MINI-ISOELEKTROFOKUSSIERUNG VON SERUM-TRANSFERRIN BEI PATIENTEN MIT CDG-SYNDROM: BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG UND KINETISCHE UNTERSUCHUNG DER ENZYME PHOSPHOMANNOMUTASE UND PHOSPHOMANNOISOMERASE

CHRISTINA WIESCHER

Aus der Kinder- und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Universität München

MINI-ISOELEKTROFOKUSSIERUNG VON SERUM-TRANSFERRIN BEI PATIENTEN MIT CDG-SYNDROM: BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG UND KINETISCHE UNTERSUCHUNG DER ENZYME PHOSPHOMANNOMUTASE UND PHOSPHOMANNOISOMERASE

DISSERTATION
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Wiescher
aus Fürstenfeldbruck
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. Yoon Shin
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Hofmann
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2003

Im Rahmen der Entstehung dieser Arbeit möchte ich mich ganz besonders bedanken bei:

Frau Prof. Dr. Yoon S.Shin,
die durch ihre intensive Betreuung die Durchführung meiner Experimente erst ermöglichte. Ohne ihre freundliche und aktive Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Franz Jansen und Jan Tausendfreund,
die mir neben ihrer unkomplizierten Einführung in biochemisch-technische Fragen bei anstehenden Problemen im Labor stets zur Seite standen

meinen Eltern,
für gleichbleibende Geduld und liebevolle Unterstützung

meiner Schwester Katharina,
für entspannende Pausen und aufmunternde Gespräche

meinem Schwager Wolfgang für die EDV-technische Unterstützung

Gewidmet meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung 7

1.1. Synthese der N-Glykane 7

1.2. Störung der N-Glykansynthese 7

1.3. Isoelektrofokussierung von Transferrin 8

1.4. CDG-Syndrom 10

1.4.1. CDG Ia 11

1.4.2. CDG Ib 13

1.5. Stoffwechselwege der Galaktose 15

1.5.1. Klassische Galaktosämie 15

1.5.2. UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel 16

2. Zielsetzung 18

3. Methoden 19

3.1. Isoelektrofokussierung 19

3.2. Enzymanalyse 21

3.2.1.Phosphomannomutase 21

3.2.2.Phosphomannoisomerase 23

3.3. Probenvorbereitung 24

3.3.1. Leukozytenpräparation 24

3.3.2. Kultivierung der Fibroblasten 24

3.3.3. Kultivierung von Chorionzotten 25

3.3.4. Proteinbestimmung nach Lowry 26

3.3.5. Berechnung der Enzymaktivität 27

4. Material 28

4.1. Isoelektrofokussierung 28

4.2. Enzymmessung 28

4.3. Kultivierung der Fibroblasten und Chorionzotten 29

5. Patienten 30
5.1. CDG 30
5.2. Epimerase-Mangel 32
5.3. Galaktosämie durch Uridyltransferase-Mangel 32
6. Ergebnisse 34
6.1. Isoelektrofokussierung von Plasma-Transferrin (IEFT) 34
6.2. Biochemische Charakterisierung von PMM und PMI 41
6.2.1 Proteinabhängigkeit Phosphomannomutase 41
6.2.2. Kinetische Eigenschaft 45
6.3. Aktivitätsbereich 48
6.3.1. PMM-Aktivität 48
6.3.2. PMI-Aktivität 48
6.3.3. PMM und PMI bei Patienten mit CDG-typischem Muster in der Mini-IEF 50
7. Diskussion 51
7.1. Mini-Isoelektrofokussierung im PhastSystem 51
7.2. Charakterisierung der Enzyme 52
7.3. Aktivität der PMM und PMI 52
8. Zusammenfassung 54
9. Literaturverzeichnis 56

1. EINLEITUNG

Viele Proteine müssen posttranslational modifiziert werden, um ihre spezielle Funktion im Organismus aufnehmen zu können. Die meisten Membranproteine und extrazellulären Proteine sowie einige intrazelluläre Proteine werden glykosyliert. Je nach Bindungsart an das Protein unterscheidet man zwei Typen: die Sauerstoff (O)- und die Stickstoff (N)-gebundenen Glykane.

