestätigt [143], weitere noch unentdeckte Interaktionen wären aber möglich. Interessanterweise, konnten Wiertelak *et al.* zeigen, dass die bekannte *SLC35A1*-Mutation Glu196Lys dazu führt, dass die Interaktion des Transporters mit der Sialyltransferase ST3Gal4 nicht mehr stattfinden kann [143]. Dies könnte auch bei anderen SLC35A1-CDG Patienten der Fall sein und eine Erklärung bieten, weshalb die  $\alpha$ -2,3 gekoppelte Sialylierung bei manchen der Patienten stärker betroffen ist als andere Sialylierungstypen.

Das Signal der Lektine RCAI und ECL, die verwendet wurden um Glykane, denen endständige Sialinsäurereste fehlen, zu detektieren, waren im Serum vergleichbar mit dem Kontrollpool. Im Lysat der Patientenfibroblasten dagegen war das RCAI-Signal signifikant erhöht. Die Färbung mit ECL führte zwar zu einem kontrollähnlichen Signal in der Quantifizierung, aber das detektierte Bandenmuster unterschied sich deutlich von der Kontrollprobe. Demnach war der Glykosylierungs- bzw. Sialylierungsdefekt der Patientin erneut nur im Lysat der Fibroblasten deutlich zu erkennen und nicht in der Serumprobe. Da die Lektinfärbungen und auch die Routinediagnostik mit dem Serum der Patientin jeweils zu eher unauffälligen Ergebnissen führten, in den Fibroblasten aber eindeutige Glykosylierungsprobleme detektiert werden konnten, wird vermutet, dass der Effekt der *SLC35A1*-Mutation organ- oder zelltypspezifisch sein könnte. Möglicherweise gibt es in anderen Organen, wie der Leber, die das Hauptorgan für die Synthese von sekretierten Serumproteinen ist, eine organspezifische Variante des SLC35A1-Proteins, die von der Mutation nicht beeinträchtigt wird. Es könnte beispielsweise auch eine andere Spleißvariante exprimiert werden, bei der die Patientenmutation nicht zum Tragen kommt, oder ein ganz anderes Protein exprimiert werden, das für den Sialinsäuretransport (mit-)verantwortlich ist. Es ist bereits bekannt, dass manche der SLC35-Transporter redundante Funktionen haben: SLC35A2 kann neben UDP-Galaktose auch UDP-GlcNAc transportieren und damit die Funktion von SLC35A3 übernehmen [144]. Auch SLC35A1 kann nicht nur CMP-Sialinsäure, sondern auch CDP-Ribitol transportieren [60]. Es wäre also möglich, dass ein anderer Transporter den

CMP-Sialinsäuretransport übernehmen könnte, wenn SLC35A1 defekt ist, dieses Protein aber nur in bestimmten Zelltypen exprimiert wird.

In einer Publikation von Szulc *et al.* wurde berichtet, dass als Folge der bereits bekannten, krankheitsverursachenden *SLC35A1*-Mutationen Gln101His (homozygot) und Thr156Arg/Glu196Lys (compound heterozygot), die in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen exprimiert wurden, die O-Glykosylierung stärker betroffen war als die N-Glykosylierung [64]. Um zu überprüfen, ob auch bei der hier untersuchten, neuen Patientin eine Beeinträchtigung der O-Glykosylierung vorliegt, wurde das Zelllysate mit den Glykosidasen PNGase F und O-GlyZOR verdaut und anschließend erneut das Markerprotein TGN46 detektiert, welches sowohl N- und O-glycosyliert als auch O-GlcNacyliert ist. Die verwendeten Enzyme entfernen N-Glykane bzw. O-Glykane des Mucintyps. Bereits bei der unverdauten Patientenprobe fiel eine Bande im unteren Bereich auf, die bei der Kontrollprobe erst nach O-GlyZOR-Verdau, also nach Entfernen der O-Glykane zum Vorschein kam. Demnach scheint diese Bande einer Glykoform des Proteins zu entsprechen, der die O-Glykane fehlen. Bei der Patientenprobe wurde die Bande durch den O-GlyZOR-Verdau noch stärker, was darauf hindeutet, dass zwar noch restliche O-Glykane vorhanden waren, die entfernt werden konnten, aber insgesamt eine unvollständige O-Glykosylierung in den Patientenzellen stattfindet. Auch nach PNGase F-Verdau war im Lysat der Patientenzellen eine Verschiebung in der TGN46 Laufhöhe zu erkennen. Demnach scheint das Protein in den Patientenzellen ebenfalls noch N-Glykane zu tragen, die durch das Enzym entfernt werden konnten. Allerdings glich sich das Verhältnis der Banden der Kontroll- und Patientenprobe hier mehr an als nach O-GlyZOR-Verdau, bei dem die N-Glykane noch vorhanden waren. Der Unterschied der Bandenverteilung nach O-GlyZOR-Verdau scheint demnach von der noch verbliebenen bzw. reduzierten Anzahl der N-Glykane in den Patientenzellen zu stammen. Daraus lässt sich schließen, dass zwar auch die O-Glykosylierung, vor allem aber die N-Glykosylierung in den Zellen der Patientin betroffen ist. Dass die O-Glykosylierung des Serumproteins ApoCIII bei der IEF unauffällig ausfiel, es aber bei der Detektion von TGN46 im Zelllysate Hinweise auf eine beeinträchtigte O-Glykosylierung gab, könnte daran liegen, dass TGN46 mehr O-Glykane trägt als ApoCIII (nach DTU Health Tech: 8 statt 1) und der Effekt einer unvollständigen Glykosylierung dadurch besser zum Vorschein kommt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich erneut um organspezifische Unterschiede handelt. Da sowohl durch das Entfernen der N- als auch der O-Glykane kein Bandenmuster entstand, das mit dem der Kontrolle übereinstimmte, wird von einem kombinierten Glykosylierungsdefekt ausgegangen. Die Bandenunterschiede könnten durch die noch verbleibenden O-GlcNAcylierungen des TGN46-Proteins hervorgerufen werden, die bei der Patientin ebenfalls betroffen sind, worauf in Abschnitt 7.10 genauer eingegangen wird. Um dies mit der Detektion des TGN46-Proteins nachzuweisen, könnte in Zukunft ein Doppelverdau mit PNGase F und O-GlyZOR durchgeführt oder zusätzlich eine O-GlcNAcase verwendet werden.

Weiterhin wurde die generelle Menge an O-Glykanen durch die Signale der Lektine PNA und Jacalin im Serum und Zelllysate untersucht. PNA bindet an O-Glykane, denen die endständige Sialinsäure fehlt, während Jacalin auch sialylierte O-Glykane erkennen kann. Sowohl im Serum der Patientin als auch dem Fibroblastenlysate wurde ein leicht erhöhtes Signal an PNA und eine leicht

reduzierte Signalstärke von Jacalin im Vergleich zu den Kontrollproben festgestellt. Im Lysat der Patientenzellen fielen die Unterschiede etwas deutlicher aus, waren aber in beiden Fällen nicht signifikant. Dennoch deuten diese Ergebnisse auf eine Beeinträchtigung der O-Glykosylierung im Allgemeinen hin: Das reduzierte Jacalin-Signal zeigt, dass insgesamt etwas weniger O-Glykane des Mucintyps in den Patientenproben vorhanden sind. Von diesen liegt vermehrt die nicht-sialylierte Form vor, aufgezeigt durch das erhöhte PNA-Signal. Dadurch konnte gezeigt werden, dass auch die O-Glykosylierung und die Sialylierung der O-Glykane bei der Patientin leicht betroffen sind, der beobachtete Glykosylierungsdefekt aber vermutlich hauptsächlich durch eine Beeinträchtigung der N-Glykosylierung hervorgerufen wird.

### 7.3.1 Lektinsignale in den Patientenzellen entsprechen einem defekten SLC35A1-Transporter in HEK293-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Signalauffälligkeiten der verschiedenen Lektine in den Fibroblasten der Patientin auf einen defekten SLC35A1-Transporter zurückzuführen sind, wurden die Lektinfärbungen zusätzlich mit dem Lysat von HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen durchgeführt. Die K.o.-Zelllinie wurde mittels CRISPR/Cas9 generiert und diente als Modell, um die Auswirkungen eines defekten Sialinsäuretransporters in einem definierten genetischen Hintergrund zu untersuchen. Der K.o. des *SLC35A1*-Gens wurde durch die homozygote Insertion eines Adenins hervorgerufen, das zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu einem verfrühten Stopp-Codon führt. Ob der K.o. des Gens erfolgreich war, wurde durch Überprüfung der mRNA und Proteinexpression mittels qPCR und ELISA ermittelt. Dabei wurde eine deutlich signifikante Reduktion der Transkriptmenge auf nur etwa 3 % festgestellt, wodurch der K.o. bestätigt werden konnte. Die verbleibende, minimale Menge konnte möglicherweise dadurch gemessen werden, dass sich die Template-Sequenz des Fw-Primers für die qPCR noch im mutierten Transkript befindet und somit eine geringe Menge amplifiziert werden konnte. Der Rev-Primer sollte dagegen aufgrund des vorzeitigen Stopp-Codons nicht mehr binden können. Die Proteinmenge betrug laut SLC35A1-ELISA trotz der reduzierten Transkriptmenge noch etwa 41 %. Dies könnte daran liegen, dass das durch die Mutation auf 64 statt 338 Aminosäuren verkürzte Protein möglicherweise trotzdem noch von dem Antikörper des ELISA-Kits gebunden werden kann. Dass ein so stark verkürztes Protein als Transporter in der Golgi-Membran noch funktionsfähig wäre, ist aber sehr unwahrscheinlich. Zudem könnte es sein, dass durch den SLC35A1-Antikörper des ELISA-Kits auch andere SLC35A-Proteine gebunden werden können, da deren Sequenzen sehr ähnlich sind. Beispielsweise weisen der SLC35A2 und SLC35A3 Transporter, laut NCBI BLAST-Untersuchung, jeweils 90 % bzw. 89 % Homologie (47 % bzw. 42 % Identität) zum SLC35A1-Protein auf.

Die Lektinfärbungen im Lysat der K.o.-Zelllinie wurde mit dem Signal in wildtypischen HEK293-Zellen verglichen, um einen Eindruck zu bekommen, welche Auswirkungen ein *SLC35A1* K.o. auf die N-Glykane und vor allem auf deren Sialylierung hat. Es stellte sich heraus, dass die Signale von WGA und MALI signifikant reduziert und ECL sowie RCAI signifikant erhöht waren, das SNA-Signal aber vergleichbar mit den HEK293 WT-Zellen blieb. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein defekter SLC35A1-Transporter auch in einem definierten genetischen Hintergrund zu einem Mangel an sialylierten N-Glykanen führt, die  $\alpha$ -2,6 Sialylierung davon aber

nicht betroffen ist. Dies spricht dafür, dass entweder ein kleiner Teil an Sialinsäure noch transportiert werden kann und diese fast ausschließlich für die  $\alpha$ -2,6 Sialylierung genutzt wird oder dass es eine alternative Route für die Aufrechterhaltung der  $\alpha$ -2,6 Sialylierung gibt. Auch Maszczak-Seneczko *et al.* beschrieben, dass in einer HEK293T *SLC35A1* K.o.-Zelllinie die sialylierten Strukturen reduziert waren, eine geringe Menge jedoch trotzdem detektiert werden konnte [54]. Dies spricht dafür, dass *SLC35A1* zwar der Haupttransporter ist, es aber auch eine *SLC35A1*-unabhängige Aufnahme von CMP-Sialinsäure in den Golgi-Apparat zu geben scheint [54], [64].

Die Ergebnisse der Lektinfärbungen lassen darauf schließen, dass auch die Signalveränderungen in den Patientenzellen auf einen defekten *SLC35A1*-Transporter zurückzuführen sind. Schließlich konnte auch in den Fibroblasten eine reduzierte Signalstärke von MALI, auffällige RCAI- und ECL-Signale und eine normale SNA-Bindung festgestellt werden. Lediglich WGA war in den Fibroblasten, anders als im Lysat der HEK293 K.o.-Zellen, vergleichbar mit der Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen also eine ähnliche Tendenz der Lektinfärbungen, wobei die Beeinträchtigung in den Fibroblasten der Patientin nicht ganz so deutlich waren, wie in den HEK293 K.o.-Zellen. Eine Begründung dafür könnte sein, dass der *SLC35A1*-Transporter in den Patientenzellen zwar ebenfalls einen Defekt aufweist, die Mutation aber zu einer weniger starken Beeinträchtigung des Proteins führt als der K.o. des Gens in den HEK293-Zellen. Immerhin wurde in den Patientenzellen eine hohe Restaktivität des mutierten Transporterproteins von 65,5 % gemessen (siehe 7.4). Da im Lysat der HEK293 K.o.-Zellen anhand der Lektinsignale ein Sialylierungsdefekt erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden diese als eine geeignete Modellzelllinie bewertet, die auch für weitere Untersuchungen der generellen Auswirkungen eines defekten *SLC35A1*-Transporters verwendet wurde. Es bleibt allerdings zu beachten, dass es zelltypspezifische Unterschiede im Stoffwechsel und den Glykosylierungsmustern geben kann und somit die Daten, die durch Verwendung der HEK293 K.o.-Zellen entstanden sind, nicht unbedingt direkt mit denen der Fibroblasten vergleichbar sind.

## 7.4 Auswirkungen der Mutation auf Expression, Stabilität, Funktionalität und Aktivität des Proteins

Die Expression des *SLC35A1*-Gens wurde in den Fibroblasten der Patientin zunächst mittels qPCR und Western Blot untersucht. Dabei wurde eine kontrollähnliche mRNA-Expression ermittelt, weshalb davon auszugehen ist, dass die Stabilität des Transkriptes durch die Mutation nicht beeinträchtigt wird. Leider konnte die Menge an *SLC35A1* im Lysat der Patientenfibroblasten durch die Detektion des Proteins im Western Blot nicht überprüft werden. Die verwendeten *SLC35A1*-Antikörper von drei unterschiedlichen Herstellern führten, bei den mit RIPA-Puffer oder 0,75 % bzw. 7,5 % Sarkosyl aufgearbeiteten Zellen, lediglich zu unspezifischen Ergebnissen. Möglicherweise konnte der Golgi-Transporter durch die verwendeten Lysemethoden nicht aus der Membran isoliert werden. Dagegen spricht allerdings, dass in Lysaten, bei denen für den Zellaufschluss RIPA-Puffer verwendet wurde, andere *SLC35*-Transporter des Golgi-Apparats, wie *SLC35A3* oder *SLC35C1*, problemlos mittels Western Blot detektiert werden konnten. Es wäre dennoch möglich, dass eine andere Lysemethode geeigneter wäre, um speziell den *SLC35A1*-

Transporter zu isolieren. Beispielsweise könnten die Lysate ohne den Schritt der Erhitzung bei 95 °C aufgetragen werden, oder bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert werden, um eine Membranfraktion zu erhalten. Alternativ zum Western Blot wurde die *SLC35A1*-Expression auf Proteinebene mittels eines SLC35A1-ELISA-Kits bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteinmenge in den Zellen der Patientin signifikant auf etwa 42 % reduziert war. Die Mutation scheint also keine Auswirkungen auf das Transkript, wohl aber auf die Menge des gebildeten Proteins zu haben. Die reduzierte Proteinmenge deutet darauf hin, dass entweder weniger Protein gebildet wird, was aufgrund der unveränderten mRNA-Menge jedoch eher unwahrscheinlich ist, oder dass das gebildete Protein schneller abgebaut wird. Da letzteres mit einer verminderten Stabilität des Proteins zusammenhängen könnte, wurde die Halbwertszeit des wildtypischen SLC35A1 und des Proteins mit der Patientenmutation mit einem Cyclohexamidassay in transfizierten HEK293 K.o.-Zellen ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Halbwertszeit des Proteins mit der Patientenmutation signifikant auf etwa 62 % der Kontrolle reduziert war. Dies bedeutet, dass das mutierte Protein weniger stabil ist und schneller abgebaut wird als das wildtypische SLC35A1-Protein. Es wäre beispielsweise möglich, dass das Protein durch die Mutation nicht korrekt gefaltet wird und dadurch instabil wird oder in der Membran des Golgi-Apparates nicht richtig agieren kann und folglich abgebaut wird. Dazu könnten auch die potenziellen strukturellen Veränderungen beitragen, die durch die Prognosetools bei der *in silico* Analyse vorhergesagt wurden. Es kann dabei ausgeschlossen werden, dass der Abbau des transfizierten Proteins lediglich aufgrund des HA-Tags induziert wird, da bei dem Experiment auch das wildtypische Protein, mit dem die Halbwertszeit verglichen wurde, den C-terminalen Tag trug. Ebenfalls zu vernachlässigen sind mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz, da die quantifizierten Werte jeweils auf die Proteinmenge der gleichen Probe ohne Cyclohexamid-Behandlung normalisiert wurden.

Um auch die Funktionalität des mutierten SLC35A1-Proteins unabhängig vom genetischen Hintergrund der Patientin zu untersuchen, wurden erneut die HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen mit einem *SLC35A1*(WT)-HA oder *SLC35A1*(A133G)-HA Konstrukt oder als Kontrolle mit dem Leervektor (Mock) transient transfiziert. Die Lysate der transfizierten Zellen wurden verwendet, um mittels Western Blot die Glykosylierungsmarkerproteine GP130 und TGN46 zu detektieren sowie für die Detektion von Lektinen, die entweder sialylierte oder nicht-sialylierte Zuckerstrukturen erkennen. Das Markerprotein ICAM1 wurde in diesem Fall nicht für die Untersuchung der allgemeinen Glykosylierung verwendet, da es im Lysat von HEK293-Zellen, im Gegensatz zu Fibroblastenlysat, mittels Western Blot nur schlecht zu detektieren ist. Im Lysat der K.o. Mock-Zellen konnte sowohl bei GP130 als auch bei TGN46 eine Verschiebung in der Laufhöhe der vollständig glykosylierten Isoformen beobachtet werden. Die Markerproteine waren also hypoglykosyliert, was auf das Fehlen des SLC35A1-Proteins zurückzuführen ist. Jedoch konnte diese Verschiebung durch die Expression des wildtypischen, aber auch durch das mutierte SLC35A1-Protein wieder auf das Level der HEK293 WT Mock-Zellen angehoben werden. Beide Konstrukte führten demnach zu einer normalen Glykosylierung der Glykosylierungsmarkerproteine, was darauf schließen lässt, dass auch das transfizierte, mutierte Protein in den HEK293-Zellen funktionsfähig ist. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Detektion

der verschiedenen Lektinsignale beobachtet werden. Die signifikante Reduktion der Signale sialinsäurebindender Lektine WGA, SNA und MALI in den K.o. Mock-Zellen wurde sowohl durch Expression des *SLC35A1*(WT)-HA als auch des *SLC35A1*(A133G)-HA Konstruktes wieder normalisiert. Zwar wurden die Lektinsignale, außer bei MALI, nicht komplett auf das Niveau im Lysat der HEK293 WT Mock-Zellen angehoben, aber die Expression des mutierten Proteins hatte jeweils den gleichen Effekt wie das wildtypische. Das SNA-Signal war bei den K.o. Mock-Zellen signifikant reduziert, entsprach im Lysat von nicht transfizierten K.o.-Zellen in vorangegangenen Experimenten aber dem Signal der wildtypischen Lysate (siehe 7.3.1). Dies könnte daran liegen, dass der Transfektionsprozess zum Einbringen des Leervektors bereits Auswirkungen auf die generelle Glykosylierung in den Zellen hat. Vielleicht wird die potenziell vorhandene, alternative Route, die zur Aufrechterhaltung der  $\alpha$ -2,6 Sialylierung in den K.o.-Zellen führt, durch den Transfektionsprozess und die möglicherweise dadurch ausgelösten Änderungen im Zellmetabolismus beeinträchtigt. Zudem wäre es möglich, dass die Sialylierung je nach Zellstatus zum Zeitpunkt des Experimentes variieren kann. Auch das in den K.o. Mock-Zellen signifikant erhöhte Signal von ECL und RCAI konnte durch Expression des wildtypischen und des mutierten *SLC35A1*-Konstruktes reduziert werden, wobei auch hier das Level der HEK293 WT Mock-Zellen nicht ganz erreicht werden konnte. Demnach konnte der Glykosylierungsdefekt der K.o. Mock-Zellen durch die Expression der transfizierten Konstrukte zwar deutlich verbessert, aber die Glykosylierung bzw. Sialylierung insgesamt nicht vollständig wiederhergestellt werden. Dies könnte an der Dauer der transienten Transfektion liegen. Möglicherweise war die Expressionszeit zu kurz, um die Glykosylierung wieder vollständig herzustellen und eventuelle Unterschiede zwischen dem wildtypischen und dem mutierten Protein aufzudecken. Schließlich erfolgte die Verbesserung des Glykosylierungsdefekts durch Expression des wildtypischen als auch des Konstruktes mit dem mutierten *SLC35A1*-Gen im gleichen Umfang. Das Transporterprotein mit der Patientenmutation scheint daher, zumindest in der verwendeten HEK293-Zelllinie, noch funktionsfähig zu sein. Auch Szulc *et al.* berichteten, dass verschiedene der bekannten krankheitsverursachenden *SLC35A1*-Varianten den Sialylierungsdefekt von HEK293T *SLC35A1* K.o.-Zellen teilweise wiederherstellen konnten [64].

Es könnte sein, dass eine stabile Transfektion durch die längere Expressionsdauer oder das Einbringen der Patientenmutation in das Genom der HEK293-Zellen mittels CRISPR/Cas9 einen möglichen Effekt des mutierten Proteins besser darstellen könnte als die transient transfizierten Zellen. Der Versuch zur Generierung einer solchen, genetisch veränderten Zelllinie, die die Patientenmutation trägt, war aber leider nicht erfolgreich. Es wäre möglich, dass die transiente Transfektion und die damit einhergehende hohe Expressionsrate, durch die starke Aktivität des CMV-Promotors auf dem verwendeten Plasmid, dazu führten, dass auch das mutierte Protein in ausreichender Kopienzahl vorhanden war und die reduzierte Halbwertszeit somit nicht zum Tragen kam. Dass das exprimierte, mutierte Protein in den HEK293 K.o.-Zellen noch funktionsfähig war, bei den Patientenzellen aber durchaus ein Glykosylierungsdefekt zu beobachten ist, könnte mehrere Gründe haben. Zum einen wurde die Funktionalität in HEK293-Zellen und nicht in Fibroblasten, also in einem anderen Zelltyp, nachgewiesen - die Mutation könnte in unterschiedlichen Zelltypen auch andere Auswirkungen haben. Zum anderen kann auch der

genetische Hintergrund der Patientin eine Rolle spielen. Möglicherweise sind weitere, nicht bekannte, genetische Veränderungen in den Patientenzellen für den Glykosylierungsdefekt verantwortlich und die *SLC35A1*-Mutation spielt nur eine untergeordnete Rolle. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Zusammenspiel des genetischen Hintergrunds und der *SLC35A1*-Mutation zum beobachteten Phänotyp führen, auch wenn die Mutation selbst eher milde Auswirkungen zu haben scheint.

Neben der Funktionalität, die in den transfizierten HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen ermittelt wurde, wurde auch die Aktivität des Proteins direkt in den Fibroblasten der Patientin überprüft. Dazu wurde ein Transporterassay durchgeführt, bei dem funktionale Golgi-Vesikel aus den Zellen isoliert und der Import von radioaktivmarkierten Zuckersubstraten gemessen wurde. Neben dem Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure wurden als Kontrolle der Import von GDP-[<sup>14</sup>C]-Fucose und UDP-[<sup>14</sup>C]-Galaktose gemessen. Zunächst fiel auf, dass der Import aller Zuckersubstrate in der Patientenprobe höher war als in der Kontrolle. Durch eine Proteinbestimmung wurde zwar sichergestellt, dass die gleiche Menge der Golgi-Fraktionen aus den Patienten- und Kontrollfibroblasten für das Experiment eingesetzt wurden, allerdings wird dadurch nur der Gesamtproteinanteil angeglichen und nicht direkt die Menge der aktiven Golgi-Vesikel. Daher wäre es möglich, dass sich in der Patientenprobe mehr Vesikel befanden, oder in der Kontrollprobe durch die Bearbeitungsschritte bei der Aufarbeitung weniger aktive Vesikel enthalten waren. Da aber der CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure Import auf den jeweiligen Import der Kontrollzucker normalisiert wird und die Importverhältnisse bei der Kontroll- und Patientenprobe sehr ähnlich waren, können diese Unterschiede vernachlässigt werden. Der auf die beiden Kontrollzucker normalisierte Import von CMP-[<sup>14</sup>C]-Sialinsäure wurde gemittelt und betrug in der Patientenprobe etwa 65,5 % der Kontrolle. Um zu überprüfen, ob in den Patientenzellen lediglich der Zuckertransport oder auch die Übertragung auf Proteine durch Glykosyltransferasen beeinträchtigt ist, wurden durch Messung der Radioaktivität auch die Zucker gemessen, die während der Inkubationszeit des in-vitro Experiments auf Proteine übertragen wurden. Diese waren in der Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle leicht reduziert, aber nicht so deutlich, wie es bei einem Transferase-Defekt zu erwarten wäre. Demnach scheint die Übertragung der Zuckersubstrate in den Patientenzellen generell zu funktionieren, wenn auch möglicherweise etwas langsamer als in der Kontrolle. Da das Experiment nur zwei Mal (n=2) durchgeführt werden konnte, war es nicht möglich, die Ergebnisse statistisch auszuwerten. Dennoch korrelierte die gemessene Transporteraktivität mit den weiteren Ergebnissen. Es scheint so, dass die *SLC35A1*-Mutation in den Patientenzellen die Aktivität des Proteins reduziert, der Zuckerimport aber nicht vollständig verhindert wird. Dies stimmt auch mit der Prognose einer mittleren Funktionalität des MutationAssessor Tools überein. Zudem könnte die reduzierte Aktivität mit der auf ca. 62 % verkürzten Halbwertszeit des Proteins zusammenhängen. Es wäre möglich, dass durch die geringere Stabilität weniger Protein zur Verfügung steht und dadurch auch die im Verhältnis geringere Transporteraktivität gemessen wurde. In diesem Fall wäre das Protein noch funktional und der CMP-Sialinsäureimport von 65,5 % auf die reduzierte Stabilität bzw. Proteinmenge zurückzuführen.

Die verringerte Halbwertszeit des mutierten Proteins könnte also als Erklärung dienen, weshalb in den Zellen der Patientin trotz unverändertem mRNA-Level weniger SLC35A1-Protein durch das ELISA-Kit festgestellt werden konnte. Zudem könnte die geringere Stabilität auch der Grund für die reduzierte Transporteraktivität sein, die in den Patientenfibroblasten gemessen wurde, obwohl das mutierte Protein, zumindest in den transfizierten HEK293-Zellen, generell noch funktionsfähig zu sein scheint. Demnach scheint die Mutation weniger die Funktionalität, sondern vor allem die Stabilität und dadurch letztendlich auch die generelle Aktivität des SLC35A1-Proteins zu beeinträchtigen.

