

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Harms -**

**Congenital Disorder of Glycosylation Ib (CDG-Ib)
Charakterisierung und vergleichende Analyse mit CDG-Ia und sekundären
Störungen der Glykosylierung**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Martin Hasilik

aus Freiburg im Breisgau

2001

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. E. Harms

2. Berichterstatter: PD Dr. med. T. Marquardt

Tage der mündlichen Prüfungen: 15.04. und 23.04.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Harms -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. E. Harms
Koreferent: PD Dr. med. T. Marquardt

ZUSAMMENFASSUNG

Congenital Disorder of Glycosylation Ib (CDG-Ib)

Charakterisierung und vergleichende Analyse mit CDG-Ia und sekundären
Störungen der Glykosylierung

Martin Hasilik

Die Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) sind eine wachsende Gruppe von hereditären Störungen der N-Glykosylierung. Derzeit sind neun verschiedene Enzymdefekte bekannt. Gemeinsames Charakteristikum dieser heterogenen Multisystemerkrankungen ist eine psychomotorische Retardierung.

Eine Ausnahme bildet das im Rahmen dieser Arbeit entdeckte CDG-Ib. Hauptmerkmal dieser rezessiv vererbten Erkrankung ist eine exsudative Enteropathie. Eine mentale Retardierung tritt nicht auf. Neben dem Nachweis einer signifikant reduzierten Aktivität der Phosphomannose Isomerase (PMI), die zum vollständigen Fehlen von proteingebundenen Oligosacchariden wie bei CDG-Ia führt, konnte gezeigt werden, dass die diätetische Substitution von Mannose eine wirksame Therapie darstellt.

Die Untersuchung weiterer Patienten führte zur Diagnose von 22 Fällen mit Phosphomannomutase (PMM) Defizienz (CDG-Ia) und 13 bislang ungeklärten CDG Fällen.

Elektrophoretisch sind CDG-Ia und Ib nicht zu unterscheiden. Die Untersuchung von Fällen mit Galaktosämie, hereditärer Fructoseintoleranz, Alkoholabusus und verschiedenen hepatischen Erkrankungen zeigten zum Teil den CDG ähnliche Elektrophoresemuster von Serumtransferrin. Mögliche pathobiochemische Ursachen, Auswirkungen auf den jeweiligen Phänotyp und Limitationen der Primärdiagnostik werden diskutiert.

Tage der mündlichen Prüfungen: 15.04. und 23.04.2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 N-Glykosylierung	1
1.1.1 Bedeutung der N-Glykosylierung	1
1.1.2 Biosynthese der N-Glykane	1
1.1.3 Zusammenfassung	5
1.2 Mannose	6
1.2.1 Stoffwechsel	6
1.2.2 Transporter	7
1.2.3 Physiologische Bedeutung	8
1.2.4 Natürliches Vorkommen und Homöostase	9
1.2.5 Exogene Zufuhr von Mannose	10
1.2.6 Zusammenfassung	11
1.3 Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)	12
1.3.1 Biochemische Grundlagen	12
1.3.2 Nomenklatur	17
1.3.3 CDG Typen	19
1.3.3.1 CDG-Ia	19
1.3.3.2 CDG-Ic	20
1.3.3.3 CDG-IId	20
1.3.3.4 CDG-Ie	21
1.3.3.5 CDG-IIa	21
1.3.3.6 CDG-IIb	22
1.3.3.7 CDG-IIc	22
1.4 Erkrankungen mit Beteiligung der Glykosylierung	23
1.4.1 Congenital Dyserythropoetic Anemia II	23
1.4.2 Defekte der O-Glykosylierung	24
1.4.3 Defekte der C-Glykosylierung	24
1.4.4 Defekte der Glykosylierung infolge somatischer Mutationen	25
1.4.5 Sekundäre Affektionen der N-Glykansynthese	25
1.4.5.1 Übersicht	25

1.4.5.2 Galaktosämie	27
1.4.5.3 Hereditäre Fructose Intoleranz (HFI)	27
1.4.5.4 Alkoholabusus	28
2. Zielsetzung	30
3. Materialien und Methoden	32
3.1 Materialien	32
3.1.1 Geräte und Zubehör	32
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	33
3.1.3 Probenmaterial	34
3.1.3.1 Patienten	34
3.1.3.2 Kontrollen	34
3.1.4 Chemikalien	35
3.1.5 Häufig verwendete Pufferlösungen	37
3.1.6 Färbelösungen	38
3.2 Proteinbiochemische Methoden	39
3.2.1 Gelmedien	39
3.2.1.1 Agarosegele	39
3.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgele	39
3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	40
3.2.2.1 Einleitung	40
3.2.2.2 Probenaufbereitung	41
3.2.2.3 Fokussierung	41
3.2.2.4 Fehlerquellen	41
3.2.3 Immunpräzipitation	42
3.2.3.1 Reagenzien	42
3.2.3.2 Präzipitation	42
3.2.3.3 Fehlerdiskussion	43
3.2.4 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.4.1 Einleitung	43
3.2.4.2 Probenaufbereitung	44

3.2.4.3 Elektrophorese _____	44
3.2.5 Färbemethoden und Gel Trocknung _____	44
3.2.5.1 Agarosegele _____	44
3.2.5.2 Polyacrylamidgele _____	45
3.2.6 Leukozytenisolierung _____	45
3.2.6.1 Reagenzien _____	45
3.2.6.2 Leukozytenisolierung _____	45
3.2.7 Zellyse _____	46
3.2.8 Proteinbestimmung _____	46
3.2.9 Aktivitätsbestimmung der Phosphomannomutase (PMM) _____	47
3.2.9.1 Einleitung _____	47
3.2.9.2 PMM Assay _____	47
3.2.9.3 Fehlerdiskussion _____	48
3.2.10 Aktivitätsmessung der Phosphomannose Isomerase (PMI) _____	49
3.2.10.1 Einleitung _____	49
3.2.10.2 PMI Assay _____	49
3.2.11 Aktivitätsbestimmung der Hexokinase (HK) _____	50
3.2.12 Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucose Isomerase (PGI) _____	51
3.2.13 Bestimmung der Serummannosekonzentration _____	51
3.2.13.1 Einleitung _____	51
3.2.13.2 Vorbereitung des Anionenaustauschers DE-53 _____	51
3.2.13.3 Präparation der Säulen _____	52
3.2.13.4 Stammlösungen _____	52
3.2.13.5 Quantitative Elimination von Glucose _____	53
3.2.13.6 Bestimmung der Mannosekonzentration _____	53
3.2.13.7 Berechnung _____	53
3.2.13.8 Fehlerdiskussion _____	54
4. Ergebnisse _____	55
4.1 Strukturelle und enzymatische Aspekte des CDG-Ia _____	55
4.1.1 Elektrophoretische Charakteristika _____	55
4.1.2 Enzymaktivität der Phosphomannomutase (PMM) _____	56

4.2 Elektrophoretische Untersuchung ungeklärter CDG _____	58
4.3 Zink als Inhibitor der PMM _____	59
4.4 Oligosaccharidstrukturen bei sekundären Störungen der Glykosylierung _____	60
4.5 CDG-Ib, ein neuer Typ der Congenital Disorders of Glycosylation ____	63
4.5.1 Klinischer Phänotyp _____	63
4.5.2 Elektrophoretische Charakteristika _____	64
4.5.3 Enzymdefekt _____	65
4.5.4 Orale Substitution von Mannose bei CDG-Ib _____	67
4.5.5 Therapieverlauf _____	68
5. Diskussion _____	69
5.1 Einleitung _____	69
5.2 Auffälligkeiten in der Analyse von CDG-Ia und CDG-x _____	70
5.3 Die Spezifität der primären CDG-Diagnostik ist limitiert _____	72
5.4 Eine neue Form der Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-Ib ____	76
5.5 Pathobiochemie der CDG-Ia und Ib _____	77
5.6 Die orale Mannosesubstitution ist die erste effektive Therapie einer CDG _____	79
6. Zusammenfassung und Ausblick _____	84
7. Literaturverzeichnis _____	86

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ADG	Acquired Disorders of Glycosylation
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDA	Congenital Dyserythropoetic Anemia
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
CDGS	Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome
CDT	Carbohydrate-deficient Transferrin
CMP	Cytidinmonophosphat
CT	Computertomographie
Da	Dalton
Dol	Dolichol
* g	x-fache Erdbeschleunigung
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
GK	Glucokinase
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
et al.	et alii (lat. und andere)
Fuc	Fucose
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
GnT	GlcNAc-Transferase
GPI	Glucosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
H.a.	Hinweis auf
HEMPAS	hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum lysis test
Hepes	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{uptake}	Michaelis-Menten-Konstante für Transportproteine
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency
LLO	lipidgebundene(s) Oligosaccharid(e)
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere

Maldi-Tof MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
mM	Millimolar
Man	Mannose
min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie
μ	mikro
n	Fallzahl
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-hydrogenphosphat
NANA	Sialinsäure
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
OST	Oligosaccharyltransferase
P	Phosphat
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PGI	Phosphoglucose Isomerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMI	Phosphomannose Isomerase
PMM	Phosphomannomutase
PNH	nächtliche Hämoglobinurie
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sia	Sialinsäure
Sle ^x	Sialyl-Lewis X
Tab.	Tabelle
Tf	Transferrin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoacetat
V	Volt
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrom
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel

Chemische Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Ein- bzw. Drei-Buchstabencode dargestellt. Englische Fachtermini wurden beibehalten, wenn ihre Übersetzung auch in der deutschsprachigen Fachliteratur unüblich bzw. unzureichend ist.

1. Einleitung

1.1 N-Glykosylierung

1.1.1 Bedeutung der N-Glykosylierung

Naszierende Proteine können durch unterschiedliche ko- und posttranslationale Prozesse modifiziert werden. Die häufigste Modifikation membrangebundener und sekretorischer Proteine ist die N-Glykosylierung. N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide beeinflussen in hohem Maße die physikalischen und funktionellen Eigenschaften der Glykoproteine. In diese Gruppe fallen viele Membranproteine, Rezeptoren, Enzyme, Hormone und Matrixproteine. Die Zuckerstrukturen sind bedeutend für eine Vielzahl von biochemischen und biologischen Prozessen (Varki, 1993):

- Proteinfaltung
- Proteinlöslichkeit
- Schutz vor Degradation
- Beeinflussung der Halbwertszeit von Proteinen
- Protein-Targetting
- Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen
- hormonelle Funktionen
- Bindungsstellen für Mikroorganismen, Toxine, Antikörper etc.
- Maskierung von Zielstrukturen für Mikroorganismen, Toxine, Antikörper etc.

Die Funktion eines Oligosaccharids ist nicht eindeutig von ihrer Struktur ableitbar. Identische Strukturen können in Abhängigkeit vom zugehörigen Protein und dem Entwicklungsalter des Organismus unterschiedliche Funktionen erfüllen (Varki, 1993).

1.1.2 Biosynthese der N-Glykane

Die N-Glykosylierung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi Apparat. Im ER werden Oligosaccharidvorläufer mit der Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ an einem Lipidträgermolekül, dem Dolichol, synthetisiert.

Nach der Übertragung auf naszierende Glykoproteine wird die Synthese im Golgi-Apparat komplettiert (Kornfeld and Kornfeld, 1985, Brockhausen et al., 1998, Hirschberg and Snider 1987, Durand et al., 2000) (Abb. 1).

Die Synthese im ER erfolgt schrittweise. Als Donor für die beiden GlcNAc- und die ersten fünf Mannosylreste dienen aktivierte Zuckernukleotide, die im Zytosol synthetisiert werden. Sie werden durch spezifische Glykosyltransferasen auf der cytoplasmatischen Seite des ER auf den Akzeptor Dolicholphosphat übertragen. Die weitere Kettenverlängerung erfolgt im Lumen des ER. Hierzu muß eine membranöse Reorientierung des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol-Komplexes}$, ein sog. "flip", vollzogen werden. Eine "Flipase" als katalysierendes Enzym konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Die sieben weiteren Zuckerreste werden von den Dolicholphosphatzuckern Dol-P-Man und Dol-P-Glc auf die wachsenden Saccharidketten transferiert. Sie werden durch die Dol-P-Man- und die Dol-P-Glc-Synthasen gebildet, die zugleich die Passage durch die Membran des ER katalysieren. Jeder Schritt beruht auf der Aktivität einer spezifischen N-Acetylglucosaminyl-, Mannosyl- oder Glucosyltransferase. Bis zur ersten Verzweigung werden die Zuckerreste β -glykosidisch verknüpft, die übrigen Bindungen sind α -glykosidisch.

Die drei terminalen Glucosylreste erleichtern die en bloc Übertragung des Oligosaccharids durch die Oligosaccharyltransferase (OST) auf den Asparaginylnrest zugehöriger Konsensusstellen der Peptidketten (Silberstein und Gilmore, 1996). Diese bestehen aus der Sequenz Asn-X-Ser/Thr, wobei X eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin und Aspartat sein kann (Bause, 1983).

Essentiell für die Reaktion ist Steigerung der Reaktivität der Amidgruppe des Asparagins durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Amidgruppe und der Hydroxylgruppe des Serins bzw. Threonins (Bause und Legler, 1981). Mit geringerer Affinität kann die OST alternativ nicht-glucosylierte Oligosaccharide übertragen (Silberstein und Gilmore, 1996).

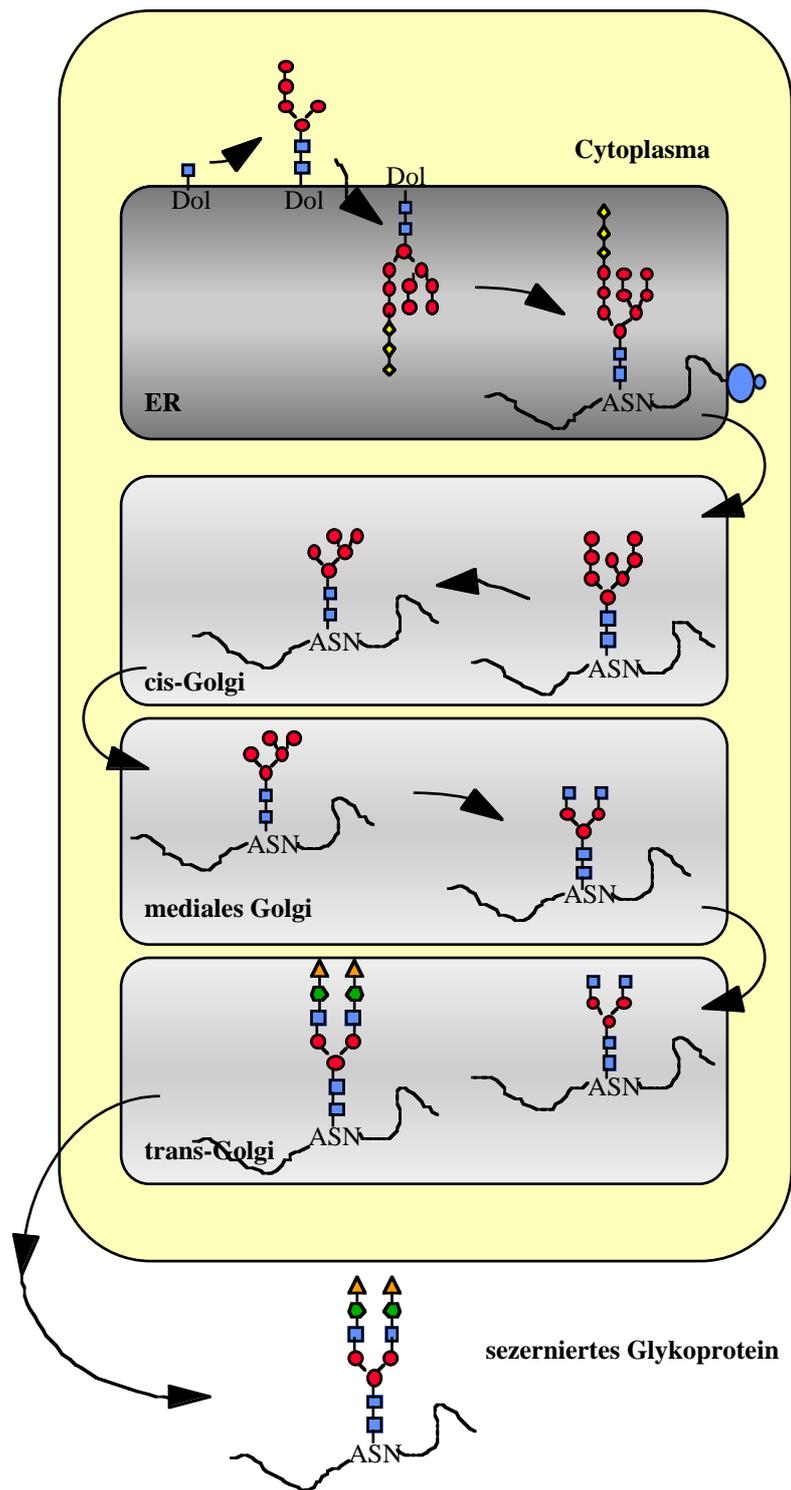


Abb.1. Glykoproteinsynthese. Vereinfachte Übersicht der Synthese und posttranslationalen Modifikation der Oligosaccharide im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat. ■ GlcNAc, ● Mannose, ● Galaktose, ▲ NANA, ASN Asparagin.

Die Glykosylierung kann nur erfolgen, solange die Konformation der im Faltungsprozess befindlichen Peptidkette die Aktion der OST an den Konsensusstellen erlaubt. Sie ist in hohem Maße abhängig von der Aktivität der OST und der Verfügbarkeit von lipidgebundenen Oligosaccharidvorstufen. Zudem besteht eine Abhängigkeit der Akzeptorwirkung der Konsensusstelle von der jeweiligen Triplettssequenz. Es ist bekannt, dass nur ca. 30 % aller Konsensusstellen mit Oligosacchariden besetzt sind (Kornfeld und Kornfeld 1985). Nicht-glykosylierte Sequenzen finden sich zunehmend in Richtung C-Terminus der Proteine (Gavel und von Heijne, 1990). Threoninhaltige Akzeptorstellen werden zu einem wesentlich höheren Prozentsatz glykosyliert als Serinhaltige (Shelikoff et al., 1996). Verschiedene Faktoren können die Synthese beeinflussen. So resultiert beispielsweise die Verarmung an Glucose oder Energie in der Synthese verkürzter Oligosaccharide der Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ und sukzessive in einer verminderten Glykosylierung (Turco, 1980; Gershman et al., 1981; Rearick et al., 1981a/b). Verantwortlich ist die Reduktion von Dol-P-Man infolge einer verminderten GDP-Man Synthese (Chapman und Calhoun, 1988).

Bereits im ER beginnt die Prozessierung der Oligosaccharide mit der Abspaltung, dem "Trimming", der drei terminalen Glucosyl- und eines α 1,2-gebundenen Mannosylrestes durch die α -Glucosidasen I und II sowie durch eine spezifische α 1,2-Mannosidase (Abb. 1).

Die weitere posttranslationale Modifikation erfolgt im Golgi-Apparat (Abb. 1) und bestimmt über die endgültige Struktur des N-Glykans als Komplex-, Hybrid- oder mannosereichen Typ. In Vertebraten ist der Komplex-Typ am häufigsten vertreten. Der Transfer aus dem ER ist energieabhängig und involviert verschiedene membranständige Rezeptoren. Lysosomale Enzyme unterlaufen einer hochspezifischen Phosphorylierung einiger Mannosylreste, jeweils am C-Atom 6. Diese Reaktion wird sequentiell durch zwei Enzyme, die N-Acetylglucosaminylphosphotransferase und die N-Acetylglucosamin-1-phosphodiester α -N-Acetylglucosaminidase, katalysiert. Der Transfer in die

Lysosomen erfolgt über Mannose-6-phosphat Rezeptoren (von Figura und Hasilik, 1986).

Die mannosereichen Oligosaccharidketten nicht-lysosomaler Glykoproteine werden im cis-Golgi durch die α -Mannosidase I zu $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ verkürzt und in den mittleren Zisternen des Golgi einer weiteren Prozessierung unterzogen. Zunächst wird ein N-Acetylglucosaminyrest durch die N-Acetylglucosaminyltransferase I übertragen. Dem folgen die Abtrennung zweier Mannosylreste durch die α -Mannosidase II und eine weitere β 1,2-Verknüpfung mit einem N-Acetylglucosaminyrest durch die N-Acetylglucosaminyltransferase II. Im trans-Golgi erfolgt abschließend die Kettenverlängerung durch Galaktosyl- und Sialyltransferasen. Die Synthese der aktivierten CMP-Sialinsäure ist im Gegensatz zu der weiterer Zuckernukleotide im Zellkern lokalisiert (Münster et al., 1998). Es entstehen komplexe biantennäre Oligosaccharide mit der Struktur $\text{Sia}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Durch konkurrierende Aktivitäten verschiedener N-Acetylglucosaminyltransferasen können zusätzliche Verzweigungen entstehen. Die terminalen Zuckerreste (Polylactosamin-, Polysialylsequenzen etc.) variieren abhängig von der Art des jeweiligen Glykoproteins.

Es wird angenommen, daß die terminale Saccharidkomposition ebenso wie C-terminale Peptidsequenzen für die weitere Bestimmung der Glykoproteine, z.B. ihre Sekretion, verantwortlich sind. Treten Alterationen der initialen Glykosylierung im ER auf, kommen v.a. im ER lokalisierte Qualitätskontrollmechanismen zum tragen, die zur Retention und Degradation der Glykoproteine führen können. Zu diesen zählt u.a. das an der Proteinfaltung beteiligte ER-ständige Chaperon Calnexin (Hammond et al., 1994; Marquardt et al. 1995, Tatu et al., 1997).

1.1.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich die N-Glykansynthese in drei Stadien einteilen. Im ersten Stadium erfolgt die Synthese lipidgebundener Oligosaccharide (LLO) im ER. Nach der Übertragung auf naszierende Proteine durch die OST

(zweites Stadium) wird im dritten Stadium die Synthese durch Prozessierung der Zuckerketten im Golgi-Apparat komplettiert.

1.2 Mannose

1.2.1 Stoffwechsel

Mannose und viele weitere Monosaccharide sind wesentlicher Bestandteil der Zuckeranteile von Glykokonjugaten. Ihre Bedeutung wurde aufgrund der ubiquitären Verfügbarkeit von Glucose und der potentiellen Konversion in Mannose und andere Zucker lange Zeit unterschätzt.

In eukaryonten Zellen wird GDP-Mannose aus Glucose über Fructose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat und Mannose-1-phosphat synthetisiert (Abb.2). Katalysiert werden die Reaktionen durch die Enzyme Hexokinase (HK), Phosphoglucose Isomerase (PGI), Phosphomannose Isomerase (PMI), Phosphomannomutase (PMM) und GDP-Mannose Synthase.

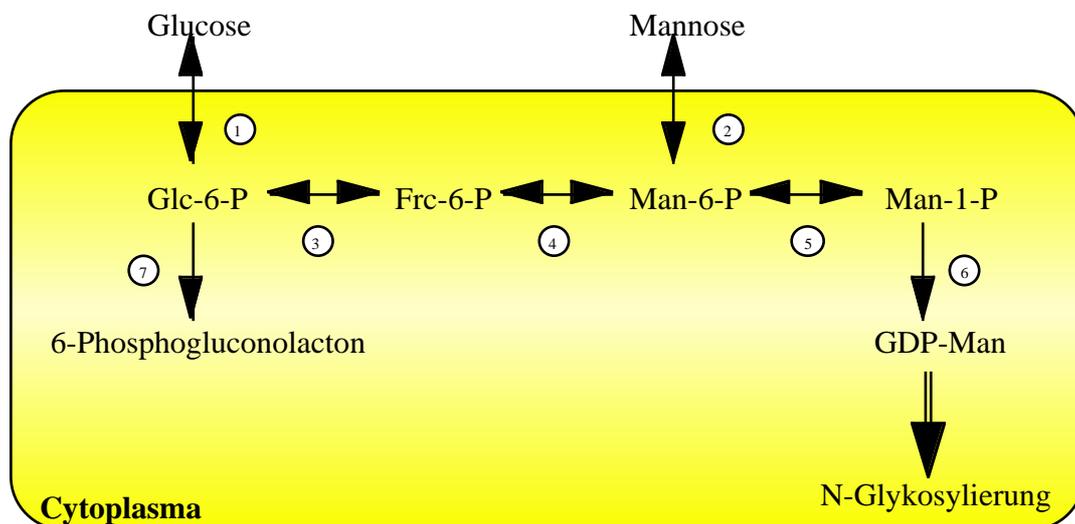


Abb.2 Mannosestoffwechsel: 1. Glucokinase, 2. Hexokinase, 3. PGI, 4. PMI, 5. PMM, 6. GDP-Man-Synthase, 7. G6PDH. GDP-Man ist Substrat der N-Glykosylierung.

Schlüsselreaktion ist der Umsatz von Fructose-6-phosphat zu Mannose-6-phosphat durch die in Eukaryonten ubiquitär exprimierte PMI. Deletionen des PMI Gens in Hefen sind ohne Substitution von Mannose letal (Mendicino and Rao, 1975; Smith et al., 1992; Gracy and Noltmann, 1968). In höheren Organismen kann alternativ Serummannose nach Aufnahme in die Zelle und Phosphorylierung durch eine Hexokinase unabhängig von der PMI in den Stoffwechsel einfließen.

1.2.2 Transporter

Bis zur Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts befassten sich nur wenige Studien mit der Bioverfügbarkeit, Resorption und Verteilung von Monosacchariden in höheren Organismen. Sie konstatierten uniform die Existenz aktiver Transportsysteme der intestinalen Mucosa nur für Glucose und Galaktose. Da Hinweise auf einen aktiven intestinalen Transportmechanismus fehlten, wurde angenommen, dass Mannose nur über Diffusion resorbiert wird. Die Transportrate der Mannose beträgt in vitro wie in vivo 10-30 % derjenigen von Glucose (Deuel et al., 1938; Wilson et al., 1955). Der bereits 1925 von C.F. Cori beobachteten Unabhängigkeit der Resorption der Mannose von der luminalen Konzentration wurde anscheinend wenig Beachtung geschenkt. Phosphorylierte Formen der Mannose und weiterer Zucker wurden zwar im Serum beobachtet, jedoch als Intermediärprodukte im Umsatz zu Glucose erklärt. Die Phosphorylierung von Monosacchariden als Teil eines aktiven Zuckertransports wurde bereits 1942 von Kjerulf-Jensen für Fructose postuliert, konnte aber von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Wilson et al., 1955).

Erst der Nachweis spezifischer Mannosetransporter ließ eine weit größere Bedeutung exogener Mannose für den Stoffwechsel vermuten. Na⁺-abhängige Transporter wurden erstmals 1970 und 1982 in renalen Tubuluszellen von Hund und Flunder entdeckt (Silverman et al., 1970; Pritchard et al., 1982). Ein spezifisches intestinales Transportsystem für Mannose wurde 1994 von Ogier-Denis et al. beschrieben. Caco-2 Zellen

exprimieren auf ihrer apikalen Oberfläche einen Na^+ -abhängigen und auf ihrer basolateralen einen Na^+ -unabhängigen Transporter (Ogier-Denis et al., 1994).