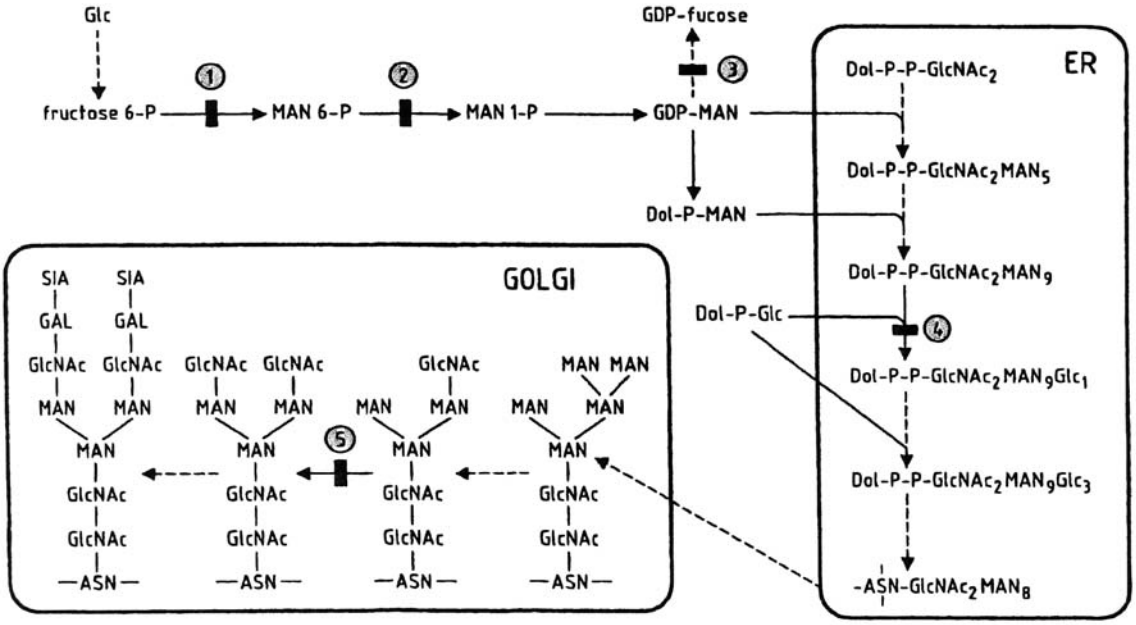
1.1. Synthese der N-Glykane

N-Glykane sind antennenartig verzweigte Oligosaccharidstrukturen, die durch Anknüpfung an die Stickstoffgruppe des Asparagins zur Entstehung glykosylierter Proteine beitragen. Ihre Synthese gehört zu den längsten bekannten Stoffwechselwegen und beinhaltet über 40 enzymatische Reaktionen und Transportschritte. Die N-Glykansynthese durchläuft nacheinander drei zelluläre Kompartimente (Figur 1): Zytosol, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex (7).

1.2. Störung der N-Glykansynthese

Die Glykane sind entscheidend verantwortlich für den intakten Stoffwechsel, die Struktur und die Funktion von Glykoproteinen und beeinflussen sie auf vielfältige Weise. Die Schwere der Krankheitsbilder bei Störungen der N-Glykansynthese in erblichen Erkrankungen des Stoffwechsels führt ihre Bedeutung eindringlich vor Augen.
In den vergangenen Jahren wurden mehrere angeborene Stoffwechselerkrankungen entdeckt, deren Ursache in einer defekten Synthese von Oligosaccharidketten N-gebundener Glykoproteine liegt. Man bezeichnet sie deshalb als „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG). Die klassische Galaktosämie führt auf ähnliche Weise zu sekundären Glykosylierungsstörungen.
Die erblichen Defekte der N-Glykansynthese machen eine große Gruppe von Krankheiten aus, die unterschiedlichste Phänotypen besitzen und sich mit hoher Geschwindigkeit ausbreiten. Wahrscheinlich sind die bislang beschriebenen Krankheitsfälle nur die Spitze eines riesigen unerforschten Eisberges. Um die Forschung voranzutreiben und bislang unerkannte Fälle aufzuspüren, sollen möglichst viele Patienten mit Stoffwechselerkrankungen

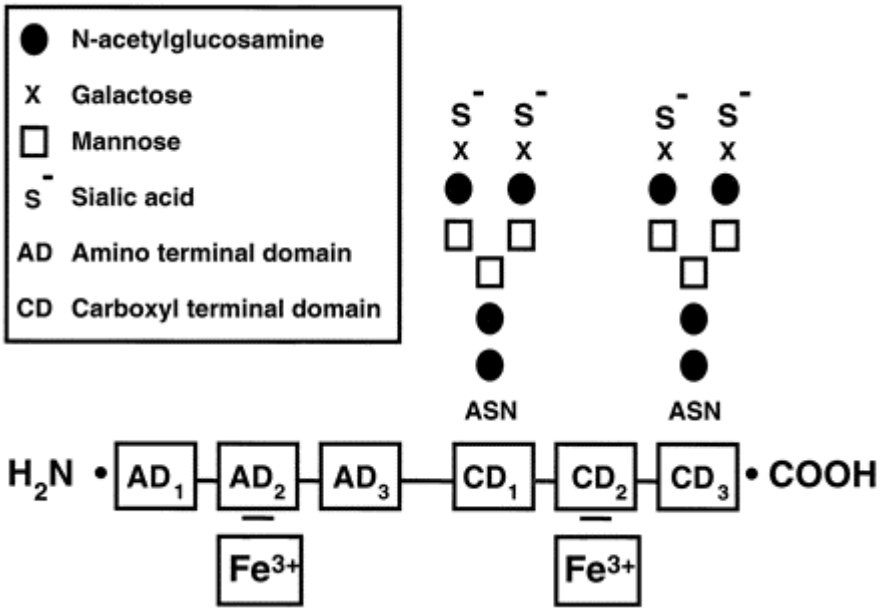
ungeklärter Ursache auf eine eventuelle Störung der N-Glykosylierung hin untersucht werden (23).