## 7.5 Das mutierte SLC35A1-Protein lokalisiert ordnungsgemäß im Golgi-Apparat

Um festzustellen, ob die Patientenmutation zu einer abweichenden intrazellulären Lokalisation des SLC35A1-Proteins führt, wurde diese mit Hilfe der Golgimarkerproteine GM130 und TGN46 sowie Detektion des HA-Tags der eingebrachten SLC35A1(WT/Thr45Ala)-Proteine mittels Immunfluoreszenz überprüft. Durch die Immunfluoreszenzaufnahmen der Zellen konnte festgestellt werden, dass der HA-Tag in allen Proben mit den Golgimarkern colokalisierte: Sowohl in den Kontroll- als auch den Patientenzellen waren das wildtypische und auch das mutierte Protein im Golgi-Apparat zu finden. Demnach beeinträchtigt weder die Mutation noch der genetische Hintergrund der Zellen die intrazelluläre Lokalisation. Es fiel jedoch auf, dass zwar in allen Kontroll- und Patientenzellen der Golgi-Apparat angefärbt war, manche aber kein Signal für den HA-Tag zeigten. Die Bindung des HA-Antikörpers scheint spezifisch zu sein, da in den Mock-Fibroblasten, wie zu erwarten, kein Signal des HA-Tags beobachtet werden konnte. An einem Durchscheinen der Fluoreszenz der Golgimarker-Antikörper (Alexa-555 gekoppelte Antikörper) in den grünen Kanal, mit dem der Alexa-488 gekoppelte HA-Antikörper aufgenommen wurde, kann diese Beobachtung nicht liegen, da in diesem Fall das Signal bei allen Zellen zu beobachten sein müsste. Außerdem findet ein Durchscheinen einer Wellenlänge in einen anderen Kanal eher von kurz- nach langwellig statt. Sollte es dazu kommen, müsste also das Signal des kurzwelligen grünen Bereichs (HA-Tag) in den langwelligeren roten Kanal strahlen (Marker), was aber nicht der Fall ist. Dass der HA-Tag nicht in allen infizierten Fibroblasten zu detektieren war, könnte auch daran liegen, dass das getaggte Protein abgebaut wird, oder bei der Zellteilung nicht weitergegeben wird und somit nur neu synthetisierte Proteine angefärbt werden konnten. Es wäre außerdem möglich, dass der HA-Tag die Funktionalität des Proteins in der Golgi-Membran behindert und deshalb von der Zelle nachträglich entfernt wird. Von einer normalen Lokalisation im Golgi-Apparat wurde auch in Bezug auf die krankheitsverursachenden SLC35A1-Varianten Gln101His und Thr156Arg/Glu196Lys berichtet [64]. Die Auswirkungen der Mutationen sind also nicht darauf zurückzuführen, dass die SLC35A1-Proteine ihren Bestimmungsort, durch eine veränderte intrazelluläre Lokalisation, nicht erreichen.

## 7.6 Komplementierung der Patientenfibroblasten mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Gen

Die Fibroblasten der Patientin wurden durch virale Infektion mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Gen komplementiert, um festzustellen, ob dessen Expression die beobachteten Glykosylierungsprobleme beheben kann. Zunächst wurde die Expression der infizierten Konstrukte durch Quantifizierung der *SLC35A1*-Transkriptmenge mittels qPCR bestätigt: Die infizierten Zellen zeigten eine deutlich höhere *SLC35A1* mRNA-Expression. In den Patientenzellen war diese mit der ca. 20-fachen Transkriptmenge im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen zwar deutlich erhöht, aber dennoch um etwa die Hälfte weniger als in den infizierten Kontrollzellen, die einen ca. 40-fachen Anstieg der mRNA-Expression zeigten. Es wäre möglich, dass es in den Patientenzellen durch die vorhandenen metabolischen Probleme zu einer reduzierten Transkription bzw. Genexpression kommt, auf die auch die Proteomik-Analyse hindeutete, die in Abschnitt 7.10 diskutiert wird. Die gemessene, 20-fache Transkriptmenge sollte aber dennoch ausreichend sein, um zu einer erfolgreichen *SLC35A1*-Expression zu führen.

Auf Proteinebene sollte die Expression der Konstrukte durch Detektion des HA-Tags nachgewiesen werden, was aber leider nicht erfolgreich war. Möglicherweise war der Grund dafür, dass wie schon beim Versuch das Protein mit SLC35A1-Antikörpern nachzuweisen, das Protein nicht richtig aufgearbeitet werden konnte und dadurch im Lysat nicht nachzuweisen war. Dagegen spricht jedoch, dass das SLC35A1-Protein mit HA-Tag in den transient transfizierten HEK293-Zellen detektiert werden konnte. Für diese Zelllinie scheint die Aufarbeitung der Zellen mit RIPA-Puffer also zu genügen. Es wäre möglich, dass der Tag die Faltung des Proteins behindert und es dadurch kurz nach der Expression wieder abgebaut oder der Tag vom Protein getrennt wird. Dafür sprechen auch die Immunfluoreszenzaufnahmen, bei denen der HA-Tag nicht in allen Zellen (sowohl in Kontroll- als auch Patientenfibroblasten) angefärbt werden konnte, obwohl diese zuvor mit Neomycin selektiert wurden und somit das eingebrachte Konstrukt mitsamt dem Resistenzgen exprimieren müssten. Es könnte auch sein, dass die virale Infektion nicht richtig funktioniert hat und das Konstrukt nicht stabil in das Genom der Zellen eingebaut wurde. Probleme mit der Expression von viral infizierten Konstrukten gab es in unserem Labor auch bei anderen Projekten, bei denen Zellen mit einem Transporterprotein komplementiert werden sollten (Daten nicht gezeigt, mündliche Kommunikation, PD Dr. Christian Thiel, 2023).

Die Lysate der infizierten Zellen wurden dennoch mittels Western Blot auf die Expression der Glykosylierungsmarkerproteine ICAM1, GP130 und TGN46 sowie die Signale der verschiedenen Lektine hin untersucht. Verwendet wurden zunächst wieder die Lektine, die an Sialinsäurereste binden (WGA, SNA, MALI) oder nicht-sialylierte Strukturen erkennen (ECL, RCAI). Die berechneten Verhältnisse der glykosylierten zur un- bzw. hypoglykosylierten Form der Markerproteine GP130 und TGN46 verbesserte sich durch die Komplementierung der Patientenzellen mit dem wildtypischen SLC35A1-HA, konnten aber das Level der Kontrollzellen nicht erreichen. Die glykosylierte Form der Proteine nahm dabei nur wenig zu, hauptsächlich nahmen die hypoglykosylierten Proteinbanden ab. Bei ICAM1 nahm das Verhältnis von

glykosylierter zu unglykosylierter Form in den Patientenzellen mit wildtypischem Konstrukt sogar ab. Insgesamt waren die Veränderungen der Expression der Glykosylierungsmarkerproteine durch die Komplementierung eher gering. Bei der Untersuchung der Lektinsignale fiel auf, dass das MALI-Signal in den Mock-Patientenzellen im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen erhöht war. In Experimenten, in denen nicht-infizierte Zellen verwendet wurden, konnte aber eine signifikante Reduzierung des MALI-Signals im Lysat der Patientenzellen beobachtet werden. Es scheint also, dass bereits der Prozess der viralen Infektion die Glykosylierungsmuster der Zellen beeinflussen kann. Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche sind oft wichtig für die Interaktion mit Viren und deren Eindringen in die Zelle [75]. Möglicherweise kommt es in den Zellen durch die virale Infektion generell schon zu einem veränderten Metabolismus und damit auch zu einer veränderten Glykosylierung. Die Signale der Lektine WGA, SNA, MALI und ECL änderten sich durch die Komplementierung in den Patientenzellen nur unwesentlich. Lediglich das in den Mock-Patientenzellen stark erhöhte RCAI-Signal zeigte eine signifikante Reduktion der Bindung in den komplementierten Zellen. Insgesamt konnten die Glykosylierungsdefizite in den Patientenzellen durch Komplementierung mit dem wildtypischen *SLC35A1*-Gen nur teilweise verbessert werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die Mutation allein für die Defekte in den Patientenzellen verantwortlich ist, sondern auch der genetische Hintergrund. Dass teilweise auch die Glykosylierung der Mock-Zellen verändert war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Methode der viralen Infektion zur Untersuchung der Glykosylierung problematisch ist und eine andere Strategie für ein Komplementierungsexperiment genutzt werden sollte. Da Fibroblasten nicht mit konventionellen Transfektionsmethoden, wie Lipofektion, transfiziert werden können, könnte als alternative Methode die Elektroporation getestet werden. Allerdings wäre auch hier noch zu beachten, dass es in den Zellen noch ein endogenes Level des mutierten Proteins gibt, wodurch mögliche Effekte durch das wildtypische Protein vielleicht verhindert oder maskiert werden. Idealerweise müssten die Zellen also genetisch verändert werden, um die Auswirkungen der Mutation direkt in den Patientenzellen im Zusammenhang mit dem genetischen Hintergrund zu untersuchen.

## 7.7 Die beeinträchtigte Proliferation wird nur zum Teil vom mutierten *SLC35A1*-Protein verursacht

Während der Kultivierung der Kontroll- und Patientenfibroblasten fiel auf, dass die Zellen der Patientin langsamer wuchsen als die der Kontrolle. Bei der Untersuchung der Proliferation wurde daraufhin festgestellt, dass die Wachstumsrate der Patientenzellen deutlich reduziert und die Verdopplungszeit auf etwa das dreifache der Kontrollzellen erhöht war. Die Zellen der Patientin teilten sich also etwa dreimal langsamer als die Kontrollzellen. Auch die HEK293 *SLC35A1* K.o. Mock-Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Proliferation im Vergleich zu HEK293 WT Mock-Zellen. Durch Expression des wildtypischen *SLC35A1*-Gens konnte in den K.o.-Zellen wieder eine Wachstumsrate bzw. Verdopplungszeit erreicht werden, die den HEK293 WT Mock-Zellen entsprach. In den K.o.-Zellen, die das *SLC35A1*(A133G)-Gen exprimierten konnte die Wachstumsrate nur auf etwa 60 % der HEK293 WT Mock-Zellen angehoben werden. Dies belegt, dass der defekte *SLC35A1*-Transporter in der HEK293-Modellzelllinie im Zusammenhang mit der

reduzierten Proliferation steht und auch das SLC35A1-Protein mit der Patientenmutation die Proliferation beeinträchtigte. Um zu überprüfen, ob auch in den Fibroblasten der Patientin die Probleme der Zellproliferation durch die Mutation des *SLC35A1*-Gens hervorgerufen werden, wurden diese viral mit einem *SLC35A1*(WT)-HA Konstrukt infiziert und die Proliferation gemessen. Im Vergleich zu den Zellen, die als Kontrolle mit dem Leervektor infiziert wurden, verbesserte sich die reduzierte Wachstumsrate und erhöhte Verdopplungszeit allerdings nur minimal. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Zellen das infizierte Konstrukt vielleicht nicht exprimierten, was aufgrund des nicht zu detektierenden HA-Tags im Western Blot nicht abschließend geklärt werden konnte. Zum anderen ist das endogene Protein in den Fibroblasten bei der Infektion noch vorhanden und könnte dadurch, anders als bei dem Experiment in HEK293 K.o.-Zellen, das Ergebnis beeinträchtigen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nicht nur die Patientenmutation zu der verringerten Proliferation in den Zellen führt, sondern es in den Fibroblasten noch weitere Beeinträchtigungen von anderen Stoffwechselwegen geben könnte, die das Zellwachstum reduzieren.

Da die Proliferation auch auf Zell-Zell-Interaktionen von meist glykosylierten Membranproteinen beruht [145], könnte es sein, dass der Glykosylierungsdefekt der Patientenzellen dazu führt, dass diese Proteine nicht mehr vollständig glykosyliert werden, daraufhin nicht mehr miteinander interagieren können, und schließlich die Signalweiterleitung gestört wird. Als Beispiel hierfür kann auch ICAM1 aufgeführt werden, das als N-Glykosylierungsmarkerprotein verwendet wurde, aber auch ein Transmembranrezeptor ist, der vor allem für adhäsive Interaktionen zwischen Zellen benötigt wird [146]. Es wäre also denkbar, dass die signifikant verringerte Menge an glykosyliertem ICAM1 dazu führt, dass die Zell-Zell-Kontakte bei der Patientin nicht richtig funktionieren. Von Matsushita *et al.* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Proliferation in Mäusen mit einer Mutation, die zu abnormalem Bindegewebswachstum führt („tight-skin“), durch nicht-funktionales ICAM1 reduziert wurde [147]. Die unvollständige Glykosylierung von ICAM1 in den Patientenfibroblasten könnte folglich zu dem Proliferationsphänotyp beitragen. Die ICAM1-Glykosylierung allein ist allerdings keine Erklärung für die verringerte Proliferation, da bei den Zellen der Patientin, die mit GlcNAc supplementiert wurden, keine Verbesserung der ICAM1-Glykosylierung, aber eine fast kontrollähnliche Proliferation beobachtet werden konnte (7.12). Weiterhin konnte in den HEK293 K.o.-Zellen durch Expression des mutierten *SLC35A1*-Konstruktes durchaus eine kontrollgleiche ICAM1-Glykosylierung, nicht aber eine normale Proliferation erreicht werden. Denkbar wäre, dass die möglichen Effekte des transfizierten *SLC35A1*(A133G)-Konstruktes erst nach mehreren Tagen Inkubation zum Tragen kommen und somit mittels Western Blot, wofür die Zellen nach 48 h transients Transfektion lysiert wurden, nicht zu detektieren war. Ein Hinweis, dass dies der Fall sein könnte, bietet die Wachstumskurve des Proliferationsassays: Bis zum vierten Messtag gleichen sich die Wachstumskurven der transfizierten Zellen sehr, erst ab Tag 5 zeigen sich die Unterschiede in der Proliferation. Die Aktivität weiterer Signalwege, wie der WNT- oder mTOR-Signalweg, die großen Einfluss auf die Proliferation haben, hängen teilweise auch von der Glykosylierung von Liganden oder der Verfügbarkeit von Zuckersubstraten ab, was durch das mutierte Transporterprotein beeinflusst werden könnte. Auch die Veränderung der

Lipidzusammensetzung, die in den Patientenzellen gemessen wurde, könnte Auswirkungen auf die Interaktionen oder Aggregatbildung von Signalproteinen und Lipiden innerhalb der Zellmembran haben. Sphingolipide, zu denen auch die Lipidklasse Ceramid gehört, welches in den Patientenzellen signifikant dereguliert war (siehe 7.11), spielen beispielsweise für das Zellwachstum, den Zellzyklus und auch die Adhäsion eine wichtige Rolle [148]. Eine verringerte Proliferation könnte auch durch eine erhöhte Apoptose hervorgerufen werden. Durch ein Apoptoseassay, bei dem die Fibroblasten mit Staurosporin behandelt und Caspase 3 detektiert wurde, konnte aber festgestellt werden, dass bei den Patientenzellen vermutlich keine erhöhte Apoptoserate vorliegt (siehe 7.11), sondern eher sogar eine verzögerte Apoptosereaktion. Allerdings wurde dadurch nur der intrinsische der möglichen Apoptosewege untersucht, weshalb eine erhöhte Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs nicht ausgeschlossen werden kann. Bei Mausembryonen wurde festgestellt, dass ein reduziertes Level an zellulärem UDP-GlcNAc zu einer verringerten Proliferation und gleichzeitig zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose-Stimuli führte [149]. Die Messung der nukleotidaktivierten Zucker in den Fibroblasten belegte allerdings, dass neben UDP-GlcNAc auch die anderen Zuckersubstrate für die Glykosylierung in ausreichender Menge vorlagen. Eine dennoch durchgeführte Supplementation der Patientenzellen mit GlcNAc führte zu einer fast kontrollähnlichen Proliferationsrate (siehe 7.12), wobei der biochemische Mechanismus nicht geklärt werden konnte.

Auch wenn durch das Proliferationsassay mit den transfizierten HEK293 K.o.-Zellen gezeigt werden konnte, dass eine verringerte Proliferation mit der *SLC35A1*-Mutation zusammenhängen könnte, scheint der Proliferationsphänotyp bei den Fibroblasten der Patientin nicht nur durch die Mutation verursacht zu werden, sie könnte aber dazu beitragen. Es wäre möglich, dass die Verfügbarkeit von Substraten für andere Stoffwechselwege als sekundärer Effekt durch die Mutation verändert wird und dadurch Signalwege, die auch Auswirkungen auf die Proliferation haben können, beeinflusst werden.

## 7.8 Beeinträchtigung verschiedener Bereiche des Glykosylierungsprozesses

Die Transkriptanalyse mittels nCounter Messung wurde dazu verwendet, einen Eindruck über die Expression verschiedener, glykosylierungsrelevanter Gene in den Patientenzellen zu erhalten. Dadurch konnte die Regulation verschiedener Prozesse, die auch für die unterschiedlichen Glykosylierungsarten wichtig sind, untersucht werden. Es wurden verschiedene Gene als dereguliert identifiziert, deren kodierte Proteine an der N-Glykosylierung, dem Hexosamin-Biosyntheseweg, dem Mevalonat-Signalweg, der GPI-Anker Synthese, der C-Mannosylierung und der zellulären Stressantwort beteiligt sind. Ob sich die Deregulation auf Transkriptebene auch auf Proteinebene übertragen lässt, wurde anschließend anhand zahlreicher Western Blots überprüft.

Bereits frühe Schritte des N-Glykosylierungsprozesses scheinen in den Patientenzellen dereguliert zu sein, da die Transkriptmengen der Gene *DPAGT1* und *ALG12*, die an der LLO-Synthese beteiligt sind, signifikant erhöht waren. *DPAGT1* (*ALG7* in *S. cerevisiae*) codiert für eine GlcNAc-Phosphotransferase, die sich in der ER-Membran befindet und den ersten Schritt im

Aufbau eines LLOs katalysiert, nämlich die Übertragung eines GlcNAc-P-Rests von UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat. Es ist damit das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des N-Glykosylierungsprozesses [150], [151]. Eine erhöhte *DPAGT1*-Expression steht im Zusammenhang mit einer erhöhten N-Glykosylierung von E-Cadherin, einem sehr wichtigen Zelladhäsionsprotein, was zu einer reduzierten Zell-Zell-Adhäsion und veränderten Zellmorphologie führt [150]. Eine erhöhte *DPAGT1*-Expression könnte eine Kompensationsreaktion der Patientenzellen sein, um die N-Glykosylierung aufrechtzuerhalten und die Akkumulation von UDP-GlcNAc abzubauen. Außerdem könnte sie zu dem beobachteten Proliferationsphänotyp und der veränderten Morphologie der Patientenzellen (siehe 6.12.3) beitragen. Auch die *DPAGT1*-Proteinmenge war in den Fibroblasten der Patientin signifikant erhöht, was die Wahrscheinlichkeit, dass die erhöhte Transkriptmenge Auswirkungen auf die Zellmetabolismus haben könnte, weiter verstärkt. *ALG12* codiert für eine Mannosyltransferase, die das Substrat Dol-P-Man verwendet, um den achten Mannoserest des LLOs im ER zu verknüpfen. Auf Proteinebene konnte keine Veränderung der exprimierten Menge in den Patientenzellen festgestellt werden, allerdings wurde statt einer Bande wie im Kontrollzelllysate, eine Doppelbande beobachtet. Vielleicht wird in den Patientenzellen durch alternatives Spleißen der mRNA eine weitere Isoform des Gens exprimiert, die aber möglicherweise nicht funktional ist. Immerhin ist bisher keine weitere funktionale Isoform von *ALG12* bekannt. *ALG12*-CDG Patienten weisen teilweise Symptome auf, die auch mit denen der hier charakterisierten Patientin übereinstimmen, wie Mikrozephalie, Gerinnungsstörungen, Thrombozytopenie, Hypotonie, wiederkehrende Infekte der oberen Atemwege und Dysmorphien [152], [153]. Teilweise sind dies klassische Symptome von CDG-Patienten, aber gerade Mikrozephalie, Gerinnungsstörungen und Thrombozytopenie wurden speziell auch für andere *SLC35A1*-CDG Patienten beschrieben. Daher wäre es möglich, dass eine Deregulation des *ALG12* Gens bei der Patientin zu diesen Symptomen beiträgt. Auch der Transfer des vollständigen LLOs auf das Protein scheint bei der Patientin nicht richtig zu funktionieren. Der Oligosaccharyl-Transferasekomplex, der dafür verantwortlich ist, besteht aus mehreren Untereinheiten. Dazu gehören auch die nicht-katalytische Untereinheit *DDOST* sowie die katalytischen *STT3A* und *STT3B* [154], deren mRNA-Level in den Zellen der Patientin signifikant dereguliert war. In einem Komplex befindet sich immer nur eine der beiden paralogen *STT3* Untereinheiten [154]. Eine Deregulation des OST-Komplexes deutet auf eine allgemeine Verringerung von proteingebundenen N-Glykanen in den Zellen der Patientin hin, die durch ein reduziertes WGA-Signal und die erheblich reduzierte Menge an N-glykosylierten Markerproteinen nachgewiesen wurde. Da auch die Transkripte der Gene *SLC35A2*, *SLC35C1*, *SLC35A5* und *SLC35B4* dereguliert waren, die für verschiedene Zuckertransporter codieren, könnte es bei der Patientin Probleme mit der Bereitstellung von Zuckersubstraten im Golgi-Apparat geben. Die Expression von *SLC35A1* war bei der nCounter Messung im unauffälligen Bereich, was mit dem Ergebnis der qPCR übereinstimmte. *SLC35A2* transportiert UDP-Galaktose, *SLC35C1* GDP-Fucose und von den noch nicht so gut erforschten Proteinen *SLC35A5* und *SLC35B4* wird angenommen, dass sie UDP-Glucuronsäure (GlcA), UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc bzw. UDP-Xylose und UDP-GlcNAc transportieren können [155], [156]. Das Verhältnis des Zuckerimports von UDP-Galaktose und GDP-Fucose in den Patientenzellen war im Vergleich zur Kontrolle bei dem durchgeführten Transporterassay nicht beeinträchtigt, weshalb

eher nicht von einer Funktionseinschränkung der Transporter SLC35A2 und SLC35C1 in den Patientenzellen auszugehen ist. Es wäre aber möglich, dass sich die verschiedenen Transporter gegenseitig regulieren und eine veränderte Expression auf die verringerte Stabilität des SLC35A1-Proteins zurückzuführen ist. Beispielsweise wird vermutet, dass SLC35A5 eine übergeordnete Rolle einnimmt, um die Aktivitäten anderer SLC35A Proteine zu regulieren. Es ist bekannt, dass SLC35A5 mit anderen Transportern Heterodimere bildet, darunter auch SLC35A1 und SLC35A4 [155], [157]. SLC35A4 wiederum hat Einfluss auf die Lokalisation des SLC35A2/SLC35A3 Komplexes [157]. Daher wird vermutet, dass es einen Multiproteinkomplex in der Golgi-Membran geben könnte, der den Zuckertransport reguliert [155]. Sollte dies der Fall sein, könnte die verringerte Stabilität und damit der schnellere Abbau von SLC35A1 in den Patientenzellen auch zu einer Deregulation der Expression anderer Transporterproteine führen. Dass die Transkriptmenge von *SLC35A5* und *SLC35B4*, die beide UDP-GlcNAc transportieren können, hochreguliert war, könnte auf einen erhöhten Bedarf dieser Proteine aufgrund einer möglichen UDP-GlcNAc Akkumulation in den Patientenzellen hindeuten, oder aber auf deren potenzielle regulatorischen Funktionen. Auf Proteinebene wurde die Menge der Transporter SLC35C1, SLC35A2 und SLC35A3 untersucht. Das Proteinlevel von SLC35A2 und SLC35A3 war in der Patientenprobe jeweils leicht reduziert, bei SLC35C1 sogar signifikant. Dies schien aber keinen Einfluss auf die generelle Fucosylierung, aufgrund der nur unwesentlich auf das 1,04-fach erhöhte Menge an defucosylierten Strukturen bei der N-Glykananalyse und der unauffälligen Ergebnisse der fucosebindenden Lektine AAL und LCH, zu haben. In Betracht kommt auch, dass es alternative Routen für die Aufnahme von Zuckersubstraten in den Golgi-Apparat zu geben scheint [155]. In den Fibroblasten der Patientin kam es auch zu einer Deregulation der Gene verschiedener Golgi-Glykosyltransferasen (*MAN1A1*, *MAN2A1* und *MGAT1*). Diese sind für die Prozessierung der proteingebundenen N-Glykane im Golgi-Apparat verantwortlich. Die Schritte, die durch diese Proteine reguliert werden, laufen direkt hintereinander ab und sind der Startpunkt für den Aufbau eines N-Glykans vom Komplextyp [21]. Auf Proteinebene wurde die Expression von *MAN1A1* und *MAN2A1* untersucht, die in den Patientenzellen signifikant verändert war. Die Menge an *MAN2A1* war, wie auch die Transkriptmenge, signifikant erhöht, während die Proteinmenge von *MAN1A1* signifikant reduziert war. Kommt es zu einer Verringerung von *MAN1A1*, könnte dies eine erhöhte Menge an mannosereichen N-Glykanen zur Folge haben, da die Prozessierungsschritte, die zum Aufbau eines komplexen N-Glykans benötigt werden, verlangsamt werden. Dementsprechend könnte eine erhöhte Menge an *MAN2A1* eine Kompensationsreaktion sein, um die Produktion von komplexen N-Glykanen aufrecht zu erhalten. Eine leicht erhöhte Menge an mannosereichen Glykanen und Probleme im Aufbau von komplexen Glykanen in den Zellen der Patientin konnten auch anhand des N-Glykanprofils aus Fibroblastenlysat beobachtet werden. *FUT8* codiert für eine  $\alpha$ -1,6 Fucosyltransferase, die für eine erfolgreiche Fucosylierung auf die vorherige Prozessierung der N-Glykanen durch *MGAT1* angewiesen ist [21], dessen Expression ebenfalls dereguliert war. Da die signifikant erhöhte Transkript- und signifikant reduzierte Proteinmenge von *FUT8* auf eine Beeinträchtigung der  $\alpha$ -1,6 Core-Fucosylierung von N-Glykanen schließen lässt, wurde die Fucosylierung im Lysat der Patientenzellen durch die Lektine AAL und LCH überprüft. AAL zeigte dabei ein leicht reduziertes Signal, insgesamt war die Färbung mit beiden Lektinen aber eher unauffällig. Dass es dennoch in den Patientenzellen zu

einer Deregulation der Fucosyltransferase kommt, könnte mit einer veränderten Regulation der  $\alpha$ -2,6 Sialylierung in den Patientenzellen zusammenhängen. Es ist bekannt, dass *FUT8* die Aktivität der  $\alpha$ -2,6 Sialyltransferase *ST6GalII* reguliert, indem sie diese fucosyliert. Die *ST6GalII* Aktivität wird durch diese Modifikation reduziert. Bei Mäusen, denen *FUT8* fehlt, wurde eine erhöhte Menge an  $\alpha$ -2,6 sialylierten N-Glykanen festgestellt, wobei die Expression von *ST6GalII* nicht verändert wird [158]. Eine deregulierte *FUT8*-Expression könnte damit im Zusammenhang mit der beobachteten, kontrollähnlichen  $\alpha$ -2,6 Sialylierung in den Patientenzellen stehen. Da die nCounter Messung eine Deregulation von Genen aufzeigt, deren Genprodukte an verschiedenen Bereichen der N-Glykosylierung beteiligt sind, deuten diese Ergebnisse auf eine weitläufige Beeinträchtigung dieses Prozesses hin.