Eine intensivere Untersuchung und Charakterisierung der Mannosetransporter wurde erst im Rahmen der Erforschung der Congenital Disorders of Glycosylation (CDG, s.u.) lanciert. Charakteristisch für diese Erkrankungsgruppe ist eine Minderglykosylierung vieler Glykoproteine. Exogene Mannose wird von CDG-Ia Fibroblasten an Stelle von Glucose für die Synthese von Oligosacchariden bevorzugt und führt zu einer Korrektur der Hypoglykosylierung (Panneerselvam and Freeze, 1996a; Panneerselvam et al., 1997).

Der in Fibroblasten, Hepatomzellen, Makrophagen, gliaähnlichen Zellen, Mastzellen und renalen Fibroblasten von Ratte und Hund nachgewiesene Transporter ist hochspezifisch und wird durch Glucose auch in hochphysiologischen Konzentrationen nicht signifikant inhibiert. Der K_{uptake} liegt zwischen 30-70 μM , der V_{max} im Bereich von 5-33 nmol/h/mg Protein (Panneerselvam and Freeze, 1996b).

In humanem Serum beträgt die physiologische Mannosekonzentration ca. 50 μM (Akazawa et al., 1986; Etchison und Freeze, 1997). Untersuchungen an 35 unterschiedlichen Spezies ergaben Konzentrationen im Bereich von 28-161 μM mit einem Mittelwert von 75 μM (Alton et al., 1998). Diese Daten lassen eine physiologische Relevanz des Mannosetransporters vermuten.

1.2.3 Physiologische Bedeutung

Markierungsversuche mit $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Mannose}$ lieferten weitere Erkenntnisse über die physiologische Relevanz extrazellulärer Mannose. Unter physiologischen Konzentrationen von Mannose und Glucose (5 mM) fließt der Großteil der aufgenommenen Mannose (83-90 %) in den Glucosstoffwechsel ein (Alton et al., 1998). Durch die Katalyse der PMI geht die ^3H -Markierung am C-Atom 2 in entsprechendem Umfang verloren. Der Rest kalkuliert für ca. 80 % der

Mannosylreste in Oligosacchariden. Diese Befunde zeigten, dass Zellen, zumindest in vitro, Mannose für die Biosynthese von Glykoproteinen bevorzugen (Alton et al., 1998; Panneerselvam et al., 1997).

1.2.4 Natürliches Vorkommen und Homöostase

Es stellt sich die Frage, welche Faktoren zur Homöostase der Mannose im peripheren Blut beitragen. Informationen zum Mannosegehalt in Nahrungsmitteln liegen praktisch nicht vor (Alton et al., 1998; Freeze, 1999a). Es kann jedoch angenommen werden, dass neben Anteilen freier Mannose ein Großteil des Monosaccharids in gebundener Form vorliegt. Tierische Proteine enthalten ca. 0,1-0,2 % Mannose. Ähnliche Relationen werden für pflanzliche Proteine angenommen (Alton et al., 1998). Daneben finden sich in Pflanzen β -Anomere der Mannose mit geringerer biologischer Verfügbarkeit als Bestandteil vieler Polysaccharide, v.a. Mannane und Galaktomannane (Alton et al., 1998). Die Art der Diät (pflanzlich, tierisch oder gemischt) hat anscheinend keinen Einfluß auf die Mannosekonzentration im Serum.

Es wird postuliert, dass die enzymatische Ausstattung der Darmmucosa und die vom Pankreas sezernierten Enzyme eine suffiziente Degradation der mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate und Glykokonjugate ermöglichen. Einige an der Prozessierung von Glykoproteinen beteiligte Golgi-Enzyme werden posttranslational auch auf der Plasmamembran verschiedener Zellen, u.a. der Enterozyten, exprimiert. Im Bürstensaum intestinaler Mukosazellen finden sich z.B. die α -Mannosidasen I und II, die Mannose aus proteingebundenen Oligosacchariden freisetzen (Velasco et al., 1993). Mit der Nahrung zugeführte Kohlenhydrate werden durch verschiedene Saccharidasen in Monosaccharide gespalten. Diese werden über spezifische Transporter (s.o.) resorbiert, zum Teil bereits in den Enterozyten verstoffwechselt oder gelangen nach transzellulärem Transport als freie Monozucker in die Blutbahn (Alton et al., 1998).

Die Spezifität des Mannosetransporters weist auf eine ausreichende Aufnahmekapazität der Zellen hin. Wie theoretische Berechnungen vermuten

lassen, reicht diätetisch zugeführte Mannose wahrscheinlich nicht aus, um den Bedarf für die Synthese von Glykokonjugaten zu decken (Alton et al., 1998). Mannose kann endogen aus Glucose generiert werden. Weitere potentielle Quellen sind die ko- und posttranslationale Prozessierung sowie die Degradation von Glykokonjugaten. Durch die Prozessierung werden ca. 67 % der Mannose aus den Oligosacchariden freigesetzt (Alton et al., 1998). Durch Recycling von degradierten Glykokonjugaten könnte weitere Mannose für den Stoffwechsel zur Verfügung stehen (Moore und Spiro, 1994). Freie Oligosaccharide werden über komplexe intrazelluläre Transportwege der Degradation in Lysosomen und Cytoplasma zugeführt. Diese Mechanismen sind durch eine hohe Effizienz gekennzeichnet. Allerdings sind die bisherigen Studien auf die Verwertung freigesetzter Galaktose, Sialinsäuren und Aminozucker limitiert. Erkenntnisse zum Verbleib der Mannose fehlen (Alton et al., 1998; Freeze, 1999a).

Auch wenn all diese Mechanismen zur Homöostase der Mannose beitragen können, bleibt ihr prozentualer Anteil und letztlich die Herkunft der Mannose, ob exogen oder endogen, unklar. Zur definitiven Klärung sind sicherlich weitere Studien erforderlich.

1.2.5 Exogene Zufuhr von Mannose

Es liegen nur wenige Informationen zur Verträglichkeit, Effizienz der Resorption, ihrer Halbwertszeit im Serum und zur peripheren Verwertung von Mannose vor. Wood und Cahill stellten 1963 fest, dass oral zugeführte Mannose geringfügig resorbiert und vermehrt über die Niere ausgeschieden wird. Des Weiteren führte eine einmalige Dosis von 500 mg/kg KG in einer 20%igen Lösung zu abdominellen Beschwerden mit osmotischer Diarrhöe. Intravenös infundierte Mannose (500 mg/kg KG als 25%ige Lösung innerhalb von 5 min) wurde dagegen gut vertragen und verstoffwechselt. Ein signifikanter Anteil wurde renal ausgeschieden. Die Infusion einer äquivalenten Menge Mannose über 10 h löste bei den Probanden allerdings schwere Nebenwirkungen mit Unwohlsein und Sklerenikterus durch Anstieg

des indirekten Bilirubins aus. Die Serumkonzentrationen erreichten maximal das 160fache der physiologischen Konzentration (50 $\mu\text{mol/l}$) (Wood und Cahill, 1963).

Konträr zu diesen Befunden zeigten neuere Studien eine effektive intestinale Resorption von Mannose bei Einzelgaben bis 210 mg/kg KG. Diarrhöe trat erst ab einer Dosis >200 mg/kg KG auf. Weitere Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Serumkonzentrationen erreichten bereits nach 90 min Maximalwerte bis ca. 450 μM und blieben durch sukzessive Gaben in dreistündlichen Intervallen konstant auf einem erhöhtem Niveau. Die Halbwertszeit lag bei ca. 4 h (Alton et al., 1997; Mayatepek et al., 1998). Die intravenöse Applikation von 5,7 g Mannose/kg KG/Tag über drei Wochen bei einem einzelnen CDG Patienten steigerte die Serumkonzentration bis auf 2 mmol/l und wurde nebenwirkungsfrei vertragen (Mayatepek et al., 1997). Im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen an Ratten zeigten ebenfalls eine effiziente intestinale Resorption. Maximale Konzentrationen wurden nach ca. 30 min erreicht. Die Halbwertszeit lag bei 30 min. Weder im Darm, im Kot noch im Urin ließen sich signifikante Mannosemengen nachweisen (Alton et al., 1998).

Durch Markierungsexperimente konnte weiterer Aufschluss über die Verwertung der Mannose gewonnen werden. Der Großteil floß in den Glucosestoffwechsel ein. Dieses belegte die hohe Konversionsrate des Labels zu ^3HOH . Der Rest wurde in Glykoproteine inkorporiert. Leber und Intestinum wiesen, bezogen auf ihr Feuchtgewicht, den aktivsten Stoffwechsel und die höchste Mannoseaufnahme auf. Signifikante Mengen fanden sich auch im Gehirn wieder. Passend zu diesen Befunden lagen die Aktivität der PMI und der PMI/PMM Quotient als Ausdruck der Syntheseleistung im Organvergleich in der Leber am niedrigsten (Alton et al., 1998).

1.2.6 Zusammenfassung

Freie Serummannose besitzt im Säugetierstoffwechsel eine zentrale Bedeutung, v.a. für die Synthese von Glykokonjugaten. Obwohl der

Organismus ausreichend mit Enzymen zur Verwertung von in der Nahrung enthaltener Mannose ausgestattet ist, bleibt ihre Herkunft im Serum unklar. Prinzipiell können ausreichende Mengen aus Glucose generiert werden. Die unterschiedliche Expression von Enzymen des Mannosestoffwechsels im Organismus spricht jedoch deutlich für die Relevanz exogener Mannose.

1.3 Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)

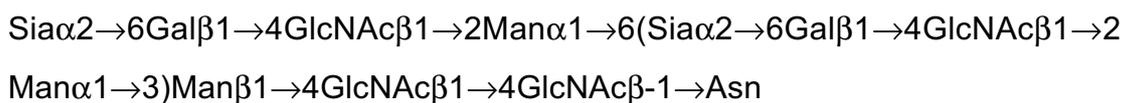
1.3.1 Biochemische Grundlagen

Die Congenital Disorders of Glycosylation, ehemals Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome (CDGS), umfassen eine Gruppe seltener erblicher Multisystemerkrankungen mit heterogenem klinischen Erscheinungsbild. Erstbeschrieben wurden sie 1980 bei einem Zwillingsspaar durch den belgischen Pädiater J. Jaeken. Gemeinsames biochemisches Merkmal aller seitdem beschriebenen Formen ist eine Hypoglykosylierung zahlreicher sezernierter, zellulärer und membrangebundener Glykoproteine. In Abhängigkeit von der Lokalisation des zugrundeliegenden Enzymdefekts im Stoffwechsel fehlen einzelne Zuckerreste bis hin zu kompletten Oligosacchariden.

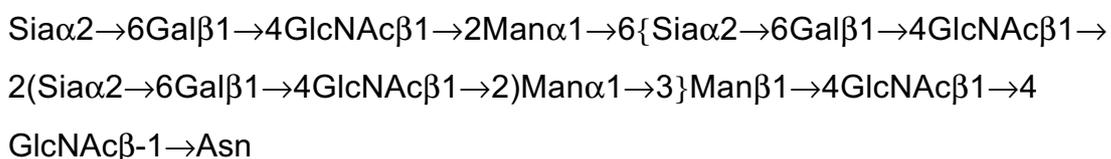
Als einfachste diagnostische Methode wurde der Nachweis atypischer Transferrinisoformen mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) etabliert. Das Transportprotein für Eisen im Serum enthält zwei Konsensusstellen für die N-Glykosylierung an den Positionen Asn⁴¹³ und Asn⁶¹¹ (MacGillivray et al., 1983). 95 % der Transferrinmoleküle tragen zwei disialylierte biantennäre N-Glykane. Die übrigen Glykovarianten enthalten Kombinationen von bi- und triantennären Strukturen mit einem unterschiedlichem Gehalt an endständigen Sialinsäuren. In Kontrollseren findet sich eine Normverteilung mit prominentem tetrasialo-Transferrin (pI 5,4) sowie geringeren Anteilen an hexa- (pI 5,2), penta- (pI 5,3), tri- (pI 5,6) und disialylierten (pI 5,7) Varianten (Stibler und Jaeken, 1990). Mono- (pI 5,8) und asialo-Formen (pI 5,9) werden praktisch nicht beobachtet (de Jong et al., 1995; Carchon et al., 1999).

Im Serum von CDG-Ia Patienten fand sich im Vergleich zu Kontrollen in der IEF eine Verschiebung zur Kathode mit vermehrtem di- und asialo-Transferrin (S2 und S0) sowie eine Reduktion des tetrasialo-Transferrins (S4) um ca. 50 %. Ebenfalls vermindert waren penta- und hexasialo-Transferrin (Jaeken et al., 1984). Pathologische Bandenmuster in der IEF konnten auch bei weiteren Glykoproteinen nachgewiesen werden (s.u.). Damit war eine Hypoglykosylierung als biochemische Expression der Erkrankung evident. Hinweise auf die Saccharidkomposition der Seitenketten konnten mit dieser Methode jedoch nicht gewonnen werden.

Die beiden Konsensussequenzen des Transferrin sind zu 85 % mit der folgenden biantennären Oligosaccharidstruktur, deren theoretisches Molekulargewicht ca. 2,2 kDa beträgt, verknüpft (Fu und van Halbeek, 1992):



Daneben finden sich in geringem Ausmaß (ca. 15 %) triantennäre Strukturen:



Um die Struktur der Oligosaccharide zu analysieren, wurden S4, S2 und S0 mittels Lektin-Affinitätschromatographie, Gelfiltrations-Chromatographie, Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF MS) untersucht. Normal strukturierte biantennäre Glykane fanden sich nur bei S4 und S2. Bei S0 konnten keine Oligosaccharide detektiert werden. Die drei Varianten des Transferrins unterschieden sich im Molekulargewicht um 2,2 und 4,4 kDa respektive, entsprechend dem Fehlen einer bzw. zweier Zuckerseitenketten. Die Monoglykosylierung der S2 Form zeigte keine Präferenz für eine der beiden Konsensusstellen. Posttranslationale Modifikationen oder eine Degradation der Glykane konnten

ausgeschlossen werden (Wada et al., 1992 und 1994; Yamashita et al., 1993a/b).

Die beschriebenen Molekulargewichtsunterschiede kommen auch in der SDS-PAGE nach Immunpräzipitation oder mit konsekutivem Western Blot zur Darstellung (Marquardt et al., 1992; Seta et al., 1996).

Als Ursache für das Fehlen kompletter Oligosaccharide wurden zum einen ein Defekt der Übertragung lipidgebundener Oligosaccharide (LLO) auf das Proteingerüst durch die Oligosaccharyltransferase (OST), zum anderen Synthesestörungen der LLO bzw. ihrer Substrate postuliert. Aktivitäten der OST in CDG-Ia Fibroblasten unterschieden sich nicht von Kontrollen (Knauer et al., 1994).

Der Gehalt an Dolicholphosphat als Grundgerüst der Synthese war in Fibroblasten dreier japanischer Patienten ebenso normal wie die Aktivität der GlcNAc-1-P Transferase. Diese katalysiert den ersten Schritt der Synthese der LLO (Yasugi et al., 1994). Das Produkt ist Dol-PP-N-GlcNAc.

Markierungsversuche mit [³H]Mannose zeigten einen reduzierten Gesamtgehalt an Mannose in CDG-Ia Fibroblasten. Dabei waren sowohl phosphorylierte Mannosederivate (Man-6-P, Man-1-P und GDP-Man) als auch der Einbau von Label in LLO und Asn-gebundene Oligosaccharide (protein derived oligosaccharides, PDO) vermindert. Im Vergleich zu Kontrollen (fünf bis neun Mannosylreste) synthetisierten CDG Fibroblasten, neben vermehrt verkürzten LLO mit fünf und weniger Mannosylresten, nur 30-35 % der Absolutmenge an LLO. Da die OST Man₉-Strukturen und mit geringerer Affinität auch kleinere LLO, die zum Teil im Golgi weiter prozessiert werden können, auf das Proteingerüst übertragen kann, erklärt sich die Hypoglykosylierung v.a. durch das geringere Angebot an LLO (Powell et al., 1994; Körner et al., 1998a).

Verschiedene Defekte z.B. der Mannosyltransferasen, der Dolicholsynthese oder der Dolichol Kinase sind in Hefemutanten beschrieben worden. Ähnlich den CDG resultieren sie in einer Verkürzung der LLO, jedoch fällt eine

homogenere Größenverteilung auf. Diese Befunde sprachen für Veränderungen der Verfügbarkeit von Monosacchariden, Zuckernukleotiden oder der Aktivität entsprechender Transferasen. Der reduzierte Pool phosphorylierter Mannosederivate war der erste H.a. die Genese des zugrundeliegenden Defekts (Powell et al., 1994; Krasnewich et al., 1995)

Der Zusatz von Mannose zum Kulturmedium führte zu einer Korrektur sowohl der Größe der LLO als auch der Minderglykosylierung in CDG-Ia Zellen (Panneerselvam and Freeze 1996a; Rush et al., 2000). Des Weiteren ließ sich eine Hypoglykosylierung in Säugerzellen durch Glucoseentzug provozieren (Turco, 1980; Gershman et al., 1981; Rearick et al., 1981a/b; Chapman und Calhoun, 1988). Beide Befunde ließen eine Störung der Mannosesynthese aus Glucose vermuten.

Die Aktivitäten der an der Synthese von Mannose-6-phosphat beteiligten Enzyme Hexokinase, Phosphoglucose Isomerase und Phosphomannose Isomerase lagen im Normbereich (Panneerselvam and Freeze, 1995).

1995 konnte eine Störung des Umsatzes von Mannose-6-phosphat zu Mannose-1-phosphat infolge einer Defizienz der Phosphomannomutase (PMM) in Fibroblasten, Leukozyten und Hepatozyten mit konsekutivem Mangel an GDP-Mannose nachgewiesen werden (Abb. 3). Die Aktivitäten der PMM untersuchter Patienten lagen im Vergleich zu Kontrollen unter 10 % (van Schaftingen et al., 1995).

Weitere Enzymdefekte wurden bisher für den in dieser Arbeit beschriebenen Indexpatienten (Typ Ib) (Abb. 3) und die Typen Ic-e und IIa-c aufgeklärt und charakterisiert.

Klinisch präsentieren sich die CDG mit schwerer mentaler und psychomotorischer Retardierung, einer Hepatopathie und Störungen des Gerinnungssystems. Formen ohne neurologische Beteiligung waren bis zum Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Das klinische Bild variiert abhängig vom ursächlichen Defekt stark in seiner Ausprägung und soll später für die einzelnen CDG Typen ausführlicher erläutert werden.

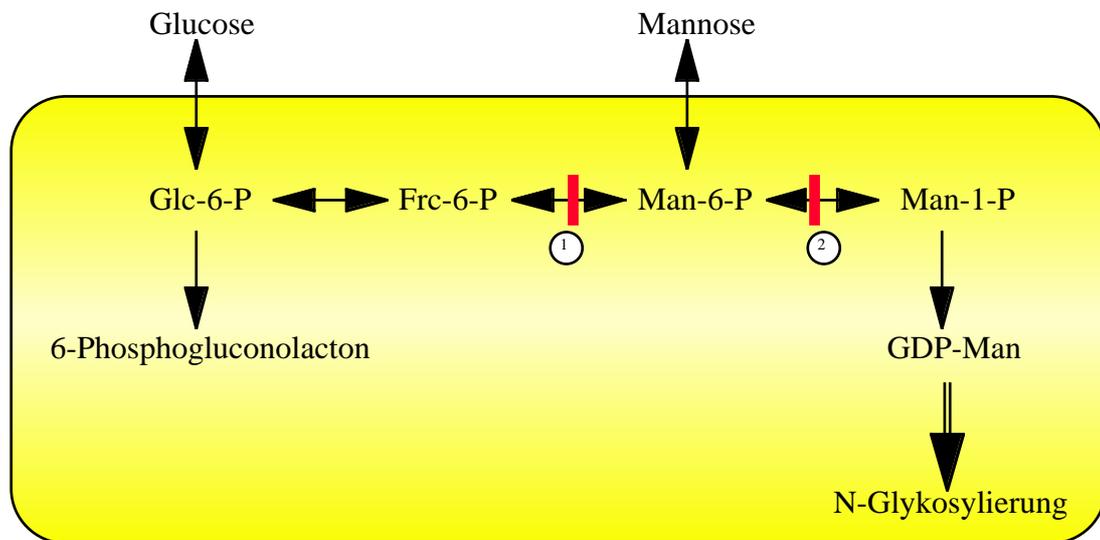


Abb. 3. Enzymdefekte bei CDG-Ia und CDG-Ib. 1 Phosphomannose Isomerase (PMI) (Indexpatient, CDG-Ib), 2 Phosphomannomutase (PMM)(CDG-Ia). GDP-Mannose kann lediglich in deutlich vermindertem Ausmaß durch Restaktivitäten der Enzyme synthetisiert werden.

Die Typen Ic-e ähneln in ihrer Symptomatik dem Typ Ia, stellen jedoch teils mildere, teils schwerere Verlaufsformen dar. Erklärungsversuche bleiben hypothetisch. Organspezifische Isoenzyme könnten die klinische Varianz bedingen. Auch die Lokalisation im Stoffwechsel könnte eine Rolle spielen. Ein solitärer Mangel an Glucosylresten ist mit einem milderem Phänotyp assoziiert (CDG Ic). Dagegen ist GDP-Mannose sowohl Substrat der N-Glykosylierung als auch der Synthese des Glykosylphosphatidylinositol Ankers, GDP-Fucose, für die C-Mannosylierung und O-Glykosylierung. Ein Mangel betrifft multiple Stoffwechselwege und ist mit schwereren Phänotypen assoziiert (z.B. CDG-Ia).

Da postuliert wird, daß ca. 1 % des humanen Genoms für Proteine/Enzyme codiert (Freeze, 1998), die an der Synthese, der Erkennung und dem Transport von Oligosacchariden beteiligt sind, stellen die bisher bekannten Glykosylierungsdefekte vermutlich nur einen geringen Prozentsatz der CDG dar. Einige Erkrankungen mit Alterationen der Glykokonjugation wurden bereits vor den CDG beschrieben. Die zugrundeliegenden Defekte sind nur

zum Teil bekannt, Störungen der Glykosylierung sind aber evident. Möglicherweise werden sie in Zukunft ebenfalls als CDG klassifiziert.

1.3.2 Nomenklatur

Unter der alten Bezeichnung Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome (CDGS) wurden alle Subtypen in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung aufgelistet. Unterschieden wurden sie durch das Bandenmuster in der isoelektrischen Fokussierung in Kombination mit der klinischen Symptomatik. Mit der Entdeckung verschiedener Enzymdefekte auch bei identischen Bandenmustern kam es zunehmend zu Subklassifizierungen mit abnehmender Übersichtlichkeit. Im Rahmen des First International Workshop on CDG [Leuven, Belgium, November 12-13, 1999] wurde daher eine Vereinfachung der Nomenklatur beschlossen (Participants of the "First International Workshop on CDG", 1999 und 2000). Um der wachsenden Zahl unterschiedlicher erblicher Glykosylierungsdefekte, die nicht auf Glykoproteine beschränkt sein müssen, gerecht zu werden, wurde des Weiteren die Umbenennung der Erkrankungsgruppe in Congenital Disorders of Glycosylation unter Beibehaltung der gebräuchlichen Kurzform CDG vereinbart. Zugleich ermöglicht der Name die Trennung von erworbenen bzw. sekundären Glykosylierungsstörungen. Diese könnten unter dem Akronym ADG (Acquired Disorders of Glycosylation) subsumiert werden.

Die Aufteilung in zwei Gruppen mit römischen Zahlen erfolgt in Abhängigkeit von der Lokalisation des Defektes im Stoffwechsel. Subklassifiziert wird in alphabetischer Reihenfolge. Gruppe I werden Synthesedefekte der lipidgebundenen Oligosaccharide (LLO) bis zur Übertragung auf das Proteingerüst durch die Oligosaccharyltransferase zugeordnet. Charakteristisch ist das Fehlen kompletter Zuckerseitenketten.

Prozessierungsdefekte der Glykoproteine werden in Gruppe II zusammengefasst.

Den zwei Gruppen zugehörige CDG können als Typen bezeichnet werden. Dieser Terminus entfällt jedoch im eigentlichen Namen (CDG-Ix/Iix). Eine Typisierung erfolgt erst nach Beschreibung des genetischen Defekts (Tab.1). In der Literatur als CDG Typen III, IV und V beschriebene Formen werden verworfen und, soweit ihre Defekte nicht identifiziert wurden (IV=Id, V=Ic), als CDG-x eingestuft.

Typ	Enzymdefekt	Lokalisation
CDG-Ia	Phosphomannomutase (PMM2)	Cytosol
CDG-Ib	Phosphomannose Isomerase (PMI)	Cytosol
CDG-Ic	Glucosyltransferase I (ALG6)	ER
CDG-Id	Mannosyltransferase (ALG3)	ER
CDG-Ie	DolP-Man Synthase (DPM1)	ER-Membran (cytosolisch)
CDG-IIa	N-Acetylglucosaminyltransferase II (MGAT II)	Golgi-Apparat
CDG-IIb	Glucosidase I (GCS 1)	ER
CDG-IIc	GDP-Fucose Transporter	Golgi-Apparat

Tab. 1. Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)

Eine direkte Anlehnung an die Lokalisation der Defekte in verschiedenen Zellkompartimenten oder an unterschiedliche Fokussierungsmuster erfolgt nicht mehr. Optional ist auch die Generierung weiterer Gruppen möglich. Inwieweit Erkrankungen mit Defekten im katabolen Stoffwechsel der Oligosaccharide, Alterationen der O- und der kürzlich beschriebenen C-Glykosylierung sowie weiterer Glykokonjugate in Zukunft in die Nomenklatur integriert werden, ist derzeit nicht abzusehen.

1.3.3 CDG Typen

1.3.3.1 CDG-Ia

CDG-Ia ist der klassische und mit mehr als 300 Patienten weltweit häufigste Vertreter der CDG und wird durch eine Defizienz der Phosphomannomutase 2 (PMM2) verursacht (van Schaftingen et al., 1995). Das zugehörige Gen konnte auf Chromosom 16p13 lokalisiert werden (Matthijs et al., 1997a/b; Wada und Sakamoto, 1997; Carchon et al., 1999). Groß- und Kleinhirn weisen interessanterweise eine eher niedrige Expression der PMM2 im Vergleich zum Isoenzym PMM1 auf (Pirard et al., 1997 und 1999a). Der für die neurologische Beteiligung verantwortliche Pathomechanismus ist ungeklärt. Mittlerweile sind über 30 verschiedene Mutationen beschrieben. Die Schwere der Erkrankung korreliert möglicherweise mit der Restaktivität der PMM2 und der organspezifischen Aktivität der PMM1 (Pirard et al., 1999b).