Figur 1. Schematische Darstellung der Synthese von N-Glykanen. Bekannte Defekte sind durch Balken und Nummern angezeigt. ASN, Asparagin; Dol, Dolichol; ER, Endoplasmatisches Retikulum; GAL, Galaktose; Glc, Glukose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; GDP, Guanosindiphosphat; MAN, Mannose; P, Phosphat; SIA, Sialinsäure; 1) Phosphomannoseisomerase-Mangel; 2) Phosphomannomutase-Mangel; 3) Leukozyten-Adhäsionsmangel-Syndrom Typ II; 4) im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierter Mangel an Glucosyltransferase; 5) im Golgi-Apparat lokalisierter Mangel an N-Acetylglucosaminyltransferase (7).

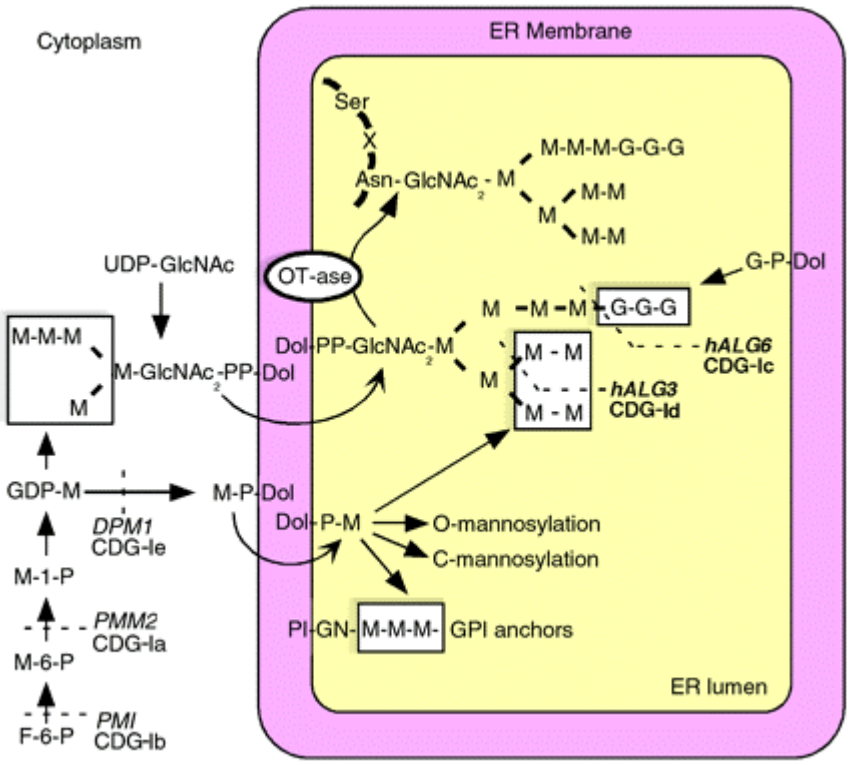
1.3. Isoelektrofokussierung von Transferrin

Für die Suche nach Glykosylierungsdefekten eignet sich die isoelektrische Auftrennung von Serumsialotransferrin, weil es aufgrund des Fehlens von Zuckerresten bei Glykosylierungsstörungen seinen isoelektrischen Punkt in charakteristischer Weise verändert. Transferrin, ein eisentransportierendes Serumglykoprotein, besitzt normalerweise vier endständige Sialinsäurereste, die alle negativ geladen sind (Figur 2).