Eine umfassende Beeinträchtigung konnte anhand der nCounter Daten auch in Bezug auf den Hexosamin-Biosyntheseweg festgestellt werden. Die Transkriptmenge von *PGM2*, *GALE* und *GMPPB* waren signifikant reduziert. Diese codieren für Proteine, die an der Umwandlung von Glucose zu dem zentralen Zuckersubstrat des Synthesewegs, UDP-GlcNAc, oder an der Generierung des nukleotidaktivierten Zuckers GDP-Mannose beteiligt sind [44], [45], [53]. Auf Proteinebene wurde die Expression von Genen des Hexosamin-Biosynthesewegs durch Detektion von *PGM2*, *GALE*, *GMPPA*, das einen Komplex mit *GMPPB* bildet [131], und *GNE*, das den ersten Schritt der Umwandlung von UDP-GlcNAc zu CMP-Sia katalysiert [132], überprüft. Für alle Proteine wurde eine signifikante Reduktion der Proteinmenge festgestellt, was erneut auf eine deutliche Beeinträchtigung der Zuckersubstratsynthese in den Zellen der Patientin hindeutet. Diese könnte aufgrund einer Akkumulation von CMP-Sia durch die reduzierte *SLC35A1*-Transporteraktivität und dadurch auch durch weitere, mögliche Feedback-Reaktionen zustande kommen.

Ein weiterer Syntheseweg, der dem N-Glykosylierungsprozess vorausgeht, ist der Mevalonat-Signalweg. Dieser ist wichtig für die Bildung von Cholesterol, Ubiquinon und Dolichol, das für die LLO-Synthese und für die Bereitstellung von Substraten im ER benötigt wird [16]. Zunächst wird Acetyl-CoA durch mehrere enzymatische Schritte über Mevalonat in Farnesyldiphosphat (FPP) umgewandelt. Dieses kann für die Synthese von Cholesterol, das für die Bildung von Gallensäure, Steroidhormonen und Vitaminen wichtig ist, verwendet werden oder weiter in Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) umgewandelt werden. Daraus kann Dolichol oder Ubiquinon, welches für die Elektronentransportkette und damit die ATP-Produktion in Mitochondrien benötigt wird, synthetisiert werden [16]. Die Transkriptmenge einer Vielzahl von Genen, die am Mevalonat-Signalweg beteiligt sind, waren in den Fibroblasten der Patientin signifikant erhöht. Darunter *HMGCR*, das für die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reduktase codiert, welche das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Synthesewegs ist und damit eine wichtige Rolle in der Cholesterol-Homöostase einnimmt [159]. Die Gene *MVD*, *IDI1* und *FDPS*, die für Enzyme codieren, die ebenfalls an frühen Schritten des Mevalonat-Signalwegs, der Bildung von FPP beteiligt sind [160], waren ebenfalls hochreguliert. Besonders dereguliert schien die Cholesterolsynthese in den Patientenfibroblasten zu sein, da die meisten der mittels nCounter identifizierten Gene mit abweichender Transkriptmenge, die zum Mevalonat-Signalweg gehören, an der Umwandlung von FPP in Cholesterol beteiligt sind: *3B-HSD*, *EBP*, *SREBF1*, *DHCR7*,

*CYP1B1* und *HSD17B7* [161]–[166]. Die Cholesterolsynthese wird hauptsächlich durch den von *SREBF1* codierten Transkriptionsfaktor SREBP reguliert, der auch Einfluss auf das Transkriptionslevel von *HMGCR* nimmt. SREBP und *HMGCR* können durch Feedback-Reaktionen des Endprodukts Cholesterol inhibiert werden [167]. Da die Expression der beteiligten Gene hochreguliert war, könnte dies ein Hinweis auf eine reduzierte Menge an Cholesterol in den Patientenzellen sein oder einer Deregulation des Feedback-Mechanismus, was zu einer Aktivierung der Cholesterolsynthese führen könnte. Da Cholesterol essenziell für die Membranintegrität von Säugetierzellen ist und bei einer erhöhten Menge in Lipidtröpfchen gespeichert wird, was bei einer Akkumulation aber zu Dysfunktionen und Entzündungsreaktionen führen kann, ist die korrekte Regulierung und damit die Homöostase der Cholesterolsynthese für die Zellfunktion sehr wichtig [168]. Bei dem Teil des Mevalonat-Signalwegs, bei dem GGPP in Ubiquinon umwandelt wird, war die Transkriptmenge des beteiligten Gens *PDSS1* signifikant reduziert. Eine verringerte mRNA-Expression von *PDSS1*, das für das Enzym codiert, welches den ersten Schritt der Ubiquinonsynthese katalysiert, steht im Zusammenhang mit einer reduzierten Menge an zellulärem Ubiquinon in Fibroblasten [169]. Falls es dadurch zu einer verminderten Produktion von Ubiquinon in den Patientenzellen kommt, könnte das Auswirkungen auf die ATP-Produktion haben. Dass es in den Fibroblasten der Patientin tatsächlich Probleme mit den mitochondrialen Funktionen gibt, konnte anhand des Mitochondrienmarkers ATP5H, der Messung von ATP in den Zellen und der Proteomik-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 7.10). Auf Proteinebene wurden zusätzlich die Enzyme *CYP1B1*, das an der Cholesterolsynthese beteiligt ist [165], sowie *DHDDS* und *SRD5A3*, die Teil der Dolicholsynthese des Mevalonat-Signalwegs sind [82], untersucht. Bei allen drei konnte eine signifikante Veränderung der Proteinmenge in den Patientenzellen festgestellt werden. Die *CYP1B1*-Expression war dabei, wie auch die Transkriptmenge signifikant erhöht, *DHDDS* und *SRD5A3* dagegen reduziert. Die geringe Proteinmenge an *DHDDS* und *SRD5A3* könnte in den Patientenzellen zu einer reduzierten Dolicholsynthese führen, die möglicherweise eine Reaktion auf eine verlangsamt ablaufende N-Glykosylierung sein könnte. Sollte in den Patientenzellen eine verringerte Menge an Dolichol vorliegen, so könnte dies Auswirkungen auf die LLO-Synthese und auch auf die Substratbereitstellung im ER in Form von Dol-P-Mannose oder Dol-P-Glucose haben. Insgesamt scheint der Mevalonat-Signalweg in den Zellen der Patientin stark dereguliert zu sein. Sowohl frühe Schritte, die zur Bildung des Moleküls FPP führen, als auch die danach folgenden, verschiedenen Synthesewege von Cholesterol, Dolichol und Ubiquinon sind dereguliert.

Bezüglich der GPI-Anker Synthese wurde die Transkriptmenge von zwei beteiligten Genen als signifikant dereguliert identifiziert. Der erste Schritt der GPI-Anker Synthese wird von dem GPI-GlcNAc-Transferasekomplex katalysiert, der aus den Untereinheiten *PIGA*, *PIGC*, *PIGH*, *PIGP*, *PIGQ* und *PIGY* besteht und GlcNAc auf das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol (PI) überträgt. Nach Modifizierung und dem Hinzufügen weiterer Zuckerreste durch andere PIG-Proteine, können Proteine C-Terminal mit dem GPI-Anker verknüpft und dadurch in der Membran verankert werden [170]. In den Zellen der Patientin war die Transkriptmenge von *PIGQ* und *PIGY* signifikant erhöht. Die beiden Untereinheiten des GPI-GlcNAc-Transferasekomplexes für die diese Gene codieren, haben regulatorische Funktionen und

sind für die korrekte Wirkungsweise des Proteinkomplexes wichtig. Allerdings wurde festgestellt, dass ein Knock-out von *PIGA*, *PIGC*, *PIGH* und *PIGP* jeweils die Aktivität des Komplexes komplett eliminierte, wohingegen ein Knock-out von *PIGQ* und *PIGY* die Aktivität lediglich reduzierte [170]. Die Expression dieser regulatorischen Untereinheiten scheint für die GPI-Anker Synthese demnach nicht essenziell zu sein. Da es deshalb wahrscheinlich ist, dass eine Deregulation von *PIGQ* und *PIGY* eher nur geringfügige Auswirkungen auf die Expression von GPI-Anker gebundenen Proteinen hat, wurde dies in den Patientenzellen noch nicht weiter überprüft. Die Funktionalität des Komplexes in den Patientenzellen könnte in Zukunft aber durch Detektion und Quantifizierung von bekannten, GPI-Anker-gebundenen Proteinen erfolgen.

Interessanterweise war die Expression des Gens *DPY19L1* in den Zellen der Patientin signifikant erhöht. Dieses codiert für eine C-Mannosyltransferase [43], weshalb eine Beeinträchtigung eines weiteren Glykosylierungstyps, der C-Mannosylierung, in den Patientenzellen vorliegen könnte. Dies wurde zunächst durch Detektion von *DPY19L1* sowie einer weiteren C-Mannosyltransferase, *DPY19L3* überprüft. Die Menge beider Proteine war in den Patientenzellen minimal erhöht, aber noch im Bereich der Kontrollproben. Die erhöhte Transkriptmenge scheint sich daher nicht auf die Proteinmenge auszuwirken. Da die C-Mannosylierung vor allem bei sekretierten Proteinen mit TSR-Domänen vorkommt, wurde die Menge der C-mannosylierten Serumproteine ADAMTS13 und Properdin im Serum der Patientin bestimmt, deren Sekretion auch durch die C-Mannosylierung beeinflusst wird [43]. Beide Proteinen lagen in signifikant verringerter Menge vor, was auf eine reduzierte Sekretion schließen lässt, die mit einer unvollständigen Glykosylierung zusammenhängen könnte. Es wäre daher möglich, dass die C-Mannosylierung bei der Patientin beeinträchtigt ist.

Zuletzt wurden auch zwei Gene in den Patientenzellen als signifikant dereguliert identifiziert, die mit zellulärem Stress in Verbindung stehen. Das erste davon war *ACOX3*, dessen Genprodukt am peroxisomalen Abbau von sehr langkettigen (VLCFAs) und verzweigten Fettsäuren beteiligt ist [171], [172]. Da die verschiedenen Acyl-CoA Oxidasen (ACOX-Proteine), neben anderen Enzymen in Peroxisomen durch die ablaufenden metabolischen Prozesse für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich sind [173], wurde *ACOX3* als Markerprotein für peroxisomalen bzw. oxidativen Stress und den Abbau von verzweigt-kettigen Fettsäuren verwendet. Die Proteinexpression von *ACOX3* war in den Patientenzellen minimal, aber nicht signifikant reduziert. Es konnte aber eine teilweise signifikant erhöhte Menge an VLCFAs in den Fibroblasten der Patientin festgestellt werden, was ein Hinweis darauf ist, dass die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in den Patientenzellen beeinträchtigt zu sein scheint. Dies könnte schließlich auch Auswirkungen auf den Energiemetabolismus und die Lipidzusammensetzung in den Zellen haben. Das zweite Gen, dessen Transkriptmenge in den Patientenzellen signifikant erhöht war, war *SGK1*. Dieses codiert für die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1, die eine Vielzahl an Enzymen und Transkriptionsfaktoren reguliert und damit Einfluss auf zentrale zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, Transport, Hormonfreisetzung oder Entzündungsreaktionen nehmen kann. Aktiviert wird die *SGK1*-Expression beispielsweise durch Energiemangel oder das Schrumpfen von Zellen und aktiviert daraufhin die Glukoseaufnahme und Glykolyse und fördert das Überleben der Zellen sowie deren Proliferation und Migration [174]. Das Proteinlevel von

SGK1 war in den Patientenzellen leicht, aber nicht signifikant reduziert. Allerdings war die Detektion des Proteins durch Flecken auf der Membran des Western Blots ungenau. Dennoch scheint es auf Proteinebene eine kontrollähnliche Expression des *SGK1* Gens in den Patientenzellen zu geben. Eine erhöhte Transkriptmenge könnte aber auf Probleme mit dem Energiemetabolismus in den Patientenzellen hindeuten, der durch eine enorm reduzierte ATP-Menge bestätigt werden konnte, und auch mit der beobachteten, reduzierten Proliferation der Fibroblasten zusammenhängen.

Auch wenn manche der deregulierten Gene auf Proteinebene eine unauffällige Expression zeigen, bedeutet das nicht, dass die Veränderungen der Transkriptmenge nicht trotzdem Auswirkungen auf die verschiedenen Prozesse haben könnte. Genauso kann es sein, dass es in den Zellen der Patientin weitere deregulierte Proteine gibt, die für die Glykosylierung relevant sind, deren mRNA-Level sich aber nicht signifikant von den Kontrollzellen unterscheidet oder nicht von den verwendeten nCounter-Sonden abgedeckt wurden.

Die Gene, die an den deregulierten Prozessen beteiligt sind und deren Proteinmenge in den Patientenfibroblasten signifikant verändert war, wurden auch in den HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen mittels Western Blot überprüft. Dabei konnte eine erneute, signifikante Deregulation der Proteine CYP1B1, SRD5A3, DHDDS, GNE, PGM2, DPAGT1 und FUT8 nachgewiesen werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Expression dieser Proteine direkt durch einen defekten SLC35A1-Transporter beeinflusst wird. Demnach wird durch den SLC35A1-Defekt vor allem eine Regulation der Cholesterol- bzw. Dolicholsynthese, des Hexosamin-Biosynthesewegs, des Starts der LLO-Synthese für die N-Glykosylierung sowie der Core-Fucosylierung von N-Glykanen hervorgerufen. Vermutlich beruht eine solche Regulation nicht auf direkten Interaktionen, da sich manche dieser Proteine in anderen Kompartimenten befinden als dem Golgi-Apparat. Es könnte aber ein Hinweis darauf sein, dass eine Beeinträchtigung der N-Glykosylierung durch einen defekten Golgi-Transporter auch Auswirkungen auf andere Teile des Prozesses hat, möglicherweise durch einen Rückstau des Substrats oder andere Feedback-Reaktionen. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass auch andere, als dereguliert identifizierte Proteine in den Patientenfibroblasten tatsächlich mit dem defekten SLC35A1-Protein zusammenhängen, da diese mit den Ergebnissen aus HEK293-Zellen verglichen wurden und dadurch zelltypspezifische Abweichungen der Genexpression nicht miteinbezogen wurden.

## 7.9 Nukleotidmessung deutet auf Akkumulationen von Zuckersubstraten hin

Die Menge der nukleotidaktivierten Zucker wurde mittels ESI-MS/MS in den Fibroblasten der Patientin bestimmt. Es wurde festgestellt, dass alle gemessenen Zuckersubstrate (CMP-Sia, UDP-GlcNAc, GDP-Mannose, UDP-Galaktose/Glucose) in den Patientenzellen leicht erhöht sind, aber noch im Bereich der Kontrolle liegen. Die Messdaten zeigten eine sehr hohe Standardabweichung, weshalb keiner der Mengenunterschiede signifikant war. Die hohe Standardabweichung deutet darauf hin, dass die gemessenen Konzentrationen in den unterschiedlichen Proben stark schwanken. Das könnte damit zusammenhängen, dass die für die Messung verwendeten Zellen aus unterschiedlichen Passagen stammten und sich somit die Substratkonzentrationen je nach Status des Zellzyklus oder der Nährstoffverfügbarkeit durch das Medium unterscheiden könnte. Die leicht erhöhten Konzentrationen der Nukleotidzucker in den Patientenzellen könnten auf einen Rückstau durch eine CMP-Sia Akkumulation hindeuten. Dafür spricht auch die mittels Western Blots ermittelte, signifikant reduzierte Menge an GNE, dem geschwindigkeitsbestimmenden Protein der CMP-Sia Synthese. Dieses wird durch eine erhöhte Konzentration an CMP-Sia inhibiert [44], wodurch es zu einer Akkumulation von UDP-GlcNAc kommen könnte. Da auch die Transkript- und Proteinmenge von GALE in den Patientenzellen im Zuge der nCounter Messung als signifikant reduziert identifiziert wurde, das UDP-Galaktose bzw. UDP-Glucose in UDP-GlcNAc umwandelt [45], könnte es daher auch zu einem Rückstau auf diese Substrate kommen. Dass auch GDP-Mannose in den Patientenzellen leicht erhöht war, könnte auf eine Kompensationsreaktion hindeuten, da dieses auch aus UDP-GlcNAc gebildet werden kann. Da die Menge an CMP-Sia nicht signifikant erhöht war, wird GNE möglicherweise nicht dauerhaft inhibiert, sodass immer wieder ManNAc-6P aus UDP-GlcNAc gebildet werden kann. Dieses kann statt für die CMP-Sia Synthese aber auch für die GDP-Mannose Bildung verwendet werden [17]. Es wäre denkbar, dass es einen Mechanismus gibt, wodurch ManNAc-6P bei einer erhöhten CMP-Sia Menge eher in GDP-Mannose umgewandelt werden kann, wodurch dessen Konzentration erhöht wird. Insgesamt waren die Unterschiede in den Konzentrationen nur leicht und nicht signifikant. Sie könnten aber im Zusammenhang mit den an der Substratbildung beteiligten, deregulierten Proteine (siehe nCounter und Proteomik-Analyse) auf eine Deregulation des Hexosamin-Biosynthesewegs in den Zellen der Patientin hindeuten.

Die Konzentrationen der Zuckersubstrate wurden zudem in HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen gemessen, die entweder mit dem wildtypischen oder dem mutierten *SLC35A1*-Konstrukt transfiziert waren. Als Kontrolle dienten HEK293 WT und K.o.-Zellen, die mit dem Leervektor (Mock) transfiziert waren. Durch dieses Experiment konnten die Auswirkungen eines defekten *SLC35A1*-Transporters und der Patientenmutation auf die Synthese der Nukleotidzucker in einem festgelegten genetischen Hintergrund untersucht werden. In den *SLC35A1* K.o. Mock-Zellen konnte eine deutlich signifikante Erhöhung von CMP-Sia beobachtet werden, was auf eine Akkumulation des Substrates durch den defekten Transporter zurück zu führen ist, da die Konzentration des Zuckers durch Expression des wildtypischen *SLC35A1*-Proteins wieder normalisiert werden konnte. Auch das Protein mit der Patientenmutation konnte die CMP-Sia

Akkumulation auf ein kontrollähnliches Niveau senken, aber nicht ganz so weit wie das wildtypische Protein. Es scheint also, dass das SLC35A1 mit der Patientenmutation nur zu einer minimalen Akkumulation des Substrates führt, was durch die noch recht hohe, gemessene Restaktivität von ca. 65 % erklärt werden kann. Durch die deutliche Akkumulation von CMP-Sia in den K.o. Mock-Zellen kommt es vermutlich zu einer starken Inhibition von GNE, das in den K.o.-Zellen mittels Western Blot kaum noch zu detektieren war. Allerdings scheint es dadurch nicht zu einer Akkumulation von UDP-GlcNAc zu kommen, da die Konzentration dieses Nukleotidzuckers in den K.o. Mock-Zellen leicht reduziert war. Möglicherweise wird UDP-GlcNAc bei einer so starken Inhibierung von GNE in Richtung der Glykolyse abgebaut. Durch Expression des wildtypischen und des mutierten *SLC35A1*-Konstruktes verringerte sich die UDP-GlcNAc Konzentration noch etwas weiter, was möglicherweise an der Wiederaufnahme der Produktion von CMP-Sia liegen könnte. Die Unterschiede der Konzentrationen von GDP-Mannose und UDP-Galaktose/Glucose waren eher unauffällig und im Bereich der Kontrolle. Im HEK293-Zellmodell konnte durch einen defekten Transporter also hauptsächlich eine deutliche Akkumulation von CMP-Sia festgestellt werden. Im Vergleich zu den K.o. Mock-Zellen war dies in den K.o.-Zellen, die mit dem mutierten *SLC35A1* transfiziert wurden und auch in den Fibroblasten der Patientin nur zu einem viel geringeren Teil der Fall. Dies deutet erneut darauf hin, dass die Mutation den Transporter nur geringfügig beeinträchtigt und es dadurch nur zu einem leichten Rückstau der Substratzucker kommt. Dennoch könnte auch eine geringe Akkumulation Auswirkungen auf die Regulation des Hexosamin-Biosynthesewegs haben.

## 7.10 Deregulation verschiedener zellulärer und hauptsächlich mitochondrialer Prozesse

Für die Untersuchung grundlegender zellulärer Prozesse in den Patientenzellen wurde eine ungerichtete, massenspektrometrische „Shotgun“ Proteomik-Analyse durchgeführt. Zu beachten war hierbei, dass durch eine solche Analyse lediglich Proteine identifiziert werden können, die in den Zellen sehr häufig vorkommen. Prozesse wie beispielsweise die Glykosylierung, deren beteiligte Proteine vergleichsweise gering exprimiert werden, konnten deshalb mit dieser Analyse nicht untersucht werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es in den Patientenzellen weitere zelluläre Prozesse oder einzelne Proteine gibt, die dereguliert waren, aber durch die ungerichtete Proteomik-Analyse oder aufgrund des untersuchten Zelltyps nicht erfasst werden konnten.

Da eine Vielzahl an Proteinen in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle als signifikant dereguliert identifiziert wurden, wurden diese mit Hilfe einer GO-Term Analyse untersucht, um die generellen Prozesse, mit denen diese Proteine in Verbindung stehen, zu ermitteln. Dabei wurde festgestellt, dass mehrere Proteine der Faltung und Stressantwort, wie z.B. „heat shock“ Proteine (HSPA2, HSPB1), in den Patientenfibroblasten dereguliert waren. Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die beeinträchtigte Glykosylierung in den Patientenzellen viele Proteine nicht vollständig glykosyliert und dadurch vermutlich auch nicht richtig gefaltet werden können. Außerdem waren drei Proteine signifikant dereguliert, die am

Nukleotidzuckermetabolismus beteiligt sind. Darunter waren GNPDA1 und UAP1, die bei der Umwandlung von Glucosamin in UDP-GlcNAc oder Fructose-6-Phosphat im Hexosamin-Biosyntheseweg beteiligt sind sowie HEXA, ein lysosomales Enzym, das GlcNAc- und GalNAc-Reste beim Abbau von Glykoproteinen und -lipiden entfernt, damit diese von der Zelle wieder verwendet werden können. Eine Deregulation dieser Proteine ist ein erneuter Hinweis darauf, dass es in den Patientenzellen zu Problemen in der Bereitstellung von Zuckersubstraten durch den Hexosamin-Biosyntheseweg (HB) kommt. Es fiel auf, dass mittels des Proteomikansatzes nicht diejenigen Proteine des HB als dereguliert identifiziert wurden, die durch die nCounter Analyse ermittelt wurden. Möglicherweise werden diese Proteine in den Fibroblasten weniger häufig exprimiert. Kombiniert man aber die Ergebnisse aus beiden Experimenten, könnte es sein, dass durch die Akkumulation von CMP-Sia, die durch den reduzierten Transport entstehen könnte, eine Feedback-Reaktion ausgelöst wird, wodurch die Synthese von UDP-GlcNAc aus Glucose reduziert wird. Da die Zellen UDP-GlcNAc als Sensormolekül aber auch für andere Prozesse als die Glykosylierung benötigen, kommt es möglicherweise zu einer Kompensation, indem der Syntheseweg über Glucosamin angeregt wird. Es wäre möglich, dass durch die reduzierte HEXA-Expression weniger recyceltes GlcNAc aus den Lysosomen zur Verfügung steht, was eine Erklärung dafür sein könnte, weshalb die GlcNAc-Supplementation einen positiven Effekt auf den Zellmetabolismus durch Verbesserung der Proliferation zeigt.

Zudem waren einige Proteine, die an der Transkription und vor allem der Translationsinitiierung beteiligt sind, in den Patientenzellen dereguliert. Diese waren im Vergleich zu den Kontrollzellen allesamt hochreguliert. Es wäre möglich, dass dies eine Reaktion der Zellen auf die Probleme bei der Proteinfaltung sein könnte. Falls vermehrt Proteine durch fehlerhafte Faltung abgebaut werden, könnte es möglicherweise dadurch insgesamt zu einer erhöhten Translation kommen, um die Menge der benötigten Proteine aufrecht zu halten. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Akkumulation an CMP-Sia aufgrund der reduzierten SLC35A1-Aktivität die Genexpression beeinflussen könnte. Schließlich findet ein Teil der CMP-Sia Synthese im Nukleus statt, sodass dadurch möglicherweise verschiedene Gene reguliert werden könnten. Beispielsweise konnte durch Knock-out des *CMAS*-Gens, das für den nuklearen Schritt der CMP-Sia Synthese verantwortlich ist, ein verändertes Transkriptionsmuster verschiedener Gene beobachtet werden [175]. Außerdem hat auch die O-GlcNAcylierung einen großen Einfluss auf die Genexpression, da diese Modifikation Transkriptionsfaktoren, Polymerasen und Histone regulieren kann [39]. Ob die O-GlcNAcylierung in den Patientenzellen beeinträchtigt ist, wurde durch Detektion der verantwortlichen Proteine OGT und OGA, der Verwendung eines O-GlcNAc-bindenden Antikörpers und des Lektins succinyliertes WGA sowie der Detektion des Histons 2B und dessen O-GlcNAcylierter Form überprüft. Die *OGT*- und *OGA*-Expression war auf Proteinebene reduziert bzw. leicht erhöht, aber nicht signifikant verändert. Es stellte sich aber heraus, dass die O-GlcNAcylierung in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert war. Die Veränderung der Menge an O-GlcNAcylierungen könnte demnach in den Patientenzellen auch an einer Veränderung der Genexpression beteiligt sein. Allerdings scheint diese Beeinträchtigung abhängig vom Zelltyp zu sein, da in den HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen eine kontrollähnliche O-GlcNAcylierung beobachtet werden konnte.

Besonders auffällig bei den Ergebnissen der Proteomik-Analyse war, dass ein Großteil der deregulierten Proteine in den Patientenzellen mitochondriale Proteine waren. Diese sind Teil der oxidativen Stressantwort, dem Aufbau der Mitochondrien und dem Transport von Stoffen aus Mitochondrien hinaus oder in diese hinein, der ATP/ADP Homöostase, der Atmungskette, des Citratzyklus und des Fettsäuremetabolismus. Um einen allgemeinen Eindruck von dem Status der Mitochondrien in den Patientenzellen zu erhalten, wurde das Protein ATP5H, eine Untereinheit der ATP-Synthase [134], detektiert und das ATP-Level in den Fibroblasten gemessen. Die Menge an ATP5H war im Lysat der Patientenfibroblasten signifikant auf weniger als die Hälfte des Proteinlevels der Kontrollen reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass in den Patientenzellen insgesamt weniger Mitochondrien vorliegen bzw. eine verringerte Anzahl an korrekt aufgebauten, funktionsfähigen Mitochondrien. Dafür spricht auch die drastisch reduzierte ATP-Konzentration in den Zellen der Patientin. Der stark beeinträchtigte Energiemetabolismus spielt vermutlich eine große Rolle bei dem beobachteten Proliferationsphänotyp der Patientenfibroblasten und auch die reduzierte O-GlcNAcylierung könnte zu diesem beitragen, da OGT Einfluss auf Proteine der oxidativen Phosphorylierung und des Aktin-Cytoskeletts nehmen kann [176], [177].