Die pathognomonische Symptomtrias Strabismus convergens, invertierte Mamillen und Fettverteilungsstörung mit auffälligen lumboglutealen Fettpolstern ermöglicht im Säuglingsalter häufig die Blickdiagnose. Mit zunehmendem Alter bleibt nur der Strabismus bestehen.

Frühzeitig fallen eine psychomotorische Retardierung und eine Gedeihstörung auf. Fakultativ finden sich eine erhöhte Infektanfälligkeit, Gerinnungsstörungen sowie eine kardiale, hepatische, renale und retinale Beteiligung. Des Weiteren treten sogenannte "stroke-like episodes" (zeitlich limitierte schlaganfallähnliche Symptome) ohne pathologisches Korrelat in der Bildgebung (MRT/CT), ein Anfallsleiden, Ataxie und Polyneuropathie auf.

Symptome und Schweregrad der Erkrankung variieren abhängig vom Lebensalter. Die Mortalität liegt bei ca. 20 % (Carchon et al., 1999). Erwachsene Patienten über 30 Jahre sind beschrieben (Stibler et al., 1994). Eine kurative Therapie konnte trotz intensiver Bemühungen bislang nicht entwickelt werden (Marquardt et al. 1997).

1.3.3.2 CDG-Ic

Patienten mit CDG-Ic ähneln klinisch dem CDG-Ia, jedoch ist die Ausprägung v.a. neurologisch milder. Auffällig ist die hohe Inzidenz von Krampfanfällen bei Infektionen (Hanefeld et al., 2000). Untersuchungen der LLO in Patientenzellen enthüllten eine Akkumulation von $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ aufgrund einer verminderten Glucosylierung durch die $\alpha 1,3$ -Glucosyltransferase. Dieses Substrat wird nur schlecht von der OST auf Glykoproteine übertragen. Da der Defekt nur partiell ist, werden dennoch einige vollständige LLO transferiert. Mutationen konnten in dem aus Hefen bekannten orthologen ALG6 Gen, dem hALG6, nachgewiesen werden. In der IEF zeigt sich eine CDG-Ia ähnliche Verteilung der Transferrin-Isoformen (Burda et al., 1998; Körner et al., 1998c; Imbach et al., 2000a;).

1.3.3.3 CDG-Id

Dem ehemaligen CDGS Typ IV, jetzt CDG-Id, liegt ursächlich ein Defekt der $\alpha 1,3$ -Mannosyltransferase zugrunde (Stibler et al., 1995; Körner et al., 1999a). Die akkumulierenden $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ Strukturen dienen der OST alternativ als Substrat und können nach dem Transfer auf Proteine weiter prozessiert werden. Die Übertragungsrates ist jedoch gering, so dass sich eine Hypoglykosylierung trotz einer nur partiellen Defizienz des Enzyms ausbildet. Mutationen finden sich auf dem humanen Ortholog des ALG3 Genes in *S. cerevisiae*. In der IEF findet sich prozentual weniger asialo-Transferrin als bei CDG-Ia. Klinisch präsentiert sich eine dem CDG-Ia ähnlich schwere, neurologisch betonte Multiorganerkrankung. Der einzige bislang bekannte Patient fiel in der Neonatalphase durch schwere Krampfanfälle auf. Weitere klinische Merkmale sind eine Mikrozephalie, schwere psychomotorische Retardierung, Visusstörungen und Skelettdeformitäten.

1.3.3.4 CDG-Ie

Beim CDG-Ie akkumulieren ebenfalls $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Formen der LLO. Mutationen finden sich im Dolicholphosphat-Mannose Synthase I Gen, das für die cytosolische Untereinheit der Dol-P-Man Synthase codiert (Imbach et al., 2000b; Kim et al., 2000). Es besteht wie bei den anderen Formen der CDG eine Restaktivität des Enzyms. Der Mangel an Dol-P-Man kann auch zu Störungen der C-Glykosylierung und der Synthese des Glykosylphosphatidylinostol Ankers führen. Die IEF zeigt deutlich vermehrtes di- und nur wenig asialo-Transferrin. Betroffene Patienten leiden an generalisierter muskulärer Hypotonie, multifokaler Epilepsie, kortikaler Blindheit, Dismorphien etc. und imponieren v.a. durch eine fast vollständig ausbleibende psychomotorische Entwicklung.

1.3.3.5 CDG-IIa

CDG-IIa resultiert aus einer Defizienz der GlcNAc-Transferase II (GnTII) (Jaeken et al., 1994). Dieses im cis-Golgi lokalisierte Enzym katalysiert die Verknüpfung des $\text{Man}_{\alpha 1 \rightarrow 6}$ -Arms des N-Glykans mit einem GlcNAc-Rest. Bei einem Defekt der GnTII ist die Synthese komplexer verzweigter Glykane nicht möglich, während der andere Arm des N-Glykans normal prozessiert wird. In der IEF und der SDS-PAGE finden sich fast ausschließlich disialo-Transferrin bzw. eine homogene Transferrinpopulation mit reduziertem Molekulargewicht. Es fehlen jeweils die drei terminalen Zuckerreste Sialinsäure, Galactose und N-Acetylglucosamin am $\text{Man}_{\alpha 1 \rightarrow 6}$ -Arm. Mutationen wurden im MGAT2 Gen nachgewiesen (Tan et al., 1996). Im Vergleich zu CDG-Ia zeigt die Erkrankung einen gravierenderen Verlauf mit mentaler und motorischer Retardierung. Kleinhirnatrophie und periphere Polyneuropathie finden sich nicht (Schachter und Jaeken, 1999).

1.3.3.6 CDG-IIb

Eine Defizienz der Glucosidase I führt zu dem Krankheitsbild der CDG-IIb (de Praeter et al., 2000). Dieses Enzym entfernt spezifisch distale α -1,2-gebundene Glucosylreste nach dem *en bloc* Transfer der LLO auf neusynthetisierte Glykoproteine im endoplasmatischen Retikulum. Alternativ, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz, können Glc_3Man Strukturen durch eine im Golgi lokalisierte Endo- α -1,2-Mannosidase abgespalten werden. Wegweisend für die Diagnose war der Nachweis einer exzessiven Ausscheidung von Glc_3Man im Urin der Indexpatientin. Die Auswirkung des Prozessierungsdefektes auf die Struktur Asn-gebundener Oligosaccharide ist nicht untersucht. Interessanterweise fanden sich keine atypischen Isoformen in der IEF von Serumtransferrin und vom β -trace Protein im Liquor. Klinisch imponierten bei dem im Alter von zwei Monaten verstorbenen Kind eine generalisierte Hypotonie, v.a. faciale Dysmorphien und eine Hypoventilation mit rezidivierenden Apnoen. Im Verlauf entwickelte die Patientin eine Hepatomegalie, eine demyelinisierende Polyneuropathie und eine generalisierte Epilepsie.

1.3.3.7 CDG-IIc

Leucocyte Adhesion Deficiency Type II (LAD II) ist eine 1992 von Etzioni et al. erstmalig beschriebene hämatologisch-immunologische Erkrankung, die durch eine Störung der Extravasation von Leukozyten in periphere Gewebe charakterisiert ist. Ursächlich ist eine Hypofucosylierung von Glykokonjugaten. Typischerweise besteht ein Mangel an fucosyliertem Sialyl-Lewis X (SLe^x), einem Oberflächenantigen der Leukozyten, das als Ligand für Selectine des Gefäßendothels dient. Während bislang ein Defekt der de novo Synthese von GDP-Fucose vermutet wurde (Sturla et al., 1998; Körner et al., 1999b) liegt zumindest bei einigen Patienten eine Störung des GDP-Fucose Imports in den Golgi-Apparat vor (Lübke et al., 1999). Eine Defizienz des GDP-Fucose Transporters konnte bei drei Patienten auch molekulargenetisch gesichert werden (Lübke et al., 2001; Lühn et al., 2001). Der Phänotyp präsentiert sich

mit rezidivierenden Infektionen, gravierender Entwicklungs- und Wachstumsretardierung, Muskelhypotonie, Mikrocephalie, Frontallappenatrophie, Bombay Blutgruppe und multiplen äußeren Stigmata. Eine Therapie mit oraler Fucosesubstitution zeigte sich bei einem Patienten mit Transporterdefizienz erfolgreich (Marquardt et al., 1999). Dagegen fanden sich bei einigen Patienten mit reduzierter Aktivität des Transporters abweichende kinetische Merkmale ohne Veränderung des V_{\max} des Enzyms. Dies wurde als Erklärung für die Ineffizienz der Fucosetherapie bei diesen Patienten gewertet (Sturla et al., 2001).

1.4 Erkrankungen mit Beteiligung der Glykosylierung

1.4.1 Congenital Dyserythropoetic Anemia II

Congenital Dyserythropoetic Anemia Typ II (CDA II) bzw. HEMPAS (hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum lysis test) ist die häufigste autosomal rezessiv vererbte Anämieform, charakterisiert durch ineffektive Erythropoese, multinukleäre Erythroblasten und sekundäre Hämosiderose (Fukuda, 1999). Die klinische Ausprägung ist zumeist mild und erfordert nur selten Transfusionen. Eine neurologische Beteiligung findet sich selten (Fukuda, 1999). Die Inzidenz eines Diabetes ist hoch und steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer durch Exposition sonst kryptischer Antigene ausgelösten Autoimmunreaktion (Fukuda, 1999). Untersuchungen von erythrozytären Membranglykoproteinen (z.B. Band 3) zeigten einen Mangel an Polylactosaminen (Fukuda, 1999). Dagegen fand sich in Zellmembranen ein erhöhter Anteil an polylactosaminylierten Glykolipiden. In Strukturanalysen der Oligosaccharide fielen v.a. Hybridstrukturen mit $\text{SiaGalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ auf und ließen einen Prozessierungsdefekt im Golgi Apparat vermuten. Ein primärer Defekt konnte bislang nicht aufgedeckt werden. Bei zwei Patienten wurden reduzierte Aktivitäten der α -Mannosidase II (MII) nachgewiesen (Fukuda et al., 1990). In einem Fall wurden Mutationen im codierenden Bereich der MII gefunden

(Fukuda, 1999). Dagegen wiesen Linkage-Analysen bei einigen Patienten auf einen als CDAN2 bezeichneten Genlocus auf Chromosom 20q11.2 hin (Gasparini et al., 1997) während bei weiteren Patienten keine Zuordnung zu einem der o.g. Enzyme/Gene möglich war (Iolascon et al., 1998). Eine Defizienz einer kürzlich beschriebenen α -Mannosidase IIx (Chui et al., 1997) wurde in keinem Fall gefunden. Möglicherweise wird die Erkrankung durch den Defekt eines Transkriptionsfaktors, der die Expression von MII und GnTII reguliert, verursacht (Iolascon et al., 1997)

1.4.2 Defekte der O-Glykosylierung

Das Wiskott-Aldrich Syndrom (WAS), ein X-chromosomal rezessives Syndrom, ist die bislang einzige bekannte Erkrankung mit einer Alteration der O-Glykosylierung (Durand und Seta, 2000). Bei dieser findet sich eine abnorme Expression eines O-glykosylierten integralen Membranproteins (CD43) mononukleärer Zellen. Die Aktivitäten der O-Glykosyltransferasen, core-2-GlcNAc-Transferase und α -2,6-Sialyltransferase sind erhöht. Das sogenannte WAS Protein (WASP, Genlocus: Xp11.22-11.23) ist vermindert. Möglicherweise ist es an der Expressionsregulation der o.g. Glykosyltransferasen beteiligt (Huang et al., 2000). Es wird in allen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert (Montgomery und Scott, 2000). Diese gravierende Erkrankung ist durch Thrombozytopenie, atopische Dermatitis und Immundefizienz charakterisiert (Buckley, 2000). Vor allem die humorale Antwort auf Polysaccharidantigene ist deutlich reduziert. Einzig kurativ ist derzeit die Knochenmarkstransplantation. Neue gentherapeutische Ansätze mit dem WAS Protein erscheinen vielversprechend (Huang et al., 2000)

1.4.3 Defekte der C-Glykosylierung

Defekte der kürzlich entdeckten C-Glykosylierung bzw. C-Mannosylierung sind bislang nicht beschrieben (Doucey et al., 1998).

1.4.4 Defekte der Glykosylierung infolge somatischer Mutationen

Die Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH, nächtliche Hämoglobinurie) beruht auf einer somatischen Mutation des X-chromosomalen PIG-A Gens in hämatopoetischen Stammzellen (Young und Maciejewski, 2000). Aus bislang ungeklärten Gründen kommt es zu einer Selektion mutierter Klone. Das PIG-A Gen kodiert für eine GlcNAc-Transferase, die den ersten Schritt der Synthese des Glucosylphosphatidylinositol (GPI) Ankers katalysiert (Rosti, 2000). Bleibt die Übertragung des N-Acetylglucosamins auf Phosphatidylinositol aus, kann keine weitere Verlängerung der Kohlenhydratkette erfolgen. Konsekutiv weisen Zellen des hämatologischen Systems eine Defizienz aller GPI-gebundenen Proteine auf. Klinisch präsentiert sich die PNH mit chronischer intravaskulärer Hämolyse, venösen Thrombosen und Zytopenie. Letztere basiert auf einer Hypoplasie des Knochenmarks. Der klinische Verlauf ist hochvariabel. 10-Jahres Überlebensraten liegen zwischen 50 % und 71 %. Gehäuft entwickelt sich ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) oder eine akute Leukämie (Raiola et al., 2000). Die Therapie ist derzeit palliativ. Vielversprechende kurative Ansätze involvieren die Knochenmarkstransplantation (Raiola et al., 2000).

1.4.5 Sekundäre Affektionen der N-Glykansynthese

1.4.5.1 Übersicht

Es gibt Erkrankungen, die mit sekundären Variationen oder Störungen der Glykosylierung einhergehen. So führen z.B. Infektionen zu Änderungen des Oligosaccharidprofils v.a. von Akutphase-Proteinen. Akute Infektionen bedingen häufig eine Reduktion, chronische eine Vermehrung der Verzweigungen proteingebundener Oligosaccharide (Durand and Seta, 2000).

Immunkomplexe von Patienten mit rheumatoider Arthritis weisen konstant einen hohen Anteil an asialo-agalaktosyl IgG auf (Brockhausen et al., 1998). Einflüsse auf die Expression der β 4-Gal-Transferase in B-Zellen werden als ursächlich diskutiert. Äquivalente Hypogalaktosylierungen finden sich auch bei Tuberkulose, Sarkoidose, Osteoarthritis und M. Crohn (Brockhausen et al., 1998).

Veränderte Kohlenhydratstrukturen, sogenannte Tumor-assoziierte Kohlenhydrat Antigene (TACAs), werden von vielen neoplastischen Zellen exprimiert und sind auch auf einigen Serumproteinen, z.B. dem α -Fetoprotein (AFP), nachweisbar. Betroffen sind neben der N- und O-Glykosylierung von Glykoproteinen auch Glykolipide. O-Glykane und Glykolipide weisen eine reduzierte Glykosylierung auf, N-Glykane v.a. einen höheren Verzweigungsgrad und atypische Fucosylierung. Die Expression ist hochspezifisch für unterschiedliche Krebsarten. Ihr potentieller Nutzen als Tumormarker, prognostischer Faktor und für immunologische Therapieansätze ist Gegenstand intensiver Forschung (Brockhausen et al., 1998; Durand and Seta, 2000).

O-glykosylierte Muzine und teilweise auch N-glykosylierte Proteine von Mucoviscidose-Patienten sind häufig hyposialyliert (Brockhausen et al., 1998). Des Weiteren findet sich eine vermehrte Fucosylierung von Glykoproteinen. Es wird spekuliert, dass Mutationen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gens (CFTR) einen abnorm niedrigen pH im Golgi-Apparat bedingen, der die Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen verändert (Brockhausen et al., 1998). Verschiedene Studien ergaben eine verminderte Sialyltransferaseaktivität und gesteigerte die Aktivitäten der Gal-, Fuc-, Man- und Sulfotferasen. Diese Störungen könnten pathophysiologisch im Zusammenhang mit einer vermehrten Empfindlichkeit für bakterielle Infektionen stehen (Brockhausen et al., 1998).

1.4.5.2 Galaktosämie

Die "klassische" Galaktosämie ist eine schwere Stoffwechselerkrankung mit einer Inzidenz von 1 : 60 000 (Chen, 2000). Ursächlich ist ein Defekt der Galaktose-1-phosphat-uridyl-transferase, der in einem intrazellulären Aufstau von Galaktose-1-phosphat und Galactitol resultiert. Die Akkumulation soll über die Hemmung mehrerer Enzyme Organschäden verursachen. Betroffen sind v.a. Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphatase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Löffler, 1990). Durch bislang ungeklärte Mechanismen kommt es auch zu Störungen der Glykosylierung. V.a. ist der Gehalt an Galaktose und NANA in Glykoproteinen und Glykolipiden vermindert (Jaeken und Carchon, 1993; Petry et al., 1998; Charlwood et al., 1998). Äquivalent zu den CDG finden sich vermehrt hyposialylierte Transferrinisoformen in der IEF (Jaeken et al., 1992). Als mögliche Ursachen werden eine verminderte Verfügbarkeit von UDP-Galaktose oder ein inhibitorischer Effekt auf die Galaktosyltransferase diskutiert (Charlwood et al., 1998). Eine Inhibition von Schlüsselenzymen der Glykosylierung (Sialyl- und Galaktosyltransferase) konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden (Stibler et al., 1997). Therapeutisch ist eine galaktosefreie Diät lebensnotwendig. Darunter kommt es zu einer Remission der Hypoglykosylierung (Winchester et al., 1995). Ohne Diät präsentiert sich ein letales Krankheitsbild mit Ikterus, Hepatomegalie, Hypoglykämie, Gedeihstörung, Entwicklungsretardierung, Lethargie und epileptischen Anfällen (Chen, 2000).

1.4.5.3 Hereditäre Fructose Intoleranz (HFI)

Ein Defekt der Fructose-1-phosphat Aldolase B verursacht die hereditäre Fructose Intoleranz. Die intrazelluläre Akkumulation des Fructose-1-phosphat nach Ingestion von Fructose oder Sucrose führt v.a. zur toxischen Schädigung von Leber, Nieren und Dünndarmmucosa, die die Aldolase B exprimieren (Ali et al., 1998). Erste Symptome treten erst nach Umstellung von Muttermilch auf fructosehaltige Nahrung auf. Charakteristisch sind Übelkeit, Erbrechen und

eine metabolische Acidose. Akut kann sich eine schwere Hypoglykämie durch Hemmung der Glycogenolyse und Gluconeogenese entwickeln. Bei Aufnahme größerer Mengen des Zuckers können Krampfanfälle bis hin zum Koma auftreten. Wird eine Fructose-arme Diät nicht eingehalten kann die Erkrankung infolge von irreversiblen Organschädigungen, v.a. der Leber, zum Tod des Patienten führen (Ali et al., 1998). Durch isoelektrische Fokussierung läßt sich auch bei diesem Stoffwechseldefekt, wenn unbehandelt, eine Glykosylierungsstörung anhand einer kathodischen Verschiebung der Transferrinisoformen nachweisen (Adamowicz und Pronicka, 1995). Verantwortlich gemacht wird eine signifikante Inhibition der Phosphomannose Isomerase durch Fructose-1-phosphat (Jaeken et al., 1996).

1.4.5.4 Alkoholabusus

Die Glykosylierung kann auch durch exogene Noxen gestört werden. Täglicher Konsum von 50-80 g Ethanol über mindestens eine Woche führt bereits zu einer signifikanten Hypoglykosylierung (Stibler, 1991). Diese läßt sich v.a. in der IEF von Transferrin und α 1-Antitrypsin darstellen. Eine Hypoglykosylierung weiterer Proteine konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Neuere Publikationen beschreiben das Fehlen kompletter Kohlenhydratseitenketten wie bei CDG-Ia (Landberg et al., 1995; Henry et al., 1999; Bergen et al., 2001). Glykosylierte Konsensusstellen tragen normale Oligosaccharide ($\text{Sia}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$). Inwieweit auch verkürzte Strukturen mit fehlendem terminalen Trisacchariden, wie früher beschrieben (Stibler und Borg, 1986), auftreten ist unklar. Die toxische Wirkung des Ethanols auf die Glykosylierung wird v.a. auf den Metaboliten Acetaldehyd zurückgeführt. Dieser modifiziert die Proteinstruktur durch Bildung von Schiff'schen Basen mit Lysin und könnte so die Funktion oder Glykosylierung von Proteinen über Änderungen der Konformation oder Struktur der Moleküle behindern (Stibler und Borg, 1991). Untersuchungen an Ratten und humanen Proben zeigten sowohl verminderte Mengen an Dolichol und

Dolicholphosphat als auch reduzierte Aktivitäten diverser Glykosyltransferasen (Stibler, 1991; Cottalasso et al., 1996). Die Hypoglykosylierung ist temporär und kann im Verlauf durch die prozentuale Bestimmung des Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT) beobachtet werden. Die Halbwertszeit des CDT wurde mit 10 -14 Tagen bestimmt (Stibler und Borg, 1991) während die von normalem Transferrin 8-10 Tage beträgt (Jeppsson et al, 1993). Die Höhe des CDT Wertes korreliert mit der Gesamtmenge des konsumierten Alkohols und dem Blutalkoholspiegel. Die komplexen Wirkungen des Ethanols und seiner Metabolite bleiben unklar. Jedoch führen sie als Ausdruck des Mißbrauchs zu einer Summe pathobiochemischer Befunde mit deutlichen Auswirkungen auf den Organismus. Besonders schwerwiegend führt sie, bei mütterlichem Abusus, zum fetalen Alkoholsyndrom, dessen klinische Ausprägung Parallelen zu den CDG aufweist. Eine Hypoglykosylierung als mögliche pathobiochemische Ursache wird in der Literatur allerdings nicht erwähnt. Vermutlich besteht ein Zusammenhang mit erhöhten Acetaldehydspiegeln im Serum von Alkoholikerinnen (Hard et al., 2001). Charakteristischerweise zeigen sich eine psychomotorische Retardierung mit variablem Schweregrad, faciale Dysmorphien mit betont schmaler Oberlippe und kardiale Defekte (Stoll und Kliegmann, 2000).

2. Zielsetzung

Vor der Erstbeschreibung der Phosphomannomutase (PMM2) Defizienz als Ursache des CDGS Typ I (heute CDG-Ia) wurden Patienten anhand des charakteristischen Bandenmusters in der isoelektrischen Fokussierung diagnostiziert. Frühzeitig viel auf, dass eine große Bandbreite in der klinischen Ausprägung bestand. Auch fanden sich weitere atypische Bandenmuster, die anderen Typen zugeordnet wurden. Man schrieb dies zunächst einer großen Heterogenität der Erkrankung zu. Dass sich dahinter unterschiedliche Defekte verbargen, zeigte sich erst nach der Entdeckung der PMM Defizienz. Ca. 20 Prozent der untersuchten Patienten wiesen diesen Defekt nicht auf. Es war daher evident, dass weitere Enzymdefekte existieren mußten, die das komplette Fehlen der Oligosaccharidseitenketten bedingen.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse der in der Fokussierung als CDG Typ I charakterisierten Proben hinsichtlich des zugrundeliegenden Defekts auf enzymatischer Ebene. Neben der Diagnose einer PMM Defizienz bei einigen Patienten, wird die erfolgreiche Aufklärung eines neuen Enzymdefektes an einem Indexfall beschrieben.

Die PMM Defizienz und vermutlich auch andere Störungen des Mannosestoffwechsels resultieren in einem Substratmangel (GDP-Mannose) für die lipidgebundene Oligosaccharidsynthese. Die Substitution eines Zwischenproduktes bzw. von Substraten zur Steigerung der Umsatzrate alternativer Stoffwechselwege zur Synthese von GDP-Mannose könnten Therapieansätze darstellen. Am Beispiel des Indexpatienten wird gezeigt, wie die diätetische Substitution eines einfachen Monosaccharids in einer Besserung der klinischen Symptome sowie in einer Normalisierung der biochemischen Befunde resultiert.

Nicht nur primäre Defekte der N-Glykosylierung verursachen Alterationen in der isoelektrischen Fokussierung. Stoffwechselerkrankungen wie Galaktosämie und hereditäre Fructoseintoleranz aber auch exogene Toxine wie Alkohol bedingen aufgrund direkter und von Metaboliten vermittelter

indirekter inhibitorische Wirkungen sekundäre Störungen der kotranslationalen Glykosylierung von Proteinen. Ein Vergleich unterschiedlicher Erkrankungen mittels elektrophoretischer Methoden soll diagnostische Probleme und Grenzen aufzeigen und die Notwendigkeit einer kritischen Interpretation der Befunde betonen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Zubehör

Geräte / Zubehör	Hersteller / Vertrieb
Ausschwingrotor A-12-11	Eppendorf
Feinwaage AE 160 (μg)	Mettler
Feinwaage research (μg)	Sartorius
Geltrockner	Eigenbau nach Prof. Dr. A. Hasilik, Marburg
Glaspipetten 5, 10 und 20 ml	Greiner Labortechnik
Heizplatte IKAMAG RCT Heizplatte + Magnetrührer IKAMAG RET	IKAMAG
Micro Ultrasonic Cell Disruptor	Kontes
Mighty Small II plus Zubehör	Bio-rad
Mixer 5432	Eppendorf
Mixing Rotor Variospeed	Renner GmbH
PHAST System plus Zubehör	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
pH-Meter 761 calimatic	Knick
Pipetten 0,5-10 , 10-100, 250 und 1000 μl	Eppendorf
Pipettman 2-20, 10-100, 10-200, 100-1000 und -5000 μl	Gilson (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster)
Rotor 1412 und 4410	Hettich
Rotor F-45-24-11	Eppendorf
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKAMAG
Powersupply 2197	LKB Bromma
Spektrophotometer 933 Double Beam UV/VIS	UVIKON
Thermostat 5320 für Wasserbäder	Eppendorf
Vortex Typ RFAX 1DR	Heidolph

Waagen (mg): PE 3600 und P 1210	Mettler
Zentrifugen Rotanta / TR und Universal 30 RF	Hettich
Zentrifugen 5214 und 5214 R	Eppendorf

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller / Vertrieb
Celophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein-Wehen
Einmalküvetten	Saarstedt
Falcon Tubes, 15 und 50 ml	Greiner Labortechnik
Gel-Fix for Agarose (265 * 125 mm)	Serva
GELoader Tips Pipettenspitzen	Eppendorf
Kimwipes Lite	Kimberly-Clark
Kleenex	Kimberly-Clark
Laborhandschuhe Satin Plus Powder free	SafeSkin
Gel Blotting Papier GB 002, GB 003	Schleicher und Schüll
Parafilm	American National Can, Menasha, Wi., USA
Pasteurpipetten, 150 und 230 mm	Brand
Safe-Lock, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Rundfilter 602 EH, Ø 185 mm	Schleicher und Schüll
TIPAC blue und yellow Pipettenspitzen	Gilson
Wägebapier MN 226	Machery-Nagel
Wiegeschalen	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.1.3 Probenmaterial

3.1.3.1 Patienten

Vollblut, Serum und Fibroblasten stammten aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde der Universitätsklinik Münster, aus externen pädiatrischen Abteilungen und von niedergelassenen Ärzten. Serumproben von Alkoholikern wurden von der Abteilung für Innere Medizin des St. Elisabeth-Hospitals in Bochum zur Verfügung gestellt.