Figur 2. Ein Teil der Transferrin-Struktur

Die Primärstruktur von Transferrin hat drei NH2-terminale Domänen (*AD_1–AD_3*) und drei COOH-terminale Domänen (*CD_1–CD_3*). Die Bindungsstellen für Eisen und die Glykosylierungsorte von Asparagin sind gekennzeichnet (25). Durch mangelnde Kohlenhydrat-Verknüpfung sind bei Patienten mit Glykosylierungsstörungen diese Sialinsäurereste reduziert oder sie fehlen ganz. In der Isoelektrofokussierung wandert das Transferrin nun im elektrischen Feld aufgrund seiner weniger negativen Ladung weiter in Richtung Kathode. Das dadurch entstehende Bandenmuster wird in Typ I (Vermehrung von Asialo- und Disialotransferrin) und Typ II (Erhöhung des Tri- und Monosialotransferrins) unterschieden und ist jeweils für eine bestimmte Gruppe von Glykosylierungsstörungen charakteristisch. Um schließlich die exakte Diagnose stellen zu können, ist zusätzlich zur Auftrennung des Serumtransferrins (und der meist charakteristischen Klinik) die Darstellung des zugrundeliegenden Enzymmangels notwendig. Dies geschieht durch biochemischen Nachweis des Aktivitätsverlustes eines wichtigen Enzyms oder die molekulargenetische Bestätigung einer Mutation in der Genregion, die für die Entstehung des Enzyms verantwortlich ist. Figur 3 veranschaulicht die möglichen Enzymdefekte bei CDG.



Figur 3. Übersicht der betroffenen Reaktionsschritte bei CDG-Syndrom I (36)

1.4. CDG-Syndrom

Der Name CDG-Syndrom steht seit 1999 für „Congenital Disorder of Glycosylation“, früher „Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome“ genannt, und bezeichnet eine Gruppe sich rasch ausbreitender angeborener Stoffwechselerkrankungen, die 1980 erstmals von Jaak Jaeken beschrieben wurden (18).

Wie der Name bereits sagt, besteht die biochemische Besonderheit dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheitsgruppe in einer verminderten Glykosylierung von Glykoproteinen. Je nach Erkrankungstyp sind die Kohlenhydratseitenketten der Proteine entweder verkürzt oder sie fehlen vollständig. Das CDG-Syndrom beeinträchtigt alle Organe des Körpers; der Schweregrad der klinischen Ausprägung ist von Patient zu Patient verschieden und das Erscheinungsbild der CDG-Untergruppen variiert stark. In den meisten Fällen ist die Funktion des zentralen und peripheren Nervensystems betroffen. Viele Patienten haben Gleichgewichts- und Koordinationsschwierigkeiten. Eine ausgeprägte Muskelschwäche in den Beinen erschwert die Fähigkeit überhaupt zu laufen oder zu sitzen. Bei einem Großteil

der Patienten wird eine unterschiedlich ausgeprägte geistige und körperliche Behinderung mit Einschränkung der Sehfähigkeit beobachtet.
Die aktuelle Nomenklatur unterteilt das CDG-Syndrom in zwei Gruppen (CDG I und II), je nachdem ob die Fett-gebundene Oligosaccharidsynthese und der Transfer oder aber das Trimmen Protein-gebundener Oligosaccharide bzw. deren Glykosylierung betroffen ist (4). Folgende Zusammenfassung in Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick der Enzymdefekte bei CDG.

Tabelle 1. CDG-Untergruppen und jeweils zugrundeliegender Enzymdefekt.

Enzymdefekt	Typ
Phosphomannomutase	Ia
Phosphomannoisomerase	Ib
Alpha-1,3-Glukosyltransferase	Ic
a-1,3-Mannosyltransferase	Id
Dolichol-P-Mannose-Synthase	Ie
GlcNAc-Transferase II	IIa
Glucosidase I	IIb

Zwei der Typ I-CDG-Syndrome entstehen durch mangelhafte Mannose-Bereitstellung für die Glykosyl-Transfer-Reaktionen aufgrund eines Defekts in der Umwandlung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat durch die Phosphomannomutase bei CDG Ia oder der Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat zu Mannose-6-Phosphat durch die Phosphomannoseisomerase bei CDG Ib (8).

Das folgende Kapitel bietet einen Einblick in die Ursache, Symptomatik, Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten derjenigen Krankheitsbilder, denen ein Phosphomannomutase- oder Phosphomannoisomerasemangel zugrunde liegt.

1.4.1. CDG Ia

Am häufigsten ist das CDG-Syndrom Typ Ia (ca 80% der Fälle), dem ein Mangel an Phosphomannomutase (PMM) zugrundeliegt. Die genetischen Untersuchungen der Patienten mit CDG Ia erbrachten eine Mutation im Chromosom 16p13 (PMM 2) (19) bzw. in der

Genregion 22q13 (PMM 1), welches für das Enzym Phosphomannomutase kodiert (42, 32, 33).

Die Phosphomannomutase ist ein Enzym, das Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat umwandelt und es wird für die Synthese von GDP-Mannose, einem wichtigen Substrat der Biosynthese des Dolichol-gebundenen Oligosaccharides Glc3Man9GlcNAc2 benötigt. Dieses Oligosaccharid ist Donor bei der N-Glykosylierung von Proteinen.