Da auch Proteine des Fettsäuremetabolismus und besonders der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in den Patientenzellen dereguliert waren, wurden zunächst die neutralen Lipide durch eine Lipid Oil Red O Färbung untersucht, um festzustellen, ob es allgemein Probleme mit dem Abbau von Fettsäuren in den Fibroblasten gibt. Tatsächlich war die Menge an angefärbten Lipiden in den Patientenzellen signifikant erhöht, was mit der erhöhten Expression von Genen der Cholesterolsynthese bei der nCounter Messung oder auch einer verringerten  $\beta$ -Oxidation zusammenhängen könnte. Um die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren weiter zu untersuchen, wurden die Markerproteine HIF1 $\alpha$  und ACOX3 mittels Western Blot detektiert. HIF1 $\alpha$  diente dabei als Marker für die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation [178] und ACOX3 als Marker für den peroxisomalen Abbau von lang- und verzweigt-kettigen Fettsäuren [171], [172]. Auf Proteinebene war die Expression von HIF1 $\alpha$  in den Patientenzellen signifikant reduziert. Liu *et al.* zeigten allerdings, dass eine erhöhte HIF1 $\alpha$ -Expression mit einer reduzierten  $\beta$ -Oxidation in Verbindung steht [178]. Wie bereits in Abschnitt 7.8 erwähnt, war die Proteinexpression von ACOX3 in den Patientenproben leicht reduziert. Anhand der Detektion der Markerproteine konnte demnach noch keine Aussage getroffen werden, ob die mitochondriale und peroxisomale  $\beta$ -Oxidation in den Fibroblasten der Patientin beeinträchtigt ist. Um einen genaueren Einblick in das Fettsäureprofil der Patientin zu erhalten, wurden die Acylcarnitine im Serum und den Fibroblasten untersucht. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die Verteilung der Acylcarnitine in den Fibroblasten war eher unauffällig mit einer leichten Reduktion von C2, was ein Hinweis auf eine Atmungskettenstörung sein könnte [179], und einzelnen, leicht erhöhten Acylcarnitinen verschiedener Kettenlänge. Das Profil im Serum der Patientin war dagegen etwas auffälliger mit einer leichten Reduktion der kurz- bis mittelkettigen und einer leichten Erhöhung der langkettigen Acylcarnitine, was für eine mitochondriale Störung und einen beeinträchtigten Energiemetabolismus der Patientin spricht (mündliche Kommunikation, Prof. Dr. Jürgen Okun, 2023). Da bei der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation Acylcarnitine ab einer Kettenlänge von C20 abgebaut werden, wurden auch die sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs) gemessen. Diese waren in den

Fibroblasten der Patientin zum Teil signifikant erhöht, was auf Probleme bei der  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen zurückzuführen sein könnte. Daher scheinen bei der Patientin vor allem allgemein der Energiemetabolismus und die  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren beeinträchtigt zu sein. Auf einen eingeschränkten Energiestoffwechsel deutet auch die Untersuchung der Aminosäuren im Serum der Patientin hin, da die Menge an Alanin und Prolin leicht erhöht war und diese als Indikator für mitochondriale Dysfunktion dienen [179]. Außerdem zeigt die Patientin auch einen veränderten Harnstoffzyklus, da die Menge an Argininosuccinat und Ornithin erhöht und Arginin verringert war, was auf eine Beeinträchtigung der Argininosuccinat-Lyase (ASL) hindeuten könnte, die Argininosuccinat in Fumarat und Arginin spaltet. Fumarat wird normalerweise im Cytosol in Malat umgewandelt, das dann wieder in die Mitochondrien transportiert und dort in den Citratzyklus eingespeist wird. Falls bei der Patientin weniger Fumarat gebildet wird, könnte dies also auch Auswirkungen auf die Atmungskette haben. Zudem wurde bei der Proteomik-Analyse festgestellt, dass einige mitochondriale Transporterproteine in den Patientenzellen dereguliert waren, unter denen auch SLC25A11, ein Transporter, der Malat aus dem Cytosol in die Mitochondrien transportiert, und SLC25A1, ein Antiporter, der Citrat aus den Mitochondrien gegen Malat aus dem Cytosol austauscht [180], waren. Citrat kann im Cytosol in Acetyl-CoA (C2) umgewandelt werden, das für die Fettsäuresynthese benötigt wird [180]. Eine beeinträchtigte Bereitstellung von Malat in den Mitochondrien und Citrat im Cytosol könnte demnach zu dem deregulierten Energiemetabolismus beitragen und auch Auswirkungen auf die Fettsäuresynthese haben. Das Aminosäureprofil in den Fibroblasten der Patientin war im Vergleich zur Kontrolle unauffällig, lediglich Ornithin war leicht reduziert. Dies könnte daran liegen, dass alle getesteten Aminosäuren, außer Ornithin, in dem zur Kultivierung verwendeten DMEM-Medium enthalten sind. Dadurch könnten eventuell vorhandene Beeinträchtigungen des Aminosäuremetabolismus in den Zellen verfälscht worden sein. Die Messung der Aminosäuren im Serum der Patientin scheint daher aussagekräftiger zu sein, zumal der Harnstoffzyklus, bei dem Aminosäuren abgebaut werden, hauptsächlich in der Leber stattfindet [181] und somit in der Serumprobe besser dargestellt werden kann.

## 7.11 Beeinträchtigung der Lipidhomöostase in den Patientenzellen

Da es aufgrund der Proteomik-Analyse, der Oil Red O-Färbung und Acylcarnitinmessung Hinweise darauf gab, dass der Lipidstoffwechsel in den Patientenzellen dereguliert zu sein scheint, wurden die verschiedenen Lipidklassen genauer untersucht. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass auch bei dieser Messung die neutralen Lipide DAG und TAG in den Fibroblasten der Patientin erhöht vorlagen, TAG sogar signifikant, was mit dem Ergebnis der Lipid Oil Red O Färbung übereinstimmt. Des Weiteren waren PE P-, das zur Lipidkategorie der Glycerophospholipide gehört, und das Sphingolipid Ceramid in den Patientenzellen signifikant erhöht. Eine Akkumulation der Lipidklassen DAG, TAG und Sphingolipide steht im Zusammenhang mit einer verringerten Nährstoffversorgung, Entzündungsreaktionen und allgemein einer metabolischen Dysregulation [182], [183]. Daher könnte die erhöhte Menge dieser Lipide ebenfalls auf einen gestörten Energiemetabolismus in den Patientenzellen hindeuten. Außerdem könnte eine Beeinträchtigung der Lipidhomöostase zu einer veränderten Zusammensetzung der Lipide in der

Zellmembran führen, wodurch das Zusammenführen und die Interaktionen von Signalproteinen oder Lipiden innerhalb der Membranen gestört werden könnten.

Sphingolipide sind Hauptbestandteil der Zellmembranen und spielen eine wichtige Rolle bei grundlegenden zellulären Funktionen wie Wachstum, Zellzyklus, Adhäsion und der Stressantwort [184]. Eine Deregulation von Sphingolipiden könnte demnach auch mit dem beobachteten Proliferationsphänotyp der Patientenfibroblasten zusammenhängen. Ceramide sind die Ausgangsmoleküle für die Bildung von weiteren Sphingolipiden. Dazu gehören beispielsweise auch die Ganglioside, die aus Ceramid in Kombination mit Oligosacchariden, die mindestens einen Sialinsäurerest beeinhaltend, synthetisiert werden [184]. Diese Glykosphingolipide kommen besonders häufig im Gehirn und dem Nervensystem vor und sind dort für die Bildung von Neuronen und auch die Reizweiterleitung von großer Bedeutung [185]. Es wäre denkbar, dass durch den beeinträchtigten Hexosamin-Biosyntheseweg und den reduzierten Transport an CMP-Sia durch die *SLC35A1*-Mutation in den Patientenzellen die Gangliosidsynthese behindert wird. Dadurch könnte es zu einem Rückstau auf das Ausgangslipid Ceramid kommen, weshalb eine erhöhte Menge dieses Sphingolipids in den Patientenzellen zu beobachten war. Außerdem könnte eine verminderte Synthese an sialinsäuretragenden Gangliosiden aufgrund deren wichtigen Funktionen für das Gehirn, auch mit der Mikrozephalie und allgemein neurologischen Defiziten der Patientin zusammenhängen. Außerdem wurde beschrieben, dass eine erhöhte Menge an Ceramid die Permeabilität der Mitochondrienmembran beeinflussen kann und somit einen Einfluss auf die Apoptose haben könnte [135]. Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen einem hohen Ceramidlevel und einer reduzierten Expression des Rezeptorproteins CD36 publiziert, das auch in den Lipidmetabolismus involviert ist [136]. Um zu überprüfen, ob bei den Patientenfibroblasten vermehrt Apoptose eingeleitet wird, wurde ein Apoptoseassay durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass bei den Patientenzellen keine erhöhte Apoptose stattzufinden scheint, sondern die Zellen sogar eher weniger empfindlich auf das apoptoseinduzierende Staurosporin reagierten als die Kontrollzellen. Dieses Ergebnis basiert allerdings auf nur einem Experiment (n=1), für eine statistische Analyse müssten also weitere Wiederholungen durchgeführt werden. Auch die Detektion von CD36 im Serum und dem Lysat der Patientenzellen zeigte keine Veränderung in der Expression dieses Proteins. Die möglichen Einflüsse von Ceramid auf diese Prozesse konnten bei den Patientenzellen somit nicht bestätigt werden. Ceramide können aber auch andere Auswirkungen, besonders auf Mitochondrien haben, wie beispielsweise eine erhöhte Bildung von ROS, eine Reduktion des ATPs, Inhibition oder Aktivierung der Elektronentransportkette oder die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen [135]. Möglicherweise besteht also ein Zusammenhang zwischen der hohen Deregulation von mitochondrialen Proteinen, was sicherlich auch Auswirkungen auf den Aufbau von Mitochondrien haben könnte, und dem hohen Ceramidlevel in den Patientenzellen. Es wäre daher möglich, dass die erhöhte Ceramidmenge in den Fibroblasten der Patientin, zumindest unter normalen Kultivierungsbedingungen, zwar keine Auswirkungen auf die Apoptose oder die Expression von *CD36* zeigte, aber dennoch mit den mitochondrialen Deregulationen und dem beeinträchtigten Energiemetabolismus in Verbindung stehen könnte.

Das Plasmalogen PE P- macht etwa 65 % aller Phosphoethanolamine aus und kommt besonders häufig in Neuronen, Muskelzellen, Thrombozyten, Neutrophilen und Makrophagen vor. Die Funktionen von Plasmalogenen sind noch nicht vollständig geklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass sie für die Membranfluidität, die Regulation von Exo- und Endozytose und für die Bindung von freien Radikalen zum Schutz von zellulären Bestandteilen durch oxidativen Stress, wichtig sind [186]. Außerdem sind sie an der Zellteilung, Autophagie und sogar der Proteinfaltung beteiligt [148]. Falls das deregulierte PE P- Level die Zellteilung in den Patientenzellen beeinflusst, könnte dies auch mit der deutlich verlängerten Verdopplungszeit der Fibroblasten zusammenhängen. Die signifikant veränderte Menge an PE P- könnte außerdem Auswirkungen auf die Membranfunktionen der verschiedenen Zelltypen haben und bei der Patientin möglicherweise eine der Ursachen für die Mikrozephalie, Thrombozytopenie und Neutropenie sein.

## 7.12 Behandlungsmöglichkeit durch GlcNAc-Supplementierung

Durch die Analyse verschiedener Transkripte, deren Gene für die Glykosylierung von Bedeutung sind (siehe 7.7 nCounter Messung), wurde festgestellt, dass auch die Bildung von UDP-GlcNAc in den Fibroblasten der Patientin beeinträchtigt sein könnte. UDP-GlcNAc ist das zentrale Metabolit des Hexosamin-Biosynthesewegs und dient, über die Umwandlung in ManNAc, als Vorläufer für CMP-Sialinsäure, oder auch für die Zuckersubstrate GDP-Fucose und GDP-Mannose [17]. Die Bildung von UDP-GlcNAc in den Zellen ist für den Glykosylierungsprozess also von großer Bedeutung. Bei der Messung der verschiedenen nukleotidaktivierten Zucker in den Patientenfibroblasten wurde zwar eine erhöhte Menge an UDP-GlcNAc detektiert, aber aufgrund großer Schwankungen war die Standardabweichung der Messergebnisse sehr hoch. Deshalb wurde dennoch ein Therapieversuch durch eine GlcNAc-Supplementierung der Patientenzellen unternommen. Wellen *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Behandlung von hämatopoetischen Zellen mit GlcNAc die Expression des wachstumsfördernden Interleukin 3 Rezeptors auf der Zelloberfläche erhöht und auch die Proliferation sowie die Energieproduktion durch Aktivierung des Citratzyklus, der Lipidbiosynthese und der Aufnahme von essenziellen Aminosäuren gefördert wird [187]. Außerdem konnte durch die proteomische Analyse der Fibroblasten gezeigt werden, dass der Energiemetabolismus in den Patientenzellen stark dereguliert ist. Es wäre daher möglich, dass die GlcNAc-Supplementierung auch in Fibroblasten einen positiven Effekt auf die ATP-Produktion, damit auf die Energieverfügbarkeit und letztlich auf die Proliferation haben könnte. Die Fibroblasten der Patientin wurden daher mit 10 mM GlcNAc im Kulturmedium supplementiert und nach 24 h bzw. 48 h lysiert und mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde für die Expression der Glykosylierungsmarkerproteine ICAM1 und GP130 keine eindeutigen Unterschiede festgestellt, bei TGN46 nahm dagegen der Anteil an hypoglykosyliertem Protein in den Patientenzellen signifikant ab und näherte sich damit nach 48 h GlcNAc-Supplementierung etwas mehr den Werten der Kontrollzellen an. Die Expression der Proteine, die nur N-Glykane tragen (ICAM und GP130) wurde demnach durch die GlcNAc-Behandlung nicht verbessert, aber es gab eine geringe Menge an hypoglykosylierten Glykoformen bei dem N- und O-glykosylierten sowie O-GlcNAcylierten Protein TGN46. Es wird daher vermutet, dass eine Verringerung der

hypoglykosylierten Formen von TGN46 auf eine Verbesserung der O-Glykosylierung oder O-GlcNAcylierung zurückzuführen ist. Die Intensität des Signals der sialinsäurebindenden Lektine WGA, SNA und MALI wurde durch die Supplementierung kaum verändert. Das WGA-Signal nahm in den behandelten Patientenzellen zwar etwas zu, das gleiche konnte aber auch in den Kontrollzellen beobachtet werden. Es wäre möglich, dass durch die Supplementierung generell mehr N-Glykane bzw. GlcNAc-Reste auf den Proteinen zu finden sind. Die SNA-Signale und damit die  $\alpha$ -2,6 Sialylierung blieben in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle unauffällig. Die  $\alpha$ -2,3 Sialylierung, die anhand des MALI-Signals dargestellt wurde, nahm nach 24 h Supplementierung sowohl in der Kontrolle als auch den Patientenzellen zu, nach 48 h jedoch wieder ab. Die Supplementierung mit GlcNAc führt also zu einer Verbesserung der  $\alpha$ -2,3 Sialylierung, kann diese aber nicht auf ein Kontrollniveau anheben. Es könnte sein, dass der Anstieg der Sialylierung nur ein kurzzeitiger Effekt nach Beginn der GlcNAc-Behandlung ist, da dadurch kurzzeitig mehr Sialinsäure gebildet werden kann und zur Verfügung steht. Durch einen reduzierten Sialinsäuretransport könnte es aber anschließend wieder zu einer Akkumulation und damit zu einer Inhibition des Proteins GNE kommen, wodurch wieder weniger Substrat für den SLC35A1-Transporter gebildet wird. Weiter vorliegendes GlcNAc fließt vermutlich in Richtung der Glykolyse und wird zur Energiebereitstellung verwendet. Die Signale der Lektine RCAI und ECL, die nicht-sialylierte Strukturen erkennen, glichen sich durch die Supplementierung ebenfalls etwas mehr den Kontrollen an. Die signifikante Erhöhung des RCAI-Signals zu Beginn des Experimentes nahm in den Patientenproben mit GlcNAc-Behandlung ab und war nicht mehr signifikant erhöht. Bei ECL waren die Unterschiede weniger ausgeprägt, aber auch hier konnte die Tendenz erkannt werden, dass die erhöhten Signale der Patientenproben durch die Supplementierung abnahmen. Auch die Lektine PNA und Jacalin, die zur Untersuchung der O-Glykosylierung, durch Bindung von Core-1 O-Glykanen eingesetzt wurden, zeigten geringfügige Veränderungen. Bei PNA konnte eine leichte Reduktion des Signals in den Proben der Patientenzellen festgestellt werden, was für eine leichte Verbesserung der Häufigkeit von hyposialylierten O-Glykanen sprach. Das Jacalin-Signal, das zu Beginn des Experimentes in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle leicht verringert war, glich sich im Laufe der Supplementierung der jeweiligen Kontrolle an. Insgesamt nahm das Signal der Proben allerdings ab. Möglicherweise wird bei einer erhöhten GlcNAc-Verfügbarkeit vermehrt ein anderer Glykantyp gebildet als das Core-1 O-Glykan vom Mucintyp. Als Therapieansatz für SLC35A1-CDG Patienten wurde bereits eine Sialinsäure- sowie ManNAc-Supplementierung getestet, die jedoch bei den verwendeten Patientenzellen keinen Erfolg, aufgrund unveränderter Lektinsignale, zeigten [72]. Es wäre jedoch möglich, dass das SLC35A1-Protein in den von Ng *et al.* verwendeten Patientenzellen durch die compound heterozygote Thr156Arg/Glu196Lys Mutation so stark beeinträchtigt war, dass auch durch Erhöhung des benötigten Substrates keine Verbesserung des Glykosylierungsdefekts erreicht werden konnte. Bei den Zellen der in dieser Arbeit untersuchten Patientin zeigte die Supplementierung mit GlcNAc zumindest leichte Effekte, auch wenn ein vollständig kontrollgleiches Glykosylierungsmuster nicht erreicht werden konnte. Dies spricht dafür, dass die größere Substratverfügbarkeit zu einem effizienteren Transport führen kann, falls das Protein generell noch funktionsfähig ist. Es besteht also eine potenzielle Behandlungsmöglichkeit für die Patientin und diese könnte durch das Testen der

Supplementierung von anderen Intermediaten des Hexosamin-Biosynthesewegs, wie der Gabe von Sialinsäure oder der unmittelbaren Vorstufe, ManNAc, möglicherweise weiter optimiert werden. Generell sprechen diese Ergebnisse dafür, dass es möglich sein könnte, SLC35A1-CDG durch Ergänzung der Patientennahrung mit Zuckern zu behandeln, sofern die individuelle Mutation das SLC35A1-Protein nicht zu stark beeinträchtigt.

In Bezug auf die Proliferation konnte durch die GlcNAc-Supplementierung eine in etwa verdoppelte Wachstumsrate und halbierte Verdopplungszeit im Vergleich zu normalen Kultivierungsbedingungen bei den Patientenfibroblasten erreicht werden. Es wäre möglich, dass die OGT-Aktivität, die in den Zellen der Patientin unter normalen Kultivierungsbedingungen reduziert war und deren Aktivität für den Zellzyklus und die Proliferation essenziell ist [176], [177], durch die höhere Verfügbarkeit von GlcNAc erhöht wird. Auf welcher Funktion genau diese Korrelation beruht wurde aber noch nicht beschrieben [176], [177]. Es ist weiterhin bekannt, dass UDP-GlcNAc oder Glucosamin den WNT- bzw. mTOR-Signalweg beeinflussen können und dadurch auch Einfluss auf die Zellproliferation haben [188], [189]. Da das zugeführte GlcNAc auch über Umwandlung in Fructose-6-Phosphat für die Glykolyse und damit die Energiebereitstellung in den Zellen genutzt werden kann, hat dies wahrscheinlich auch einen positiven Effekt auf die Proliferation. Es wäre daher möglich, dass die verbesserte Proliferation der Patientenzellen durch die GlcNAc-Supplementierung auf einem Effekt beruht, der nicht direkt mit dem Glykosylierungsprozess und dem SLC35A1-Protein zusammenhängt, sondern eher mit der Bereitstellung der Zuckersubstrate, dem Energiemetabolismus oder der Regulation der Proliferation durch andere Signalwege, die ebenfalls durch GlcNAc angeregt werden können.

### 7.13 Vergleichende Gegenüberstellung mit bekannten SLC35A1-CDG Patienten

Die inzwischen siebenjährige Patientin, deren Serum und Fibroblasten im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigt vielfältige Symptome, die teilweise auch mit denen der bisher beschriebenen SLC35A1-CDG Patientin übereinstimmen. Insgesamt ergibt sich eine sehr diverse Ausprägung dieses CDG-Typs, der sich zudem schwierig diagnostizieren lässt. Die Standarddiagnostik für Glykosylierungsdefekte über IEF von Transferrin und ApoCIII lieferte bei den bekannten SLC35A1-CDG Patienten nicht immer eindeutige Ergebnisse. Deshalb ist es wichtig, neue Markerproteine oder spezifische Auffälligkeiten im N-Glykanprofil der Patienten zu identifizieren, durch welche die Diagnose verbessert werden kann. Das N-Glykanprofil der Fibroblasten der Patientin zeigte Auffälligkeiten bei den Glykanen M2, M3, F(6)A2G(4)2 und F(6)A4G(4)4S(3)1, die möglicherweise als Marker für einen SLC35A1-Defekt dienen könnten. Allerdings wurde nur die Probe der in dieser Arbeit charakterisierten Patientin analysiert. Es müssten weitere Wiederholungen mit dem Material anderer SLC35A1-CDG Patienten durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob diese Glykane wirklich spezifisch für einen SLC35A1-Defekt sind und damit auch für die Diagnostik verwendet werden können. Ein unauffälliges Transferrinmuster, wie es auch bei der in dieser Arbeit charakterisierten Patientin (Patient 6) zu beobachten war, wurde auch für Patient 1 beschrieben (siehe

Tabelle 24). Bei den Patienten 2, 3 und 4/5 war die Transferrin IEF dagegen auffällig. Möglicherweise kommt es je nach Art der *SLC35A1*-Mutation zu einer Beeinträchtigung der  $\alpha$ -2,6 oder aber hauptsächlich der  $\alpha$ -2,3 Sialylierung, was keine Auswirkungen auf die  $\alpha$ -2,6 gebundenen Sialinsäurereste von Transferrin hat. Der O-Glykosylierungsmarker ApoCIII wurde nicht bei allen Patienten untersucht, aber bei Patient 1 und 2 wurde von einem auffälligen Ergebnis berichtet. Bei der hier charakterisierten Patientin war das ApoCIII Muster vergleichbar mit der Kontrolle, was an der eher milden Ausprägung der Mutation und daran, dass die N-Glykane stärker betroffen zu sein scheinen als die O-Glykane, liegen könnte. Die Aktivität des SLC35A1-Transporters war, sofern sie bestimmt wurde, bei den anderen Patienten niedriger als bei Patient 6. Bei Patient 3 war die Aktivität deutlich auf ca. 11 % reduziert und Patient 2 zeigte eine Aktivität von 50 %. Bei der hier charakterisierten Patientin beträgt die gemittelte Aktivität ca. 65,5 %, was erneut für eine eher milde Beeinträchtigung des Proteins durch die Mutation spricht. Zu den angegebenen Symptomen der Patientin zählen Entwicklungsverzögerung, Kleinwüchsigkeit und Dysmorphien. Auch die Patienten 2, 3 und 4/5 zeigten eine verzögerte Entwicklung und für Patient 2 wurden auch einige Dysmorphien wie Klinodaktylie, Pterygium colli und Hyperlaxie der Gelenke beschrieben [109]. Bei Patient 6, wie auch den anderen SLC35A1-CDG Patienten mit einer homozygoten Mutation (Patient 2, Patient 4/5), wurde zudem eine Mikrozephalie festgestellt. Als weiteres neurologisches Symptom zeigten die meisten der Patienten (Patient 2, 3, 4/5) Ataxie, was bei Patient 6 aber nicht der Fall ist. Stattdessen wurde bei ihr von einer raschen Ermüdung berichtet, die dazu führt, dass sie nur kurze Distanzen gehend zurücklegen kann. Zudem wurde bei allen Patienten, sofern explizit angegeben, von Epilepsie oder Krampfanfällen berichtet. Auch bei Patient 6 ist in der Anamnese ein Krampfanfall vermerkt worden. Ob sich dieser wiederholt hat, oder ob es bei einem einzigen Anfall blieb, ist nicht bekannt. Hypotonie kommt sowohl bei Patient 6 sowie auch bei den Patienten 2 und 3 vor, nicht aber bei dem Geschwisterpärchen Patient 4/5 und für Patient 1 gibt es darüber keine Informationen. Neutropenie in Kombination mit Thrombozytopenie ist neben Patient 6 nur bei Patient 1 festgestellt worden. Bei Patient 2 und 4/5 lagen eine Thrombozytopenie, aber keine Neutropenie vor und bei Patient 3 keines von beidem. Entsprechend wurde bei Patient 1, 2 und 4/5 auch von einer Gerinnungsstörung berichtet. Bei Patient 6 gibt es darüber keine ärztlichen Angaben, es ist aber wahrscheinlich, dass es aufgrund der Thrombozytopenie ebenfalls zu einer beeinträchtigten Gerinnung kommen könnte.

Tabelle 24: Vergleichende Gegenüberstellung der bisher bekannten SLC35A1-CDG Patienten sowie der in dieser Arbeit charakterisierten Patientin (Patient 6) und deren häufigsten Symptome. Angepasst und erweitert nach Ng *et al.* [72].