Leukozyten wurden direkt nach Erhalt aus EDTA-Blut präpariert und gemeinsam mit den Serumproben bei -80 °C tiefgefroren. Nicht-in-Kulturbefindliche Fibroblasten wurden in flüssigem Stickstoff bzw. bei -80 °C gelagert.

Bei einigen Patienten bestand bereits im Vorfeld -mittels IEF- die Verdachtsdiagnose CDG Typ I. Klinisch präsentierte sich ein heterogenes Symptomenspektrum, das von einer isolierten Gerinnungsstörung bis hin zu schwerster psychomotorischer Retardierung und Multiorganbeteiligung reichte. Soweit verfügbar, wurde ebenfalls Probenmaterial von den Eltern und Geschwistern der Patienten untersucht.

Eine Besonderheit stellte der Indexpatient M.C. dar, der anhand eines CDG I Musters in der IEF trotz fehlender neurologischer Beteiligung dem damaligen CDGS Typ I, heute Ia, als atypischer Fall zugeordnet wurde. Serum und Leukozyten der Eltern und des Bruders konnten ebenfalls asserviert werden.

Die Diagnosen der Patienten mit Glaktosämie, Fructosämie, Lebererkrankungen und Alkoholabusus waren im Vorfeld bekannt.

3.1.3.2 Kontrollen

Serum und Leukozyten wurden vom Autor und weiteren Mitarbeitern zur Verfügung gestellt. Fibroblasten stammten von Patienten mit Grunderkrankungen, die nicht zur Beeinträchtigung der Glykosylierung führen.

3.1.4 Chemikalien

Substanz	Hersteller / Vertrieb
α -D(+)-Glucose	Sigma
Acrylamid	Sigma
Agarose IEF for isoelectric focussing	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Albumin (human)	Sigma
Ampholine pH 5 - 7	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Ammoniumpersulfat	Sigma
Antipain	Sigma
Aqua ad injectabilia	Braun
Aqua bidest.	Waldeck GmbH & Co KG, Münster
Bisacrylamid	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chymostatin	Sigma
Coomassie blau (Brilliant blue R 250)	Serva
Dc-Protein Assay Kit	Bio-rad
Dextran	Sigma
DMSO	Serva
Eisen-(III)-citrat	Sigma
Essigsäure 100%	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol 100%	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
G6PDH	Sigma
Glc-1,6-bisphosphat	Sigma
Glycerol 87%	Merck
Glycin pro analysi	Merck

HCl 1 N	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
HCl 20% (6 N)	Apotheke der WWU Münster
Hepes	Biochrom KG, Berlin
Kaninchen-anti-Transferrin-Antiserum	Dako A/S, Dänemark
KH_2PO_4	Merck
Leupeptin	Sigma
D-Mannose	Karden Biochemicals/ Sigma
Mannose-1-phosphat	Sigma
Mannose-6-phosphat	Sigma
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
MgCl_2 pro analysi	Merck
2-[N-morpholino]ethan Sulfonsäure	Serva
Na_2HPO_4 pro analysi	Merck
NaCl 0.9%	Braun
NADP	Sigma
NaHCO_3 pro analysi	Merck
NaN_3	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
PBS Dulbecco	Biochrom KG, Berlin
Pepstatin	Sigma
Phosphoglucose Isomerase (PGI)	Sigma
Phosphomannose Isomerase (PMI)	Sigma
Protein A Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
SDS (Dodecylsulfat-Natriumsalz) cryst. research	Serva

grade	
Temed (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylene diamine)	Serva
Tris pro analysi	Merck
Triton X-100	Serva
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Zitronensäure anhydrous	Fluka Chemie AG
Zitronensäure Monohydrat	Merck

3.1.5 Häufig verwendete Pufferlösungen

Connie's wash:	Triton X-100	0,05 %
	SDS	0,1 %
	NaCl	0,3 M
	Tris pH 8,6	10 mM
	NaN ₃	0,02 %
Laufpuffer:	Tris	25 mM
	Glycin	0,2 M
	SDS	0,1 %
MNT-Puffer:	2-[N-morpholino]ethan Sulfonsäure	20 mM
	NaCl	100 mM
	Tris	30 mM
	NaN ₃	0,05 %
	pH 7,5, Lagerung bei 4 °C	
Sammelgel-Puffer:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M

SDS-Probenpuffer:	Tris-HCl pH 7,8	30 mM
	SDS	9 %
	Glycerol	15 %
	Bromphenolblau	0,05 %
Trenngel-Puffer:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
Puffer A:	TrisHCl, pH 8,5	0,25 M
Puffer B:	TrisHCl, pH 7,8	0,5 M

3.1.6 Färbelösungen

Coomassie-Lösung:	Methanol	44 %
	Essigsäure	11 %
	Coomassie blue	0.28 g/l
Entfärber (Destain):	Methanol	30 %
	Essigsäure	10 %
IEF-Coomassie-Lösung:	Ethanol	30 %
	Essigsäure	10 %
	Coomassie blue	5 g/l
IEF-Destain:	Ethanol	30 %
	Essigsäure	10 %

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Gelmedien

3.2.1.1 Agarosegele

Für ein 5 x 6,2 cm 1 % Gel mit einem pH-Bereich von 5,0-7,0 wurden 2,2 ml einer Agaroselösung im Wasserbad bei ca. 100 °C hergestellt und nach vollständiger Lösung der Agarose und Abkühlung auf <90 °C mit 110 µl Ampholinen versetzt. Im Anschluss wurde das Gel auf einen vorgeschneidenden Plastikträger gegossen. Art und vollständige Lösung der Agarose sind essentiell, um Unregelmäßigkeiten im Gel, die das Laufverhalten stören, zu minimieren.

3.2.1.2 SDS-Polyacrylamidgele

Nicht-reduzierende 7,5 % SDS-Polyacrylamid Gele wurden im Multicaster des Mighty Small II Elektrophoresesystems präpariert. Für 10 Gele wurde folgende Lösung angesetzt:

Acrylamid	25 ml
(30% w/v Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	
4 x Trenngelpuffer	25 ml
Aqua dest.	50 ml
SDS 20 %	500 µl
APS 10 %	500 µl
Temed	50 µl
	= 101,5 ml

Die Gele wurden bei 4 °C mindestens 2 Stunden polymerisiert und vor dem Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Vor dem Beladen der Gele wurde ein 4%iges Sammelgel mit 10-15 Probenaschen aufgegossen:

Acrylamid (30 % w/v Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	3,35 ml
Sammelgelpuffer	6,25 ml
Aqua dest.	15,125 ml
SDS 20 %	125 µl
APS 10 %	185 µl
Temed	50 µl
	= 25,1 ml

Die Polymerisierung erfolgte bei RT für 15-30 min.

3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

3.2.2.1 Einleitung

Bei diesem Verfahren wandern Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten bis die Nettoladung, die Summe aller positiven und negativen Ladungen, gleich Null ist. Die Oligosaccharidanteile der Glykoproteine enthalten endständig Sialinsäuren (NANA). Diese geladenen Teilchen beeinflussen maßgeblich die Ladung des Proteins und damit das Laufverhalten in der Fokussierung. In der Regel enthalten an Transferrin gebundene Oligosaccharide zwei Sialinsäurereste. Es kommen natürlicherweise aber auch Formen mit drei, einer oder ohne NANA vor. Es finden sich daher in der IEF Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) in einer Normverteilung.

Serumtransferrin besitzt zwei Konsensusstellen für die Glykosylierung und ist somit in der Regel zweifach glykosyliert. Die häufigste Isoform ist, einfach verzweigte Oligosaccharide vorrausgesetzt, das Tetrasialo-Transferrin. Störungen der Glykosylierung mit Änderungen des Gehalts an NANAs führen zu einer Alteration im Bandenmuster, die für die Diagnostik genutzt werden kann. Dabei ist es unerheblich, ob nur die Sialinsäurereste oder das gesamte Oligosaccharid fehlen. Weitere Aussagen bezüglich der Struktur der Zuckerseitenkette sind daher nicht möglich.

3.2.2.2 Probenaufbereitung

Serum	6,5 μ l
NaCl 0,9 %	26,4 μ l
Eisen (III)-citrat	1 μ l

Die vollständige Sättigung des Transferrins mit Eisen schafft in der Fokussierung einen besseren Kontrast.

Nach 5-10 min Inkubation wurden die Proben gemischt und 1 μ l NaHCO_3 , pH 8,0 zugegeben.

3.2.2.3 Fokussierung

Die Fokussierung erfolgte im PHAST System von Pharmacia (van Schaftingen et al., 1995). Um eine gleichmäßige Kühlung zu gewährleisten, wurden vor dem Einsetzen der Gele unter jedes Gel zwei Tropfen Aqua dest. plaziert. In die mit Parafilm ausgekleideten Kammern der Ladehilfe wurden 2,5 μ l je Probe pipettiert (max. 8 Proben). Im Anschluss wurde mit sanftem Druck der Probenkamm aufgesetzt und dieser in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

<u>Laufbedingungen:</u>	1. 300 V, 2 mA, 0,5 W, 10 °C => 40 AVh
	2. 100 V, 1 mA, 0,5 W, 10 °C => 10 AVh
	3. 200 V, 2 mA, 1 W, 10 °C => 65 AVh

Nach Ende der Fokussierung wurden auf jedes Gel 80 μ l Transferrin-Antikörper pipettiert und mit einer gebogenen Pasteurpipette ausgestrichen. Dadurch werden die Transferrinisoformen direkt im Gel präzipitiert (Niehues et al., 1998). Nach 15 min Inkubationszeit wurden die übrigen Proteine mit 0,9 %igem NaCl über 3-12 h ausgewaschen.

3.2.2.4 Fehlerquellen

- Ungleiche Probenmengen auf dem Probenkamm können neben der

natürlichen Varianz im Proteingehalt der verwendeten Sera die quantitative Interpretation stören.

- Unregelmäßige Geldicke, -oberfläche und -struktur, ungleichmäßige Kühlung und Kondensflüssigkeit auf der Geloberfläche können die Laufbedingungen in Teilen des Gels verändern und zu Verzerrungen führen.
- Durch Verzögerungen bei der Antikörperauftragung entsteht ein schlechter Kontrast durch Diffusion des Transferrins.
- Färbeunregelmäßigkeiten können infolge unvollständiger Trocknung der Gele auftreten.

3.2.3 Immunpräzipitation

3.2.3.1 Reagenzien

Protein A Sepharose	10 % w/v in MNT Puffer, 0,02 % NaN_3
Proteaseinhibitoren	je 10 mg/ml Chymostatin, Leupeptin, Antipain und Pepstatin (CLAP) in DMSO
Puffer	1. MNT Puffer, 2. MNT Puffer (+ 1g/l Albumin, 1 mM Fe-III-Cl_2), 3. Connie's wash
Transferrin Antikörper	1:3 Verdünnung mit Aqua dest.

3.2.3.2 Präzipitation

Bei einem durchschnittlichen Serumgehalt an Transferrin von 2,0-3,6 g/l werden ausreichende Mengen für die weitere Bearbeitung bei Einsatz von 5 μl Serum präzipitiert.

- Alle Ansätze enthielten 1 ml MNT Puffer (+ 1g/l Albumin, 1 mM Fe-III-Cl_2), 70 μl Protein A Sepharose, 2 μl CLAP und Serum.
- Die Inkubation erfolgte auf einem Drehrad bei 4 °C über 3-12 h.
- Im Anschluss wurden die Proben bei 3000 Upm für 3 min zentrifugiert.
- Nach Abziehen des Überstandes wurden die Pellets einmal mit 1 ml

Connie's wash und anschließend zweimal mit 1 ml MNT Puffer gewaschen.

- Die Pellets wurden in 30 µl Proben-Puffer resuspendiert.
- Nach Inkubation bei 95 °C für 5 min und Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 min wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3 Fehlerdiskussion

Die Methode beinhaltet zwei potentielle Fehlerquellen:

- Einsatz ungleicher Volumina an Protein A Sepharose durch Pipettierfehler. Zur Vermeidung sollten die Pipettenspitzen mittels einer Rasierklinge abgeschnitten werden, um ein Verstopfen durch Sepharose beim Ansaugen zu vermeiden. Die Volumina in den Reaktionsgefäßen sollten sich gleichen.
- Beim Abziehen der Überstände während des Waschvorgangs können Sepharoseteilchen verloren gehen. Hierdurch können deutliche Mengenunterschiede nach elektrophoretischer Auftrennung auftreten. Daher sollte der Überstand erst vor Zugabe des Proben-Puffers mit einer gelben Pipettenspitze vollständig abgezogen werden.

3.2.4 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.4.1 Einleitung

Proteine werden bei dieser Methode nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von ihrer Eigenladung aufgetrennt. Durch Wahl eines geeigneten prozentualen Acrylamidanteils im Gel können Unterschiede im Molekulargewicht von 2 kDa gut dargestellt werden (Marquardt et al., 1992). Dies entspricht rechnerisch dem Gewicht eines Oligosaccharids. Strukturelle Alterationen der Zuckerseitenketten können somit zur Darstellung gelangen.

3.2.5.2 Polyacrylamidgele

Grundlage der Färbung ist ebenfalls die Bindung des Farbstoffes Coomassie blue an Proteine.

- Die Gele wurden in Coomassie-Lösung für ca. 1/2 h gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mit Destain aus der Gelmatrix entfernt.
- Zum Trocknen wurden die Gele zwischen zwei Lagen feuchter Cellophanfolie auf einem Rahmen aufgespannt. Dauer ca. 3 d.

3.2.6 Leukozytenisolierung

3.2.6.1 Reagenzien

Lösung 1:	Glucose	2,45 g
	Natriumcitrat (Natriumcitrat * 2 H ₂ O)	2,2 g (2,61g)
	Zitronensäure (Zitronensäure * H ₂ O)	0,73 g (0,8 g)
	Natriumchlorid	0,9 g
	in 100 ml Aqua dest.	
Lösung 2:	Dextran in NaCl 0,9 %	6 %
Lösung 3:	Glucose in NaCl 0,9 %	5 %

3.2.6.2 Leukozytenisolierung

Kontroll- und Patientenleukozyten wurden ausnahmslos aus EDTA-Blut isoliert. Das Material wurde innerhalb von maximal 48 h bearbeitet. Die Trennung von den Erythrozyten erfolgte entlang eines Dichtegradienten.

- Das Lösungsgemisch im Verhältnis 1.5 : 5 : 3.5 wurde in einem langen stumpfen Glasröhrchen vorgelegt. EDTA-Blut wurde behutsam zugegeben, mit der Lösung vermischt und bei Raumtemperatur stehengelassen bis sich die Erythrozyten abgesetzt hatten (Dauer ca. 60 min).

- Der Überstand wurde in ein konisch zulaufendes Reagenzglas überführt und bei 4 °C und 2000 Upm (Hettich Rotanta/TR) für 15 min zentrifugiert.
- Sichtbar verbleibende Erythrozyten wurden mittels osmotischer Lyse in 0,225 %igem NaCl über ca. eine min entfernt. Durch ihre größere osmotische Resistenz bleiben die Leukozyten intakt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 1250 Upm für 5 min (Hettich Rotanta/TR).
- Das Erythrozytenfreie Pellet wurde in 1 ml NaCl 0,9 % aufgenommen und in einem Mikroliterreaktionsgefäß bei 250 * g für 10 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge 5241). Nach Abziehen des Überstandes wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Zellyse

Nach Zusatz von 200 µl NaCl 0,9 % wurden die Zellen mittels Ultraschall lysiert.

Die Lysate wurden in einer Hettich Universal 30 RF Zentrifuge bei 10 000 * g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in Mikroliterreaktionsgefäße überführt und unmittelbar auf Eis weiterverarbeitet.

3.2.8 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach einer Modifikation der Methode nach Lowry et al. (1951) mittels des Dc-Kits der Firma Biorad. Als Standard diente Rinderalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0,2, 0,4 und 0,8 µg/µl.

Aufgrund des höheren Proteingehaltes in den verwendeten Zellysaten wurden diese vorab 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Zu je 20 µl Aqua dest., als Leerwert, den BSA Standards und den Proben wurden 100 µl Reagenz A und 800 µl Reagenz B zugegeben. Nach kurzem Schütteln und 15 min Inkubation wurde die Absorption bei 750 nm gegen den Leerwert gemessen.

3.2.9 Aktivitätsbestimmung der Phosphomannomutase (PMM)

3.2.9.1 Einleitung

Die Phosphomannomutase katalysiert die reversible Umwandlung von Mannose-6-phosphat zu Mannose-1-phosphat. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt durch einen kolorimetrischen enzymatischen Assay, der auf einem Konzentrationsanstieg von NADPH basiert. Hierbei macht man sich den Stoffwechselweg der Mannose retrograd zunutze. Der durch die Phosphomannomutase (PMM) katalysierte Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend, da weder Konzentration noch Aktivität bekannt sind. Durch Zugabe eines Überschusses der übrigen Enzyme (PMI, PGI, G6PDH) wird entstehendes Mannose-6-phosphat vollständig zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt. Dabei ist die durch die G6PDH katalysierte Dehydrierung irreversibel. Als Akzeptor der Reduktionsäquivalente dient NADP. Die Geschwindigkeit des Absorptionsanstiegs und damit der Bildung von NADPH ist dabei im linearen Bereich des Assays der eingesetzten Menge an PMM direkt proportional.

3.2.9.2 PMM Assay

Der hier beschriebene Assay stellt eine geringfügige Modifikation der ursprünglichen Methode nach van Schaftingen et al. (1995) dar (Alton et al. 1997). Als Kofaktor dient statt des aufwendig zu synthetisierenden Mannose-1,6-bisphosphats (Man-1,6-P₂) das kommerziell erhältliche Glucose-1,6-bisphosphat (Glc-1,6-P₂), welches eine vernachlässigbar geringere Affinität zur PMM besitzt als Man-1,6-P₂. Als Substrat wird Mannose-1-phosphat (Man-1-P) im Überschuss zugesetzt.

Jeder Ansatz wurde doppelt, mit und ohne Zusatz von Substrat, angesetzt. Bei Einsatz von 200-400 µg/µl Protein im Ansatz findet sich ein signifikanter linearer Aktivitätsanstieg, so dass Verdünnungs- und Pipettierfehler

vernachlässigbar sind und Ungenauigkeiten durch niedrige Zahlengrößen bei der rechnerischen Auswertung weitestgehend entfallen.

Endvolumen jedes Ansatzes war 1 ml (50 mM Hepes pH 7,1, 6 mM MgCl₂, 1 μM Glc-1,6-P₂, 250 μM NADP und je 250 mU PGI, PMI und G6PDH). Folgende Volumina der Stammlösungen wurden eingesetzt:

1M	Hepes, pH 7,1	50 μl
0,6 M	MgCl ₂	10 μl
100 μM	Glc-1,6-P ₂	10 μl
25 mM	NADP	10 μl
100 mU/μl	PGI	2,5 μl
100 mU/μl	PMI	2,5 μl
100 mU/μl	G6PDH	2,5 μl
		= 87,5 μl

Je 100 U der Enzyme wurden bei 10000 * g und 4 °C für 10 min zentrifugiert um Ammoniumsulfat, das sich störend auf den Assay auswirken kann, aus der Ausgangslösung zu entfernen. Das Pellet wurde als Stammlösung in 1 ml einer 25 mM TrisHCl Pufferlösung (950 μl H₂O mit 50 μl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,8) aufgenommen.

Das Substrat Mannose-1-phosphat wurde in einer 1 mM Endkonzentration zugegeben, entsprechend 10 μl einer 100 mM Lösung.

Die spektrophotometrische Messung erfolgte in genormten Einmalküvetten bei einer Wellenlänge von 340 nm in acht 15-minütigen Intervallen gegen Aqua dest.

3.2.9.3 Fehlerdiskussion

- Um Volumenfehlern vorzubeugen, empfiehlt es sich vorab eine Stammlösung herzustellen.
- Hohe Probenzahlen können durch verzögerte Bearbeitung und Messung zu Ungenauigkeiten durch den entstehenden Zeitversatz führen.
- Chargen einzelner Substanzen, z.B. der Enzyme, können Verunreinigungen enthalten, die zu einer Degradierung des NADPH und

damit zu falschen Messergebnissen führen. Besteht der Verdacht, müssen alle Substanzen in dem Assay entsprechender Konzentration nach Zusatz von NADPH überprüft werden.

- Erfahrungen bezüglich eines bei längerer Lagerung eintretenden Aktivitätsverlustes der Enzyme liegen nicht vor.

3.2.10 Aktivitätsmessung der Phosphomannose Isomerase (PMI)

3.2.10.1 Einleitung

Die Phosphomannose Isomerase katalysiert die Umwandlung von Fructose-6-phosphat zu Mannose-6-phosphat. Analog dem Phosphomannomutase Assay basiert dieser Assay auf der Reversibilität der enzymkatalysierten Schritte des Mannosestoffwechsels und der irreversiblen Oxidation von Glc-6-P mit NADP als Kofaktor (s.o.).

3.2.10.2 PMI Assay

Der Assay wurde entsprechend einer Modifikation der Methode nach van Schaftingen et al. (1995) durchgeführt (Alton et al. 1997). Für jede Probe wurde je ein Ansatz mit und einer ohne 1 mM Substrat (Mannose-6-phosphat) angesetzt. In einem Gesamtvolumen von 1 ml waren 40 mM Tris-HCl (pH 7,4), 6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄, 1 mM NADP, 1U PGI und 2U G6PDH enthalten. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Enzyme und des NADP im Vergleich zum PMM-Assay begründen sich durch die im Vergleich zur PMM ca. 10fach höhere Aktivität der PMI. Einen linearen Anstieg der NADPH Konzentration über 120 min beobachtet man bei Einsatz von ca. 40 µg Protein.

Folgende Volumina der Stammlösungen wurden eingesetzt:

1 M	TrisHCl, pH 7,4	40 μ l
0.6 M	MgCl ₂	10 μ l
500 mM	Na ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄ , pH 7,5	10 μ l
100 mM	NADP	10 μ l
200 U/ml	PGI	5 μ l
400 U/ml	G6PDH	5 μ l
		= 80 μ l

Die Stammlösungen der Enzyme enthielten 25 mM Tris-HCl, pH 7,8. Nach Zugabe des Substrats wurde die Absorption spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm in acht 15-min Intervallen gegen Aqua dest. gemessen. Fehlerquellen sind dem Phosphomannomutase Assay analog.

3.2.11 Aktivitätsbestimmung der Hexokinase (HK)

Der Hexokinase Assay leitet sich vom PMM Assay ab und unterscheidet sich im wesentlichen nur durch den Zusatz von ATP und Mannose als Substrat.

Jede Probe wurde mit und ohne Zugabe von Substrat angesetzt. Je 1 ml Endvolumen enthielt 50 mM Hepes pH 7,1, 6 mM MgCl₂, 2,5 mM NADP, 10 mM ATP und je 250 mU PGI, PMI und G6PDH.

Die Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

1 M	Hepes, pH 7,1	50 μ l
0,6 M	MgCl ₂	10 μ l
25 mM	NADP	100 μ l
100 mM	ATP	100 μ l
100 mU/ μ l	PGI	2,5 μ l
100 mU/ μ l	PMI	2,5 μ l
100 mU/ μ l	G6PDH	2,5 μ l
		= 267,5 μ l

Es wurden je 10 μ g zelluläres Protein eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l 500 mM Mannose gestartet. Analog zu den anderen Enzymassays wurde der Umsatz von NADP spektrophotometrisch bei 340 nm in acht 15-minütigen Intervallen gemessen.

3.2.12 Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucose Isomerase (PGI)

Der PGI Assay wurde dem PMI Assay entlehnt. Als Substrat diente 1 mM Fru-6-P. Eingesetzt wurden 40 µg zelluläres Protein. Die Messung der Aktivität erfolgte wie für die übrigen Enzymassays beschrieben.

3.2.13 Bestimmung der Serummannosekonzentration

3.2.13.1 Einleitung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der von Etchison und Freeze 1997 beschriebenen enzymatischen Methode, die sich wie die vorbeschriebenen Enzymaktivitätsbestimmungen am Mannosestoffwechsel orientiert. Nach Zusatz von Glucokinase zur Serumprobe werden Glucose als 6-Phosphat und andere geladene Strukturen mittels eines Anionenaustauschers (DE-53) quantitativ aus dem Ansatz entfernt. Durch Zusatz einer unspezifischen Hexokinase wird freie Mannose vollständig in das zugehörige 6-Phosphat umgewandelt und, da die Reaktion der G6PDH irreversibel ist, über die beschriebene Enzymkaskade vollständig zu 6-Phosphogluconolakton umgesetzt. Die Konzentration der Mannose ist der Konzentration des entstehenden NADPH direkt proportional.

3.2.13.2 Vorbereitung des Anionenaustauschers DE-53

- Ca. 50 g DE-53 wurden dreimal in 300-400 ml Aqua dest. resuspendiert und der Überstand nach je 1 h abgegossen.
- Anschließend wurde das DE-53 in 200-300 ml 0,25 M Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und über eine Glasfritte einmal mit 100-200 ml 0,25 M Tris-HCl, pH 8,5 und dreimal mit 100-200 ml Aqua dest. ohne Einsatz von Vakuum gewaschen.
- Der Anionenaustauscher wurde in einem möglichst geringem Volumen Aqua dest. aufgenommen.

- Sobald sich das DE-53 vollständig abgesetzt hatte, wurde das überstehende Volumen auf ca. 1/3 des Gesamtvolumens ausgeglichen.
- Zur Konservierung wurden 50 µl 1M NaN₃ zugegeben.
- Bei häufigem Gebrauch wurde das DE-53 bei RT, ansonsten bei 4 °C gelagert.

3.2.13.3 Präparation der Säulen

- Nach Resuspension wurden je 600 µl des DE-53 in Mikrolitersäulen gefüllt. Die Filter wurden im Ausschwingrotor (Eppendorfzentrifuge 5417) bei 2100 Upm für 2 min zentrifugiert.
- Im Anschluss wurde das DE-53 zweimal mit 200 µl Aqua dest. gespült und zentrifugiert (s.o.). Die Effluente wurden verworfen.