Hier folgt eine kurze Darstellung des Reaktionsweges, an dem die Phosphomannomutase beteiligt ist:

Phosphomannomutase

Mannose-6-P ⟷ Mannose-1-P ⟷ GDP-Mannose ⟷ N-Glykosylierung

Fällt die Phosphomannomutase aufgrund eines Gendefekts aus, so ist die Funktion von vielen Proteinen wie zum Beispiel Hormonen, Transport- und Membranproteinen, Enzymen und Enzyminhibitoren stark beeinträchtigt, weil diese glykosyliert werden müssen, bevor sie ihre Funktion im Organismus aufnehmen können (3). Da Glykoproteine an vielen Stellen des Stoffwechsels fungieren, gestaltet sich das klinische Bild des CDG-Syndroms mannigfaltig: Die Klinik des CDG Typ Ia besitzt zwei unterschiedlich schwere Ausprägungen: Eine leichtere neurologische Form, bei der psychomotorische Retardierung, Strabismus, zerebelläre Hypoplasie und Retinitis pigmentosa im Vordergrund stehen. Zum anderen gibt es eine schwere multiviszerale Form mit neurologischen und extraneurologischen Manifestationen einschließlich Leber-, Herz- Nieren- und Darmbeteiligung (29). Die Kinder fallen bereits im Neugeborenenalter durch Entwicklungs- und Gedeihstörungen, Hypotonie, und eingezogene Brustwarzen auf. Ein beidseitiges Einwärtsschielen, halbmondförmige Augen und ein prominentes Kinn sind typische Merkmale fazialer Dysmorphien. Häufig sieht man in der Gesäßregion dicke Fettpolster. Eine Vielzahl sekretorischer Proteine ist abnormal (20).

In seiner gravierendsten Ausprägung äußert sich das CDG-Syndrom als olivopontozerebelläre Atrophie, die bereits im Neugeborenenalter einsetzt (1, 12, 17). Damit verbunden sein kann eine lebensbedrohliche hypertrophische obstruktive Kardiomyopathie, Pleura- und Perikardergüsse sowie eine Leberzirrhose (5) und gelegentlich Nierenzysten (4). Einige

Kinder sterben an Infektionen oder an der Folge chirurgischer Eingriffe (1). Das CDG-Syndrom verläuft in mehreren Stadien: Im Kleinkindalter überwiegen die Symptome innerer Organe, was meist lebenbedrohlich ist. Im späteren Kindesalter stehen die zerebelläre Ataxie, geistige Behinderung sowie eine langsam fortschreitende Neuropathie der unteren Gliedmaßen, eine Pigmentdegeneration der Retina und sekundäre Skelettdeformitäten im Vordergrund. In der Pubertät und im Erwachsenenalter ist der Zustand meist gleichbleibend (11). Aufgrund eines FSH-Mangels kommen weibliche Patienten oft nicht in die Pubertät. Leider steht für das CDG Ia derzeit keine kausale Therapie zur Verfügung. Man kann den Patienten lediglich durch supportive Maßnahmen helfen, mit ihren Behinderungen das tägliche Leben besser zu meistern.

Äußert sich klinisch der Verdacht auf ein CDG-Syndrom, so folgt die weiterführende Diagnostik: Die für das CDG-Syndrom namensgebende mangelhafte Glykosylierung von Serumproteinen, kann für die Darstellung von krankhaftem Transferrin in der Isoelektrofokussierung genutzt werden (19). Die veränderten Transferrin-Banden können mittels Densitometrie quantifiziert werden (22). Ein ähnliches Bandenmuster wie beim „Congenital Disorder of Glycosylation“ zeigt sich bei chronischem Alkoholismus, unbehandelter Galaktosämie und erblicher Fruktose-Intoleranz.

Neben den oben genannten Abnormalitäten der Serum-Glykoproteine weisen die Ergebnisse der Laboruntersuchungen erhöhte Serumtransaminasen, eine Hypoalbuminämie und eine tubuläre Proteinurie auf. Für die Unterscheidung, welchem CDG-Untertyp das vorliegende Krankheitsbild angehört, liefert die klinische Symptomatik erste Anhaltspunkte. Um die Diagnose zu sichern und um den CDG-Untertyp Ia zu beweisen, dem ein Phosphomannomutase-Mangel zugrunde liegt, wird die Aktivität dieses Enzyms in Leukozyten und Fibroblasten gemessen (42).