	<b>Patient 1</b> [107]	<b>Patient 2</b> [109]	<b>Patient 3</b> [72]	<b>Patient 4</b> <b>Patient 5</b> [110]	<b>Patient 6</b>
Mutation	c.277_280delGTG CinsTG  p.Val93Cysfs*17  c.752-158_752- 157insCACT  p.Val208Phefs*20	  c.330G>C  p.Gln101His	c.467C>G  p.Thr156Arg  c.586G>A  p.Glu196Lys	  c.439T>C  p.Ser147Pro	c.133A>G  p.Thr45Ala
Art der Mutation	Compound heterozygot	Homozygot	Compound heterozygot	Homozygot	Homozygot
SLC35A1-Aktivität	-	50 %	ca. 11 %	-	ca. 65,5 %
Entwicklungsverzögerung	-	ja	ja	ja	ja
Thrombozytopenie	ja	ja	nein	ja	ja
Neutropenie	ja	nein	nein	nein	ja
Ataxie	-	ja	ja	ja	nein
Hypotonie	-	ja	ja	nein	ja
Epilepsie/ Krampfanfälle	-	ja	ja	ja	(ja)
Mikrozephalie	-	ja	nein	ja	ja
Gerinnungsstörung	ja	ja	nein	ja	-
Transferrin IEF	Normal	Auffällig (Di-, Trisialo erhöht)	Auffällig (Di-, Trisialo erhöht)	Auffällig (Mono-, Di-, Trisialo erhöht)	Normal
ApoCIII IEF	Auffällig (ApoCIII <sub>2</sub> verringert, ApoCIII <sub>1</sub> erhöht)	Auffällig (ApoCIII <sub>2</sub> verringert, ApoCIII <sub>1</sub> erhöht)	-	-	Normal

Besonders Thrombozytopenie scheint in einem direkten Zusammenhang mit Sialylierungsdefekten zu stehen, da sowohl Patienten mit *SLC35A1*-Mutationen als auch mit genetischen Veränderungen in den Genen *GNE* und *GALE*, die direkt an der Synthese von CMP-Sia durch den Hexosamin-Biosyntheseweg beteiligt sind, meist einen Mangel an Thrombozyten aufweisen. Es wurde festgestellt, dass eine verringerte  $\alpha$ -2,3 Sialylierung der Blutplättchen zu deren frühzeitigen Abbau führt [190]. Der Abbau von Neutrophilen scheint dagegen mit dem Fehlen des Sialyl-Le<sup>x</sup> Antigens auf der Zelloberfläche zusammenzuhängen [190], [191]. Kommt es durch den Sialylierungsdefekt der Patienten zu einer Reduktion oder Fehlen des Sialyl-Le<sup>x</sup> Antigens, könnte dies auch Auswirkungen auf die Funktionen von Leukozyten und damit Entzündungsreaktionen haben [31] und könnte mit wiederkehrenden Infekten in Verbindung stehen, wie sie auch bei der hier charakterisierten Patientin beobachtet wurden. Durch das von Ma *et al.* generierte *Slc35a1*<sup>-/-</sup>-Mausmodell konnte erneut ein Zusammenhang zwischen einem defekten SLC35A1-Transporter und dem Auftreten von Thrombozytopenie hergestellt werden. In den K.o. Mäusen wurde eine erhöhte Menge an nicht-sialylierten Blutplättchen festgestellt, die in der Leber der Mäuse abgebaut wurden [192]. Eine Möglichkeit dieses Symptom zu behandeln, wäre eine Transfusion mit normal glykosylierten Thrombozyten, wie sie bereits von Willig *et al.* beschrieben wurde [106].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Symptome und die Ergebnisse der Diagnostikmarker zwischen den SLC35A1-CDG Patienten nach wie vor unterscheiden, weshalb es keine eindeutige Kombination aus Symptomen zu geben scheint, die direkt auf SLC35A1-CDG zurückzuführen ist. Teilweise gibt es Gemeinsamkeiten wie Entwicklungsverzögerung, Dysmorphien, Hypotonie, Ataxie oder Krampfanfälle, die aber zum einen nicht vollständig bei allen Patienten festgestellt wurden und zum anderen für CDG-Patienten generell typisch sind. Die Symptome, die in Kombination mit den bereits genannten am ehesten spezifisch auf einen Sialylierungsdefekt und damit unter anderem auch auf eine *SLC35A1*-Mutation hindeuten könnten, sind Neutropenie, Thrombozytopenie und eine daraus resultierende Gerinnungsstörung.

## 7.14 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die c.133A>G (p.Thr45Ala) Mutation im *SLC35A1*-Gen, das für den CMP-Sialinsäuretransporter des Golgi-Apparats codiert, einer neuen Patientin charakterisiert. Das mutierte SLC35A1-Protein scheint generell noch funktionsfähig zu sein, die Mutation führt aber zu einer verringerten Halbwertszeit bzw. Stabilität des Proteins, was die Hauptursache für die beobachtete, reduzierte Transporteraktivität und den Glykosylierungsdefekt in den Fibroblasten der Patientin sein könnte. Die verringerte Aktivität scheint auszureichen, um ein gewisses Sialylierungslevel, vor allem im Serum der Patientin, aufrechtzuerhalten. Der mutierte Transporter scheint kaum Auswirkungen auf die Serumproteine zu haben, was damit zusammenhängen könnte, dass die Nährstoffe aus der Nahrung von Magen und Darm an die Leber weitergeleitet werden, in der die meisten sekretierten Proteine gebildet werden. Möglicherweise reicht die Bereitstellung von Zuckersubstraten aus der Nahrung in Kombination mit dem eher nur geringfügig beeinträchtigten Transporterprotein aus, um für eine annähernd normale Sialylierung zu sorgen. Um die Mutation unabhängig vom genetischen Hintergrund der Patientin zu untersuchen, wurde eine HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zelllinie generiert. Die Experimente mit dieser Zelllinie führten teilweise zu abweichenden Ergebnissen, was vermutlich mit zelltypspezifischen Unterschieden der Expression, des Stoffwechsels und der Glykosylierung zusammenhängt. Außerdem wäre es möglich, dass der genetische Hintergrund der Patientin eine Rolle für den beobachteten Phänotyp spielt. Da HEK293-Zellen aber teilweise Ähnlichkeit mit den Charakteristika von Neuronen zeigen [64], könnte dies auch interessante Hinweise auf die Auswirkungen der *SLC35A1*-Mutation in anderen Zelltypen geben. Um in zukünftigen Experimenten festzustellen, welche Auswirkungen die c.133A>G Mutation im genetischen Hintergrund der Patientin hat, müssten deren Fibroblasten genetisch verändert werden, um die Punktmutation in die wildtypische Sequenz umzuwandeln. Dies könnte jedoch eine schwierig umzusetzende Aufgabe sein, da Fibroblasten schwer zu transfizieren und zu vereinzeln sind, sodass ein herkömmlicher CRISPR/Cas9 Ansatz vermutlich nicht funktionieren würde. In dieser Arbeit wurde außerdem festgestellt, dass ein defekter SLC35A1-Transporter zu einer Deregulation verschiedener Bereiche des N-Glykosylierungsprozesses führt. Ob dies durch direkte Interaktionen oder Feedback-Reaktionen ausgelöst wird ist noch ungeklärt und wäre ein interessanter Ansatz für zukünftige Forschungsprojekte. Zudem wäre es noch interessant das SLC35A1-Protein daraufhin zu untersuchen, ob es trotz der Patientenmutation fähig ist, in der Golgi-Membran Dimere zu bilden, da dies die Aktivität ebenfalls beeinträchtigen könnte.

Generell bleibt zu beachten, dass für die hier durchgeführten Experimente lediglich Material von einer Patientin zur Verfügung stand. Die Erkenntnisse durch Untersuchung der Fibroblasten und des Serums lassen sich nicht ohne weiteres auf einen ganzen Organismus übertragen. Es wäre durchaus möglich, dass die Mutation in anderen Organen oder Zelltypen des Körpers weitreichendere Auswirkungen hat, wodurch der klinische Phänotyp der Patientin hervorgerufen wird. Zudem kann nicht festgestellt werden, welche Auswirkungen die Mutation und die daraus resultierende, reduzierte Aktivität des SLC35A1-Proteins bei der embryonalen Entwicklung hatte. Genauso bleibt unklar, wie sich die Mutation auf die weitere Entwicklung der Patientin auswirken

könnte, beispielsweise bei starkem Wachstum in der Pubertät, wobei verstärkt Glykoproteine bereitgestellt werden müssen, oder bei Stresssituationen wie z.B. bei einer Infektion oder Nährstoffmangel.

Als potenzielle Behandlungsmöglichkeit für die hier charakterisierte Patientin kommt zum einen eine diätische Supplementierung mit GlcNAc in Frage. Die dazu durchgeführten Experimente mit den Patientenfibroblasten führten zwar nicht zu einer globalen Verbesserung der Glykosylierung, scheinen aber dennoch positive Auswirkungen auf den generellen Stoffwechsel der Zellen zu haben, was anhand einer erheblichen Verbesserung der Proliferation festgestellt wurde. Es wäre daher möglich, dass eine erhöhte Zufuhr an GlcNAc auch einen positiven Effekt auf den gesamten Organismus der Patientin haben könnte. Zum anderen könnte eine Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen in Betracht gezogen werden, da der Glykosylierungsdefekt der Patientin vermutlich vor allem mit der reduzierten Stabilität des SLC35A1-Proteins zusammenhängt. Die verabreichten Chaperone könnten die korrekte Faltung des Proteins unterstützen und damit die Stabilität verbessern [104], [193]. Da das Protein generell noch funktionsfähig zu sein scheint, wäre es möglich, dass die Symptome der Patientin dadurch gemildert werden könnten.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass im Rahmen dieser Arbeit eine neue *SLC35A1*-Mutation charakterisiert wurde, die bei der untersuchten Patientin zu einer milden Form von SLC35A1-CDG führt. Die daraus entstandenen Erkenntnisse können dazu beitragen, diesen komplexen, schwierig zu diagnostizierenden und sehr diversen CDG-Typ weiter zu erforschen. Außerdem wurden erste Zusammenhänge zwischen einem defekten Transporterprotein und der Expression anderer glykosylierungsrelevanter Proteine entdeckt, die einen Grundstein für weitere Forschungsprojekte legen, um die Regulation des N-Glykosylierungsprozesses genauer zu verstehen.

## 8 Referenzen

- [1] K.-Y. Huang *u. a.*, „dbPTM in 2019: exploring disease association and cross-talk of post-translational modifications“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 47, Nr. Database issue, S. D298–D308, Jan. 2019, doi: 10.1093/nar/gky1074.
- [2] T.-Y. Lee, H.-D. Huang, J.-H. Hung, H.-Y. Huang, Y.-S. Yang, und T.-H. Wang, „dbPTM: an information repository of protein post-translational modification“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 34, Nr. Database issue, S. D622–D627, Jan. 2006, doi: 10.1093/nar/gkj083.
- [3] R. G. Spiro, „Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds“, *Glycobiology*, Bd. 12, Nr. 4, S. 43R–56R, Apr. 2002, doi: 10.1093/glycob/12.4.43R.
- [4] K. W. Moremen, M. Tiemeyer, und A. V. Nairn, „Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 13, Nr. 7, S. 448–462, Juni 2012, doi: 10.1038/nrm3383.
- [5] R. Apweiler, H. Hermjakob, und N. Sharon, „On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1473, Nr. 1, S. 4–8, Dez. 1999, doi: 10.1016/s0304-4165(99)00165-8.
- [6] A. Dell, A. Galadari, F. Sastre, und P. Hitchen, „Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes“, *Int. J. Microbiol.*, Bd. 2010, S. 148178, 2010, doi: 10.1155/2010/148178.
- [7] C. G. Gahmberg und M. Tolvanen, „Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 21, Nr. 8, S. 308–311, Aug. 1996, doi: 10.1016/S0968-0004(96)10034-7.
- [8] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, und L. Stryer, „Kohlenhydrate“, in *Stryer Biochemie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, S. 373–403. doi: 10.1007/978-3-662-54620-8\_11.
- [9] K. T. Schjoldager, Y. Narimatsu, H. J. Joshi, und H. Clausen, „Global view of human protein glycosylation pathways and functions“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 21, Nr. 12, Art. Nr. 12, Dez. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00294-x.
- [10] G. Lauc, M. Pezer, I. Rudan, und H. Campbell, „Mechanisms of disease: The human N-glycome“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 1860, Nr. 8, S. 1574–1582, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.10.016.
- [11] M. R. Sairam, „Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction“, *FASEB J.*, Bd. 3, Nr. 8, S. 1915–1926, 1989, doi: 10.1096/fasebj.3.8.2542111.
- [12] J. D. Marth und P. K. Grewal, „Mammalian glycosylation in immunity“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 8, Nr. 11, Art. Nr. 11, Nov. 2008, doi: 10.1038/nri2417.
- [13] J. Breitling und M. Aebi, „N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum“, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Bd. 5, Nr. 8, S. a013359, Aug. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a013359.
- [14] A. Alavi und J. S. Axford, „Sweet and sour: the impact of sugars on disease“, *Rheumatology*, Bd. 47, Nr. 6, S. 760–770, Juni 2008, doi: 10.1093/rheumatology/ken081.
- [15] S. Shrimal, N. A. Cherepanova, und R. Gilmore, „Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum“, *Semin. Cell Dev. Biol.*, Bd. 41, S. 71–78, Mai 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.005.
- [16] L. A. Wolfe, E. Morava, M. He, J. Vockley, und K. M. Gibson, „Heritable disorders in the metabolism of the dolichols: A bridge from sterol biosynthesis to molecular glycosylation“, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, Bd. 160C, Nr. 4, S. 322–328, 2012, doi: 10.1002/ajmg.c.31345.
- [17] H. H. Freeze, M. Boyce, N. E. Zachara, G. W. Hart, und R. L. Schnaar, „Glycosylation Precursors“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L.

- Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 17. April 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579932/>
- [18] N. Wang, S.-T. Li, M.-H. Xiang, und X.-D. Gao, „Alg mannosyltransferases: From functional and structural analyses to the lipid-linked oligosaccharide pathway reconstitution“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 1866, Nr. 5, S. 130112, Mai 2022, doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130112.
- [19] M. A. Haeuptle *u. a.*, „Human RFT1 Deficiency Leads to a Disorder of N-Linked Glycosylation“, *Am. J. Hum. Genet.*, Bd. 82, Nr. 3, S. 600–606, März 2008, doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.021.
- [20] J. Helenius, D. T. W. Ng, C. L. Marolda, P. Walter, M. A. Valvano, und M. Aebi, „Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein“, *Nature*, Bd. 415, Nr. 6870, Art. Nr. 6870, Jan. 2002, doi: 10.1038/415447a.
- [21] P. Stanley, K. W. Moremen, N. E. Lewis, N. Taniguchi, und M. Aebi, „N-Glycans“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 17. April 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
- [22] D. J. Kelleher, D. Karaoglu, E. C. Mandon, und R. Gilmore, „Oligosaccharyltransferase Isoforms that Contain Different Catalytic STT3 Subunits Have Distinct Enzymatic Properties“, *Mol. Cell*, Bd. 12, Nr. 1, S. 101–111, Juli 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00243-0.
- [23] D. J. Kelleher und R. Gilmore, „An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase“, *Glycobiology*, Bd. 16, Nr. 4, S. 47R-62R, Apr. 2006, doi: 10.1093/glycob/cwj066.
- [24] T. Hirata und Y. Kizuka, „N-Glycosylation“, in *The Role of Glycosylation in Health and Disease*, Bd. 1325, G. Lauc und I. Trbojević-Akmačić, Hrsg., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1325, Cham: Springer International Publishing, 2021, S. 3–24. doi: 10.1007/978-3-030-70115-4\_1.
- [25] B. G. Ng und H. H. Freeze, „Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders“, *Trends Genet.*, Bd. 34, Nr. 6, S. 466–476, Juni 2018, doi: 10.1016/j.tig.2018.03.002.
- [26] P. Stanley, „Golgi Glycosylation“, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Bd. 3, Nr. 4, Apr. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a005199.
- [27] A. Harduin-Lepers, R. Mollicone, P. Delannoy, und R. Oriol, „The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach“, *Glycobiology*, Bd. 15, Nr. 8, S. 805–817, Aug. 2005, doi: 10.1093/glycob/cwi063.
- [28] D. Dutta, C. Mandal, und C. Mandal, „Unusual glycosylation of proteins: Beyond the universal sequon and other amino acids“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 1861, Nr. 12, S. 3096–3108, Dez. 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.025.
- [29] I. Brockhausen, H. H. Wandall, K. G. T. Hagen, und P. Stanley, „O-GalNAc Glycans“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 19. April 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579921/>
- [30] J. E. Hansen, O. Lund, J. O. Nielsen, J.-E. S. Hansen, und S. Brunak, „O-GLYCBASE: A Revised Database of O -Glycosylated Proteins“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 24, Nr. 1, S. 248–252, Jan. 1996, doi: 10.1093/nar/24.1.248.
- [31] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, und J. Novak, „Glycosylation in health and disease“, *Nat. Rev. Nephrol.*, Bd. 15, Nr. 6, Art. Nr. 6, Juni 2019, doi: 10.1038/s41581-019-0129-4.

- [32] F.-G. Hanisch, „O-Glycosylation of the Mucin Type“, *Biol. Chem.*, Bd. 382, Nr. 2, Jan. 2001, doi: 10.1515/BC.2001.022.
- [33] R. S. Haltiwanger, L. Wells, H. H. Freeze, H. Jafar-Nejad, T. Okajima, und P. Stanley, „Other Classes of Eukaryotic Glycans“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 12. April 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579906/>
- [34] A. Magalhães, H. O. Duarte, und C. A. Reis, „The role of O-glycosylation in human disease“, *Mol. Aspects Med.*, Bd. 79, S. 100964, Juni 2021, doi: 10.1016/j.mam.2021.100964.
- [35] I. S. B. Larsen *u. a.*, „Discovery of an O-mannosylation pathway selectively serving cadherins and protocadherins“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 114, Nr. 42, S. 11163–11168, Okt. 2017, doi: 10.1073/pnas.1708319114.
- [36] M. O. Sheikh, S. M. Halmo, und L. Wells, „Recent advancements in understanding mammalian O-mannosylation“, *Glycobiology*, Bd. 27, Nr. 9, S. 806–819, Sep. 2017, doi: 10.1093/glycob/cwx062.
- [37] C. Butkinaree, K. Park, und G. W. Hart, „O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1800, Nr. 2, S. 96–106, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.018.
- [38] G. W. Hart, „Nutrient regulation of signaling and transcription“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 294, Nr. 7, S. 2211–2231, Feb. 2019, doi: 10.1074/jbc.AW119.003226.
- [39] K. Sakabe, Z. Wang, und G. W. Hart, „ $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 107, Nr. 46, S. 19915–19920, Nov. 2010, doi: 10.1073/pnas.1009023107.
- [40] M.-A. Doucey, D. Hess, R. Cacan, und J. Hofsteenge, „Protein C-Mannosylation Is Enzyme-catalysed and Uses Dolichyl-Phosphate-Mannose as a Precursor“, *Mol. Biol. Cell*, Bd. 9, Nr. 2, S. 291–300, Feb. 1998.
- [41] W. Lw, L.-M. C, H. Rs, und A. Ss, „Post-translational modification of thrombospondin type-1 repeats in ADAMTS-like 1/punctin-1 by C-mannosylation of tryptophan“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 284, Nr. 44, Okt. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.038059.
- [42] J. Krieg, S. Hartmann, A. Vicentini, W. Gläsner, D. Hess, und J. Hofsteenge, „Recognition Signal for C-Mannosylation of Trp-7 in RNase 2 Consists of Sequence Trp-x-x-Trp“, *Mol. Biol. Cell*, Bd. 9, Nr. 2, S. 301–309, Feb. 1998.
- [43] S. Minakata *u. a.*, „Protein C-Mannosylation and C-Mannosyl Tryptophan in Chemical Biology and Medicine“, *Molecules*, Bd. 26, Nr. 17, S. 5258, Aug. 2021, doi: 10.3390/molecules26175258.
- [44] A. P. Willems, B. G. M. van Engelen, und D. J. Lefeber, „Genetic defects in the hexosamine and sialic acid biosynthesis pathway“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1860, Nr. 8, S. 1640–1654, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.12.017.
- [45] N. M. Akella, L. Ciraku, und M. J. Reginato, „Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer“, *BMC Biol.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 52, Juli 2019, doi: 10.1186/s12915-019-0671-3.
- [46] C. Durrant *u. a.*, „Defects in Galactose Metabolism and Glycoconjugate Biosynthesis in a UDP-Glucose Pyrophosphorylase-Deficient Cell Line Are Reversed by Adding Galactose to the Growth Medium“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 21, Nr. 6, S. 2028, März 2020, doi: 10.3390/ijms21062028.
- [47] P. Franzka *u. a.*, „GMPPA defects cause a neuromuscular disorder with  $\alpha$ -dystroglycan hyperglycosylation“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 131, Nr. 9, Mai 2021, doi: 10.1172/JCI139076.
- [48] J. Nüttymäki, P. Mattila, und R. Renkonen, „Differential gene expression of GDP-L-fucose-synthesizing enzymes, GDP-fucose transporter and fucosyltransferase VII“, *APMIS Acta*

- Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, Bd. 114, Nr. 7–8, S. 539–548, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0463.2006.apm\_461.x.
- [49] N. Itano und S. Iwamoto, „Dysregulation of hexosamine biosynthetic pathway wiring metabolic signaling circuits in cancer“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 1867, Nr. 1, S. 130250, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130250.
- [50] M. S. Denzel und A. Antebi, „Hexosamine pathway and (ER) protein quality control“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 33, S. 14–18, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.ccb.2014.10.001.
- [51] R. J. Clark *u. a.*, „Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 278, Nr. 45, S. 44230–44237, Nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M303810200.
- [52] R. R. Traxinger und S. Marshall, „Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 266, Nr. 16, S. 10148–10154, Juni 1991.
- [53] A. Paneque, H. Fortus, J. Zheng, G. Werlen, und E. Jacinto, „The Hexosamine Biosynthesis Pathway: Regulation and Function“, *Genes*, Bd. 14, Nr. 4, S. 933, Apr. 2023, doi: 10.3390/genes14040933.
- [54] D. Maszczak-Seneczko, M. Wiktor, E. Skurska, W. Wiertelak, und M. Olczak, „Delivery of Nucleotide Sugars to the Mammalian Golgi: A Very Well (un)Explained Story“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 23, Nr. 15, S. 8648, Aug. 2022, doi: 10.3390/ijms23158648.
- [55] B. Hadley, T. Litfin, C. J. Day, T. Haselhorst, Y. Zhou, und J. Tiralongo, „Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function“, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, Bd. 17, S. 1123–1134, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.csbj.2019.08.002.
- [56] S. Ahuja und M. R. Whorton, „Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport“, *eLife*, Bd. 8, S. e45221, Apr. 2019, doi: 10.7554/eLife.45221.
- [57] M. Eckhardt, B. Gotza, und R. Gerardy-Schahn, „Mutants of the CMP-sialic Acid Transporter Causing the Lec2 Phenotype“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 273, Nr. 32, S. 20189–20195, Aug. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.32.20189.
- [58] Z. Song, „Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease“, *Mol. Aspects Med.*, Bd. 34, Nr. 2, S. 590–600, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.12.004.
- [59] E. Nji, A. Gulati, A. A. Qureshi, M. Coincon, und D. Drew, „Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialylation“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Bd. 26, Nr. 6, Art. Nr. 6, Juni 2019, doi: 10.1038/s41594-019-0225-y.
- [60] B. Ury, S. Potelle, F. Caligiore, M. R. Whorton, und G. T. Bommer, „The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 296, S. 100789, Juni 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100789.
- [61] W. Zhao, T.-L. L. Chen, B. M. Vertel, und K. J. Colley, „The CMP-sialic Acid Transporter Is Localized in the Medial-Trans Golgi and Possesses Two Specific Endoplasmic Reticulum Export Motifs in Its Carboxyl-terminal Cytoplasmic Tail“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 281, Nr. 41, S. 31106–31118, Okt. 2006, doi: 10.1074/jbc.M605564200.
- [62] R. Salinas-Marín, R. Mollicone, und I. Martínez-Duncker, „A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter“, *Glycoconj. J.*, Bd. 33, Nr. 6, S. 897–906, Dez. 2016, doi: 10.1007/s10719-016-9697-8.
- [63] N. Ishida und M. Kawakita, „Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35)“, *Pflugers Arch.*, Bd. 447, Nr. 5, S. 768–775, Feb. 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1093-0.
- [64] B. Szulc, Y. Zadorozhna, M. Olczak, W. Wiertelak, und D. Maszczak-Seneczko, „Novel Insights into Selected Disease-Causing Mutations within the SLC35A1 Gene Encoding the CMP-Sialic Acid Transporter“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 304, Dez. 2020, doi: 10.3390/ijms22010304.
- [65] K. Aoki, N. Ishida, und M. Kawakita, „Substrate Recognition by Nucleotide Sugar Transporters: FURTHER CHARACTERIZATION OF SUBSTRATE RECOGNITION REGIONS BY ANALYSES OF UDP-GALACTOSE/CMP-SIALIC ACID