3.2.13.4 Stammlösungen

Reagenz A:	100 mM ATP, pH 6,5	1 ml
	100 mM NADP, pH 6,5	1 ml
	1 M MgCl ₂	100 µl
	H ₂ O	400 µl
	Puffer A	2 ml
	Glucokinase 500 U/ml	25 µl
	G6PDH 100 U/ml	250 µl
		= 4,8 ml

Reagenz B:	100 mM ATP, pH 6,5	167,5 µl
	100 mM NADP, pH 6,5	167,5 µl
	1 M MgCl ₂	167,5 µl
	H ₂ O	4,5 ml
	Puffer B	6,5 ml
	HK/G6PDH/PGI	1 ml
	je 50 U/ml	
		= 12,5 ml

Die für 24 Bestimmungen ausreichende Stammlösung wurde immer frisch angesetzt.

3.2.13.5 Quantitative Elimination von Glucose

- Je Probe wurden 100 µl Serum mit 100 µl Aqua dest. und 200 µl Reagenz A in Mikroliterreaktionsgefäßen vermischt und im Wasserbad bei 37 °C für 20 min inkubiert.
- Um Verluste durch Kondensat zu vermeiden, wurde bei 10.000 Upm (Eppendorfcentrifuge 5417) für 20 sec zentrifugiert.
- Die Proben wurden in 200 µl Fraktionen im Ausschwingrotor bei 3400 Upm für 2 min durch den Anionenaustauscher filtriert. Dieser wurde anschließend mit zweimal 200 µl Aqua dest. unter obigen Bedingungen gespült.

3.2.13.6 Bestimmung der Mannosekonzentration

- Je Probe wurden insgesamt 800 µl Effluent in ein Eppendorf Mikrolitergefäß übertragen und mit 500 µl Reagenz B vermischt.
- Die Ansätze wurden halbiert und auf zwei Mikrolitergefäße verteilt.
- Jedem Ansatz wurden 10 µl Aqua dest. bzw. PMI zugegeben.
- Nach 20 min Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurden zunächst die Absorptionen der Proben ohne und sukzessiv mit PMI bei 340 nm gemessen.

3.2.13.7 Berechnung

- $A_{340} \text{ "plus PMI"} - A_{340} \text{ "minus PMI"} = \Delta A_{340}$

$$[\text{Mannose im Serum}] (\mu\text{M}) = \Delta A_{340} * 6,6 / \varepsilon$$

$\varepsilon = 6,2 * 10^{-3}$, der Faktor 6,6 entspricht der Probenverdünnung und beinhaltet einen Korrekturfaktor, der die Basisabsorption im Kontrollansatz berücksichtigt (Etchison und Freeze, 1997).

3.2.13.8 Fehlerdiskussion

- Hämolytische Seren können zu hoher Hintergrundabsorption und damit zu fehlerhaften Werten führen.
- Lipämische Seren können zu falschen Ergebnissen führen bzw. die Säulen verstopfen.
- Möglicherweise ist die Aktivität der GK in der verwendeten Charge zu niedrig. Nach entsprechender Kontrolle muß entweder die Menge erhöht oder eine neue Charge verwendet werden.
- Sind die gemessenen Absorptionen unerklärlich niedrig, liegt eventuell eine Degradation des gebildeten NADPH vor. Zum Ausschluss dieser Problematik muß jedes Einzelreagenz in Puffer B gelöst unter Assaybedingungen mit und ohne Zusatz von kommerziell erhältlichem NADPH (z.B. 50 mM) bei 340 nm überprüft werden.

4. Ergebnisse

4.1 Strukturelle und enzymatische Aspekte des CDG-Ia

4.1.1 Elektrophoretische Charakteristika

Die Diagnostik pathologischer Glykosylierungsmuster beruht primär auf der isoelektrischen Fokussierung von Transferrin. Gesunde Kontrollen weisen ein heterogenes Spektrum an Isoformen unterschiedlicher Gesamtladung auf. Es lassen sich v.a. das vollständig glykosylierte tetrasialo- und geringere Mengen von hexa-, penta-, tri- und disialo-Transferrin darstellen. Asialo-Transferrin kommt nicht in signifikanter Menge vor. Beim CDG-Ia fehlen nachweislich vollständige Oligosaccharidketten. Dadurch reduziert sich der Anteil höhersialylierter Isoformen zugunsten von di- und asialo-Transferrinformen (Abb. 4).

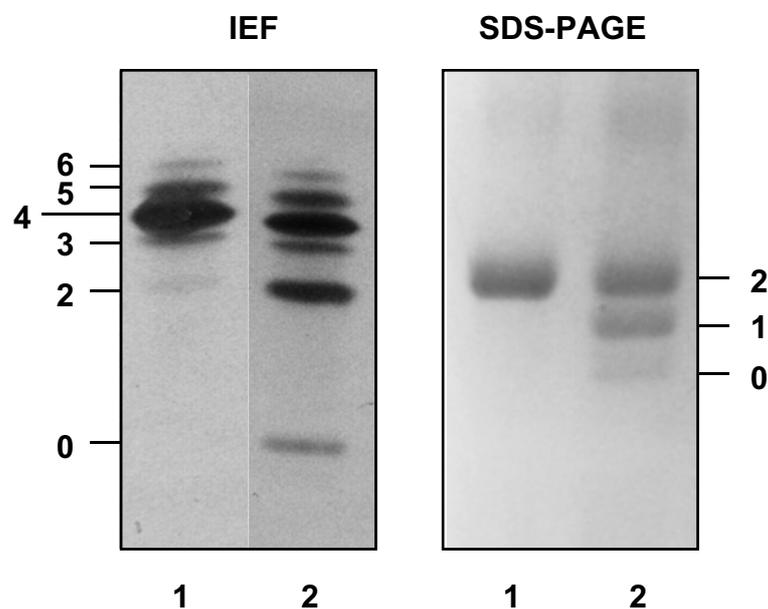


Abb. 4. Elektrophoretische Auftrennung von Transferrinisoformen. Die Auftrennung erfolgte mittels IEF (links) und SDS-PAGE (rechts). Spur 1 Kontrolle, Spur 2 CDG-Ia. Die seitlichen Zahlen beschreiben die Anzahl vorhandener Sialinsäuren (IEF) bzw. Oligosaccharidketten (SDS-PAGE).

Die Auftrennung von Transferrin nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE ergibt normalerweise eine homogene Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 78 kDa. Dagegen treten beim CDG-Ia zwei zusätzliche Banden auf. Diese laufen im elektrischen Feld schneller und unterscheiden sich im Molekulargewicht um ca. 2 kDa, entsprechend jeweils einem Oligosaccharid (Abb. 4). Die Transferrinisoformen tragen zwei, eine bzw. keine komplexen biantennären Zuckerketten.

4.1.2 Enzymaktivität der Phosphomannomutase (PMM)

Zur Sicherung der Diagnose CDG-Ia bedarf es des Nachweises einer deutlich reduzierten Aktivität der Phosphomannomutase. Dieser Befund konnte bei 22 Patienten ($n_{\text{gesamt}} = 35$) erhoben werden. Fibroblasten von drei bekannten CDG-Ia Patienten standen als positiv-Kontrollen zur Verfügung. Der Substratumsatz verläuft bei Einsatz von 200 bis 400 μg Protein über mindestens 120 min linear (Abb. 5). Im Rahmen der Probenvorbereitung entsteht ein geringfügiger Zeitversatz, der einen uniformen Messfehler bedingt. Zum Ausgleich wird für die Berechnung der Aktivität die rechnerisch korrigierte Absorption zum Zeitpunkt 60 min herangezogen, die sich aus der Funktion $f = c \cdot x$ unter Vernachlässigung des Achsenabstandes ergibt.

Die Menge an gebildetem NADPH erhält man über den Absorptionskoeffizienten ϵ . Dieser beträgt für NADPH $6,2 \cdot 10^{-3}$. Mit Hilfe der übrigen Daten kann die spezifische Aktivität als nmol NADPH pro mg Protein und min bzw. als mU/mg Protein errechnet werden. Die Aktivitäten gesunder Kontrollen lagen im Durchschnitt bei 1,87 mU/mg zellulärem Gesamtprotein, die von Patienten mit unklaren Glykosylierungsdefekten mit 2,61 mU/mg etwas höher. CDG Ia Patienten zeigten im Kontrollvergleich im Mittel auf 6 % reduzierte Werte (Tab. 4).

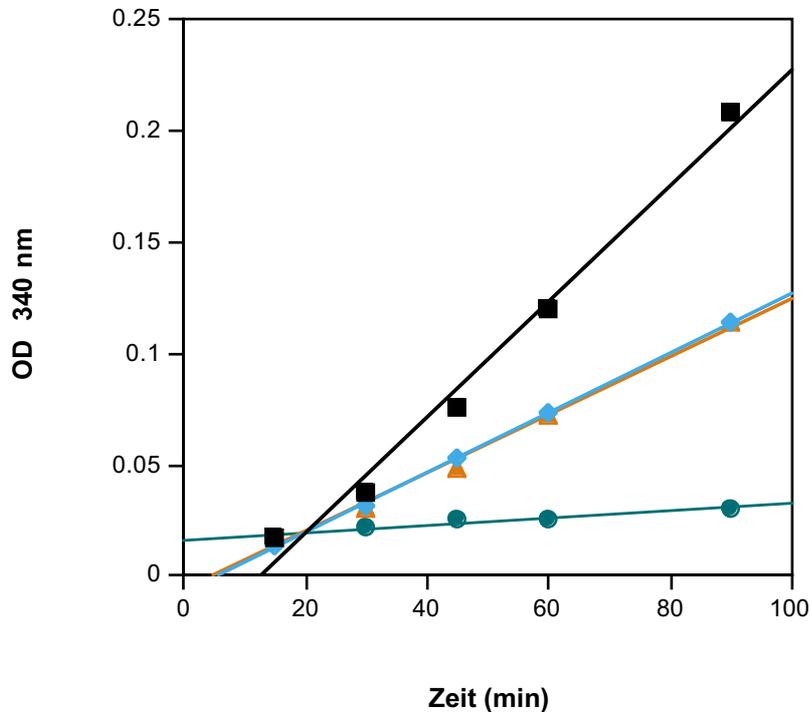


Abb. 5. PMM Assay. Linearer Aktivitätsanstieg der PMM in von Zelllysaten. Es wurden äquivalente Proteinmengen eingesetzt. CDG Typ Ia (●), Eltern (●, ▲), Kontrolle (■).

	Fibroblasten			Leukozyten		
	Bereich (mU/mg)	Mittelwert	%	Bereich (mU/mg)	Mittelwert	%
Kontroller	1,33-6,18 (n = 7)	2,82	100	1,28-2,81 (n = 26)	1,87	100
Eltern CDG Ia				0,19-3,19 (n = 32)	0,96	52
Eltern CDG X				1,34-1,79 (n = 3)	1,5	80,2
Patienten CDG Ia	0,18-0,71 (n = 13)	0,37	13	0-0,28 (n = 22)	0,12	6,6
Patienten CDG X	2,56-5,15 (n = 4)	3,92	139	1,3-8,61 (n = 20)	2,61	139,6

Tab. 4. Aktivitäten der Phosphomannomutase. Die Messungen erfolgten in Fibroblasten und Leukozyten von Kontrollen und Patienten mit elektrophoretisch nachgewiesenen Glykosylierungsdefekten. Die Fallzahl n bezieht sich auf die Gesamtzahl durchgeführter Messungen.

Im intra- und interassay Vergleich lagen die Aktivitäten von CDG-Ia Patienten konstant unter 10 % der Kontrollaktivitäten. In Fibroblasten wurden generell höhere Aktivitäten als in Leukozyten gemessen, ca. 50 % in Kontrollzellen und bis zu 200 % in Patientenzellen.

Im Kontrollvergleich betragen die PMM-Aktivitäten der CDG-Ia Patienten 13 % der normalen Aktivität. Schwankungen der Absorption können allerdings die rechnerische Auswertung des Aktivitätsverlaufs im unteren Messbereich erheblich beeinflussen. Daher waren exakte Vergleichszahlen unter den gegebenen Versuchsbedingungen zum Teil nicht erhebbar. Eltern und Patienten mit unklaren Glykosylierungsdefekten zeigten Werte im Normbereich (Tab. 4).

4.2 Elektrophoretische Untersuchung ungeklärter CDG

Die Verteilungsmuster der Isoformen von Serumtransferrin wichen bei einigen Patienten vom typischen CDG-Ia Muster ab. In der IEF war kein unterschied festzustellen (nicht abgebildet). Dagegen war in der SDS-PAGE im Vergleich zu CDG-Ia praktisch kein vollständig unglykosyliertes Transferrin nachweisbar (Abb. 6).

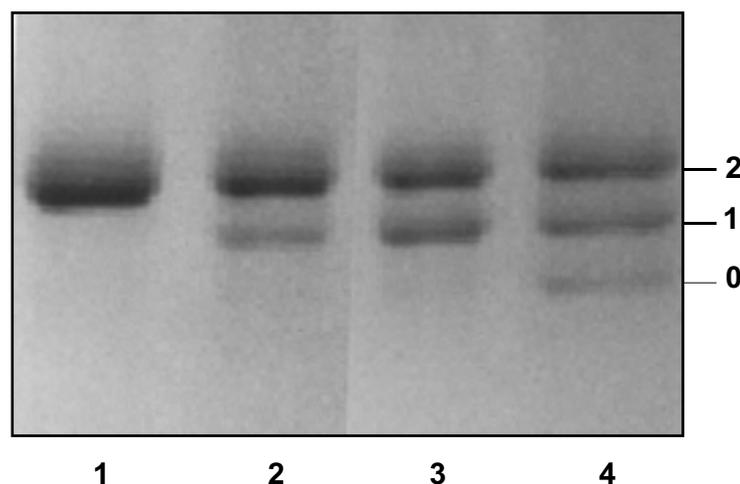


Abb. 6. Verteilungsmuster der Transferrinisoformentypen in der SDS-PAGE bei Patienten mit CDG-Ix. 1 Kontrolle, 2 u. 3 CDG-Ix, 4 CDG-Ia. Die Zahl der Oligosaccharidseitenketten wird durch die seitlichen Zahlen indiziert.

4.3 Zink als Inhibitor der PMM

Im Rahmen der Versuche eine potentielle Therapie für CDG-Ia zu entwickeln wurden zwei verschiedene Ansätze getestet. Zum einen die orale Substitution von Mannose analog zu CDG-Ib (Niehues R., Dissertation, in Vorbereitung), zum anderen die selektive Hemmung der PMI durch Zink. Letzteres unter der Vorstellung, mittels einer Anhäufung von Man-6-P einen vermehrten Umsatz durch die PMM zu erzielen. Tatsächlich konnte im *in vitro* Experiment eine Verminderung der PMI Aktivität um ca. 60 % beobachtet werden. Die maximale Hemmung wurde bei Zinkkonzentrationen von 500 μM erreicht. Bereits ab einer Konzentration von 100 μM zeigte sich eine deutliche Sättigungstendenz (Abb. 6).

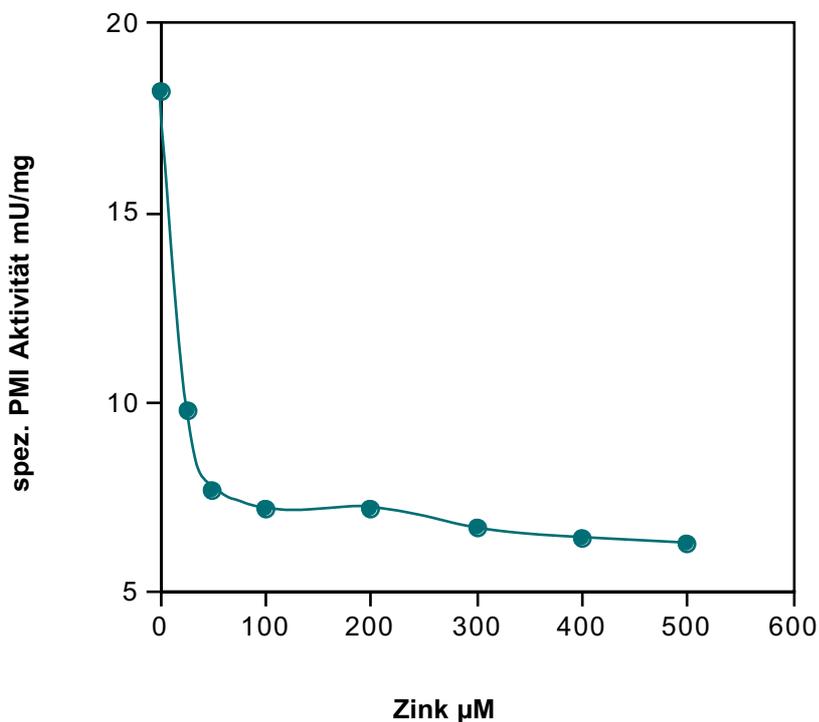


Abb. 6. Abhängigkeit der PMI Aktivität von Zink. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Ansätze mit ca. 40 μg zellulärem Protein wurden mit 25, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 μM Zink versetzt und die OD bei 340 nm über 75 min gemessen.

4.4 Oligosaccharidstrukturen bei sekundären Störungen der Glykosylierung

Einige kongenitale und erworbene Erkrankungen verursachen über sekundäre Mechanismen eine Hypoglykosylierung. Hierunter fallen u.a. die Stoffwechselerkrankungen Galaktosämie und die hereditäre Fructoseintoleranz sowie der Abusus von Alkohol. Um Komplikationen der Diagnostik von CDG aufzuzeigen, wurde die Auswirkung der sekundären Störungen elektrophoretisch mittels IEF und SDS-PAGE mit den für CDG-Ia charakteristischen Bandenmustern verglichen.

Weder eine Leberzirrhose als Spätfolge von Alkoholabusus oder Hepatitis B bzw. C, noch eine extrahepatische Gallengangsatresie, die zum Tode des Patienten führte, ließen in der IEF und SDS-PAGE eine Veränderung der Oligosaccharidstrukturen erkennen (Abb. 7 und 8).

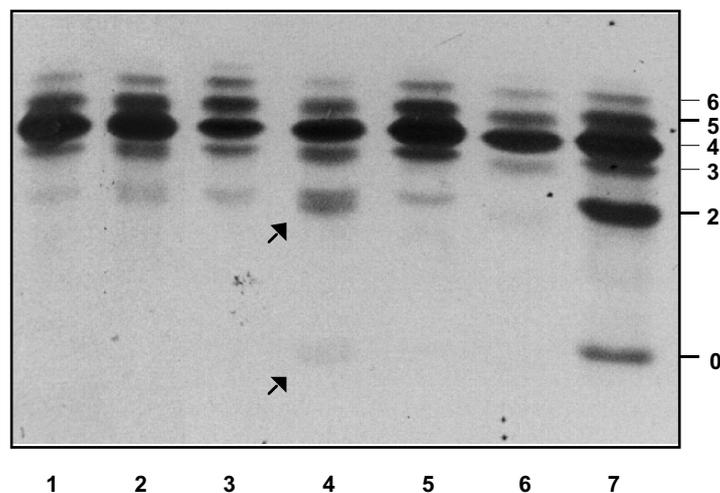


Abb. 7. IEF von Transferrin von Patienten mit Alkoholismus und verschiedenen hepatischen Erkrankungen. 1 Kontrolle, 2 histologisch gesicherte Leberzirrhose nach Alkoholabusus, 3 u. 4 Alkoholabusus, 5 Leberzirrhose bei Hepatitis C, 6 unklarer hepatischer Ikterus, 7 CDG-Ia. Die Pfeile weisen auf atypische Isoformen hin.

Interessanterweise fanden sich hyposialylierte Isoformen zum Teil bei Patienten mit aktuell bestehendem Alkoholabusus sowohl in der IEF als auch in der SDS-PAGE (Abb. 7 u. 8).

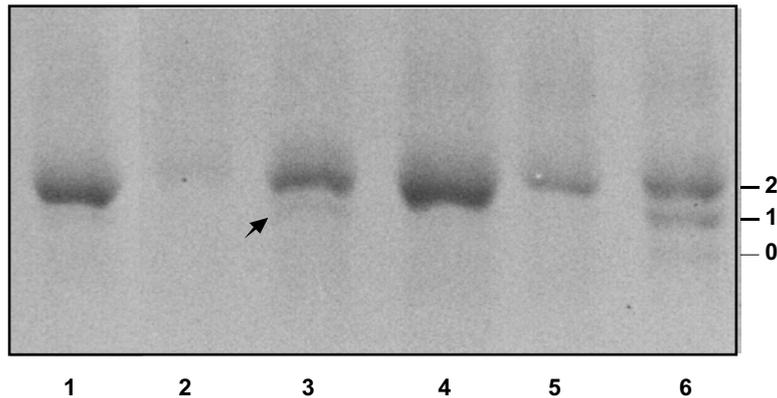


Abb. 8. SDS-Page von Transferrin von Patienten mit Alkoholabusus und verschiedenen hepatischen Erkrankungen. 1 Kontrolle, 2 histologisch gesicherte Leberzirrhose nach Alkoholabusus, 3 u. 4 Alkoholabusus, 5 Leberzirrhose bei Hepatitis C, 6 unklarer hepatischer Ikterus, 7 CDG-Ia. Der Pfeil weist auf eine atypische Isoform hin.

Unbehandelte Galaktosämie präsentierte sich in der IEF ähnlich wie CDG-Ia mit akzentuiertem di- und asialotransferrin. Im Gegensatz zu früheren Befunden (Jaeken et al., 1992) fanden sich die atypischen Isoformen auch bei einigen diätetisch behandelten Patienten. Die Kettenveränderung betrifft vermutlich nur terminale Zuckerreste, da in der SDS-PAGE keine Änderung des Molekulargewichtes zu beobachten war (Abb. 9 u. 10).

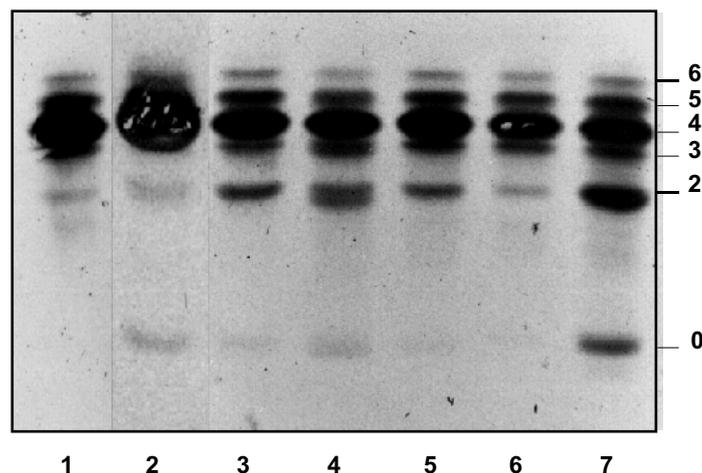


Abb. 9. IEF von Serumtransferrin bei Galaktosämiepatienten. 1 Kontrolle, 2 unbehandelte Galaktosämie, 3-6 behandelte Galaktosämie, 7 CDG-Ia. Die Zahlen am rechten Rand beziffern die Anzahl terminaler Sialinsäuren der Oligosaccharidketten.

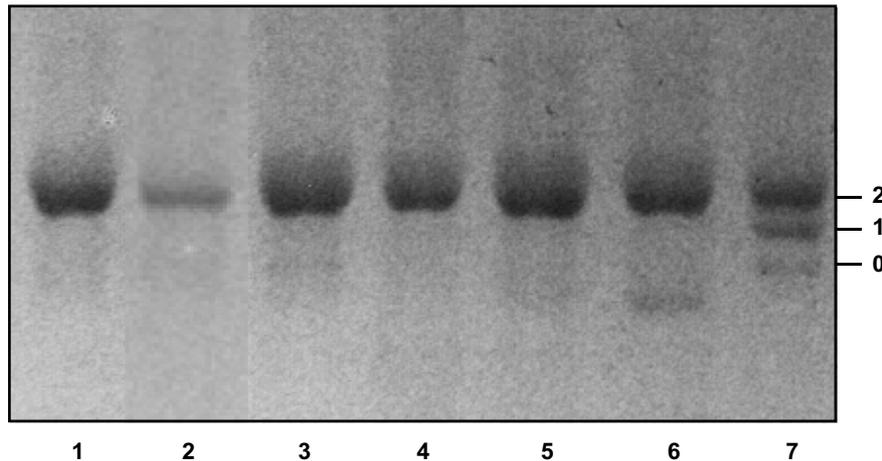


Abb. 10. SDS-PAGE von Transferrin bei Galaktosämiepatienten. 1 Kontrolle, 2 unbehandelte Galaktosämie, 3-6 behandelte Galaktosämie, 7 CDG-Ia. Die Zahl vorhandener Oligosaccharide ist am rechten Rand aufgeführt.

In Proben hereditärer Fructoseintoleranz ließen sich interessanterweise zu CDG-Ia identische Bandenmuster durch beide Elektrophoresemethoden darstellen. Offensichtlich resultieren die Sekundäreffekte in einer mangelnden Synthese oder Übertragung komplexer Oligosaccharide. Die Differenz der Molekulargewichte der zusätzlichen Banden in der SDS-PAGE entsprach äquivalent zu CDG-Ia jeweils 2 kDa (nicht abgebildet). Eine Unterscheidung vom primären Glykosylierungsdefekt war auch in der IEF nicht möglich (Abb. 11).

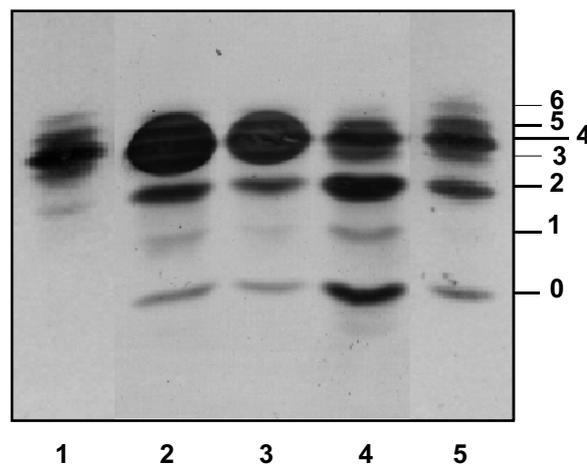


Abb. 11. Fokussierungsmuster von Transferrin bei Fructosämie. 1 Kontrolle, 2 u. 3 Eltern des Patienten (4) und 5 CDG-Ia. Die seitlichen Zahlen beziffern den Sialylierungsgrad der Oligosaccharidketten.