1.4.2. CDG Ib

Der Typ Ib des „Congenital Disorder of Glycosylation“ tritt seltener auf als das CDG Ia. Biochemisch liegt dem CDG Ib ein Mangel an Phosphomannoisomerase (PMI) zugrunde, ein Enzym, das auf dem Weg zur N-Glykosylierung von Proteinen für die Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat in Mannose-6-Phosphat verantwortlich ist. Hier folgt eine kurze Darstellung des Reaktionsweges, für den die Phosphomannoisomerase benötigt wird:

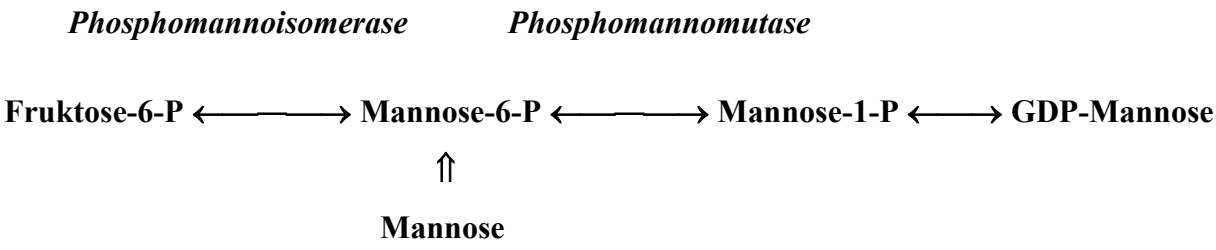
Phosphomannoisomerase

Fruktose-6-P ⟷ Mannose-6-P ⟷ Mannose-1-P ⟷ GDP-Mannose

Molekulargenetisch liegt eine Genmutation auf Chromosom 15q22-qter vor. Das Gen wird auch PMI1-Gen genannt, da es für die Bildung von Phosphomannoisomerase kodiert.
Im klinischen Erscheinungsbild des CDG Ib überwiegen gastrointestinale Symptome. Die wegweisende schwere hyperinsulinämische Hypoglykämie beginnt bereits im Säuglingsalter, oft in Kombination mit plötzlich beginnender Enteropathie, Eiweißverlust, Hepathomegalie sowie veränderten Leberenzymen und Koagulopathie (2). Unstillbares Erbrechen und therapieresistente Durchfälle dienen ebenfalls als Leitsymptom (28). Im Gegensatz zu der vorrangig neurologischen Symptomatik bei CDG Ia entwickeln sich Patienten mit „Congenital Disorder of Glycosylation" Typ Ib psychomotorisch und geistig normal (35, 21).

Zu diagnostischen Zwecken kann die Hypoglykosylierung wie oben bereits beschrieben routinemäßig mit der Isoelektrofokussierung (IEF) von Serum-Transferrin dargestellt werden, wobei die Proteine zuerst im elektrischen Feld aufgetrennt und dann mittels Immunofixation sichtbar gemacht werden. Der verminderte Gehalt an negativ geladenen Sialinsäureresten führt zu einer Bandenverschiebung in Richtung Kathode (19). Allein anhand der Isoelektrofokussierung kann man allerdings nicht auf den Untertyp des CDG-Syndroms schließen, da der Glykosylierungsdefekt die Endstrecke mehrerer Enzymdefekte darstellt. Um CDG Ib von anderen Untergruppen abzugrenzen, muss die deutlich erniedrigte Aktivität des Enzyms Phosphomannoisomerase (PMI) in Fibroblasten und Leukozyten nachgewiesen werden. Der PMI-Mangel stellt den ursächlichen Defekt bei CDG Ib dar.

Orale Mannose-Behandlung führt bei Patienten mit Phosphomannoisomerase-Mangel zu einer klinischen Besserung mit Normalisierung des Blutzuckers, der Aminotransferasen und der Gerinnungsfaktoren. Wie folgendes Reaktionsschema zeigt, kann Mannose den Enzymdefekt umgehen und zum GDP-Pool beitragen, der als Mannose-Donor für die N-Glykosylierung dient.



1999 beschreibt deLonlay den positiven klinischen Verlauf eines Patienten, der sechsmal täglich mit einer Mannose-Dosis von 0,17g/kg Körpergewicht therapiert wurde (28). In Übereinstimmung damit schildert D.Babovic-Vuksanovic die Geschichte eines Patienten der an CDG Ib litt. Nachdem er 6 Monate mit einer oralen Mannose-Dosis von 0,15 mg/kg Körpergewicht therapiert wurde, hatte sich die Klinik des Kindes drastisch verbessert. In der Isoelektrofokussierung von Serum-Transferrin des Patienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollperson 11 Monate nach Beginn der Mannose-Therapie haben sich die CDT (Carbohydrate-deficient Transferrin)-Banden deutlich verringert.
Da sich das pathognomonische IEF-Bandenmuster unter erfolgreicher Therapie normalisiert, hat man vorgeschlagen, diese Methode entsprechend dem glykosylierten Hämoglobin bei Diabetes Mellitus für die Therapiekontrolle behandelbarer Glykosylierungsstörungen einzusetzen.