- TRANSPORTER CHIMERAS AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF PARENTAL AND CHIMERIC TRANSPORTERS \*“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 278, Nr. 25, S. 22887–22893, Juni 2003, doi: 10.1074/jbc.M302620200.
- [66] S. F. Lim, M. M. Lee, P. Zhang, und Z. Song, „The Golgi CMP-sialic acid transporter: A new CHO mutant provides functional insights“, *Glycobiology*, Bd. 18, Nr. 11, S. 851–860, Nov. 2008, doi: 10.1093/glycob/cwn080.
- [67] A. L. Lewis, X. Chen, R. L. Schnaar, und A. Varki, „Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 26. Juni 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579976/>
- [68] C. Traving und R. Schauer, „Structure, function and metabolism of sialic acids“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, Bd. 54, Nr. 12, S. 1330–1349, Dez. 1998, doi: 10.1007/s000180050258.
- [69] S.-W. Yoo *u. a.*, „Sialylation regulates brain structure and function“, *FASEB J.*, Bd. 29, Nr. 7, S. 3040–3053, 2015, doi: 10.1096/fj.15-270983.
- [70] M. Eckhardt, M. Mühlenhoff, A. Bethe, und R. Gerardy-Schahn, „Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 93, Nr. 15, S. 7572–7576, Juli 1996.
- [71] M. Schwarzkopf *u. a.*, „Sialylation is essential for early development in mice“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 99, Nr. 8, S. 5267–5270, Apr. 2002, doi: 10.1073/pnas.072066199.
- [72] B. G. Ng *u. a.*, „Encephalopathy caused by novel mutations in the CMP-sialic acid transporter, SLC35A1“, *Am. J. Med. Genet. A.*, Bd. 173, Nr. 11, S. 2906–2911, Nov. 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38412.
- [73] M. Trinchera, A. Aronica, und F. Dall’Olio, „Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers“, *Biology*, Bd. 6, Nr. 1, S. 16, Feb. 2017, doi: 10.3390/biology6010016.
- [74] T. Hennet, D. Chui, J. C. Paulson, und J. D. Marth, „Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 95, Nr. 8, S. 4504–4509, Apr. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.8.4504.
- [75] A. Varki, „Sialic acids in human health and disease“, *Trends Mol. Med.*, Bd. 14, Nr. 8, S. 351–360, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.002.
- [76] I. Moustafa *u. a.*, „Sialic Acid Recognition by *Vibrio cholerae* Neuraminidase\*“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 279, Nr. 39, S. 40819–40826, Sep. 2004, doi: 10.1074/jbc.M404965200.
- [77] J. Jaeken, „Chapter 179 - Congenital disorders of glycosylation“, in *Handbook of Clinical Neurology*, Bd. 113, O. Dulac, M. Lasseigne, und H. B. Sarnat, Hrsg., in *Pediatric Neurology Part III*, vol. 113. , Elsevier, 2013, S. 1737–1743. doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7.
- [78] J. Jaeken, T. Hennet, H. H. Freeze, und G. Matthijs, „On the nomenclature of congenital disorders of glycosylation (CDG)“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Bd. 31, Nr. 6, S. 669–672, Dez. 2008, doi: 10.1007/s10545-008-0983-x.
- [79] J. Jaeken *u. a.*, „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“, *Pediatr. Res.*, Bd. 14, Nr. 2, Art. Nr. 2, Feb. 1980, doi: 10.1203/00006450-198002000-00117.
- [80] R. Péanne *u. a.*, „Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis?“, *Eur. J. Med. Genet.*, Bd. 61, Nr. 11, S. 643–663, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.ejmg.2017.10.012.
- [81] „About CDG | CDG Hub“. Zugegriffen: 23. Juni 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.cdghub.com/about/>
- [82] D. J. Lefeber, H. H. Freeze, R. Steet, und T. Kinoshita, „Congenital Disorders of Glycosylation“, in *Essentials of Glycobiology*, 4th Aufl., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, und P. H. Seeberger, Hrsg., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, 2022. Zugegriffen: 23. Juni 2023. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579928/>
- [83] P. Lipiński und A. Tylki-Szymańska, „Congenital Disorders of Glycosylation: What Clinicians Need to Know?“, *Front. Pediatr.*, Bd. 9, S. 715151, Sep. 2021, doi: 10.3389/fped.2021.715151.
- [84] R. Westermeier, W. Postel, J. Weser, und A. Görg, „High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients“, *J. Biochem. Biophys. Methods*, Bd. 8, Nr. 4, S. 321–330, Dez. 1983, doi: 10.1016/0165-022X(83)90006-4.
- [85] J. Denecke, „Biomarkers and diagnosis of congenital disorders of glycosylation“, *Expert Opin. Med. Diagn.*, Bd. 3, Nr. 4, S. 395–409, Juli 2009, doi: 10.1517/17530050902878023.
- [86] Y. Satomi, Y. Shimonishi, T. Hase, und T. Takao, „Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry“, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Bd. 18, Nr. 24, S. 2983–2988, 2004, doi: 10.1002/rcm.1718.
- [87] Y. Wada *u. a.*, „Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 189, Nr. 2, S. 832–836, Dez. 1992, doi: 10.1016/0006-291X(92)92278-6.
- [88] E. Marklová und Z. Albahri, „Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation“, *Clin. Chim. Acta*, Bd. 385, Nr. 1, S. 6–20, Okt. 2007, doi: 10.1016/j.cca.2007.07.002.
- [89] C. Thiel, D. Meßner-Schmitt, G. F. Hoffmann, und C. Körner, „Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Bd. 36, Nr. 5, S. 887–892, Sep. 2013, doi: 10.1007/s10545-012-9531-9.
- [90] S. Wopereis *u. a.*, „Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis“, *Clin. Chem.*, Bd. 49, Nr. 11, S. 1839–1845, Nov. 2003, doi: 10.1373/clinchem.2003.022541.
- [91] H. A. Carchon, R. Chevigné, J.-B. Falmagne, und J. Jaeken, „Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin“, *Clin. Chem.*, Bd. 50, Nr. 1, S. 101–111, Jan. 2004, doi: 10.1373/clinchem.2003.021568.
- [92] J. M. Lacey, H. R. Bergen, M. J. Magera, S. Naylor, und J. F. O’Brien, „Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry“, *Clin. Chem.*, Bd. 47, Nr. 3, S. 513–518, März 2001.
- [93] F. Parente, N. Ah Mew, J. Jaeken, und B. M. Gilfix, „A new capillary zone electrophoresis method for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDG)“, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, Bd. 411, Nr. 1–2, S. 64–66, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.cca.2009.10.004.
- [94] C. R. Ferreira, R. Altassan, D. Marques-Da-Silva, R. Francisco, J. Jaeken, und E. Morava, „Recognizable phenotypes in CDG“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Bd. 41, Nr. 3, S. 541–553, Mai 2018, doi: 10.1007/s10545-018-0156-5.
- [95] N. Abu Bakar, D. J. Lefeber, und M. van Scherpenzeel, „Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Bd. 41, Nr. 3, S. 499–513, 2018, doi: 10.1007/s10545-018-0144-9.
- [96] M. Guillard *u. a.*, „Plasma N-Glycan Profiling by Mass Spectrometry for Congenital Disorders of Glycosylation Type II“, *Clin. Chem.*, Bd. 57, Nr. 4, S. 593–602, Apr. 2011, doi: 10.1373/clinchem.2010.153635.
- [97] N. Abu Bakar *u. a.*, „Intact transferrin and total plasma glycoproteomics for diagnosis and therapy monitoring in phosphoglucomutase-I deficiency“, *Transl. Res.*, Bd. 199, S. 62–76, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.trsl.2018.04.008.
- [98] P. Sosicka, B. G. Ng, und H. H. Freeze, „Therapeutic Monosaccharides: Looking Back, Moving Forward“, *Biochemistry*, Bd. 59, Nr. 34, S. 3064–3077, Sep. 2020, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00565.
- [99] J. Verheijen, S. Tahata, T. Kozicz, P. Witters, und E. Morava, „Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update“,

- Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.*, Bd. 22, Nr. 2, S. 268–279, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41436-019-0647-2.
- [100] R. G. Feichtinger *u. a.*, „A spoonful of L-fucose-an efficient therapy for GFUS-CDG, a new glycosylation disorder“, *EMBO Mol. Med.*, Bd. 13, Nr. 9, S. e14332, Sep. 2021, doi: 10.15252/emmm.202114332.
- [101] N. Ondruskova, A. Cechova, H. Hansikova, T. Honzik, und J. Jaeken, „Congenital disorders of glycosylation: Still “hot” in 2020“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, Bd. 1865, Nr. 1, S. 129751, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129751.
- [102] A. F. Martínez-Monseny *u. a.*, „AZATAx: Acetazolamide safety and efficacy in cerebellar syndrome in PMM2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG)“, *Ann. Neurol.*, Bd. 85, Nr. 5, S. 740–751, Mai 2019, doi: 10.1002/ana.25457.
- [103] S. Brasil *u. a.*, „CDG Therapies: From Bench to Bedside“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 19, Nr. 5, S. 1304, Apr. 2018, doi: 10.3390/ijms19051304.
- [104] P. Yuste-Checa *u. a.*, „Pharmacological Chaperoning: A Potential Treatment for PMM2-CDG“, *Hum. Mutat.*, Bd. 38, Nr. 2, S. 160–168, 2017, doi: 10.1002/humu.23138.
- [105] S. Mitrani-Rosenbaum *u. a.*, „Sustained expression and safety of human GNE in normal mice after gene transfer based on AAV8 systemic delivery“, *Neuromuscul. Disord. NMD*, Bd. 22, Nr. 11, S. 1015–1024, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.nmd.2012.03.013.
- [106] T.-N. Willig, „Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes--a new syndrome?“, *Blood*, Bd. 97, Nr. 3, S. 826–828, Feb. 2001, doi: 10.1182/blood.V97.3.826.
- [107] I. Martínez-Duncker *u. a.*, „Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter“, *Blood*, Bd. 105, Nr. 7, S. 2671–2676, Apr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-09-3509.
- [108] S. Wopereis *u. a.*, „Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects“, *Clin. Chem.*, Bd. 53, Nr. 2, S. 180–187, Feb. 2007, doi: 10.1373/clinchem.2006.073940.
- [109] M. Mohamed *u. a.*, „Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport“, *Neurology*, Bd. 81, Nr. 7, S. 681–687, Aug. 2013, doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a08f53.
- [110] A. Kauskot *u. a.*, „A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation“, *Haematologica*, Bd. 103, Nr. 12, S. e613–e617, Dez. 2018, doi: 10.3324/haematol.2018.198028.
- [111] R. Niehues *u. a.*, „Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy.“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 101, Nr. 7, S. 1414–1420, Apr. 1998.
- [112] C. Körner, L. Lehle, und K. von Figura, „Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency“, *Glycobiology*, Bd. 8, Nr. 2, S. 165–171, Feb. 1998, doi: 10.1093/glycob/8.2.165.
- [113] X. Liu, C. Li, C. Mou, Y. Dong, und Y. Tu, „dbNSFP v4: a comprehensive database of transcript-specific functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs“, *Genome Med.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 103, Dez. 2020, doi: 10.1186/s13073-020-00803-9.
- [114] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, und R. J. Randall, „Protein measurement with the Folin phenol reagent“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 193, Nr. 1, S. 265–275, Nov. 1951.
- [115] A. Banning, A. Zakrzewicz, X. Chen, S. J. Gray, und R. Tikkanen, „Knockout of the CMP-Sialic Acid Transporter SLC35A1 in Human Cell Lines Increases Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus 9: Implications for Gene Therapy Potency Assays“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 5, S. 1259, Mai 2021, doi: 10.3390/cells10051259.

- [116] „Cloning Cells with the Agarose Method“, Lindberg Lab. Zugegriffen: 29. August 2022. [Online]. Verfügbar unter: <http://thelindberglab.com/cloning-cells-with-the-agarose-method/>
- [117] P. Schindele, F. Wolter, und H. Puchta, „CRISPR Guide RNA Design Guidelines for Efficient Genome Editing“, in *RNA Tagging*, Bd. 2166, M. Heinlein, Hrsg., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2166, New York, NY: Springer US, 2020, S. 331–342. doi: 10.1007/978-1-0716-0712-1\_19.
- [118] G. Liebisch, M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, und G. Schmitz, „High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, Bd. 1761, Nr. 1, S. 121–128, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.bbaliip.2005.12.007.
- [119] C. Özbacı, T. Sachsenheimer, und B. Brügger, „Quantitative analysis of cellular lipids by nano-electrospray ionization mass spectrometry“, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, Bd. 1033, S. 3–20, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-487-6\_1.
- [120] L. M. Røst, A. Shafaei, K. Fuchino, und P. Bruheim, „Zwitterionic HILIC tandem mass spectrometry with isotope dilution for rapid, sensitive and robust quantification of pyridine nucleotides in biological extracts“, *J. Chromatogr. B*, Bd. 1144, S. 122078, Mai 2020, doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122078.
- [121] L. Hoeren, „A novel variant of the Golgi CMP-sialic acid transporter SLC35A1 induces dysregulation of glycomarkers and affects N-glycosylation and O-mannosylation in patient derived primary fibroblasts and serum.“, Masterarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Deutschland, 2020.
- [122] U. Omasits, C. H. Ahrens, S. Müller, und B. Wollscheid, „Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 30, Nr. 6, S. 884–886, März 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btt607.
- [123] B. Reva, Y. Antipin, und C. Sander, „Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 39, Nr. 17, S. e118, Sep. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr407.
- [124] B. Reva, Y. Antipin, und C. Sander, „Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization“, *Genome Biol.*, Bd. 8, Nr. 11, S. R232, 2007, doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r232.
- [125] C. H. Rodrigues, D. E. Pires, und D. B. Ascher, „DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 46, Nr. W1, S. W350–W355, Juli 2018, doi: 10.1093/nar/gky300.
- [126] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, und M. J. E. Sternberg, „The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis“, *Nat. Protoc.*, Bd. 10, Nr. 6, S. 845–858, Juni 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.053.
- [127] M. E.A. Pereira, E. A. Kabat, R. Lotan, und N. Sharon, „Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) Agglutinin“, *Carbohydr. Res.*, Bd. 51, Nr. 1, S. 107–118, Okt. 1976, doi: 10.1016/S0008-6215(00)84040-9.
- [128] A. A. Jeyaprakash *u. a.*, „Crystal Structure of the Jacalin–T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin–T-antigen Complexes“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 321, Nr. 4, S. 637–645, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00674-5.
- [129] T. Iskratsch, A. Braun, K. Paschinger, und I. B. H. Wilson, „Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins“, *Anal. Biochem.*, Bd. 386, Nr. 2, S. 133–146, März 2009, doi: 10.1016/j.ab.2008.12.005.
- [130] F. Lehmann, E. Tiralongo, und J. Tiralongo, „Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 63, Nr. 12, S. 1331–1354, 2006, doi: 10.1007/s00018-005-5589-y.
- [131] L. Zheng *u. a.*, „Cryo-EM structures of human GMPPA-GMPPB complex reveal how cells maintain GDP-mannose homeostasis“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Bd. 28, Nr. 5, S. 1–12, Mai 2021, doi: 10.1038/s41594-021-00591-9.

- [132] S. Hinderlich, W. Weidemann, T. Yardeni, R. Horstkorte, und M. Huizing, „UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE), a master regulator of sialic acid synthesis“, *Top. Curr. Chem.*, Bd. 366, S. 97–137, 2015, doi: 10.1007/128\_2013\_464.
- [133] K. Fahie *u. a.*, „Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine“, *Curr. Protoc.*, Bd. 1, Nr. 5, S. e129, 2021, doi: 10.1002/cpz1.129.
- [134] K.-H. Song *u. a.*, „Mitochondrial reprogramming via ATP5H loss promotes multimodal cancer therapy resistance“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 128, Nr. 9, S. 4098–4114, doi: 10.1172/JCI96804.
- [135] L. J. Siskind, R. N. Kolesnick, und M. Colombini, „Ceramide Channels Increase the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Small Proteins“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 30, S. 26796–26803, Juli 2002, doi: 10.1074/jbc.M200754200.
- [136] Y. Luan und H. R. Griffiths, „Ceramides reduce CD36 cell surface expression and oxidised LDL uptake by monocytes and macrophages“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Bd. 450, Nr. 1, S. 89–99, Juni 2006, doi: 10.1016/j.abb.2006.03.016.
- [137] A. Fiser und A. Sali, „ModLoop: automated modeling of loops in protein structures“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 19, Nr. 18, S. 2500–2501, Dez. 2003, doi: 10.1093/bioinformatics/btg362.
- [138] J. Espadaler, E. Querol, F. X. Aviles, und B. Oliva, „Identification of function-associated loop motifs and application to protein function prediction“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 22, Nr. 18, S. 2237–2243, Sep. 2006, doi: 10.1093/bioinformatics/btl382.
- [139] D. Li und S. Mukhopadhyay, „A three-pocket model for substrate coordination and selectivity by the nucleotide sugar transporters SLC35A1 and SLC35A2“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 297, Nr. 3, S. 101069, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101069.
- [140] C. Thiel *u. a.*, „Improved diagnostics lead to identification of three new patients with congenital disorder of glycosylation-1p“, *Hum. Mutat.*, Bd. 33, Nr. 3, S. 485–487, März 2012, doi: 10.1002/humu.22019.
- [141] D. R. Beriault *u. a.*, „Glucosamine induces ER stress by disrupting lipid-linked oligosaccharide biosynthesis and N-linked protein glycosylation“, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, Bd. 312, Nr. 1, S. E48–E57, Jan. 2017, doi: 10.1152/ajpendo.00275.2016.
- [142] A. L. Hipgrave Ederveen, N. de Haan, M. Baerenfaenger, D. J. Lefeber, und M. Wuhrer, „Dissecting Total Plasma and Protein-Specific Glycosylation Profiles in Congenital Disorders of Glycosylation“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 21, Nr. 20, Art. Nr. 20, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijms21207635.
- [143] W. Wiertelak, M. Olczak, und D. Maszczak-Seneczko, „An interaction between SLC35A1 and ST3Gal4 is differentially affected by CDG-causing mutations in the SLC35A1 gene“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 635, S. 46–51, Dez. 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.10.019.
- [144] H. Segawa, M. Kawakita, und N. Ishida, „Human and Drosophila UDP-galactose transporters transport UDP-N-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose: UDP-Gal transporter transports UDP-GlcNAc“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 269, Nr. 1, S. 128–138, Jan. 2002, doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02632.x.
- [145] Y. Gao, X. Luan, J. Melamed, und I. Brockhausen, „Role of Glycans on Key Cell Surface Receptors That Regulate Cell Proliferation and Cell Death“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 5, S. 1252, Mai 2021, doi: 10.3390/cells10051252.
- [146] T. M. Bui, H. L. Wiesolek, und R. Sumagin, „ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis“, *J. Leukoc. Biol.*, Bd. 108, Nr. 3, S. 787–799, Sep. 2020, doi: 10.1002/JLB.2MR0220-549R.
- [147] Y. Matsushita *u. a.*, „Intercellular Adhesion Molecule-1 Deficiency Attenuates the Development of Skin Fibrosis in Tight-Skin Mice1“, *J. Immunol.*, Bd. 179, Nr. 1, S. 698–707, Juli 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.1.698.
- [148] E. Calzada, O. Onguka, und S. M. Claypool, „Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease“, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, Bd. 321, Elsevier, 2016, S. 29–88. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.001.

- [149] G. Boehmelt *u. a.*, „Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells“, *EMBO J.*, Bd. 19, Nr. 19, S. 5092–5104, Okt. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.19.5092.
- [150] P. K. Sengupta, M. P. Bouchie, M. Nita-Lazar, H.-Y. Yang, und M. A. Kukuruzinska, „Coordinate regulation of N-glycosylation gene DPAGT1, canonical Wnt signaling and E-cadherin adhesion“, *J. Cell Sci.*, Bd. 126, Nr. 2, S. 484–496, Jan. 2013, doi: 10.1242/jcs.113035.
- [151] Y. Y. Dong *u. a.*, „Structures of DPAGT1 Explain Glycosylation Disease Mechanisms and Advance TB Antibiotic Design“, *Cell*, Bd. 175, Nr. 4, S. 1045–1058.e16, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.037.
- [152] J. Ziburová *u. a.*, „A novel homozygous mutation in the human ALG12 gene results in an aberrant profile of oligomannose N-glycans in patient’s serum“, *Am. J. Med. Genet. A.*, Bd. 185, Nr. 11, S. 3494–3501, 2021, doi: 10.1002/ajmg.a.62474.
- [153] S. Tahata, L. Gunderson, B. Lanpher, und E. Morava, „Complex phenotypes in ALG12-congenital disorder of glycosylation (ALG12-CDG): Case series and review of the literature“, *Mol. Genet. Metab.*, Bd. 128, Nr. 4, S. 409–414, Dez. 2019, doi: 10.1016/j.ymgme.2019.08.007.
- [154] S. Pfeiffer *u. a.*, „Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon“, *Nat. Commun.*, Bd. 5, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2014, doi: 10.1038/ncomms4072.
- [155] P. Sosicka, B. Bazan, D. Maszczak-Seneczko, Y. Shauchuk, T. Olczak, und M. Olczak, „SLC35A5 Protein—A Golgi Complex Member with Putative Nucleotide Sugar Transport Activity“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 20, Nr. 2, Art. Nr. 2, Jan. 2019, doi: 10.3390/ijms20020276.
- [156] J. Liu *u. a.*, „A novel YAP1/SLC35B4 regulatory axis contributes to proliferation and progression of gastric carcinoma“, *Cell Death Dis.*, Bd. 10, Nr. 6, S. 452, Juni 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1674-2.
- [157] P. Sosicka, D. Maszczak-Seneczko, B. Bazan, Y. Shauchuk, B. Kaczmarek, und M. Olczak, „An insight into the orphan nucleotide sugar transporter SLC35A4“, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, Bd. 1864, Nr. 5, S. 825–838, Mai 2017, doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.02.002.
- [158] G. Huang *u. a.*, „Loss of core fucosylation in both ST6GAL1 and its substrate enhances glycoprotein sialylation in mice“, *Biochem. J.*, Bd. 477, Nr. 6, S. 1179–1201, März 2020, doi: 10.1042/BCJ20190789.
- [159] H. Chen *u. a.*, „Regulated degradation of HMG CoA reductase requires conformational changes in sterol-sensing domain“, *Nat. Commun.*, Bd. 13, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juli 2022, doi: 10.1038/s41467-022-32025-5.
- [160] P. J. Mullen, R. Yu, J. Longo, M. C. Archer, und L. Z. Penn, „The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 16, Nr. 11, S. 718–731, Nov. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.76.
- [161] Y. Lachance *u. a.*, „Structure of the human type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) gene: adrenal and gonadal specificity“, *DNA Cell Biol.*, Bd. 10, Nr. 10, S. 701–711, Dez. 1991, doi: 10.1089/dna.1991.10.701.
- [162] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, G. Wietzorrek, A. Haidekker, A. Eder, und H. Glossmann, „Cloning of an emopamil-binding protein (EBP)-like protein that lacks sterol delta8-delta7 isomerase activity“, *Biochem. J.*, Bd. 374, Nr. Pt 1, S. 229–237, Aug. 2003, doi: 10.1042/BJ20030465.
- [163] D. Xu *u. a.*, „The gluconeogenic enzyme PCK1 phosphorylates INSIG1/2 for lipogenesis“, *Nature*, Bd. 580, Nr. 7804, S. 530–535, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2183-2.
- [164] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, J. N. Lee, Y. K. Paik, und H. Glossmann, „Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 95, Nr. 4, S. 1899–1902, Feb. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.4.1899.
- [165] T. Shimada *u. a.*, „Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants“, *Carcinogenesis*, Bd. 20, Nr. 8, S. 1607–1613, Aug. 1999, doi: 10.1093/carcin/20.8.1607.

- [166] R. Breitling, A. Krazeisen, G. Möller, und J. Adamski, „17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7--an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis“, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Bd. 171, Nr. 1–2, S. 199–204, Jan. 2001, doi: 10.1016/s0303-7207(00)00416-0.
- [167] Y. Duan, K. Gong, S. Xu, F. Zhang, X. Meng, und J. Han, „Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics“, *Signal Transduct. Target. Ther.*, Bd. 7, Nr. 1, Art. Nr. 1, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01125-5.
- [168] M.-S. Lee und S. J. Bensinger, „Reprogramming cholesterol metabolism in macrophages and its role in host defense against cholesterol-dependent cytolysins“, *Cell. Mol. Immunol.*, Bd. 19, Nr. 3, Art. Nr. 3, März 2022, doi: 10.1038/s41423-021-00827-0.
- [169] B. Garcia-Diaz *u. a.*, „Lack of aprataxin impairs mitochondrial functions via downregulation of the APE1/NRF1/NRF2 pathway“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 24, Nr. 16, S. 4516–4529, Aug. 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv183.
- [170] S.-S. Liu *u. a.*, „A knockout cell library of GPI biosynthetic genes for functional studies of GPI-anchored proteins“, *Commun. Biol.*, Bd. 4, Nr. 1, Art. Nr. 1, Juni 2021, doi: 10.1038/s42003-021-02337-1.
- [171] S. Ferdinandusse *u. a.*, „A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, Bd. 1864, Nr. 3, S. 952–958, März 2018, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.12.032.
- [172] G. P. Mannaerts und P. P. Van Veldhoven, „[Peroxisomal beta-oxidation]“, *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.*, Bd. 55, Nr. 1, S. 45–78, 1993.
- [173] J. Kim und H. Bai, „Peroxisomal Stress Response and Inter-Organellar Communication in Cellular Homeostasis and Aging“, *Antioxidants*, Bd. 11, Nr. 2, S. 192, Jan. 2022, doi: 10.3390/antiox11020192.
- [174] F. Lang, C. Stournaras, N. Zacharopoulou, J. Voelkl, und I. Alesutan, „Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress“, *Cell Stress*, Bd. 3, Nr. 1, S. 1–8, Feb. 2018, doi: 10.15698/cst2019.01.170.
- [175] R. A. Kohnz *u. a.*, „Protein Sialylation Regulates a Gene Expression Signature that Promotes Breast Cancer Cell Pathogenicity“, *ACS Chem. Biol.*, Bd. 11, Nr. 8, S. 2131–2139, Aug. 2016, doi: 10.1021/acscchembio.6b00433.
- [176] Z. G. Levine *u. a.*, „Mammalian cell proliferation requires noncatalytic functions of O-GlcNAc transferase“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 118, Nr. 4, S. e2016778118, Jan. 2021, doi: 10.1073/pnas.2016778118.
- [177] R. M. de Queiroz, S.-H. Moon, und C. Prives, „O-GlcNAc transferase regulates p21 protein levels and cell proliferation through the FoxM1-Skp2 axis in a p53-independent manner“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 298, Nr. 9, S. 102289, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102289.
- [178] Y. Liu *u. a.*, „HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 $\alpha$ -mediated fatty acid  $\beta$ -oxidation“, *Toxicol. Lett.*, Bd. 226, Nr. 2, S. 117–123, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.01.033.
- [179] J. Zschocke und G. F. Hoffmann, *Vademecum Metabolicum*, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, S.41-43, 2021.
- [180] G. Fernandez-Fuente, M. J. Rigby, und L. Puglielli, „Intracellular Citrate/acetyl-CoA flux and endoplasmic reticulum acetylation: Connectivity is the answer“, *Mol. Metab.*, Bd. 67, S. 101653, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.molmet.2022.101653.
- [181] A. Ginguay und L. A. Cynober, „Amino Acids | Amino Acid Metabolism“, in *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, Elsevier, 2021, S. 2–9. doi: 10.1016/B978-0-12-819460-7.00059-1.
- [182] T. Hla und A. J. Dannenberg, „Sphingolipid Signaling in Metabolic Disorders“, *Cell Metab.*, Bd. 16, Nr. 4, S. 420–434, Okt. 2012, doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.017.
- [183] S.-C. Kang, B.-R. Kim, S.-Y. Lee, und T.-S. Park, „Sphingolipid Metabolism and Obesity-Induced Inflammation“, *Front. Endocrinol.*, Bd. 4, 2013, doi: 10.3389/fendo.2013.00067.
- [184] Y. A. Hannun und L. M. Obeid, „Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 19, Nr. 3, Art. Nr. 3, März 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.107.

- [185] G. Cutillo, A.-H. Saariaho, und S. Meri, „Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases“, *Cell. Mol. Immunol.*, Bd. 17, Nr. 4, Art. Nr. 4, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0388-9.
- [186] S. Wallner, E. Orsó, M. Grandl, T. Konovalova, G. Liebisch, und G. Schmitz, „Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine plasmalogens in lipid loaded human macrophages“, *PLoS ONE*, Bd. 13, Nr. 10, S. e0205706, Okt. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0205706.
- [187] K. E. Wellen *u. a.*, „The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism“, *Genes Dev.*, Bd. 24, Nr. 24, S. 2784–2799, Dez. 2010, doi: 10.1101/gad.1985910.
- [188] L. R. Neitzel *u. a.*, „Developmental regulation of Wnt signaling by Nagk and the UDP-GlcNAc salvage pathway“, *Mech. Dev.*, Bd. 156, S. 20–31, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.mod.2019.03.002.
- [189] B. He, J. Bai, und Z. Wu, „Glucosamine enhances proliferation, barrier, and anti-oxidative functions in porcine trophectoderm cells“, *Food Funct.*, Bd. 13, Nr. 8, S. 4551–4561, Apr. 2022, doi: 10.1039/D1FO04086C.
- [190] C. Jones *u. a.*, „A Novel Type of Macrothrombocytopenia Associated with a Defect in  $\alpha$ 2,3-Sialylation“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 179, Nr. 4, S. 1969–1977, Okt. 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.012.
- [191] A. Marín-Quílez *u. a.*, „Inherited Thrombocytopenia Caused by Variants in Crucial Genes for Glycosylation“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 24, Nr. 6, S. 5109, März 2023, doi: 10.3390/ijms24065109.
- [192] X. Ma *u. a.*, „Slc35a1 deficiency causes thrombocytopenia due to impaired megakaryocytopoiesis and excessive platelet clearance in the liver“, *Haematologica*, Bd. 106, Nr. 3, S. 759–769, Apr. 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.225987.
- [193] L. Liguori *u. a.*, „Pharmacological Chaperones: A Therapeutic Approach for Diseases Caused by Destabilizing Missense Mutations“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 21, Nr. 2, S. 489, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijms21020489.