4.5 CDG-Ib, ein neuer Typ der Congenital Disorders of Glycosylation

4.5.1 Klinischer Phänotyp

Die Betreuung des Indexpatienten M.C. erfolgte im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. HK Harms. M.C. wurde nach komplikationsloser Schwangerschaft am Termin entbunden. Erste klinische Symptome zeigten sich im Alter von 11 Monaten mit rezidivierender Emesis und Diarrhoe. Eine infektiöse Genese wurde ausgeschlossen. Hauptsymptom war im Folgenden eine exsudative Enteropathie. In einer Dünndarmbiopsie fand sich eine partielle Zottenatrophie, die bei gleichzeitig erhöhten Gliadin-Antikörpern (IgA 66, normal <3 mg/dl, IgG 36, normal <30 mg/dl) eine glutensensitive Enteropathie (Zöliakie) vermuten ließ. Eine zweite Biopsie drei Monate später bestätigte zunächst diesen Befund. Elektronenmikroskopisch zeigten sich lysosomale Einschlusskörperchen und ein dilatiertes ER mit tubulären Bündeln unklarer Genese (Niehues et al., 1998). Nach Umstellung auf eine glutenfreie Diät sanken die Gliadin-Antikörper in den Normbereich, allerdings kam es nur zu einer vorübergehenden Besserung der Symptomatik. Im Alter von viereinhalb Jahren führten duodenale Ulcera zu abdominellen Beschwerden. Sechs Monate später bestand weiterhin eine histologisch gesicherte Duodenitis. Des Weiteren traten rezidivierende Thrombosen, erstmalig im Alter von 3¹¹/₁₂ Jahren, mit unterschiedlicher Lokalisation auf. Eine antithrombotische Therapie mit dem Vitamin-K-Antagonisten Marcumar wurde nach einer Thrombose im rechten Arm und multiplen Mikrothrombosen im Jejunum und Ileum am Ende des fünften Lebensjahres eingeleitet. Im weiteren Verlauf kam es zu Episoden schwerer gastrointestinaler Blutungen mit diffusem Ursprung, die auch nach Absetzen der antithrombotischen Prophylaxe nicht sistierten. Mehrfache chirurgische Interventionen, u.a. mit Ligation der A. gastroduodenalis und A. gastrica sinistra, erbrachten ebenfalls keinen durchgreifenden Erfolg. Eine neurologische Beteiligung war zu keiner Zeit präsent.

Laborchemisch zeigten sich wiederholt eine schwere Hypoproteinämie (2,8 - 5,3 g/dl, normal >5,2 g/dl), Hypoglykämie (bis <10 mg/dl, normal >60 mg/dl), Anämie (Hb <10 g/dl), eine Reduktion von Gerinnungsfaktoren (VII, XI, XII, Protein C und S, Quick 35-45 %, normal >80 %) sowie erhöhte Transaminasen (GOT und GPT >60 U, normal <22 U). Faecales α_1 -Antitrypsin war mit >5 mg/g deutlich erhöht (normal <1 mg/g). Erst eine verminderte Antithrombin-III-Aktivität (7 -30 %), charakteristisch für die CDG, führte, trotz der fehlenden neurologischen Symptomatik, zur Einleitung der CDG Diagnostik.

4.5.2 Elektrophoretische Charakteristika

Elektrophoretisch war dieser neue CDG Typ nicht vom Typ Ia zu unterscheiden. Es fanden sich sowohl vermehrt di- und asialo-Transferrinisoformen in der IEF als auch um 2, respektive 4 kDa leichtere Moleküle in der SDS-PAGE (Abb. 12). Es lag ein eindeutiger Mangel vollständiger Zuckerseitenketten vor.

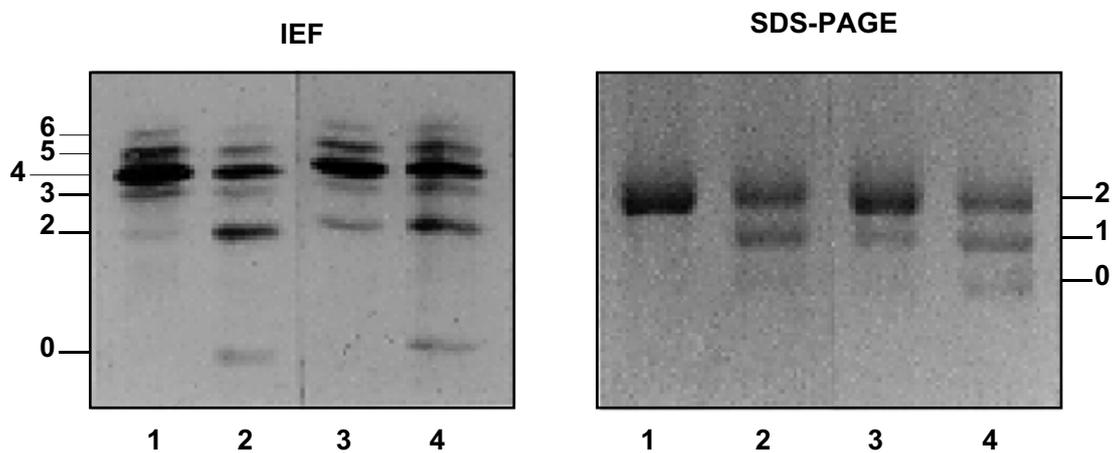


Abb. 12. IEF and SDS-PAGE bei CDG Ib. Serum Transferrin wurde mittels IEF und SDS-PAGE vor Beginn der Mannose Therapie (s.u.) untersucht. Um Veränderungen der Glykosylierung unter Therapie nachzuweisen, wurde Serumtransferrin nach 11 Monaten erneut analysiert.

4.5.3 Enzymdefekt

Passend zur atypischen klinischen Symptomatik fand sich in Leukozyten und Fibroblasten des Patienten eine normale Aktivität der PMM. Die Untersuchung weiterer Enzyme des Mannosestoffwechsels ergab normale Aktivitäten für Hexokinase und Phosphoglucose Isomerase (Tab. 5).

	Hexokinase			Phosphoglucose Isomerase		
	Bereich (mU/mg)	Mittelwert	%	Bereich (mU/mg)	Mittelwert	%
Kontroller (n = 2)	4,99-8,37	6,68	100	245,5-329,7	287,6	100
Patient CDG-Ib	5,83		87,3	254,9		88,6
	Phosphomannomutase					
	Bereich (mU/mg)	Mittelwert	%			
Kontroller (n = 7)	1,33-6,18	2,82	100			
Patient CDG-Ib	5,15		182,6			

Tab. 5. Aktivitäten verschiedener Enzyme des Mannosestoffwechsels. Die Bestimmungen der Hexokinase, Phosphoglucose Isomerase und Phosphomannomutase erfolgten in Fibroblasten des Patienten und verschiedenen Kontrollzelllinien.

	Fibroblasten			Leukozyten		
	Bereich	Mittelwert	%	Bereich	Mittelwert	%
Kontroller (n = 11)	14,7-26,42	21,63	100	9,83-20,4	15,84	100
Patient (n = 9)	1,4-2,2	1,69	7,8	0,52-0,61	0,58	3,7
Vater (n = 2)				7,7-11,5	9,6	60,6
Mutter (n = 2)				6,0-6,2	6,1	38,5
Bruder (n = 1)				8,0		50,5

Tab. 6. Phosphomannose Isomerase Aktivität. Die Messungen erfolgten in Fibroblasten bzw. Leukozyten des Patienten, der Eltern und des Bruders und verschiedenen Kontrollzelllinien. Es wurden jeweils ca. 40 µg zelluläres Protein eingesetzt.

Eine signifikant verminderte Aktivität zeigte sich bei der Phosphomannose Isomerase (Abb. 13). Das Enzym katalysiert die Synthese des Substrates der PMM, des Mannose-6-phosphat (s.o.). Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte in Analogie zur Analyse der PMM (s.o.). In Kontrollfibroblasten lagen die Aktivitäten im Bereich von 14,7-26,4 mU/mg mit einem arithmetischen Mittel von 21,6 mU/mg.

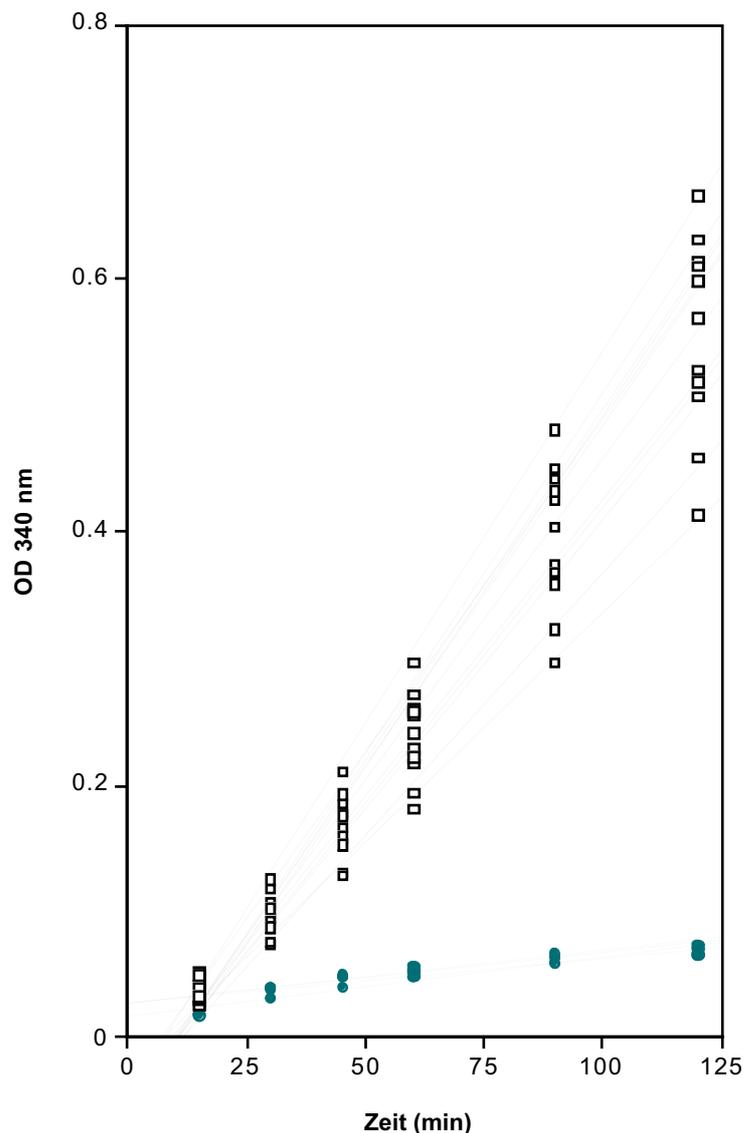


Abb. 13. PMI Assay. Lysate von Fibroblasten wurden wiederholt auf ihre PMI Aktivität untersucht. CDG-Ib Zellen (●) wiesen 7,8 % der PMI Aktivität in Kontrollen (□) auf (Kontrollen: 14,7-26,4, Mittelwert 21,6; Patient: 1,40-2,16, Mittelwert 1,69 nmol NADPH / mg Protein / min).

Etwas niedriger war die Aktivität in Leukozyten mit einem Mittelwert von 15,8 mU/mg. Im Vergleich zu Kontrollen war bei dem Indexpatienten die Aktivität in Fibroblasten auf 7,8 % und in Leukozyten auf 3,7 % reduziert (Tab. 6).

Vater, Mutter sowie der gesunde Bruder des Patienten wiesen Aktivitäten von 60,6 %, 38,5 % und 50,5 % auf. Somit ist auch der Bruder heterozygoter Träger des Gendefektes (Tab. 6).

4.5.4 Orale Substitution von Mannose bei CDG-Ib

Umfassende Daten zur oralen Applikation, Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit von Mannose wurden unter Mitwirkung des Autors in der Arbeitsgruppe von H.H. Freeze am Burnham Institute in San Diego erhoben (Alton et al., 1997). Basierend auf diesen Daten wurden dem Patienten, der sich in Folge von nicht beherrschbaren gastrointestinalen Blutungen in einem lebensbedrohlichen Zustand befand, in Absprache mit den behandelnden Ärzten initial dreimal und im Weiteren fünfmal täglich 100 mg/kg KG Mannose verabreicht. Der ursächliche Defekt war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Basale Konzentrationen lagen im Bereich von 11-37 $\mu\text{mol/l}$. Die Serumkonzentrationen wurden vor sowie 30, 60, 90 und 120 min nach der jeweils ersten und dritten Gabe bestimmt. Maximale Konzentrationen erreichten 60 min nach der ersten Gabe 280 $\mu\text{mol/l}$ und lagen nach der dritten Gabe etwas niedriger mit einem Maximum nach 90 min. Nach 8 Monaten Therapie wurde die Dosierung auf fünf Einzeldosen mit je 150 mg/kg KG pro Tag angehoben. Die höchsten Serumspiegel wurden 90 min nach der dritten Gabe mit 490 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Bereits nach der ersten Einnahme erreichten sie ca. 370 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 14).

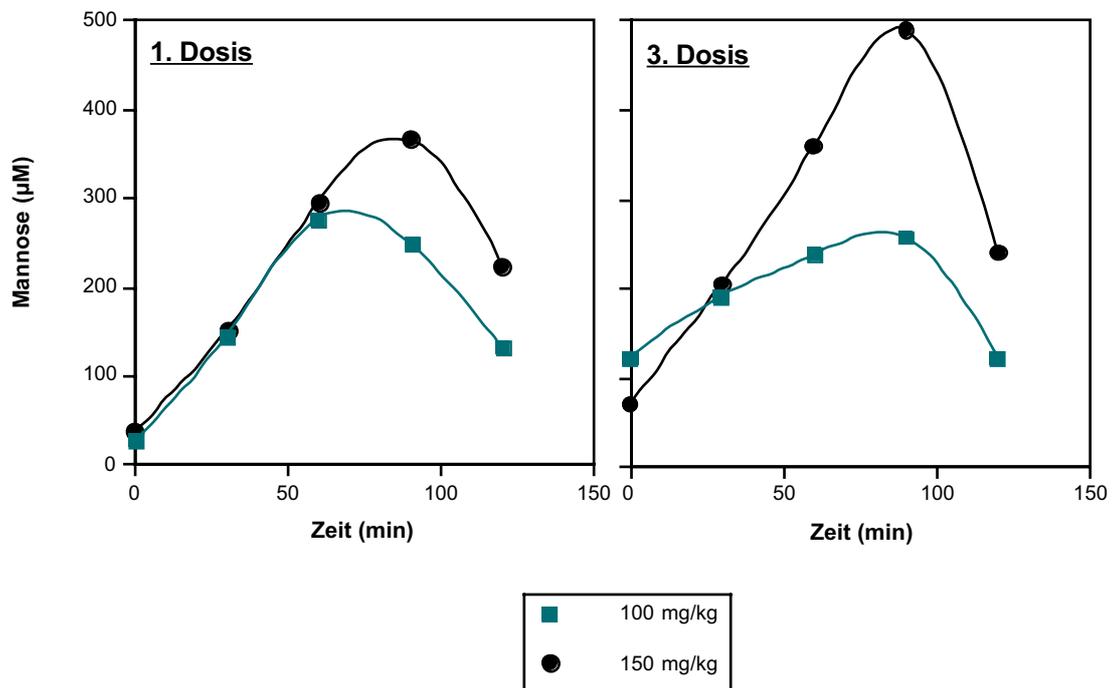


Abb. 14. Mannose Konzentrationen im Serum. Mannosespiegel im Serum des Patienten M.C. wurden im Anschluss an die orale Einnahme bei insgesamt fünf Einzeldosen pro Tag bestimmt. 1. Dosis: erste Tagesdosis. 3. Dosis: dritte Tagesdosis. Die Serumspiegel lagen vor Therapie deutlich unterhalb des Normbereichs (11 -37 µM; normal 30 -50 µM).

4.5.5 Therapieverlauf

Die Blutungen und chronische Diarrhoe sistierten innerhalb der ersten Wochen nach Initiierung der Therapie. Auffällige Laborparameter, wie ATIII und faecales α_1 -Antitrypsin, stabilisierten sich und blieben in der Folge im Normbereich. Ein markanter Rückgang abnormaler Transferrinisoformen wurde nach 11 Monaten Therapie beobachtet (Abb. 8). Gesundheitliche Probleme, die auf die Grunderkrankung bzw. Therapie zurückzuführen sind, sind bisher nicht bekannt geworden. Einzig eine Erhöhung des unspezifisch glykosylierten Hämoglobin HbA1c wurde beobachtet. Weitere Details liegen jedoch nicht vor.

5. Diskussion

5.1 Einleitung

Die N-Glykosylierung stellt eine wesentliche Modifikation fast aller sezernierten Proteine dar. Ein großer Prozentsatz intrazellulärer Proteine, z.B. lysosomale Enzyme und extracytosolische Domänen von Membranproteinen, ist ebenfalls N-glykosyliert. Die N-Glykane erfüllen eine Vielzahl von Funktionen (Varki 1993). Sie beeinflussen die Faltung, Polarität und Stabilität von Proteinen und sind an Protein-Protein- und Ligandenbindungen sowie Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Weitere Bedeutung haben sie in der Infektiologie und Immunologie als Bindungsliganden für pathogene Keime. Tumorzellen exprimieren häufig ein verändertes Spektrum proteingebundener Oligosaccharide, die z.B. für die veränderten Adhäsionseigenschaften neoplastischer Zellen verantwortlich sein können.

Störungen im Abbau der N-Glykane sind insgesamt selten aber seit langem bekannt. Wichtige Vertreter dieser Oligosaccharidosen sind die Fucosidose, α - und β -Mannosidose und Sialidose. Neben morphologischen Auffälligkeiten und Skelettdeformitäten (Dysostosis multiplex) sind eine psychomotorische Retardierung und Krampfanfälle Hauptmerkmale dieser Erkrankungen. Dagegen wurden die seltenen Synthesestörungen der N-Glykane, die Congenital Disorders of Glycosylation (CDG), erst in den letzten zwei Jahrzehnten bekannt.

Unter den Stoffwechselkrankheiten entfällt nur ein geringer Prozentsatz auf die Gruppe der CDG. Die kumulative Inzidenz dieser 1980 erstmalig von dem belgischen Pädiater J. Jaeken beschriebenen Erkrankungsgruppe wird auf 1:80 000 geschätzt, wobei die Gesamtzahl diagnostizierter Fälle nur ca. 500 weltweit beträgt. Für das Verständnis der N-Glykosylierung und ihrer Funktionen haben sie jedoch einen besonderen Stellenwert. Die meisten metabolischen Erkrankungen führen über Störungen kataboler Stoffwechselwege, von Transportmechanismen oder der Interkonversion von Substraten zur selektiven Ansammlung toxischer Metabolite oder zum Mangel

essentieller Stoffwechselprodukte (z.B. Neurotransmitter). Dagegen sind die pathobiochemischen Auswirkungen der CDG weit komplexer, da sie die Funktion und/oder die Absolutmenge zahlreicher Glykoproteine in unterschiedlicher Ausprägung betreffen können. Es resultiert daher eine klinisch sehr heterogene Erkrankungsgruppe.

Zu Beginn dieser Arbeit war nur der Defekt des CDG-IIa, eine Defizienz der GlcNAc-transferase II, beschrieben. Dieser Defekt resultiert in einer homogenen Verkürzung der Oligosaccharidseitenketten. Die übrigen CDG Typen basierten auf einer beschreibenden Einteilung anhand der qualitativen und quantitativen Verteilung der Transferrinisoformen in der isoelektrischen Fokussierung und des jeweiligen Phänotyps. Charakteristisch für den häufigsten Typ (CDG Typ I) war eine deutliche Vermehrung von di- und asialo-Transferrin. Als Defekt konnte 1995 von van Schaftingen et al. eine Defizienz der Phosphomannomutase (PMM), einem Schlüsselenzym im Mannosestoffwechsel, nachgewiesen werden. Diese resultiert in dem Fehlen vollständiger Zuckerseitenketten. Diagnostisch kommt dies in der SDS-PAGE zur Darstellung. Interessanterweise fand sich dieser Defekt nur bei ca. 80 % der als CDG Typ I diagnostizierten Fälle (Jaeken et al., 1997).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Präsentation eines neuen Subtypen der CDG, der biochemische und klinische Vergleich zum CDG-Ia sowie die Vorstellung einer erfolgreichen diätetischen Therapie, die sich aus den Studien zum Mannosestoffwechsel der Arbeitsgruppe von H. Freeze in San Diego unter Mitwirkung des Autors ableitet. Ferner soll auf Limitationen der Primärdiagnostik hingewiesen werden.

5.2 Auffälligkeiten in der Analyse von CDG-Ia und CDG-x

Das CDG-Ia bildet nicht zuletzt durch seine Entdeckung als erster Vertreter dieser Erkrankungsgruppe bis heute den patientenreichsten Typ. Dies liegt u.a. an der charakteristischen Klinik, die differentialdiagnostisch wegweisend ist. Aufgrund der geringen Fallzahlen fehlen ähnlich klare diagnostische

Kriterien für die übrigen CDG Typen. Vermutlich wird daher eine Vielzahl von Patienten nicht der Diagnostik zugeführt.

Bei 36 in dieser Studie untersuchten Patientenproben fanden sich mittels elektrophoretischer Verfahren pathologische Transferrinisoformen. In 22 Fällen konnte durch die Bestimmung der Enzymaktivität eine PMM-Defizienz mit Aktivitäten unter 10 % nachgewiesen werden. Ein Versuch die variable Restaktivität der PMM2 bei CDG-Ia über eine Korrelation der zugrundeliegenden Mutationen mit der Schwere der Phänotypen zu erklären wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen. Die erhobenen Daten sind jedoch konform mit der von Pirard et al. (1999) beobachteten mutationsabhängigen Aktivitätsverteilung der PMM2. Die Aktivitäten in Leukozyten der Eltern wiesen in den meisten Fällen deutlich auf eine Heterozygotie der Erkrankung hin. Ungewöhnlich waren jedoch einzelne Abweichungen bis in den Normbereich, aber auch ein mit 0,19 mU/mg extrem niedriger Wert. Bei Patienten als pathologisch gewertet, wird dieser Befund von dem betroffenen Elternteil offenbar ohne Krankheitswert toleriert. Möglicherweise ist der einmalig in Leukozyten erhobene Wert Resultat eines Messfehlers oder aber nicht repräsentativ für die PMM-Aktivität in anderen Zellen. Unterschiedliche Expressionsraten der mutierten und gesunden Allele in verschiedenen Organen könnten diese Beobachtungen erklären.

Klinische präsentierte sich ein heterogenes Spektrum, jedoch waren eine psychomotorische Retardierung mit cerebellärer Atrophie und Gerinnungsstörungen gemeinsame Charakteristika bei allen CDG-Ia Patienten. Der Schweregrad der Erkrankung zeigte deutliche Varianz.

Die inhomogene Verteilung der elektrophoretischen Bandenmuster und der Ausschluss einer PMM- oder PMI-Defizienz bei den 13 CDG-x Fällen wies auf unterschiedliche ursächliche Defekte hin. Um Aufschluss über die Lokalisation der Defekte zu erlangen werden derzeit Strukturanalysen der Oligosaccharide durchgeführt. Die fehlende neurologische Beteiligung bei einigen Patienten lässt vermuten, dass neben CDG-Ib auch weitere CDG

eine normale mentale Entwicklung ermöglichen. Allerdings konnten sekundäre Störungen als Ursache bislang nicht ausgeschlossen werden.

Die Zahl der diagnostizierten CDG-Ia Patienten unterstützt die bislang beobachtete prozentuale Häufigkeit der PMM-Defizienz unter den CDG mit CDG-I Muster in der IEF, ist aber aufgrund der geringen Fallzahlen naturgemäß nur bedingt von statistischer Relevanz (Jaeken et al., 1997).

5.3 Die Spezifität der primären CDG-Diagnostik ist limitiert

Die in dieser Arbeit untersuchten Erkrankungen, die über sekundäre Effekte zu einer Störung der Glykosylierung führen, weisen auf ein Problem in der primären CDG-Diagnostik hin. In der elektrophoretischen Analyse von Serumtransferrin können den CDG ähnliche Bandenmuster auftreten. Fehldiagnosen sind eine mögliche Folge. Erst weitere strukturelle Analysen von Oligosacchariden und der Ausschluß bereits bekannter CDG Typen bzw. die Diagnose einer metabolischen Erkrankung mit sekundärer Affektion der Glykosylierung können hier Aufklärung verschaffen. Erkrankungen wie die Galaktosämie sollten im Rahmen des Neugeborenen-Screenings erkannt werden, allerdings können metabolische Defekte, die im Screening nicht erfasst werden, z.B. die hereditäre Fructoseintoleranz, als CDG missinterpretiert werden (Adamowicz und Pronicka, 1996). Durch genetische Polymorphismen kann es zur Expression von Transferrinvarianten mit unterschiedlicher Aminosäurenkomposition (Anderson und Anderson, 1979; Knopf et al., 2000) kommen, die in der IEF eine Hypoglykosylierung vermuten lassen. Auch sind CDG-Ia Patienten mit zumindest zeitweise normalen Transferrin Fokussierungsmustern bekannt (Fletcher et al., 2000). Am Beispiel des CDG-IIb wird zudem deutlich, dass nicht alle CDG mittels elektrophoretischer Verfahren erfaßt werden. Dem Untersucher obliegt daher die Verantwortung einer kritischen Beurteilung der pathologischen Befunde.

Bei der klassischen Galaktosämie wurde ein verminderter Einbau von Galaktose- und Sialinsäureresten nachgewiesen (Dobbie et al. 1990; Ornstein et al. 1992). Unterstützend fand sich in der SDS-PAGE von Proben

unbehandelter Patienten kein differenzierbarer Unterschied im Molekulargewicht von Transferrin im Vergleich zu Kontrollen während sich in der IEF vermehrt di- und asialo-Transferrin zeigte. Die hereditäre Fructosämie fiel ebenfalls durch ein dem CDG Typ I ähnliches Verteilungsmuster der Transferrinisoformen in der IEF auf. Im Gegensatz zur Galaktosämie fanden sich zusätzliche Banden in der SDS-PAGE wie bei CDG-Ia. Damit konnte erstmalig das Fehlen vollständiger Zuckerseitenketten bei der hereditären Fructosämie nachgewiesen werden. Eine exakte Strukturanalyse steht allerdings noch aus. Pathobiochemisch wird eine inhibitorische Wirkung akkumulierenden Fruktose-1-phosphats auf die PMI diskutiert, die sich analog zur PMI-Defizienz auf die Oligosaccharidsynthese auswirken könnte (Jaeken et al. 1997). Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der Galaktosämie vorliegen. Da nur einzelne Zuckerreste fehlen, ist eine Inhibition von Enzymen in der Synthese oder dem Transport von UDP-Galaktose und/oder CMP-Sialinsäure zu vermuten. Diese könnte durch Galaktose-1-phosphat oder Galactitol, das durch Katalyse der Aldose-Reduktase als alternativer Stoffwechselmetabolit der Galaktose entsteht, bedingt sein, ist jedoch bislang ungeklärt. Beide Erkrankungen werden diätetisch mittels Galaktose- bzw. Fructose-armer Ernährung therapiert, unter der es zu einer Normalisierung der N-Glykosylierung kommt (Jaeken et al. 1992; Winchester et al., 1995). Interessanterweise fanden sich bei Galaktosämiepatienten auch unter Therapie veränderte Glykosylierungsmuster in der IEF. Charlwood et al. (1998) beobachteten mittels HPLC ebenfalls eine Persistenz abnormer Zuckerketten bei Patienten mit normalisierten Galaktose-1-phosphat Spiegeln. Inwieweit diese im Zusammenhang mit einer mangelnden Diätcompliance stehen ist nicht bekannt. Eine endogene Intoxikation mit Galaktose-1-phosphat durch Freisetzung aus UDP-Galaktose wäre eine mögliche Erklärung. Andererseits kann UDP-Galaktose über eine Epimerasereaktion zu UDP-Glucose umgesetzt werden und anschließend in die Glykogensynthese einfließen. Ebenso unklar ist ob die Hypoglykosylierung an der phänotypischen Ausprägung beider Erkrankungen beteiligt ist. Langzeitbeobachtungen

ergaben, dass die Galaktosämie trotz guter Therapiecompliance mit einem unterdurchschnittlichen IQ, motorischen und Sprachschwierigkeiten, einem verlangsamten Wachstum und einer Dysfunktion des Ovars weiblicher Patienten belastet sein kann. Die Persistenz einer leichten Hypoglykosylierung wäre eine mögliche Ursache und wird auch von Charwood et al. vermutet. Die Symptomatik der hereditären Fructosämie basiert v.a. auf den toxischen Effekten des Fructose-1-P. Die Glykosylierungsstörung resultiert ebenfalls aus der Toxizität dieses Metaboliten (s.o.). Eine Beteiligung an der akuten Symptomatik erscheint unwahrscheinlich da die Hypoglykosylierung in Abhängigkeit von den Halbwertszeiten einzelner Glykoproteine vermutlich erst mit Verzögerung zur Ausprägung kommt. Bei persistierender Aufnahme von Fructose wäre allerdings ein Zusammenhang mit der schweren Organschädigung, v.a. der Leber, denkbar. In der Literatur ist zu diesem Aspekt bislang nichts beschrieben.