1.5. Stoffwechselwege der Galaktose

1.5.1. Klassische Galaktosämie

Ursache der klassischen Galaktosämie ist ein Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, der auf verschiedenen Mutationen im GALT-Gen beruhen kann (43). Der Erbgang ist autosomal-rezessiv. Eine häufige Variante des Enzyms, die sogenannte Duarte-Variante, scheint ohne pathologische Bedeutung zu sein (26). Die Krankheit tritt in Europa mit einer Häufigkeit von 1: 40000 – 1: 60000 auf (24). Der Enzymmangel führt zu einem Intoxikationssyndrom mit fulminantem und akutem Verlauf, sobald die Milchfütterung einsetzt. Binnen zwei Wochen nach Beginn der Laktosezufuhr zeigen sich die ersten klinischen Symptome: Trinkschwäche, Gedeihstörungen mit Gewichtsabnahme, Erbrechen, Durchfall, ein sepsisähnliches Bild und Gerinnungsstörungen sind die Leitsymptome. Ein schwerer prolongierter Ikterus und eine Hepatomegalie sind Ausdruck der Leberzellschädigung. Eine zerebelläre Ataxie kann sich entwickeln. Oft entstehen bereits in

den ersten Lebenswochen Katarakte. Laborchemisch findet man eine zunehmende direkte Hyperbilirubinämie und ein renal-tubuläres Syndrom (13).
Ein weitverbreitetes Neugeborenen-Screening für verminderte Konzentrationen an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase und erhöhte Konzentration an Galaktose-1-Phosphat in roten Blutkörperchen führt häufig zur frühen Diagnose (39). Des Weiteren kann man Galaktose, Galaktose-1-Phosphat und Galaktitol im Blut, sowie Galaktose im Urin nachweisen (15) . Die Messung der einzelnen Enzyme erlaubt ein Enzym-Assay nach Shin (46). Eine pränatale Diagnostik ist ebenfalls möglich (45). Unbehandelt führt sie zur klassischen Symptomtrias Leberzirrhose, Katarakt und geistige Retardierung. Die Behandlung der Galaktosämie erfolgt durch eine lebenslange galaktosefreie Diät. Die Prognose der Erkrankung ist bei frühzeitiger Diagnose und Therapie nicht so gut wie ursprünglich angenommen. Mädchen mit dieser Erkrankung leiden an hypergonadotropem Hypogonadismus (10, 6). Neuere Studien haben darüber hinaus einen mit fortlaufendem Alter abnehmenden Intelligenzquotienten, teilweise Mikrozephalie, Störungen der visuellen Perzeption, der Sprache, des Rechnens und Ataxie aufgedeckt. Man vermutet, dass diese Schäden zum Teil durch die endogene Biosynthese von Galaktose und somit nicht nur durch eine schlechte Diätführung verursacht werden (51, 24, 47).

1.5.2. UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel

Die durch UDP-Galaktose-4-Epimerase-Mangel (GALE) verursachte Form der Galaktosämie ist eine relativ seltene autosomal-rezessive Erkrankung. Man unterscheidet zwei Gruppen: eine sehr seltene generalisierte Form mit schwerem klinischem Verlauf und eine gutartige periphere Form, die auf Erythrozyten beschränkt ist. Die meisten dieser Patienten sind asymptomatisch (34). Allerdings existieren neuere Beschreibungen von Endres und Shin, nach denen auch Patienten mit peripherem GALE-Mangel bereits früh ein Katarakt oder eine geistige Retardierung entwickeln können (48).

Die generalisierte Form ist sehr selten. Holton und Kollegen sowie Sardharwalla und Kollegen beschrieben Patienten mit einem generalisierten Mangel des Enzyms (14, 41). Das klinische Erscheinungsbild ist sehr vielgestaltig, was möglicherweise auf die Komplexität des GALE-Enzyms und auf seine Gewebe- und Substratspezifität zurückzuführen ist (50). Die Symptome sind denen der klassischen Galaktosämie sehr ähnlich, wobei häufig zusätzlich eine Hypotonie und verminderte Nervenleitgeschwindigkeit vorliegen (49).

Die periphere Form des Epimerase-Mangels bedarf meist keiner Therapie. Die Behandlung der generalisierten Form besteht, wie auch bei klassischer Galaktosämie, in einer diätetischen Einschränkung der Galaktosezufuhr. Liegt ein absoluter Epimerase-Mangel vor, so werden theoretisch keine Galaktoproteine und Galaktolipide mehr produziert. Um die Synthese dieser essentiellen Bausteine zu gewährleisten, führt man daher kleinste Mengen exogener Galaktose zu (44). Beide Formen des Epimerase-Mangels, die gutartige wie auch die bösartige Form, können durch das komplette oder teilweise Fehlen des Enzyms in Erythrozyten und die Bestimmung des Galaktosespiegels im Blut identifiziert werden (41, 9). Um die Diagnose zu sichern sind allerdings noch eine große Anzahl biochemischer Untersuchungen mit verschiedenen Gewebearten und unterschiedlichen Substraten notwendig (48). Durch die Identifizierung spezifischer Mutationen im GALE-Gen wird die klinische und biochemische Diagnostik ergänzt (31).