## 9 Anhang

Anhang Tabelle 1: Quantifizierungswerte der Glykosylierungsmarkerproteine (Glykomarker) und Lektinsignale im Lysat von HEK293 WT und HEK293 *SLC35A1* K.o.-Zellen, die mit dem pCI-Neo Leervektor (WT Mock/ K.o. Mock), oder mit pCI-Neo *SLC35A1*(WT)-HA bzw. pCI-Neo *SLC35A1*(A133G)-HA Konstrukten transfiziert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die auf die Aktin-Ladekontrolle und den Mittelwert der WT Mock Probe normalisiert wurden sowie die Standardabweichung. Im unteren Bereich sind die jeweiligen p-Werte der Daten nach one-way ANOVA mit Tukey Test aufgeführt.

Lektin/ Glykomarker	WT Mock		K.o. Mock		K.o. + WT		K.o. + A133G	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
HA-Tag	1,00	0,73	1,61	0,97	26,21	4,24	27,52	2,60
MALI	1,00	0,11	0,63	0,15	1,04	0,32	1,32	0,66
WGA	1,00	0,11	0,46	0,13	0,53	0,22	0,59	0,24
SNA	1,00	0,35	0,51	0,00	0,64	0,04	0,78	0,04
ECL	1,00	0,26	3,82	0,67	2,45	0,41	2,49	0,39
RCAI	1,00	0,43	3,39	1,07	2,79	0,93	2,95	0,80
TGN46 glykosyliert	1,00	0,60	0,37	0,26	0,93	0,75	1,13	0,71
TGN46 hypoglyko.	1,00	0,71	1,80	0,85	0,59	0,41	0,68	0,71
TGN46 glyko./ hypoglyko.	1,00	0,88	0,12	0,08	1,72	0,97	3,48	2,17
GP130 glykosyliert	1,00	0,37	0,48	0,27	0,94	0,51	1,30	0,92
GP130 unglykosyliert	1,00	0,67	1,28	0,71	0,96	0,80	1,07	1,00
GP130 glyko./ unglyko.	1,00	0,51	0,56	0,60	1,04	0,82	1,52	1,40

p-Wert

Lektin/ Glykomarker	WT Mock vs. K.o. Mock	WT Mock vs. K.o. + WT	WT Mock vs. K.o. + A133G	K.o. Mock vs. K.o. + WT	K.o. Mock vs. K.o. + A133G	K.o. + WT vs. K.o. + A133G
HA-Tag	0,991	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,921
MALI	0,028	>0,999	0,902	0,525	0,152	0,940
WGA	0,028	0,052	0,094	0,970	0,823	0,973
SNA	0,042	0,140	0,463	0,826	0,341	0,786
ECL	<0,001	0,019	0,017	0,026	0,031	1,000
RCAI	0,034	0,116	0,083	0,816	0,915	0,995
TGN46 glykosyliert	0,245	0,897	0,794	0,295	0,166	0,697
TGN46 hypoglyko.	0,192	0,490	0,581	0,064	0,080	0,886

TGN46 glyko./ hypoglyko. GP130 glykosyliert	0,420	0,505	0,044	0,160	0,012	0,128
GP130 unglykosyliert	0,690	0,999	0,918	0,761	0,361	0,868
GP130 glyko./ unglyko.	0,972	>0,999	1,000	0,960	0,988	0,998
	0,929	>0,999	0,893	0,913	0,585	0,911

Chromosome	start	end	strand	MM	target_seq	alignment	distance	position	gene name	gene id
chr6	88187126	88187148	-	0	TGGTATAGACTGCAGCCATC	PAM	0	Exonic	C6orf165	ENSG00000213204
chr2	221181809	221181831	+	4	GCCTTAGACTGCAGCCATC	--- PAM	4991	Intronic	AC114765.1	ENSG00000239498
chr14	78697810	78697832	-	4	CAGCAGAGACTGCAGCCATC	-- PAM	0	Exonic	RP11-332E1	ENSG00000239438
chr15	71691834	71691856	-	4	CAGTGAAGACTGCAGCCATC	-- PAM	12170	Intronic	THSD4	ENSG00000187720
chr8	52425315	52425337	-	4	TGATTGTGACTGCAGCCATC	PAM	12985	Intronic	PXDNL	ENSG00000147485
chr6	170810529	170810551	+	4	GGGCATGCACTGCAGCCATC	- PAM	33654	Intergeni	PSMB1	ENSG0000008018
chr6	170810135	170810157	+	4	GGGCATGCACTGCAGCCATC	- PAM	34048	Intergeni	PSMB1	ENSG0000008018
chr7	565430	565452	-	4	CGGTCCACTGCAGCCATC	- PAM	561	Intergeni	AC147651.3	ENSG00000223855
chr12	104531184	104531206	-	4	GCGTAAAGAATGCAGCCATC	- PAM	0	Exonic	NFYB	ENSG00000120837
chr3	95494811	95494833	-	4	AGCCTAGATTGCAGCCATC	- PAM	92774	Intergeni	MTHFD2P1	ENSG00000244681
chr6	170812432	170812454	+	4	GAGTATATCCTGCAGCCATC	- PAM	31751	Intergeni	PSMB1	ENSG0000008018
chr4	13848718	13848740	-	4	TGATTTGGCTGCAGCCATC	PAM	17247	Intronic	RP11-341G	ENSG00000250634
chr11	60975544	60975566	+	4	AGTCATAGACTGTAGCCATC	- PAM	0	Exonic	PGA3	ENSG00000229859

RPS26P48 (ENSG00000239438)	WT	ATCCAAAATACAGCAGAGACTGCAGCCATCAGGACATGCATGAATCATGTATCTTCAAGG
	K.o.	ATCCAAAATACAGCAGAGACTGCAGCCATCAGGACATGCATGAATCATGTATCTTCAAGG
NFYB (ENSG00000120837)	WT	TCCCGCAGCCTGGTTTGC GCGTAAAGAATGCAGCCATC TGGCGGTTTGCGGTCCCTGTA
	K.o.	TCCCGCAGCCTGGTTTGC GCGTAAAGAATGCAGCCATC TGGCGGTTTGCGGTCCCTGTA
PGA3 (ENSG00000229859)	WT	GACCATCTGTTCTCCAGCAAAATCTCACCTGAGTCATAGACTGTAGCCATCTGGAGATC
	K.o.	GACCATCTGTTCTCCAGCAAAATCTCACCTGAGTCATAGACTGTAGCCATCTGGAGATC

Anhang Abbildung 1: Überprüfung möglicher Off-Target Stellen. Mit CC-Top wurden potenzielle Schnittstellen, zu denen die Verwendung der gRNA führen könnte, ermittelt. Da neben dem *SLC35A1*-Gen (C6orf165) alle Treffer mindestens 4 Mismatches (MM) zeigten, wurden lediglich die drei wahrscheinlichsten Gene überprüft, bei denen es innerhalb eines Exons (Exonic) zu einem Doppelstrangbruch kommen könnte. Dargestellt ist jeweils ein Alignment der relevanten Bereiche der Sequenzierungen. Die Ziel-Sequenzen (target\_seq), die durch die gRNA gebunden werden könnten, entsprachen bei dem gewählten Knock-out Klon (K.o.) der wildtypischen (WT) Sequenz, sodass keine Mutationen in diesen Bereichen detektiert wurden.

Anhang Tabelle 2: Mittels nCounter gemessene Expressionswerte verschiedener Gene. Die nCounter Messung erfolgte an der nCounter Core Facility in Heidelberg und wurde von Ralph Röth durchgeführt. Angegeben ist das Verhältnis der Expression in Patientenzellen zu Kontrollzellen und der  $-\log_{10}(\text{p-Wert})$  nach multiplem ungepaartem T-Test mit einer FDR von 5 %. Gemessen wurde die Transkriptmenge in, aus Fibroblasten isolierter, RNA (n=3).

Gen	Ratio Patient/Kontrolle [A.U.]	$-\log_{10}(\text{p-Wert})$
<i>3B-HSD</i>	1,611	4,204
<i>ACOX3</i>	1,290	2,187
<i>ALG1</i>	0,893	0,180
<i>ALG11</i>	1,176	0,800
<i>ALG12</i>	1,325	1,640
<i>ALG13</i>	1,143	0,378
<i>ALG14</i>	1,143	0,353
<i>ALG2</i>	1,153	0,501
<i>ALG3</i>	0,780	1,095
<i>ALG5</i>	1,067	0,180
<i>ALG8</i>	1,008	0,068
<i>ALG9</i>	1,148	0,353
<i>ATF5</i>	1,283	0,726
<i>ATF6</i>	1,006	0,068
<i>B3GalNAcT2</i>	1,125	0,209
<i>B3GLCT/ B3GALTL</i>	0,999	0,068
<i>B4GALT1</i>	1,003	0,068
<i>B4GALT2</i>	0,995	0,068
<i>B4GALT7</i>	0,989	0,068
<i>C14Orf1/ ERG28</i>	1,026	0,085
<i>CASD1</i>	0,893	0,345
<i>COQ2</i>	0,631	0,455
<i>COQ3</i>	0,730	1,117
<i>COQ5</i>	0,772	0,643
<i>COQ6</i>	0,632	0,842
<i>COQ7</i>	0,948	0,180
<i>CYP1B1</i>	4,047	2,830
<i>CYP51A1</i>	1,758	1,117
<i>DAD1</i>	0,993	0,068
<i>DDOST</i>	0,836	1,306
<i>DHCR24</i>	1,191	0,180

<i>DHCR7</i>	2,122	2,830
<i>DHDDS</i>	0,927	0,180
<i>DOLK</i>	1,112	0,726
<i>DOLPP1</i>	1,002	0,068
<i>DPAGT1</i>	1,208	1,796
<i>DPM1</i>	0,878	0,402
<i>DPM2</i>	0,824	0,618
<i>DPM3</i>	0,864	0,345
<i>DPY19L1</i>	1,619	2,187
<i>DPY19L2</i>	0,844	0,210
<i>DPY19L3</i>	0,998	0,068
<i>DPY19L4</i>	1,073	0,153
<i>EBP</i>	1,808	3,532
<i>EIF2AK3</i>	1,015	0,090
<i>ERN1</i>	0,919	0,183
<i>FDFT1</i>	1,231	0,402
<i>FDPS</i>	1,703	2,023
<i>FGFR1</i>	0,676	0,866
<i>FUT8</i>	1,818	1,560
<i>GALE</i>	0,540	1,560
<i>GANAB</i>	0,997	0,068
<i>GFPT1</i>	1,066	0,180
<i>GMPPA</i>	0,739	0,719
<i>GMPPB</i>	0,795	1,560
<i>GNE</i>	0,849	0,353
<i>GPAA1</i>	0,974	0,170
<i>HiF1alpha</i>	1,323	1,080
<i>HMGCR</i>	1,620	1,654
<i>HSD17B1</i>	0,332	0,397
<i>HSD17B7</i>	1,362	2,733
<i>HSPA5</i>	0,994	0,068
<i>HSPD1</i>	0,910	0,318
<i>IDI1</i>	2,161	1,920
<i>LDLR</i>	2,141	1,230
<i>LFNG</i>	0,413	0,657
<i>LSS</i>	1,199	0,210

<i>MAGT1</i>	0,934	0,204
<i>MAN1A1</i>	4,834	4,831
<i>MAN1B1</i>	1,070	0,318
<i>MAN2A1</i>	1,522	3,280
<i>MGAT1</i>	1,193	1,560
<i>MGAT2</i>	0,947	0,747
<i>MGAT5</i>	1,470	0,535
<i>MOGS</i>	0,932	0,174
<i>MPDU1</i>	0,856	0,800
<i>MPI</i>	1,141	0,180
<i>mTOR</i>	1,065	0,204
<i>MVD</i>	2,010	1,560
<i>MVK</i>	1,245	0,204
<i>NEU1</i>	1,394	0,953
<i>NEU3</i>	0,889	0,183
<i>NGLY1</i>	0,859	0,402
<i>NSDHL</i>	1,403	1,117
<i>NUS1/ NgBR</i>	0,791	0,698
<i>OGA</i>	1,211	0,391
<i>OGT</i>	0,988	0,068
<i>OST4</i>	1,018	0,113
<i>OSTC</i>	0,633	0,780
<i>PDSS1</i>	0,535	2,383
<i>PDSS2</i>	0,728	0,760
<i>PGAP1</i>	1,168	0,180
<i>PGAP2</i>	0,742	0,616
<i>PGAP3</i>	0,889	0,210
<i>PGAP4</i>	0,855	0,402
<i>PGM1</i>	1,256	0,976
<i>PGM2</i>	0,499	1,500
<i>PIGA</i>	1,171	0,210
<i>PIGB</i>	1,103	0,289
<i>PIGC</i>	1,158	0,900
<i>PIGF</i>	1,176	0,402
<i>PIGG</i>	1,196	0,888
<i>PIGL</i>	0,831	0,402

<i>PIGM</i>	0,900	0,210
<i>PIGN</i>	1,181	0,914
<i>PIGO</i>	0,936	0,204
<i>PIGP</i>	1,017	0,076
<i>PIGQ</i>	1,208	1,842
<i>PIGS</i>	0,937	0,186
<i>PIGT</i>	1,108	0,180
<i>PIGU</i>	0,953	0,137
<i>PIGV</i>	0,931	0,180
<i>PIGW</i>	0,810	0,181
<i>PIGX</i>	1,094	0,210
<i>PIGY</i>	1,250	3,116
<i>PIGZ</i>	1,183	0,719
<i>PMM1</i>	1,101	0,402
<i>PMM2</i>	0,803	0,914
<i>PMVK</i>	0,888	1,117
<i>POFUT1</i>	1,015	0,068
<i>POFUT2</i>	1,013	0,068
<i>POLR2A</i>	0,790	1,000
<i>POMGnT1</i>	0,994	0,068
<i>POMGnT2</i>	0,853	0,183
<i>POMT1</i>	1,141	0,931
<i>POMT2</i>	1,485	1,099
<i>RFNG</i>	0,997	0,068
<i>RFT1</i>	0,874	0,353
<i>RPL13A</i>	1,017	0,116
<i>RPN1</i>	1,027	0,147
<i>RPN2</i>	1,122	0,869
<i>SC4MOL/ MSMO1</i>	1,774	0,931
<i>SC5DL/ SC5D</i>	0,973	0,068
<i>SGK1</i>	2,731	4,424
<i>SLC35A1</i>	1,188	0,283
<i>SLC35A2</i>	0,796	2,466
<i>SLC35A3</i>	1,076	0,210
<i>SLC35A4</i>	1,054	0,170
<i>SLC35A5</i>	1,180	1,403

---

<i>SLC35B4</i>	1,240	1,331
<i>SLC35C1</i>	0,777	3,280
<i>SLC35C2</i>	0,905	0,353
<i>SLC35D1</i>	0,948	0,179
<i>SLC35D2</i>	1,123	0,378
<i>SOD2</i>	1,211	0,204
<i>SPRING1</i>	1,263	1,117
<i>SQLE</i>	1,123	0,141
<i>SRD5A3</i>	0,722	0,901
<i>SREBF1</i>	2,724	4,831
<i>ST3GAL1</i>	0,889	0,180
<i>ST3GAL2</i>	0,798	0,780
<i>ST3GAL3</i>	1,070	0,137
<i>ST8SLA3</i>	0,675	0,345
<i>STT3A</i>	0,883	1,830
<i>STT3B</i>	1,379	1,331
<i>TBP</i>	1,044	0,116
<i>TMEM258</i>	0,862	0,353
<i>TUSC3</i>	1,023	0,113
<i>UAP1</i>	0,876	0,210

---

Anhang Tabelle 3: Mittels „Shotgun“ Proteomik identifizierte, signifikant deregulierte Proteine. Gemessen wurden die Peptide aus je drei Kontroll- und Patientenzellpellets mit LC-MS/MS durch das Labor von Dr. Ruppert (Heidelberg). Angegeben ist jeweils das identifizierte Protein, das dazugehörige Gen, die Menge an gemessenen Peptiden, die prozentuale Sequenzabdeckung, der p-Wert und der Uniprot-Identifizierer (Uniprot-ID). Die Schattierung der Zeilen deutet darauf hin, ob die Expression des Proteins leicht erhöht (weiß), leicht verringert (hellgrau) oder verringert (dunkelgrau) war.

Gen	Protein	Peptide	Sequenzabdeckung [%]	-log p-Wert	Uniprot-ID
<i>ABHD10</i>	Mycophenolic acid acylglucuronide esterase, mitochondrial	6	30,1	2,481	Q9NUJ1
<i>ACAT1</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	22	62,8	2,220	P24752
<i>ACO2</i>	Aconitate hydratase, mitochondrial	32	55,8	2,388	Q99798
<i>AIFM1</i>	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	17	37,5	2,388	O95831
<i>AK2</i>	Adenylate kinase 2, mitochondrial; Adenylate kinase 2, mitochondrial, N-terminally processed	12	64,4	2,978	P54819
<i>AK3</i>	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	16	74	2,012	Q9UIJ7
<i>ALDH1B1</i>	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	25	58,4	2,670	P30837
<i>APPL2</i>	DCC-interacting protein 13-beta	17	37,8	3,455	Q8NEU8
<i>ATP2A2</i>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	45	43,8	2,487	P16615
<i>ATP5F1</i>	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	14	46,5	2,379	P24539
<i>ATP5I</i>	ATP synthase subunit e, mitochondrial	3	52,2	2,328	P56385
<i>ATP6V1H</i>	V-type proton ATPase subunit H	8	25,1	3,191	Q9UI12
<i>BLVR4</i>	Biliverdin reductase A	8	32,4	2,290	P53004
<i>BTF3</i>	Transcription factor BTF3	9	55,8	2,432	P20290
<i>CD9</i>	CD9 antigen	6	26,3	2,100	P21926
<i>CNN3</i>	Calponin-3	18	66,9	2,778	Q15417

<i>COX6C</i>	Cytochrome c oxidase subunit 6C	7	50,7	2,803	P09669
<i>CSRP2</i>	Cysteine and $\alpha$ -rich protein 2	12	62,7	2,112	Q16527
<i>CTSK</i>	Cathepsin K	15	69,6	1,913	P43235
<i>CYC1</i>	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	8	32,6	2,107	P08574
<i>DECR1</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	13	47,5	2,805	Q16698
<i>DLST</i>	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	14	38,4	2,229	P36957
<i>DNPEP</i>	Aspartyl aminopeptidase	9	31,8	3,919	Q9ULA0
<i>DPP4</i>	Dipeptidyl peptidase 4;Dipeptidyl peptidase 4 membrane form;Dipeptidyl peptidase 4 soluble form	35	49,1	4,136	P27487
<i>DPYSL3</i>	Dihydropyrimidinase-related protein 3	25	66,7	2,057	Q14195
<i>ECH1</i>	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	14	66,2	2,583	Q13011
<i>EIF3G</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	10	31,6	3,783	O75821
<i>EIF4G2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	21	27	3,253	P78344
<i>EIF6</i>	Eukaryotic translation initiation factor 6	7	56,7	4,402	P56537
<i>EPHX1</i>	Epoxide hydrolase 1	14	45,9	4,738	P07099
<i>ERO1L</i>	ERO1-like protein alpha	15	42,9	2,544	Q96HE7
<i>ETFA</i>	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	17	66,1	2,063	P13804
<i>ETFB</i>	Electron transfer flavoprotein subunit beta	13	52,9	2,399	P38117
<i>FAP</i>	Prolyl endopeptidase FAP;Antiplasmin-cleaving enzyme FAP, soluble form	33	51,1	5,107	Q12884
<i>FBLN2</i>	Fibulin-2	29	36	1,735	P98095

<i>FKBP4</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4, N-terminally processed	17	49,2	3,957	Q02790
<i>GBE1</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	30	51	1,958	Q04446
<i>GNPDA1</i>	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	12	67,8	2,401	P46926
<i>GPNMB</i>	Transmembrane glycoprotein NMB	6	11,5	2,421	Q14956
<i>GSPT1</i>	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	20	49,5	2,957	P15170
<i>GSR</i>	Glutathione reductase, mitochondrial	11	30,3	2,421	P00390
<i>H1F0</i>	Histone H1.0;Histone H1.0, N-terminally processed	7	27,8	2,920	P07305
<i>H2AFY</i>	Core histone macro-H2A.1	13	43	2,188	O75367
<i>HADHA</i>	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial;Long-chain enoyl-CoA hydratase;Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	38	67,5	2,206	P40939
<i>HEXA</i>	Beta-hexosaminidase subunit alpha	16	38,2	2,017	P06865
<i>HSPA2</i>	Heat shock-related 70 kDa protein 2	33	57,9	4,624	P54652
<i>HSPB1</i>	Heat shock protein beta-1	19	90,7	3,949	P04792
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	25	55,1	3,918	P48735
<i>ITGAV</i>	Integrin alpha-V;Integrin alpha-V heavy chain;Integrin alpha-V light chain	39	46	3,767	P06756
<i>LONP1</i>	Lon protease homolog, mitochondrial	27	37,5	2,463	P36776
<i>LRRFIP1</i>	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	20	31,3	3,016	Q32MZ4
<i>MCM5</i>	DNA replication licensing factor MCM5	12	24,3	2,720	P33992

<i>MME</i>	Neprilysin	40	56	2,562	P08473
<i>MRC2</i>	C-type mannose receptor 2	37	33,1	3,131	Q9UBG0
<i>NAP1L1</i>	Nucleosome assembly protein 1-like 1	11	39,4	2,903	P55209
<i>NDUFA13</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	3	26,4	2,370	Q9P0J0
<i>NDUFA9</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	8	31,3	3,320	Q16795
<i>NNMT</i>	Nicotinamide N- methyltransferase NAD(P)	14	68,6	1,979	P40261
<i>NNT</i>	transhydrogenase, mitochondrial	32	35,5	4,024	Q13423
<i>NPC1</i>	Niemann-Pick C1 protein	11	12,2	4,824	O15118
<i>NUCB1</i>	Nucleobindin-1	23	59,4	3,062	Q02818
<i>OSBPL8</i>	Oxysterol-binding protein- related protein 8	11	19,6	3,005	Q9BZF1
<i>PCYOX1</i>	Prenylcysteine oxidase 1	16	47,5	3,216	Q9UHG3
<i>PGRMC1</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 1	13	63,6	2,513	O00264
<i>PGRMC2</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 2	10	43,9	3,239	O15173
<i>PLXNB2</i>	Plexin-B2	19	16,4	2,760	O15031
<i>POR</i>	NADPH--cytochrome P450 reductase	16	34,1	3,501	P16435
<i>PPA2</i>	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	10	36,8	2,594	Q9H2U2
<i>PTK7</i>	Inactive tyrosine-protein kinase 7	36	43,7	3,251	Q13308
<i>PYGL</i>	Glycogen phosphorylase, liver form	28	40,7	2,481	P06737
<i>RFTN1</i>	Raftlin	15	47,9	2,409	Q14699
<i>RPLP1</i>	60S acidic ribosomal protein P1	5	94,7	3,716	P05386
<i>SDHA</i>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	20	43,4	2,662	P31040

<i>SDHB</i>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	9	36,4	2,601	P21912
<i>SFXN3</i>	Sideroflexin-3	13	54,5	2,313	Q9BWM7
<i>SH3GL1</i>	Endophilin-A2	11	41,8	3,573	Q99961
<i>SLC25A1</i>	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	13	41,8	2,815	P53007
<i>SLC25A11</i>	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	12	50	3,164	Q02978
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	13	83,3	1,886	P04179
<i>SQRDL</i>	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	26	67,1	2,263	Q9Y6N5
<i>SUCLG2</i>	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	16	42,6	2,534	Q96I99
<i>TMEM14C</i>	Transmembrane protein 14C	1	15,2	2,296	Q9P0S9
<i>TPM4</i>	Tropomyosin alpha-4 chain	41	81	3,260	P67936
<i>TUBB6</i>	Tubulin beta-6 chain	25	67,9	2,942	Q9BUF5
<i>TYMP</i>	Thymidine phosphorylase	13	36,1	1,865	P19971
<i>UAP1</i>	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylgalactosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	15	42,7	2,511	Q16222
<i>UQCRC1</i>	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	18	54,4	2,590	P31930
<i>UQCRC1; UQCRC1P1</i>	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;Cytochrome b-c1 complex subunit 11;Putative cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1	6	41,6	2,367	P47985;P0C7P4
<i>UTRN</i>	Utrophin	74	29	2,360	P46939
<i>VAT1</i>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	26	73	2,436	Q99536

<i>WDFY1</i>	WD repeat and FYVE domain-containing protein 1	8	26,8	3,655	Q8IWB7
<i>YWHAH</i>	14-3-3 protein eta	21	71,1	4,379	Q04917

Anhang Tabelle 4: Konzentration der Acylcarnitine im Serum der Patientin (n=3) und Kontrollseren (n=3). Die Konzentrationen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Hoeren [121] mittels ESI-MS/MS gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Für die grafische Darstellung der Werte wurden diese auf den jeweiligen Kontroll-Mittelwert normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Tests mit Sidak-Holm Korrektur.

Acyl-carnitine	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]				Konzentration normalisiert auf Kontrolle [A.U.]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
C0	21,842	13,130	26,333	6,538	1,000	0,601	1,206	0,299	1,000
C2	9,618	5,445	11,984	3,088	1,000	0,566	1,246	0,321	1,000
C3	0,288	0,176	0,384	0,122	1,000	0,611	1,333	0,422	1,000
C4	0,201	0,159	0,117	0,011	1,000	0,793	0,582	0,056	1,000
C5:1	0,018	0,014	0,022	0,003	1,000	0,749	1,235	0,176	1,000
C5	0,097	0,061	0,059	0,024	1,000	0,630	0,610	0,247	1,000
C6	0,070	0,033	0,034	0,011	1,000	0,464	0,477	0,159	0,976
C8:1	0,188	0,136	0,110	0,018	1,000	0,722	0,588	0,094	1,000
C8	0,105	0,064	0,082	0,027	1,000	0,615	0,781	0,260	1,000
C10:1	0,218	0,126	0,098	0,030	1,000	0,581	0,449	0,140	0,993
C10	0,099	0,051	0,069	0,008	1,000	0,514	0,694	0,081	1,000
C12	0,073	0,050	0,043	0,014	1,000	0,688	0,596	0,199	1,000
C14:1	0,074	0,033	0,075	0,021	1,000	0,448	1,022	0,283	1,000
C14	0,048	0,035	0,035	0,003	1,000	0,721	0,733	0,067	1,000
C14OH	0,030	0,019	0,029	0,003	1,000	0,643	0,964	0,107	1,000
C16:1	0,018	0,010	0,026	0,006	1,000	0,529	1,412	0,353	1,000
C16	0,134	0,072	0,266	0,048	1,000	0,533	1,976	0,357	0,811
C16:1OH	0,012	0,010	0,018	0,008	1,000	0,818	1,500	0,682	1,000
C16OH	0,007	0,003	0,018	0,002	1,000	0,429	2,357	0,214	0,208
C18:2	0,041	0,023	0,090	0,026	1,000	0,575	2,211	0,632	0,859
C18:1	0,095	0,052	0,190	0,046	1,000	0,550	2,006	0,489	0,875
C18	0,163	0,084	0,238	0,082	1,000	0,516	1,461	0,500	1,000
C18:1OH	0,018	0,012	0,016	0,003	1,000	0,660	0,882	0,176	1,000
C18OH	0,005	0,005	0,008	0,005	1,000	0,849	1,500	0,900	1,000

Anhang Tabelle 5: Konzentration der Acylcarnitine in Fibroblasten der Patientin (n=4) und Kontrollzellen (n=4). Die Konzentrationen wurden mittels ESI-MS/MS gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Für die grafische Darstellung der Werte wurden diese auf den jeweiligen Kontroll-Mittelwert normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Tests mit Sidak-Holm Korrektur.