Die meisten Serumglykoproteine werden in der Leber synthetisiert. Es wäre daher zu erwarten, dass sich schwere Erkrankungen mit Beteiligung der Leber (Hepatitis B und C, extrahepatische Gallengangsatresie) bis hin zum zirrhotischen Umbau und Versagen des Organs auch in einer Hypoglykosylierung niederschlagen. Einige Publikationen beschrieben tatsächlich erhöhte Werte für Kohlenhydrat-defizientes Transferrin (CDT) bei schweren hepatischen Erkrankungen (Stibler, 1991). Jedoch konnte mittels der zur Verfügung stehenden Methoden keine Veränderung im Glykosylierungsmuster des Transferrins nachgewiesen werden. Möglicherweise reichte die Syntheseleistung bei den untersuchten Patienten selbst bei schwerster Beeinträchtigung der Leber noch aus, um eine normale Glykosylierung von Transferrin zu gewährleisten. Andererseits wird die CDT Bestimmung (Austauschchromatographie) von vielen Autoren als der IEF überlegen bewertet. Die Leberinsuffizienz fällt u.a. durch eine Verminderung der Cholinesterase und der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, XI auf. Inwieweit eine gestörte Glykosylierung diesen Befunden zugrunde liegt und ob weitere Glykoproteine betroffen sind ist bislang nicht untersucht.

Die alkoholinduzierte Hypoglykosylierung ist v.a. aus pathobiochemischer Sicht von großem Interesse. Der Pathomechanismus ist bislang ungeklärt. Nach täglichem Konsum von mindestens 60 g Ethanol über 14 Tage lässt sich bereits eine deutliche Minderglykosylierung von Serumtransferrin nachweisen. Die Halbwertszeit beträgt etwa zwei Wochen (Stibler, 1991). Dieses Kohlenhydrat-defiziente Transferrin (CDT) wird als sensitiver Verlaufsparemeter in der Behandlung von Alkoholkranken eingesetzt. Untersuchungen der Oligosaccharide von Transferrin zeigten ein vollständiges Fehlen einzelner Zuckerketten analog zum CDG Typ I (Landberg et al., 1995). Die IEF und SDS-PAGE der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben bestätigten diese Befunde. Allerdings war die Hypoglykosylierung nicht durchgehend bei allen Patienten nachweisbar. Eine Erklärung ist die schwierige Sammlung und Charakterisierung des Patientenmaterials. Zu den meisten Proben lag nur die Diagnose eines Alkoholabusus und verschiedener Folgeerkrankungen vor. Genaue Angaben v.a. zum aktuellen Trinkverhalten waren nicht eruiert.

Ursächlich wird ein toxischer Effekt des Ethanolmetaboliten Acetaldehyd vermutet. Es ist jedoch ungeklärt, ob eine Inhibition eines einzelnen bzw. mehrerer Enzyme der N-Glykosylierung oder möglicherweise ein vermehrter Abbau des Trägerlipides Dolichol durch Induktion von Monooxygenasen zugrunde liegt (Stibler, 1991; Cottalasso et al., 1996).

Inwieweit die beim Erwachsenen Patienten beobachtete Hypoglykosylierung an der Pathogenese der Alkoholembyopathie beteiligt ist unbekannt. Daten zur N-Glykosylierung bei betroffenen Patienten liegen nicht vor. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit zu den CDG wäre eine Analyse des Glykosylierungsstatus von großem Interesse. Leider standen Serumproben für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

5.4 Eine neue Form der Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-Ib

Unter den Patienten mit normaler PMM-Aktivität konnte für den in dieser Arbeit beschriebene Indexpatient M.C. ein neuer Typ der CDG (CDG-Ib) als ursächliche Erkrankung identifiziert werden. Sowohl in der IEF als auch in der SDS-PAGE von Serumtransferrin zeigte sich ein dem ehemaligen CDG Typ I identisches Bandenmuster. Jedoch unterschied sich der klinische Phänotyp fundamental von allen bekannten Formen der CDG. Predominantes Symptom war eine exsudative Enteropathie. Eine neurologische Beteiligung bestand nicht. Einzig eine Gerinnungsstörung mit rekurrenten Thrombosen und Blutungen stellte ein den übrigen CDG Typen gemeinsames Merkmal dar. Ursächlich konnte eine Defizienz der Phosphomannose Isomerase (PMI) nachgewiesen werden, die zu einer verminderten Synthese von Mannose-6-Phosphat aus Fructose-6-Phosphat führt. Mannose-6-Phosphat liefert 9 der 14 Monosaccharide für die Synthese lipidgebundener Oligosaccharide (LLO). Des Weiteren ist es Substrat für die Synthese von Fucose und Glycophospholipid(GPI)-Ankern. Ein reduzierter Mannose-6-Phosphat Pool bedingt einen Mangel an normalen LLO, der sich in einer Hypoglykosylierung naszierender Proteine äußert.

Die Restaktivität der PMI in Fibroblasten und Leukozyten lag unter 10 %. Die auf 53 % und 33,7 % deutlich verminderten Aktivitäten in Leukozyten der Eltern wiesen auf einen rezessiven Erbmodus hin. Mutationsanalysen in unserem Labor konnten eine Punktmutation an Position 656 des väterlichen Allels nachweisen, die zum Austausch einer basischen gegen eine neutrale Aminosäure (Arg219 → Gln219) in einer konservierten Region des Enzyms führt (Proudfoot et al., 1994). Auf dem mütterlichen Allel fand sich keine Mutation. Es bestand jedoch ein deutliches Disequilibrium väterlicher und mütterlicher Allele, so dass eine reduzierte Transkription des mütterlichen Allels oder eine verminderte Stabilität der Transkripte anzunehmen ist. Die Auswirkung der Mutation auf die Enzymaktivität wurde durch eine kooperierende Arbeitsgruppe am Burnham Institute in San Diego, USA durch

Expression in COS-7 Zellen überprüft. Die Transfektion mit Plasmiden, die die mutierte cDNA bzw. kein Insert enthielten, führte zu keiner Veränderung der endogenen Aktivität, während die codierende Sequenz normaler humaner PMI in einem 10fachen Anstieg der Aktivität resultierte (Niehues et al. 1998).

Des Weiteren ergaben detailliertere Untersuchungen der Enzymaktivität in den Zellextrakten einen 16fach niedrigeren V_{\max} , wohingegen der K_m durch die Mutation unbeeinflusst blieb. Es ist daher zu vermuten, dass die katalytische Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigt ist. Allerdings ist eine genaue Aussage über die Korrelation des V_{\max} mit der Gesamtmenge an Enzym oder aber dessen Qualität nur durch Untersuchungen am gereinigten Enzym oder durch Titration mit einem spezifischen Antikörper möglich, so dass die publizierten Werte nur bedingt aussagekräftig sind. Dennoch erscheinen anhand der vorliegenden Daten eine verminderte Transkription, Translation, Stabilität oder eine vermehrte Retention des Enzyms als Ursache für eine reduzierte Gesamtmenge an PMI plausibel (Niehues et al. 1998).

Da die Erkrankung elektrophoretisch nicht von der CDG-Ia zu unterscheiden ist wurde sie als CDG-Ib klassifiziert (Niehues et al. 1998). Zwischenzeitlich wurden weitere Patienten mit PMI Defizienz beschrieben. Die klinische Symptomatik ähnelte mit Variationen der des Indexpatienten. Neben gastrointestinalen Symptomen fand sich v.a. eine hepatische Beteiligung mit Fibrose bis zur Dysfunktion des Organs (Jaeken et al., 1998; de Koning et al., 1998, de Lonlay et al., 1999)

5.5 Pathobiochemie der CDG-Ia und Ib

Es stellt sich die Frage, wie zwei im Stoffwechsel direkt benachbarte Defekte sich phänotypisch unterschiedlich manifestieren können, obwohl eine Reduktion des GDP-Mannose Pools die gemeinsame Folge ist. Betrachtet man den Mannosestoffwechsel und die heterogene Aktivitätsverteilung der beteiligten Enzyme, eröffnet sich eine plausible Erklärung.

Exogene Mannose kann durch einen spezifischen Transporter (Panneerselvam et al.) in die Zellen aufgenommen und durch eine

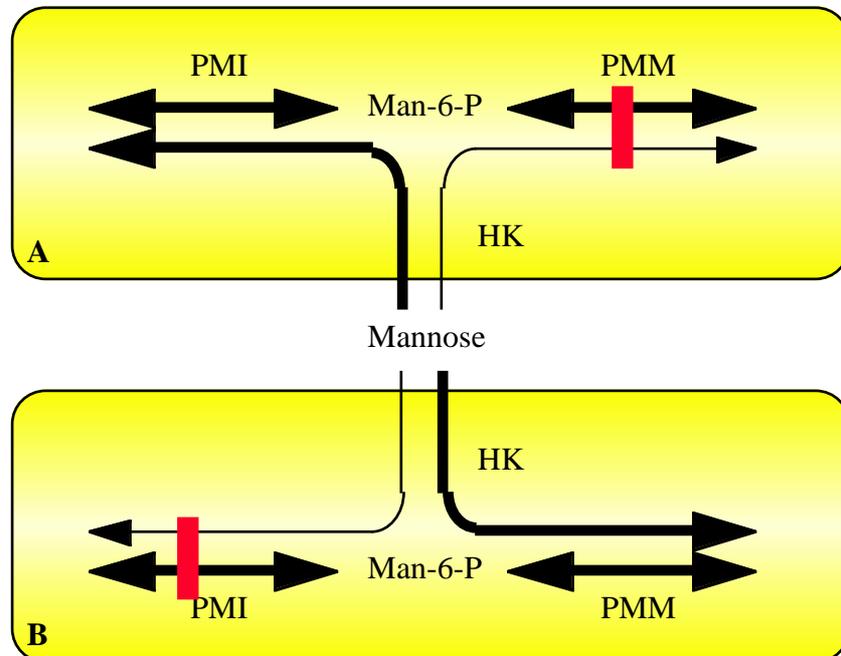


Abb. 15. Defekte im Metabolismus der Mannose. Hexokinase (HK), A. Phosphomannomutase (PMM), B. Phosphomannose Isomerase (PMI).

Hexokinase zu Mannose-6-phosphat, dem Substrat der PMM, umgesetzt werden. Ein Defekt der PMM führt daher in sämtlichen Organen über einen Mangel an GDP-Mannose zur Hypoglykosylierung neu synthetisierter Glykoproteine. Ist die de novo Synthese der Mannose aus Glucose bedingt durch einen Defekt der PMI gestört, bleibt der Alternativweg über exogene Mannose erhalten (Abb. 15).

Da vermutlich alle Zellen den Mannosetransporter exprimieren, könnte die physiologische Serummannosekonzentration von 50 μM ausreichen, um den Bedarf von Organen mit geringer Syntheseleistung und PMM-Aktivität für die LLO Synthese zu decken.

Weitere Mannose könnte im Rahmen der Degradation von Glykokonjugaten in den Lysosomen entstehen und nach Phosphorylierung in die Synthese der

LLO einfließen. Dieses zelluläre Recycling ist allerdings spekulativ und detaillierte Untersuchungen stehen noch aus. Es ließe sich jedoch erklären, warum im Falle des CDG-Ib vor allem Organe mit hoher Syntheseleistung, i.e. Leber und Intestinum, betroffen sind. Das Gehirn von Ratten weist im Organvergleich eine geringe Syntheserate und niedrige PMM-Aktivität auf, während die PMI-Aktivität vergleichsweise hoch liegt (Alton et al., 1998). Vermutlich wird nur ein geringer Teil exogener Mannose für die Oligosaccharidsynthese benötigt, wogegen der Großteil über die PMI in den Energiestoffwechsel einfließt. Bei einer Defizienz der PMI steht so möglicherweise genügend Mannose für eine normale N-Glykosylierung zur Verfügung. Während der Hirnentwicklung ist der Quotient aus Energiebedarf und Syntheseleistung vermutlich deutlich zu letzterem hin verschoben. Jedoch könnte die diaplazentare Versorgung des Foetus mit mütterlicher Mannose eine unbeeinträchtigte Entwicklung des zentralen Nervensystems ermöglichen. Über die organspezifischen Aktivitätsmuster der PMI und PMM im humanen Organismus existieren bislang keine Daten. Die obigen Überlegungen stützen sich daher auf die unter Beteiligung des Autors in Rattenorganen erhobenen Daten (Alton et al., 1998). Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft der Säugetiere sind Parallelen allerdings in hohem Maße zu vermuten.

5.6 Die orale Mannosesubstitution ist die erste effektive Therapie einer CDG

Die alternative Nutzung exogener Mannose im Stoffwechsel eröffnete neben theoretischen Erklärungsansätzen der phänotypischen Ausprägung der CDG-Ia und Ib auch therapeutische Möglichkeiten. Durch diätetische Zufuhr von Mannose könnte das Substratangebot deutlich gesteigert werden.

Untersuchungen an PMM-defizienten Fibroblasten zeigten eine vollständige Korrektur der Hypoglykosylierung unter Zusatz von Mannose zum Medium. Betrachtet man den Mannosestoffwechsel, läßt sich dieser Befund nicht erklären. Es wurde daher die Existenz einer Mannose-1-kinase spekuliert, die

allerdings bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der bei allen Patienten vorliegenden Restaktivität der PMM erscheint ein erhöhter Substratumsatz wahrscheinlicher. Die infolge gross angelegten Therapiestudien bei CDG-Ia Patienten, u.a. auch unter Beteiligung des Autors, blieben bislang ohne Erfolg (Niehues R., Dissertation in Vorbereitung). Obwohl CDG-Ia Fibroblasten bis 1,6fach mehr Mannose aufnehmen als Kontrollzellen und der Einbau in Glykoproteine 7fach gesteigert ist (Dupre et al., 1999) lassen sich ausreichende Mannosekonzentrationen im interzellulären Raum in vivo vermutlich nicht erreichen. Weitere Versuche zur effektiven Anhebung des GDP-Mannose Pools begleitend zur Mannosesubstitution (u.a. ketogene Diät, Fucosesubstitution und Zinksabstitution) sind Gegenstand aktueller Studien. In vitro führt ein Glucosemangel bei CDG-Ia Zellen zu einer Korrektur des Glykosylierungsdefektes (Körner et al., 1998b). Die ketogene Diät ist der Versuch diesen Effekt auch in vivo zu erzielen. Bei den behandelten Patienten konnte bislang jedoch keine objektivierbare Normalisierung der Glykosylierung festgestellt werden.

Fucose kann nach Aktivierung zu GDP-Fucose in GDP-Mannose umgewandelt werden. Die Substitution von Fucose wurde als effektive diätetische Therapie bei LAD II etabliert. Bei CDG-Ia Patienten hatte sie keinen objektivierbaren Effekt (Marquardt, nicht veröffentlicht). Die Konversion ist vermutlich zu gering um eine ausreichende Anhebung der GDP-Mannose spiegel zu bewirken.

Eine Erhöhung des intrazellulären Man-6-P könnte auch durch Hemmung des Umsatzes zu Fructose-6-P durch die PMI erreicht werden. Die PMI ist ein zinkabhängiges Metalloprotein. Im Überschuss wird die katalytische Aktivität jedoch durch Zink und einige andere Metalle (u.a. Ca, Co, Hg, Mn) inhibiert (Wells et al., 1993). Zink führte in vitro ab Konzentrationen von 25-50 $\mu\text{mol/l}$ zu einer signifikanten Hemmung humaner PMI Aktivität. Allerdings würde der Versuch die normalen Serumspiegel von ca. 15 $\mu\text{mol/l}$ adäquat zu steigern, um die intrazelluläre Konzentration in den o.g. Bereich anzuheben, vermutlich

zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Neben vegetativen Symptomen, Anämie und Kupfermangel durch verminderte Resorption ist eine inhibitorische Wirkung auf weitere Enzyme zu erwarten. Auch die Induktion von Apoptose in Säugerzellen durch Zink wurde berichtet (Haase et al., 2001) Aufgrund der unvorhersehbaren kurz- und langfristigen Nebenwirkungen einer erhöhten Zinkzufuhr wurde auf Versuche in vivo verzichtet.

Dagegen erwies sich die orale Mannosesubstitution als effektive Therapie des im Rahmen dieser Arbeit erstmalig diagnostizierten CDG-Ib. Mehrere wichtige Anforderungen an die Wirksamkeit und Praktikabilität einer Therapie werden erfüllt. Der Wirkmechanismus ist bekannt. Er beruht auf einer Verzweigung im Stoffwechsel im Anschluss an die von der PMI katalysierten Reaktion und der Verfügbarkeit spezifischer Mannosetransporter. Das Monosaccharid kann nach Aufnahme in die Zellen durch eine unspezifische Hexokinase unabhängig von der PMI zu Mannose-6-phosphat umgesetzt und für die Synthese von GDP-Mannose genutzt werden. Durch Verteilung der Tagesgesamtdosis auf fünf Einzelgaben wird eine im Tagesverlauf konstante Anhebung des Mannosespiegels gewährleistet und eine mögliche osmotische Diarrhoe vermieden. Die Praktikabilität der Therapie wird des Weiteren durch die einfache Applikation der süßlich schmeckenden Mannose unterstrichen. Innerhalb von wenigen Wochen kam es bereits zu einer deutlichen Stabilisierung des klinischen Zustandes des Patienten M.C. sowie zu einer zunehmenden Normalisierung verschiedener Laborparameter. Nach sechs Monaten konnte auch eine partielle Korrektur der Glykosylierung von Transferrin sowohl in der IEF als auch in der SDS-PAGE beobachtet werden, die sich schließlich nach 11 Monaten kaum mehr von Kontrollen unterschied. Ein solitärer Effekt auf die Glykosylierung des Transferrins konnte durch Untersuchung weiterer Glykoproteine mittels 2D-Gelelektrophorese ausgeschlossen werden (Niehues R., Dissertation, in Vorbereitung). Damit war auch die Wirksamkeit der Therapie bewiesen. Weitere CDG-Ib Patienten werden mittlerweile ebenfalls erfolgreich mit Mannose behandelt (Freeze und Aebi, 1999)

Nebenwirkungen dieser Therapie sind bislang nicht bekannt. Verschiedene Studien beschreiben einen teratogenen Effekt von Mannose in Ratten-Embryonen (Freinkel et al. 1984) sowie eine potentielle Toxizität in PMI-defizienten Tumorzellen (de la Fuente et al. 1988), Bienen (de la Fuente et al. 1986) und *Plesiomonas shigelloides* (Rager et al., 2000). Die Relation der Aktivitäten von PMI und HK ist bei Bienen zugunsten der Hexokinase verschoben. Das sich bei Fütterung 1M Mannoselösungen aufstauende Mannose-6-phosphat wird über Phosphatasen rasch wieder dephosphoryliert, so dass durch die energieabhängige Reaktion der HK mit konsekutivem ATP-Verlust ein letaler Kreislauf resultiert. Eine Depletion energiereicher Nukleotide wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Teratogenität der Mannose in Ratten-Embryonen gesehen (Freinkel et al. 1984). Der exakte Mechanismus ist bislang ungeklärt, jedoch wird eine inhibitorische Wirkung der Mannose auf die Glykolyse diskutiert. *Plesiomonas shigelloides* besitzt keine PMI. Es kommt zu einem Aufstau von Mannose-6-phosphat mit toxischer Wirkung auf das Wachstum. Die toxischen Effekte sind aber aufgrund der limitierten Aufnahmekapazität des Darmes für Mannose und der Enzymausstattung humaner Zellen bezüglich der Mannosetherapie von CDG Patienten nicht von Relevanz. Bereits ab Einzeldosen über 200 mg/kg KG wird eine osmotische Diarrhoe induziert (Alton et al., 1997). Bei CDG-Ib Patienten besteht ein gesteigerter Bedarf an Mannose. Diese wird durch die PMM zu Mannose-1-phosphat umgesetzt und somit einer möglichen Dephosphorylierung entzogen. Der für Bienen beschriebene energiedepletierende Kreislauf ist daher ohne Relevanz. Die maximalen Mannosekonzentrationen im Serum von CDG-Ia und Ib Patienten wurden 60-fach unter der für PMI-defiziente Tumorzellen toxischen Dosis (~27 mM) gemessen. Der teratogene Effekt der Mannose ist dosisabhängig und kommt erst ab Konzentrationen über 0,75 mg/ml zum tragen. Diese Konzentrationen werden durch die physiologisch limitierten Höchstdosen um den Faktor 10 unterschritten. Dennoch bleibt derzeit unabsehbar, ob auf längere Sicht nicht doch potentiell toxische Nebenwirkungen evident werden, dies z.B. durch eine unspezifische Mannosylierung von Proteinen. Mannose ist bezüglich

unspezifischer Reaktionen 5fach reaktiver als Glucose (Bunn et al., 1981). HbA1c, unspezifisch glykosyliertes Hämoglobin, dient als Kontrollparameter der Insulintherapie bei Diabetes mellitus. Die Bedeutung eines erhöhten HbA1c, das im Laufe der Therapie beobachtet wurde, ist bislang ungeklärt. Regelmäßige Untersuchungen der in Behandlung befindlichen Patienten sind aus diesen Gründen unbedingt erforderlich.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) sind eine wachsende Gruppe von hereditären Störungen der N-Glykosylierung. Derzeit sind neun verschiedene Enzymdefekte bekannt. Sie betreffen entweder die Synthese der Oligosaccharidketten oder deren Prozessierung nach der Übertragung auf das Proteingerüst. Gemeinsames biochemisches Merkmal ist eine Verkürzung bis hin zum vollständigen Fehlen proteingebundener Oligosaccharide.

Klinisch präsentieren sich die CDG als heterogene Multisystemerkrankungen. Gemeinsames Merkmal ist eine psychomotorische Retardierung. Eine Ausnahme bildet das im Rahmen dieser Arbeit entdeckte CDG-Ib. Hauptmerkmal ist eine exsudative Enteropathie. Eine mentale Retardierung tritt nicht auf.

Eine weitere Besonderheit stellt die Lokalisation des Enzymdefektes im Mannosestoffwechsel dar. Durch die Defizienz der Phosphomannose Isomerase ist die endogene Mannoseproduktion aus Glucose blockiert. Alternativ ist die Nutzung exogener Mannose für die Synthese von GDP-Mannose möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die diätetische Substitution von Mannose eine wirksame Therapie des CDG-Ib darstellt während sie beim CDG-Ia keinen Effekt auf die Hypoglykosylierung zeigt (Niehues R., Dissertation in Vorbereitung).

Ein generelles Problem in der CDG-Diagnostik stellen Erkrankungen dar, die sekundäre Veränderungen der Glykosylierung verursachen, sowie genetische Transferrinvarianten. Die primär eingesetzten elektrophoretischen Verfahren besitzen eine hohe Sensitivität bei geringer Spezifität. Um Fehldiagnosen zu vermeiden sind eine kritische Beurteilung der Befunde sowie weiterführende Analysen essentiell.

Der Einsatz von Methoden wie High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Massenspektrometrie ermöglicht die exakte Analyse der Struktur der Oligosaccharidseitenketten bzw. der lipidgebundenen Vorstufen und

damit die Eingrenzung zugrundeliegender Enzymdefekte. Durch Aktivitätsbestimmungen der Enzyme und Mutationsanalysen können diese bestätigt werden.

Aufgrund der Zahl der an der N-Glykosylierung beteiligten Enzyme ist zu erwarten, dass in Zukunft zahlreiche neue CDG entdeckt werden. Neben der Diagnostik werden die Erforschung der Pathomechanismen der CDG und die Therapieentwicklung Hauptgegenstand der Forschung sein. Bei frühzeitiger Diagnose könnte ein Therapiebeginn bereits in utero eine normale Entwicklung betroffener Individuen ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

- Adamowicz M, Pronicka E (1996) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome-like transferrin isoelectric focussing pattern in untreated fructosaemia. *Eur. J. Pediatr.* 155:347-348
- Akazawa S, Metzger BE, Freinkel N (1986) Relationships between Glucose and Mannose during Late Gestation in Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Diabetes Mellitus: Concurrent Concentrations in Maternal Plasma and Amniotic Fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62:984-989
- Ali M, Rellos P, Cox TM (1998) Hereditary fructose intolerance. *J. Med. Genet.* 35:353-365
- Alton G, Kjaergaard S, Etchison JR, Skovby F, Freeze HH (1997) Oral ingestion of mannose elevates blood mannose levels: a first step toward a potential therapy for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Biochem. Biomed. Med.* 60:127-133
- Alton G, Hasilik M, Niehues R, Panneerselvam K, Etchison JR, Fana F, Freeze HH (1998) Direct utilization of mannose for mammalian glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 8(3):285-95
- Anderson NL, Anderson NG (1979) Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and α_2 HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional elektrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88:258-265
- Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C (1999) Cerebellar atrophy: An important feature of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Pediatr. Radiol.* 29:194-198
- Barone R, Carchon H, Jansen E, Pavone L, Fiumara A, Bosshard NU, Gitzelmann R, Jaeken J (1998) Lysosomal enzyme activities in serum and leucocytes from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia (phosphomannomutase deficiency). *J. Inher. Metab. Dis.* 21:167-172
- Bause E, Legler G (1981) The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *Biochem. J.* 195:639-644
- Bause E, Hettkamp H, Legler G (1982) Conformational aspects of N-glycosylation of proteins. *Biochem. J.* 203:761-768
- Bause E (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. *Biochem. J.* 209:331-336
- Bergen HR, Lacey JM, O'Brien JF, Naylor S (2001) Online Single-Step Analysis of Blood Proteins: The Transferrin Story. *Anal. Biochem.* 296:122-129
- Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W (1998) Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.* 161:36-78

- Buckley RH (2000) Immunodeficiency with thrombocytopenia and eczema (Wiskott-Aldrich Syndrome). In: Behrmann RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg) Nelson textbook of pediatrics. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 16. Aufl, S 604
- Bunn HF, Higgins PJ, (1991) Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 213:222-224
- Burda P, Borsig L, Rij-van Andel J, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, Berger EG (1998) A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J. Clin. Invest.* 102(4):647-652
- Chapman AE, Calhoun IV JC (1988) Effects of glucose starvation and puromycin treatment on lipid-linked oligosaccharide precursors and biosynthetic enzymes in Chinese Hamster Ovary Cells in vivo and in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 260:320-333
- Carchon H, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J (1999) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia (phosphomannomutase-deficiency). *Biochim. Biophys. Acta* 1455:155-165
- Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B (1998) Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. *Glycobiology* 8:351-357
- Chen YT (2000) Defects in galactose metabolism. In: Behrmann RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg) Nelson textbook of pediatrics. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 16. Aufl, S 413
- Chui D, Oh-Eda M, Liao YF, Panneerselvam K, Lal A, Marek KW, Freeze HH, Moremen KW, Fukuda MN, Marth JD (1997) Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* 90:157-167
- Conradi N, de Vos R, Jaeken J, Lundin P, Kristiansson B, van Hoof F (1991) Liver pathology in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 375:50-54
- Cori CF (1925) The fate of sugar in the animal body. I. The rate of absorption of hexoses and pentoses from the intestinal tract. *J. Biol. Chem.* 66:691-715
- de Jong G, Feelders R, van Noort WL, van Eijk HG (1995) Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states. *Glycoconj. J.* 15:265-273
- de Koning TJ, Dorland L, van Diggelen OP, Boonman AMC, de Jong GJ, van Noort WL, de Schryver J, Duran M, van den Berg IET, Gerwig GJ, Berger R, Poll-The BT (1998) A novel disorder due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:38-42
- de la Fuente M, Peñas PF, Sols A (1986) Mechanism of mannose toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140:51-55

- de la Fuente M, Hernanz A (1988) Enzymes of mannose metabolism in murine and human lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer* 58:567-569
- de Lonlay P, Cuer M, Vuillaumier-Barrot S, Beaune G, Castelnau P, Kretz M, Durand G, Saudubray JM, Seta N (1999) Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign in phosphomannose isomerase deficiency: A new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. *J. Pediatr.* 135: 379-383
- de Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, de Paepe AM, Chan NW, Dacremont GA, van Coster RN (2000) A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 66(6):1744-1756
- Deuel HJ, Hallman LF, Murray S, Hilliard J (1938) Studies on Ketosis XV. The comparative metabolism of D-mannose and D-glucose. *J. Biol. Chem.*
- Dobbie JA, Holton JB, Clamp JR (1990) Defective galactosylation of proteins in cultured skin fibroblasts from galactosemic patients. *Ann. Clin. Biochem.* 27:315-332
- Doucey MA, Hess D, Cacan R, Hofsteenge (1998) Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol. Biol. Cell* 9,291-300
- Dupre T, Ogier-Denis E, Moore SEH, Cormier-Daire V, Dehoux M, Durand G, Seta N, Codogno P (1999) Alteration of mannose transport in fibroblasts from type I carbohydrate deficient glycoprotein syndrome patients. *Biochim. Biophys. Acta* 1453:369-377
- Durand G and Seta N (2000) Protein glycosylation and diseases: Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin. Chem.* 46:795-805
- Etchison JR and Freeze HH (1997) Enzymatic assay of D-mannose in serum. *Clin. Chem.* 43:533-538
- Fletcher LM, Matthijs G, Jaeken J, van Schaftingen E, Nelson PV (2000) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: Beyond the screen. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23:396-398
- Freeze HH, Aebi M (1999) Molecular basis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes type I with normal phosphomannomutase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1455:167-178
- Freinkel N, Lewis NJ, Akazawa S, Roth SI, Gorman L (1984) The honeybee syndrome - implications of the teratogenicity of mannose in rat-embryo culture. *N. Engl. J. Med.* 310:223-230
- Fu D, van Halbeek H (1992) N-Glycosylation site mapping of human serotransferrin by serial lectin affinity chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry, and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 206:53-63

- Fukuda MN, Masri KA, Dell A, Luzzatto L, Moremen KW (1990) Incomplete synthesis of N-glycans in congenital dyserythropoetic anemia type II caused by a defect in the gene encoding α -mannosidase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7443-7447
- Fukuda MN (1999) HEMPAS. *Biochim. Biophys. Acta* 1455:231-239
- Gasparini P, Miraglia del Giudice E, Delaunay J, Totaro A, Granatiero M, Melchionda S, Zelante L, Iolascon A (1997) Localization of the congenital dyserythropoetic anemia II locus to chromosome 20q11.2 by genomewide search. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1112-1116
- Gavel Y, von Heijne Gunnar (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Prot. Eng.* 3:433-442
- Gershman H, Robbins PW (1981) Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 256:7774-7780
- Gracy RW and Noltmann EA (1968) Studies on phosphomannose isomerase. I. Isolation, homogeneity measurements, and determination of some physical properties. *J. Biol. Chem.* 243:3161-3168
- Haase H, Wätjen W, Beyersmann D (2001) Zinc induces apoptosis that can be suppressed by lanthanum in C6 rat glioma cells. *Biol. Chem.* 382:1227-1234
- Hagberg BA, Blennow G, Kristiansson B, Stibler H (1993) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: peculiar group of new disorders. *Pediatr. Neurol.* 9:255-262
- Hammond C, Braakman I, Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:913-917
- Hanefeld F, Körner C, Holzbach-Eberle U, von Figura K (2000) Congenital disorder of glycosylation-Ic: case report and genetic defect. *Neuropediatrics.* 31(2):60-2.
- Hard MJ, Einarson TR, Koren G (2001) The role of acetaldehyde in pregnancy outcome after prenatal alcohol exposure. *Ther. Drug Monit.* 23:427-434
- Henry H, Tissot JD, Messerli B, Markert M, Muntau A, Skladal D, Sperl W, Jaeken J, Weidinger S, Heyne K, Bachmann C (1997) Microheterogeneity of serum glycoproteins and their liver precursors in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I: apparent deficiencies in clusterin and serum amyloid P. *J. Lab. Clin. Med.* 129:412-421

- Henry H, Froehlich F, Perret R, Tissot JD, Eilers-Messerli B, Lavanchy D, Dionisi-Vici C, Gonvers JJ, Bachmann C (1999) Mikroheterogeneity of serum glycoproteins in patients with chronic alcohol abuse compared with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Clin. Chem.* 45:1408-1413
- Hirschberg CB, Snider MD (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56:63-87
- Huang MM, Tsuboi S, Wong A, Yu XJ, Oh-Eda M, Derry JM, Francke U, Fukuda M, Weinberg KI, Kohn DB (2000) Expression of human Wiskott-Aldrich syndrome protein in patients' cells leads to partial correction of a phenotypic abnormality of cell surface glycoproteins. *Gene Ther.* 7:314-320
- Imbach T, Grünewald S, Schenk B, Burda P, Schollen E, Wevers RA, Jaeken J, de Klerk JBC, Berger EG, Matthijs G, Aebi M, Hennet T (2000a) Multi-allelic origin of congenital disorder of glycosylation (CDG)-Ic. *Hum. Genet.* 106:538-545
- Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grünewald S, Bailie NM, King MD, Jaeken J, Matthijs G, Berger EG, Aebi M, Hennet T (2000b) Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J. Clin. Invest.* 105:233-239
- Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P (1997) Exclusion of three candidate genes as determinants of congenital dyserythropoetic anemia type II (CDA-II). *Blood* 90:4197-4200
- Iolascon A, DeMattia D, Perrotta S, Carella M, Gasparini P, Deliliers GL (1998) Genetic heterogeneity of congenital dyserythropoetic anemia type II. *Blood* 92:2593-2594
- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P (1980) Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TGB deficiency, increased serum arylsulfatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr. Res.* 14:179
- Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E (1984) Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin. Chim. Acta* 144(2-3):245-247
- Jaeken J, Kint J, Spaapen L (1992) Serum lysosomal enzyme abnormalities in galactosemia. *Lancet* 340:1472-1473
- Jaeken J, Carchon H, Stibler H (1993) The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: pre-golgi and golgi disorders? *Glycobiology* 3:423-428
- Jaeken J, Carchon H (1993) The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. *J. Inher. Metab. Dis.* 16:813-820
- Jaeken J, Schachter H, Carchon H, de Cock P, Coddeville B, Spik G (1994) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II: A deficiency in golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Arch. Dis. Child.* 71:123-127

- Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E (1996) Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: An explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr. Res.* 40:764-766
- Jaeken J, Artigas J, Barone R, Fiumara A, de Koning TJ, Poll-The BT, de Rijk-van Andel JF, Hoffmann GF, Assmann B, Mayatepek E, Pineda M, Vilaseca MA, Saudubray JM, Schlüter B, Wevers R, van Schaftingen E (1997) Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectric focussing pattern of serum sialotransferrins. *J. Inher. Metab. Dis.* 20:447-449
- Jaeken J, Matthijs G, Saudubray JM, Dionisi-Vici C, Bertini E, de Lonlay P, henri H, carchon H, Schollen E, van Schaftingen E (1998) Phosphomannose isomerase deficiency: A carbohydrate-deficient glycoproteine syndrome with hepatic-intestinal presentation. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1535-1539
- Kim S, Westphal W, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Karnes PS, Patterson MC, Freeze HH (2000) Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). *J. Clin. Invest.* 105:191-198
- Knauer R, Lehle L, Hanefeld F, von Figura K (1994) Normal N-oligosaccharyltransferase activity from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Inher. Metab. Dis.* 17:541-544
- Körner C, Lehle L, von Figura K (1998a) Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. *Glycobiology.* 8(2):165-71.
- Körner C, Lehle L, von Figura K (1998b) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose. *Glycoconj J.* 15(5):499-505.
- Körner C, Knauer R, Holzbach U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K (1998c) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichyl-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(22):13200-5.
- Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, von Figura K (1999a) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J.* 18(23):6816-22.
- Körner C, Linnebank M, Koch HG, Harms E, von Figura K, Marquardt T (1999b) Decreased availability of GDP-L-fucose in a patient with LAD II with normal GDP-D-mannose dehydratase and FX protein activities. *J Leukoc Biol.* 66(1):95-8.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54:631-64

- Krasnewich DM, Holt GD, Brantly M, Skovby F, Redwine J, Gahl WA (1995) Abnormal synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Glycobiology* 5(5):503-510
- Knopf C, Rod R, Jaeken J, Berant M, van Schaftingen E, Fryns JP, Brill-Zamir R, Gershoni-Baruch R, Lischinsky S, Mandel H (2000) Transferrin protein variant mimicking carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome in trisomy 7 mosaicism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23:399-403
- Landberg E, Pålsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppsson JO (1995) Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210(2):267-274
- Löffler G (1990) Intermediärstoffwechsel II: Kohlenhydrate. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) *Physiologische Chemie*. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, 4. Aufl, S 349-390
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with folin reagents. *J. Biol. Chem.* 193:263-275
- Lübke T, Marquardt T, von Figura K, Körner C (1999) A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *J. Biol. Chem.* 274(37):25986-25989
- Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc (LAD II), a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat. Genet.* 28(1):73-76
- Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D (2001) The defective gene in leucocyte adhesion deficiency II codes for a GDP-fucose transporter. *Nat. Genet.* 28(1):69-72
- MacGillivray RTA, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K (1983) The primary structure of human serum transferrin. *J. Biol. Chem.* 258:3543-3553
- Marquardt T, Helenius A (1992) Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 117(3):505-13
- Marquardt T, Ullrich K, Zimmer P, Hasilik A, Deufel T, Harms E (1995) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome (CDGS) - glycosylation, folding and intracellular transport of newly synthesized glycoproteins. *Eur. J. Cell Biol.* 66:268-273
- Marquardt T, Hasilik M, Niehues R, Herting M, Muntau A, Holzbach U, Hanefeld F, Freeze H, Harms E (1997) Mannose therapy in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I - first results of the german multicenter study. *Amino Acids* 12:389

- Marquardt T, Lühn K, Srikrishna G, Freeze HH, Harms E, Vestweber D (1999) Correction of leucocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood* 94:3976-3985
- Marquardt T and Freeze HH (2001) Congenital disorders of glycosylation: Glycosylation defects in man and biological models for their study. *Biol. Chem.* 382:161-177
- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, van Schaftingen E (1997a) Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat. Genet.* 16:88-92
- Matthijs G, Schollen E, Pirard M, Budarf ML, van Schaftingen E, Cassiman JJ (1997b) PMM (PMM1), the homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* 40:41-47
- Matthijs G, Schollen E, van Schaftingen E, Cassiman JJ, Jaeken J (1998) Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia. *Am. J. Hum. Genet.* 62:542-550
- Mayatepek E, Schröder M, Kohlmüller D, Bieger WP, Nützenadel W (1997) Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Acta Paediatr.* 86:1138-1140
- Mayatepek E, Kohlmüller D (1998) Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 157:605-612
- McGovern MM, Desnick RJ (2000) Mucopolidoses. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg) *Nelson textbook of pediatrics*. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 16. Aufl, S 405
- Mendicino J, Rao AK (1975) Regulation of the synthesis of nucleoside diphosphate sugars in reticulo-endothelial tissues. *Eur. J. Biochem.* 51:547-556
- Montgomery RR, Scott JP (2000) Congenital Thrombocytopenic Syndromes. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg) *Nelson textbook of pediatrics*. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 16. Aufl, S 1522-1523
- Moore SE, Spiro RG (1994) Intracellular compartmentalization and degradation of free polymannose oligosaccharides released during glycoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269:12715-12721
- Münster AK, Eckhardt M, Potvin B, Mühlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionary conserved structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(16):9140-9145

- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, Marquardt T (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest.* 101(7):1414-20.
- Ogier-Denis E, Blais A, Houri JJ, Voisin T, Trugnan G, Codogno P (1994) The emergence of a basolateral 1-deoxymannojirimycin-sensitive mannose carrier is a function of intestinal epithelial cell differentiation. Evidence for a new inhibitory effect of 1-deoxymannojirimycin on facilitative mannose transport. *J. Biol. Chem.* 269:4285-4290
- Okamoto N, Wada Y, Kobayashi M, Otani K, Tagawa T, Futagi Y, Imayoshi Y, Hayashi A, Shimizu A, Kato Y (1993) Decreased blood coagulation activities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Inher. Metab. Dis.* 16:435-440
- Ornstein KS, McGuire EJ, Berry GT, Roth S, Segal S (1992) Abnormal galactosylation of complex carbohydrates in cultured fibroblasts from patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Pediatr. Res.* 31:508-511
- Panneerselvam K and Freeze HH (1995) Enzymes involved in the synthesis of mannose-6-phosphate from glucose are normal in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:517-522
- Panneerselvam K and Freeze HH (1996a) Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 97(6):1478-1487
- Panneerselvam K and Freeze HH (1996b) Mannose enters mammalian cells using a specific transporter that is insensitive to glucose. *J. Biol. Chem.* 271(16):9417-9421
- Panneerselvam K, Etchison JR, Freeze HH (1997) Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 272(37):23123-23129
- Participants of the "First International Workshop on CDGS", Leuven, Belgium, November 12-13, 1999 (1999) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome becomes congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycokonj. J.* 16(11):669-671
- Participants of the "First International Workshop on CDGS", Leuven, Belgium, November 12-13, 1999 (2000) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. *Glycobiology* 10:iii-vi- Pirard M, Collet JF, Matthijs G, van Schaftingen E (1997) Comparison of PMM1 with the phosphomannomutases expressed in rat liver and in human cells. *FEBS Lett.* 411:251-254

- Petry KG, Reichardt JKV (1998) The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. *Trends Genet.* 14:98-102
- Pirard M, Matthijs G, Heykants L, Schollen E, Grünewald S, Jaeken J, van Schaftingen E (1999a) Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett.* 452:319-322
- Pirard M, Achouri Y, Collet JF, Schollen E, Matthijs G, van Schaftingen E (1999b) Kinetic properties and tissular distribution of mammalian phosphomannomutase isozymes. *Biochem. J.* 339:201-207
- Powell LD, Panneerselvam K, Vij R, Diaz S, Manzi A, Buist N, Freeze HH, Varki A (1994) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? *J. Clin. Invest.* 94:1901-1909
- Pritchard JB, Booz GW, Kleinzeller A (1982) Renal sugar transport in the winter flounder VI. Reabsorption of D-mannose. *Am. J. Physiol.* 242:F415-422
- Proudfoot AEI, Turcatti G, Wells TNC, Payton MA, Smith DJ (1994) Purification, cDNA cloning and heterologous expression of human phosphomannose isomerase. *Eur. J. Biochem.* 219:415-423
- Rager MN, Binet MRB, Ionescu G, Bouvet OMM (2000) ³¹P-NMR and ¹³C-NMR studies on mannose metabolism in *Plesiomonas shigelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267:5136-5141
- Raiola AM, van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Benvenuto F, Figari O, Mordini N, Berisso G, Bregante S, Frassoni F, Bacigalupo A (2000) Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 85:59-62
- Rearick JI, Fujimoto K, Kornfeld S (1981a) Identification of the mannosyl donors involved in the synthesis of lipid-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 256(8):3762-3769
- Rearick JL, Chapman A, Kornfeld S (1981b) Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 256:6255-6261
- Rosti V (2000) The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 85:82-87
- Rush JS, Panneerselvam K, Waechter CJ, Freeze HH (2000) Mannose supplementation corrects GDP-mannose deficiency in cultured fibroblasts from some patients with congenital disorders of glycosylation (CDG). *Glycobiology* 10(8):829-835
- Schachter H, Jaeken J (1999) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II. *Biochim. Biophys. Acta* 1455:179-192

- Seta N, Barnier A, Hochedez F, Besnard MA, Durand G (1996) Diagnostic value of western blotting in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Clin. Chim. Acta* 254:131-140
- Shelikoff M, Sinskey AJ, Stephanopoulos G (1996) A modeling framework for the study of protein glycosylation. *Biotech. Bioeng.* 50:73-90
- Silberstein S, Gilmore R (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FasebJ.* 10:849-858
- Silverman M, Aganon MA, Chinard FP (1970) Specificity of monosaccharide transport in the dog kidney. *Am. J. Physiol.* 218(3):743-750
- Smith DJ, Proudfoot A, Friedli L, Klig LS, Paravicini G, Payton MA (1992) PMI40, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. *Mol. Cell Biol.* 12:2924-2930
- Steinlin M, Blaser S, Boltshauser E (1998) Cerebellar involvement in metabolic disorders: A pattern-recognition approach. *Neuroradiology* 40:347-354
- Stibler H, Borg S (1986) Carbohydrate composition of transferrin in alcoholic patients. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10:61-64
- Stibler H, Jaeken J (1990) Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome. *Arch. Dis. Child.* 65:107-111
- Stibler H, Borg S (1991) Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls. *Scand. J. Clin. Invest.* 51:43-51
- Stibler H (1991) Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin. Chem.* 37:2029-2037
- Stibler H, Blennow G, Kristiansson B, Lindehammer H, Hagberg B (1994) Clinical expression in adults with a new metabolic disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57:552-556
- Stibler H, Stephani U, Kutsch U (1995) Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome - A fourth subtype. *Neuropediatrics* 26, 235-237
- Stibler H, Holzbach U, Tengborn L, Kristiansson B (1996) Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7:118-126
- Stibler H, von Döbeln U, Kristiansson B, Guthenberg C (1997) Carbohydrate-deficient transferrin in galactosaemia. *Acta Paediatr.* 86:1377-1378
- Stoll BJ, Kliegmann RM (2000) Metabolic disturbances. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg) *Nelson textbook of pediatrics*. W.B. Saunders Company, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 16. Aufl, S 528-531

- Sturla L, Etzioni A, Bisso A, Zanardi D, De Flora G, Silengo L, De Flora A, Tonetti M (1998) Defective intracellular activity of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase in leucocyte adhesion deficiency type II syndrome. *FEBS Lett.* 429:274-278
- Sturla L, Puglielli L, Tonetti M, Berninsone P, Hirschberg CB, De Flora A, Etzioni A (2001) Impairment of the Golgi GDP-L-fucose transport and unresponsiveness to fucose replacement therapy in LAD II patients. *Pediatr Res* 49(4):537-42
- Tan J, Dunn J, Jaeken J, Schachter H (1996) Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am. J. Hum. Genet.* 59:810-817
- Tatu U, Helenius A (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 136(3):555-565
- Turco SJ (1980) Modification of oligosaccharide-lipid synthesis and protein glycosylation in glucose-deprived cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 330-339
- van Schaftingen E, Jaeken J (1995) Phosphomannomutase deficiency is a cause of Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome type I. *FEBS Lett.* 377:318-320
- Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3(2):97-130
- Velasco A, Hendricks L, Moremen KW, Tulsiani DRP, Touster O, Farquhar MG (1993) Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of α -mannosidase I and II. *J. Cell Biol.* 122:39-51
- von Figura K, Hasilik A (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55:167-93
- Wada Y, Nishikawa A, Okamoto N, Inui K, Tsukamoto H, Okada S, Taniguchi N (1992) Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:832-836
- Wada Y, Gu J, Okamoto N (1994) Diagnosis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Biol. Mass Spec.* 23:108-109
- Wada Y and Sakamoto M (1997) Isolation of the human phosphomannomutase gene (PMM1) and assignment to chromosome 22q13. *Genomics* 39:416-417
- Wells TNC, Coulin F, Payton MA, Proudfoot AEI (1993) Phosphomannose Isomerase from *Saccharomyces cerevisiae* Contains Two Inhibitory Metal Ion Binding Sites. *Biochemistry* 32:1294-1301
- Wilson TH and Vincent TN (1955) Absorption of sugars in vitro by the intestine of the golden hamster. *J. Biol. Chem.*

- Winchester B, Clayton P, Mian N, di-Tomaso E, Dell A, Reason A, Keir G (1995) The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: an experiment of nature in glycosylation. *Biochem. Soc. Trans.* 23:185-188
- Wood FC and Cahill GF (1963) Mannose utilization in man. *J. Clin. Invest.* 42:1300-1312
- Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, Fukushima K, Yuasa I, Ohno K, Takeshita K (1993a) Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J. Biol. Chem.* 268(8):5783-5789
- Yamashita K, Ohkura T, Ideo H, Ohno K, Kanai M (1993b) Electrospray ionization-mass spectrometric analysis of serum transferrin isoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Biochem.* 114:766-769
- Yasugi E, Nakasuji M, Dohi T, Oshima M (1994) Major defekt of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome is not found in the synthesis of dolichyl phosphate or N-acetylglucosaminyl-pyrophosphoryl-dolichol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200(2):816-820
- Young G and Driscoll MC (1999) Coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: case report and review of the literature. *Am. J. Hematol.* 60:66-69
- Young NS, Maciejewski JP (2000) Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes "Why? Why? Why?". *J. Clin. Invest.* 106: 637-641

Folgenden Personen sei für Ihre Unterstützung gedankt:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Erik Harms für die Möglichkeit die Dissertation unter Anleitung durch Thorsten Marquardt in der Kinderklinik der Unikliniken Münster durchzuführen.

Thorsten Marquardt für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas. Danken möchte ich ihm für die lange und geduldige Betreuung der Doktorarbeit, seine Ratschläge, seine Unterstützung diverser Auslandsaufenthalte und seine Freundschaft.

Prof. Dr. med. Hinrich K. Harms für die Betreuung des CDG-Ib Patienten und die Kooperation bei der Aufklärung der Erkrankung.

Prof. Dr. med. H. Neumann für die Bereitstellung von Probenmaterial aus der Abteilung für Innere Medizin des Elisabeth Hospitals in Bochum.

Dr. med. Y. Shin für die Bereitstellung der Galaktosämieproben.

Ralf Niehues für eine lange Freundschaft und die schöne und produktive Zeit im Labor in Münster und San Diego.

Hans-Georg Koch für praktische Ratschläge und Unterstützung im Labor.

Martina Herting und Vera Sablitzky für die viele Hilfe im Labor und in frustranen Zeiten.

Meinem "Bruder" Hugo Vautrin für die enorme Hilfe bei Korrektur und Formatierung der Arbeit.

Kurt von Figura und Christian Körner für die geduldige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Ausbildung nach meinem Wechsel in die Biochemie II in Göttingen.

Torben Lübke, Anna lena Illert, Judith Blanz, Bengt Hanßke, Jan Rindermann und Christian Thiel für die freundliche Aufnahme in Göttingen.

Meinem Bruder Albert für den seelischen Beistand und die wertvolle Korrekturhilfe.

Und ganz besonders meinen Eltern für Ihre Liebe und Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Martin Hasilik
Geburtsdatum/-ort: 2. August 1971, Freiburg im Breisgau
Eltern: Prof. Dr. Andrej Hasilik, Dr. Anna Hasilik, geb. Dvorzakova
Geschwister: Albert Hasilik, stud. iur.

Schulische Ausbildung

1977 - 1979 Grosvenor Elementary School in Bethesda, MD, USA
1979 - 1981 St. Michael Grundschule in Münster
1981 - 1990 Gymnasium Paulinum in Münster; Abschluß: Abitur

Hochschulausbildung

1991 - 1998 Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum (RUB): Physikum (08/93), 1. Staatsexamen (03/95),
2. Staatsexamen (03/98)
10/94 - 12/94 Forschungsaufenthalt in der Abteilung von Dr. W.A. Gahl am National Institutes of Health, NICHD, Bethesda, MD, USA
04/95 - 11/98 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Marquardt in der Kinderklinik der Universitätsklinik Münster
Thema: Neue Typen des Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome (CDGS)
07/96 - 10/96 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. H.H. Freeze am "TheBurnham Institute" in San Diego, CA, USA
1998 - 1999 Hochschulwechsel: Praktisches Jahr an der Uniklinik der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster (WWU)
Wahlfach: Pädiatrie; 3. Staatsexamen (05/99)
10/98 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. H.H. Freeze am "TheBurnham Institute" in San Diego, CA, USA

Berufliche Praxis

08/99 - 10/00 Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde der Unikliniken Münster
11/00 - 01/01 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Biochemie II der Georg-August Universität Göttingen
02/01 - 04/01 Fortsetzung der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Kinderklinik der Georg-August Universität Göttingen
seit 05/01 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Biochemie II der Georg-August Universität Göttingen

Göttingen, 10.11.2001