Acyl-carnitine	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]				Konzentration normalisiert auf Kontrolle [A.U.]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
C0	0,321	0,135	0,285	0,114	1,000	0,420	0,889	0,356	1,000
C2	0,130	0,086	0,089	0,029	1,000	0,665	0,688	0,224	1,000
C3	0,055	0,021	0,113	0,042	1,000	0,375	2,042	0,752	0,758
C4	0,008	0,002	0,013	0,002	1,000	0,257	1,598	0,222	0,333
C5:1	0,004	0,001	0,005	0,001	1,000	0,377	1,339	0,305	0,999
C5	0,034	0,018	0,029	0,004	1,000	0,522	0,856	0,134	1,000
C6	0,002	0,000	0,003	0,001	1,000	0,138	1,174	0,407	1,000
C8:1	0,005	0,001	0,007	0,003	1,000	0,215	1,433	0,581	0,999
C8	0,004	0,001	0,006	0,001	1,000	0,143	1,340	0,213	0,686
C10:2	0,025	0,005	0,023	0,006	1,000	0,192	0,921	0,254	1,000
C10:1	0,008	0,002	0,008	0,002	1,000	0,314	1,077	0,316	1,000
C10	0,002	0,001	0,002	0,001	1,000	0,327	1,132	0,405	1,000
C12	0,001	0,001	0,002	0,002	1,000	0,803	1,590	1,331	1,000
C14:2	0,009	0,001	0,014	0,003	1,000	0,155	1,498	0,274	0,459
C14:1	0,009	0,002	0,010	0,002	1,000	0,255	1,124	0,204	1,000
C14	0,002	0,001	0,003	0,003	1,000	0,478	1,235	1,406	1,000
C14OH	0,001	0,001	0,001	0,001	1,000	0,933	0,843	0,794	1,000
C16:1	0,004	0,001	0,004	0,001	1,000	0,174	1,005	0,379	1,000
C16	0,012	0,006	0,021	0,021	1,000	0,470	1,732	1,699	1,000
C16:1OH	0,003	0,000	0,005	0,004	1,000	0,116	1,545	1,196	1,000
C16OH	0,009	0,002	0,008	0,002	1,000	0,254	0,876	0,251	1,000
C18:2	0,002	0,001	0,003	0,001	1,000	0,348	1,379	0,500	1,000
C18:1	0,006	0,003	0,009	0,008	1,000	0,494	1,512	1,289	1,000
C18	0,006	0,003	0,014	0,018	1,000	0,583	2,475	3,241	1,000
C18:2OH	0,003	0,000	0,003	0,001	1,000	0,163	1,157	0,401	1,000
C18:1OH	0,002	0,001	0,002	0,001	1,000	0,436	1,061	0,583	1,000
C18OH	0,001	0,000	0,001	0,000	1,000	0,515	1,085	0,495	1,000

Anhang Tabelle 6: Konzentration der sehr-langkettigen Fettsäuren (VLCFAs) in Fibroblasten der Patientin (n=4) und Kontrollfibroblasten (n=4). Die Konzentrationen wurden mittels ESI-MS/MS gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Für die grafische Darstellung der Werte wurden diese auf den jeweiligen Kontroll-Mittelwert normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Tests.

VLCFA	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]				Konzentration normalisiert auf Kontrolle [A.U.]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Phytansäure	0,008	0,008	0,008	0,004	1,000	1,106	1,000	0,577	1,000
C22:0	6,595	1,832	10,783	2,525	1,000	0,278	1,635	0,383	0,036
C24:0	14,503	3,893	24,015	5,315	1,000	0,268	1,656	0,366	0,028
C26:0	0,510	0,203	0,920	0,282	1,000	0,398	1,804	0,553	0,056

Anhang Tabelle 7: Konzentration der verschiedenen Lipidklassen in Patienten- und Kontrollfibroblasten (jeweils n=4). Die Konzentrationen wurde mittels ESI-MS/MS durch das Labor von Prof. Dr. Britta Bügger gemessen und auf die zuvor bestimmte Zellzahl normalisiert. Für die grafische Darstellung wurden die Konzentrationen auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrolle normalisiert. Aufgeführt sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Test nach Sidak-Holm Korrektur.

Lipid-klasse	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]				Konzentration normalisiert auf Kontrolle [x-fach]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
CE	7,80	0,78	7,06	2,16	1,00	0,10	0,91	0,28	0,991
Cer	1,05	0,09	8,10	1,48	1,00	0,08	7,74	1,41	0,002
Chol	104,87	9,26	164,48	44,23	1,00	0,09	1,57	0,42	0,401
DAG	1,98	0,24	6,42	2,67	1,00	0,12	3,23	1,35	0,245
Hex2Cer	0,49	0,05	0,65	0,17	1,00	0,11	1,32	0,35	0,722
HexCer	1,49	0,16	3,12	0,80	1,00	0,11	2,09	0,53	0,127
LPC	2,91	0,31	2,85	0,83	1,00	0,11	0,98	0,29	0,991
PA	1,40	0,21	1,54	0,48	1,00	0,15	1,10	0,34	0,991
PA O	0,07	0,01	0,09	0,03	1,00	0,14	1,24	0,41	0,918
PC O	15,07	1,07	21,91	5,27	1,00	0,07	1,45	0,35	0,417
PC	118,25	10,08	155,39	39,55	1,00	0,09	1,31	0,33	0,717
PE	66,58	5,42	73,04	19,94	1,00	0,08	1,10	0,30	0,991
PE O	8,53	0,89	15,37	4,50	1,00	0,10	1,80	0,53	0,295
PE P	20,34	1,53	45,92	4,63	1,00	0,08	2,26	0,23	0,001
PG	0,76	0,14	1,36	0,48	1,00	0,19	1,78	0,63	0,463
PG O	0,05	0,00	0,05	0,02	1,00	0,07	1,05	0,39	0,991
PI	14,28	1,38	17,10	4,41	1,00	0,10	1,20	0,31	0,918
PI O	0,44	0,06	0,47	0,13	1,00	0,14	1,08	0,30	0,991
PS	20,85	1,45	35,30	9,29	1,00	0,07	1,69	0,45	0,282
PS O	1,45	0,11	2,89	0,78	1,00	0,08	1,99	0,53	0,172
SM	18,33	0,85	30,46	7,45	1,00	0,05	1,66	0,41	0,250
TAG	3,82	1,87	16,04	4,46	1,00	0,49	4,20	1,17	0,045

Anhang Tabelle 8: Konzentration der Aminosäuren im Serum der Patientin (n =3) sowie in Kontrollseren (n=3). Die Konzentrationen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Hoeren [121] mittels ESI-MS/MS gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Für die grafische Darstellung der Werte wurden diese auf den jeweiligen Kontroll-Mittelwert normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Tests mit Holm-Sidak Korrektur.

Amino- säure	Messwerte [ $\mu\text{M}$ ]				Werte normalisiert auf Kontrolle [A.U.]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Ala	164,21	14,08	335,97	18,62	1,00	0,09	2,05	0,11	0,004
Arg	106,96	4,90	31,87	2,52	1,00	0,05	0,30	0,02	<0,001
Asa	0,06	0,02	0,30	0,06	1,00	0,29	5,39	1,13	0,041
Asp	44,04	10,10	80,35	26,44	1,00	0,23	1,82	0,60	0,251
Cit	19,84	0,98	30,56	4,11	1,00	0,05	1,54	0,21	0,112
Gln	244,14	29,03	280,36	45,41	1,00	0,12	1,15	0,19	0,309
Glu	198,53	9,98	549,04	99,84	1,00	0,05	2,77	0,50	0,051
Gly	231,63	10,30	455,88	71,42	1,00	0,04	1,97	0,31	0,072
Hci	0,80	0,11	1,67	0,38	1,00	0,14	2,09	0,47	0,129
His	297,62	34,45	462,60	91,00	1,00	0,12	1,55	0,31	0,229
Leu/Ile	147,92	12,86	185,16	27,79	1,00	0,09	1,25	0,19	0,251
Met	14,89	2,76	20,51	2,00	1,00	0,19	1,38	0,13	0,229
Orn	37,87	1,59	124,47	22,13	1,00	0,04	3,29	0,58	0,039
Phe	52,22	5,99	83,05	11,46	1,00	0,11	1,59	0,22	0,123
Pro	645,34	87,79	1300,84	16,16	1,00	0,14	2,02	0,03	0,004
Thr	106,10	7,85	136,76	8,36	1,00	0,07	1,29	0,08	0,103
Trp	46,35	4,31	90,08	13,41	1,00	0,09	1,94	0,29	0,072
Tyr	62,36	4,63	82,07	7,35	1,00	0,07	1,32	0,12	0,129
Val	139,44	21,15	175,86	14,54	1,00	0,15	1,26	0,10	0,251

Anhang Tabelle 9: Messwerte für die Konzentrationen der Aminosäuren in den Fibroblasten der Patientin (n=4) sowie Kontrollzellen (n=4). Die Konzentrationen wurden mittels ESI-MS/MS gemessen und die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Für die grafische Darstellung der Werte wurden diese auf den jeweiligen Kontroll-Mittelwert normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (SD) sowie der p-Wert des Student'schen T-Tests mit Holm-Sidak Korrektur.

Amino- säure	Messwerte [ $\mu\text{M}$ ]				Werte normalisiert auf Kontrolle [A.U.]				p-Wert
	Kontrolle		Patient		Kontrolle		Patient		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Ala	94,76	19,09	109,47	31,47	1,00	0,20	1,16	0,33	0,943
Arg	87,93	13,10	138,83	25,89	1,00	0,15	1,58	0,29	0,206
Asa	0,14	0,07	0,20	0,11	1,00	0,51	1,49	0,84	0,928
Asp	29,99	8,88	32,74	8,42	1,00	0,30	1,09	0,28	0,943
Cit	1,07	0,51	1,22	0,26	1,00	0,48	1,15	0,24	0,943
Gln	438,91	49,43	511,66	99,97	1,00	0,11	1,17	0,23	0,853
Glu	126,29	19,33	169,15	34,46	1,00	0,15	1,34	0,27	0,665
Gly	66,50	22,02	78,26	17,60	1,00	0,33	1,18	0,26	0,943
Hci	0,13	0,11	0,15	0,11	1,00	0,88	1,14	0,87	0,943
His	176,70	37,69	238,75	53,09	1,00	0,21	1,35	0,30	0,701
Leu/Ile	93,83	14,07	145,98	38,58	1,00	0,15	1,56	0,41	0,520
Met	9,39	1,33	14,70	3,91	1,00	0,14	1,57	0,42	0,520
Orn	23,90	14,95	12,35	2,12	1,00	0,63	0,52	0,09	0,789
Phe	34,29	5,90	43,92	8,75	1,00	0,17	1,28	0,26	0,701
Pro	71,74	14,12	105,34	29,90	1,00	0,20	1,47	0,42	0,671
Thr	8,40	1,53	11,77	2,65	1,00	0,18	1,40	0,32	0,665
Trp	17,29	4,53	26,43	7,04	1,00	0,26	1,53	0,41	0,665
Tyr	28,72	4,35	42,89	6,48	1,00	0,15	1,49	0,23	0,189
Val	50,62	9,68	69,70	17,42	1,00	0,19	1,38	0,34	0,701

Anhang Tabelle 10: Quantifizierungswerte der Glykosylierungsmarkerproteine (Glykomarker) und Lektinsignale im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten, die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Standardkulturmedium DMEM supplementiert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die auf die Aktin-Ladekontrolle und den Mittelwert der Kontrolle (-) Probe normalisiert wurden sowie die Standardabweichung.

Lektin/ Glyko- marker	Kontrolle (-)		Patient (-)		Kontrolle (24 h)		Patient (24 h)		Kontrolle (48 h)		Patient (48 h)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
GP130 glyko.	1,00	0,36	0,17	0,05	0,98	0,25	0,12	0,04	1,05	0,27	0,18	0,08
GP130 unglyko.	1,00	0,07	1,15	0,53	1,30	0,55	1,31	0,42	1,08	0,18	1,02	0,32
ICAM1 glyko.	1,00	0,16	0,22	0,14	1,37	0,45	0,34	0,19	1,42	0,23	0,26	0,11
ICAM1 unglyko.	1,00	0,74	1,49	0,93	0,65	0,17	1,61	1,35	1,19	0,52	1,78	1,36
TGN46 glyko.	1,00	0,19	1,17	0,29	1,04	0,20	1,17	0,36	1,02	0,25	1,03	0,24
TGN46 hypoglyko.	1,00	0,11	2,87	0,34	0,84	0,38	2,20	0,47	0,55	0,24	1,11	0,24
WGA	1,00	0,24	0,77	0,13	1,07	0,11	1,32	0,47	1,55	0,54	1,16	0,33
SNA	1,00	0,18	0,83	0,18	1,20	0,11	0,94	0,05	1,09	0,46	0,72	0,39
MALI	1,00	0,05	0,52	0,10	1,59	0,47	0,96	0,21	0,94	0,13	0,52	0,19
RCAI	1,00	0,52	1,90	0,50	1,57	0,72	1,80	0,53	1,64	0,68	1,40	0,42
ECL	1,00	0,18	1,37	0,13	1,50	0,25	1,30	0,56	1,46	0,42	0,86	0,42
PNA	1,00	0,15	1,19	0,23	1,35	0,59	1,24	0,19	1,33	0,55	0,85	0,16
Jacalin	1,00	0,31	0,86	0,21	0,82	0,25	0,73	0,29	0,56	0,01	0,53	0,15

Anhang Tabelle 11: Berechnete p-Werte für die Glykosylierungsmarkerproteine im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten, die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Standardkulturmedium DMEM supplementiert wurden. Die Analyse erfolgte mittels two-way ANOVA.

<b>Test Kondition</b>	<b>GP130 glyko.</b>	<b>GP130 unglyko.</b>	<b>ICAM1 glyko.</b>	<b>ICAM1 unglyko.</b>	<b>TGN46 glyko.</b>	<b>TGN46 hypoglyko.</b>
Kontrolle (-) vs. Patient (-)	0,004	0,564	0,182	0,398	0,478	<0,0001
Kontrolle (-) vs. Kontrolle (24 h)	0,926	0,250	0,517	0,546	0,882	0,495
Kontrolle (-) vs. Patient (24 h)	0,002	0,241	0,257	0,293	0,479	<0,0001
Kontrolle (-) vs. Kontrolle (48 h)	0,862	0,759	0,464	0,745	0,935	0,072
Kontrolle (-) vs. Patient (48 h)	0,004	0,940	0,202	0,180	0,890	0,660
Patient (-) vs. Kontrolle (24 h)	0,004	0,558	0,053	0,154	0,574	<0,0001
Patient (-) vs. Patient (24 h)	0,844	0,542	0,833	0,832	0,998	0,010
Patient (-) vs. Kontrolle (48 h)	0,002	0,787	0,045	0,600	0,530	<0,0001
Patient (-) vs. Patient (48 h)	0,975	0,616	0,950	0,608	0,567	<0,0001
Kontrolle (24 h) vs. Patient (24 h)	0,003	0,981	0,081	0,105	0,575	<0,0001
Kontrolle (24 h) vs.	0,789	0,394	0,933	0,356	0,947	0,246

Kontrolle (48 h) Kontrolle (24 h) vs. Patient (48 h) Patient (24 h) vs. Kontrolle (48 h) Patient (24 h) vs. Patient (48 h) Kontrolle (48 h) vs. Patient (48 h)	0,005	0,281	0,061	0,058	0,992	0,266
	0,001	0,381	0,069	0,463	0,531	<0,0001
	0,820	0,271	0,882	0,763	0,568	<0,0001
	0,002	0,816	0,051	0,304	0,955	0,029

Anhang Tabelle 12: Berechnete p-Werte für die Lektine im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten, die für 0 h (-), 24 h oder 48 h mit 10 mM GlcNAc im Standardkulturmedium DMEM supplementiert wurden. Die Analyse erfolgte mittels two-way ANOVA.

Test Kondition	WGA	SNA	MALI	ECL	RCAI	PNA	Jacalin
Kontrolle (-) vs. Patient (-)	0,268	0,373	0,048	0,264	0,022	0,440	0,586
Kontrolle (-) vs. Kontrolle (24 h)	0,721	0,288	0,016	0,132	0,136	0,169	0,469
Kontrolle (-) vs. Patient (24 h)	0,124	0,745	0,882	0,366	0,040	0,341	0,288
Kontrolle (-) vs. Kontrolle (48 h)	0,010	0,627	0,810	0,162	0,095	0,193	0,085
Kontrolle (-) vs. Patient (48 h)	0,425	0,138	0,050	0,671	0,294	0,543	0,071
Patient (-) vs. Kontrolle (24 h)	0,146	0,054	<0,0001	0,684	0,385	0,532	0,856
Patient (-) vs. Patient (24 h)	0,010	0,570	0,066	0,827	0,787	0,854	0,598

Patient (-) vs. Kontrolle (48 h)	0,000	0,171	0,080	0,769	0,493	0,584	0,225
Patient (-) vs. Patient (48 h)	0,060	0,546	0,985	0,128	0,188	0,174	0,195
Patient (48 h) vs. Kontrolle (24 h)	0,234	0,167	0,011	0,533	0,547	0,658	0,728
Patient (24 h) vs. Kontrolle (24 h)	0,025	0,561	0,009	0,910	0,852	0,937	0,298
Patient (24 h) vs. Kontrolle (48 h)	0,658	0,013	<0,0001	0,057	0,644	0,053	0,261
Patient (48 h) vs. Patient (24 h)	0,276	0,418	0,927	0,609	0,676	0,716	0,484
Patient (24 h) vs. Patient (48 h)	0,452	0,244	0,069	0,188	0,291	0,125	0,432
Patient (48 h) vs. Kontrolle (48 h)	0,069	0,051	0,083	0,072	0,518	0,062	0,931

Anhang Tabelle 13: Quantifizierungswerte der Glykosylierungsmarkerproteine (Glykomarker) und Lektinsignale im Lysat von Kontroll- und Patientenfibroblasten, die mit dem pLNCX2 Leervektor (Mock), oder mit pLNCX2 *SLC35A1*(WT)-HA bzw. pLNCX2 *SLC35A1*(A133G)-HA Konstrukten viral infiziert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte (MW), die auf die Aktin-Ladekontrolle und den Mittelwert der Kontrolle Mock normalisiert wurden sowie die Standardabweichung. Im unteren Bereich sind die jeweiligen p-Werte der Daten nach two-way ANOVA mit Tukey Test aufgeführt.

Lektin/ Glykomarker	Kontrolle Mock		Patient Mock		Kontrolle + WT		Patient + WT	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
GP130 glyko.	1,00	0,05	0,21	0,07	1,22	0,02	0,42	0,12
GP130 unglyko.	1,00	0,37	2,61	0,99	1,43	0,38	1,38	0,82
GP130 glyko./ unglyko.	1,00	0,35	0,09	0,05	0,82	0,26	0,32	0,12
ICAM1 glyko.	1,00	0,35	0,35	0,16	1,33	0,43	0,28	0,14
ICAM1 unglyko.	1,00	0,06	1,66	0,26	1,20	0,24	2,50	1,37
ICAM1 glyko./ unglyko.	1,00	0,30	0,23	0,12	1,09	0,18	0,17	0,11
TGN46 glyko.	1,00	0,15	0,73	0,15	0,78	0,26	0,90	0,16

TGN46 hypoglyko.	1,00	0,11	2,54	1,07	1,73	1,06	1,63	0,59
TGN46 glyko./hypoglyko.	1,00	0,07	0,33	0,11	0,66	0,38	0,60	0,14
WGA	1,00	0,24	1,68	0,54	1,24	0,44	1,61	0,32
MALI	1,00	0,17	1,33	0,62	1,24	0,22	1,37	0,22
SNA	1,00	0,31	1,04	0,31	0,85	0,20	0,85	0,15
RCAI	1,00	0,22	2,79	0,59	1,91	0,51	1,53	0,53
ECL	1,00	0,50	1,95	0,92	1,50	0,41	1,37	0,26

## p-Wert

Lektin/ Glykomarker	Kontrolle Mock vs. Patient Mock	Kontrolle Mock vs. Kontrolle + WT	Kontrolle Mock vs. Patient + WT	Patient Mock vs. Kontrolle + WT	Patient Mock vs. Patient + WT	Kontrolle + WT vs. Patient + WT
GP130 glyko.	0,195	0,945	0,458	0,057	0,953	0,184
GP130 unglyko.	0,001	0,698	0,779	0,018	0,012	0,999
GP130 glyko./ unglyko.	0,064	0,959	0,249	0,193	0,919	0,526
ICAM1 glyko.	0,363	0,839	0,275	0,070	0,998	0,046
ICAM1 unglyko.	0,342	0,956	0,001	0,653	0,156	0,008
ICAM1 glyko./ unglyko.	0,156	0,994	0,112	0,089	0,999	0,061
TGN46 glyko.	0,859	0,920	0,991	0,999	0,960	0,987
TGN46 hypoglyko.	0,000	0,148	0,256	0,096	0,048	0,992
TGN46 glyko./ hypoglyko.	0,151	0,710	0,589	0,718	0,825	0,997
WGA	0,325	0,927	0,420	0,696	0,998	0,794
MALI	0,808	0,918	0,751	0,994	1,000	0,985
SNA	0,999	0,973	0,972	0,943	0,941	>0,999
RCAI	<0,0001	0,104	0,536	0,125	0,010	0,776
ECL	0,055	0,533	0,748	0,621	0,406	0,986

## 10 Danksagung

Zunächst möchte mich bei Prof. Dr. Britta Brügger bedanken, die diese Arbeit als Erstgutachterin betreute. Bei den jährlichen TAC-Meetings sorgte sie für eine angenehme und konstruktive Atmosphäre und gab stets sehr hilfreiche Tipps und scharfsinnige Denkanstöße für das weitere Vorgehen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinem Zweitgutachter PD Dr. Christian Thiel, der mir die Durchführung der Experimente und das Schreiben dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Er hatte immer ein offenes Ohr und zeigte jederzeit Verständnis, weshalb ich mich während meiner Zeit als Doktorandin sehr wohl und gut betreut gefühlt habe.

Außerdem ein großes Dankeschön an Dr. Mirko Völkers für die Teilnahme, Diskussion und Hilfestellung während meiner TAC-Meetings und wie auch an Dr. Vytaute Starkuviene-Erfle, für das Beisitzen meiner Abschlussprüfung.

Vielen Dank an PD Dr. Ines Brecht, Dr. Ruth Falb, Dr. Tobias Haack und Darja Gauck des Universitätsklinikums Tübingen, welche die Whole-Exome-Sequenzierung der hier beschriebenen Patientin durchführten und das Patientenmaterial bereitstellten. Zudem möchte ich mich bei Dr. Thomas Ruppert und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der Proteomik-Analyse bedanken und bei Prof. Dr. Britta Brügger und ihrem Labor für die Messung der verschiedenen Lipide.

Ein ganz besonderer Dank geht an Virginia Geiger, das Herz des CDG-Forschungslabors, die mich mit ihrem großen technischen und methodischen Wissen sowie zahlreichen Tipps und Tricks im Laboralltag unterstützte und mit der man herzlich lachen, aber genauso gut auch wunderbar schweigen kann. Ebenso möchte ich Bianca Dimitrov meinen herzlichen Dank aussprechen, die mir ebenfalls immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir durch das Korrekturlesen der Arbeit einen großen Gefallen tat. Beiden bin ich sowohl für die fachliche Hilfe, aber auch für die persönliche und mentale Unterstützung, die lustigen Gespräche, vielsagenden Blicke und die gemeinsamen Mittagspausen, an die ich mich immer gerne zurückerinnern werde, sehr dankbar.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei den Kolleginnen der CDG-Routinediagnostik, Simone Hengst und Dorothea Messner-Schmitt, die mich fachlich jederzeit sehr gut beraten haben und sich stets Zeit nahmen, wenn ich ihre Hilfe benötigte.

Zu großem Dank bin ich außerdem meinen Mit-Doktoranden verpflichtet, angefangen mit Marlen Hutter, Andreas Hüllen und Lars Beedgen, die mich sofort willkommen hießen, den Einstieg ins Doktoranden-Dasein sehr leicht gemacht haben und einen großen Teil dieses Weges mit mir gegangen sind. Ich bin sowohl für die wissenschaftlichen Diskussionen, aber vor allem auch die persönlichen Gespräche und aufheiternden, lustigen Momente äußerst dankbar. Außerdem möchte ich mich bei Lukas Hören bedanken, der mit seiner Masterarbeit und brennendem Forschergeist dieses Projekt anstieß und der auch später noch Zeit für jegliche Unterstützung und interessante Gespräche fand. Auch nach dem Wechsel einer Doktoranden-Generation, wurde es

durch Andreas Hecker nie langweilig und ich bedanke mich für seine unerschütterliche Unternehmungslust, die mir immerhin schon einen eigenen Cocktail und eine lilane Pizza beschert hat. Trotz der erschwerten Bedingungen während unserer gemeinsamen PhD-Zeit hatten wir doch sehr viel zu lachen und ich gebe hiermit den Staffelstab der CDG-Doktoranden an ihn weiter.

Bei meiner Schwester Patricia Falkenstein und meinen Freunden Yannick Gietz und Alexandra Bendel bedanke ich mich von Herzen für die seelische Unterstützung und dafür, dass man mit ihnen immer lachen oder auch weinen kann, sie jederzeit hinter mir stehen, mich verstehen und ermutigen und mich immer wieder dazu bringen Schritte zu gehen, die ich mir selbst zunächst nicht zugetraut hätte.

Meine Eltern, Sabine und Bernhard Falkenstein, haben mich schon immer voll und ganz unterstützt. Dies und ihr Glaube an mich und meine Fähigkeiten waren es, durch die ich es überhaupt bis hierher geschafft habe. Dafür und für so vieles mehr, mein allerherzlichstes Dankeschön!