2. ZIELSETZUNG

Hauptziel der Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, das eine schnelle und sichere Diagnose des CDG-Syndroms ermöglicht. Bei Patienten mit Verdacht auf diese angeborene Multisystemerkrankung bietet sich als erster Schritt die Isoelektrofokussierung von Glykoproteinen an. Dabei lässt das charakteristische Bandenmuster mit einer deutlichen Vermehrung von Di- und Asialotransferrin bereits früh die Unterscheidung zwischen dem CDG-Syndrom und anderen Glykosylierungsstörungen wie beispielsweise klassischer Galaktosämie und Fruktose-Intoleranz zu.

Wir wollten hier mit dem Mini-PhastSystem die Isoelektrofokussierung von Serum-Transferrin durchführen und durch den schnellen Nachweis einer verminderten Anzahl an Sialinsäureresten dieses Glykoproteins eine einfache und sichere Methode zur Differentialdiagnostik von Glykosylierungsstörungen bei Patienten mit CDG-Symdrom und Galaktosämie-Patienten mit klassischer Galaktosämie sowie Epimerase-Mangel aufzeigen. Im nächsten Schritt folgt die biochemische Charakterisierung zweier Enzyme. Hierzu haben wir zunächst die Kinetik der Enzyme Phosphomannomutase (PMM) und Phosphomannoisomerase (PMI) in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten untersucht. Da die beiden Enzyme bei Patienten mit CDG-Syndrom am häufigsten betroffen sind, ermöglicht die Identifizierung einer Aktivitätsminderung die Diagnose CDG Ia bzw. CDG-Syndrom Typ Ib.

3. METHODEN

3.1. Isoelektrofokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen innerhalb eines pH-Gradienten, der in einem Trägermedium durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgebaut und mit Trägerampholyten stabilisiert wird. Als Separationskriterium wird der isoelektrische Punkt benutzt, der dem pH-Wert entspricht, an dem in einem elektrischen Feld keine Wanderung des Proteins mehr zu verzeichnen ist.

Auf die markierten Kühlflächen werden etwa 100 µl Aqua bid. aufgetragen, um den Kontakt zwischen Kühlfläche und Gelträger herzustellen. Das PhastGel mit dem pH-Bereich 4 - 6,5 wird nach Entfernen der Schutzfolie möglichst blasenfrei auf den dafür vorgesehenen Markierungen justiert. Danach wird der Elektrodenhalter auf die Geloberfläche abgesenkt. Wenn die Kühlfläche eine Temperatur von 15 C erreicht hat, werden die Trägerampholyte vor dem Aufbringen der Probe für eine Dauer von 75 Vh fokussiert und so der pH-Gradient aufgebaut. Mit Hilfe eines Probenstempels werden in Parafilm 12 Napfformen eingeprägt und mit einer Mikropipette je 2 µl unverdünnte Plasmaprobe hineinpipettiert. Ein Probenträger, der das Plasma in 12 dafür vorgesehenen Vertiefungen von je 0,3 µl Fassvolumen aufnehmen kann, saugt die Plasmaproben durch Kapillarwirkung an. Dann setzt man den Probenträger in die entsprechende Halterung am Elektrodenhalter ein. Je weiter die Probe im Gel bis zu ihrem isoelektrischen Punkt laufen muss, desto schärfer trennen sich die einzelnen Banden auf. Da der isoelektrische Punkt von Transferrin zwischen pH 5,1 und 5,9 liegt, setzt man den Probenträger in die Halterung, bei der der niedrigste pH-Wert vermutet wird.
Nach 75 Vh wird die Spannung ohne Veränderung der anderen Parameter auf 200 V begrenzt. Die Probenträger werden auf das Gel abgesenkt, so dass die Proben in das Gel diffundieren können, und nach 15 Vh wieder abgehoben. Die verminderte Spannung verhindert, dass die enthaltenen Proteine initial auseinandergerissen werden und deswegen nicht in das Gel hineindiffundieren.

Nach Entfernen der Probenträger wird die Spannung erneut auf maximal 1500V erhöht, so dass nun die Proteine in dem vorgebildeten pH-Gradienten aufgetrennt werden. Die Fokussierung endet für das PhastGel IEF 4-6,5 nach insgesamt 500 Vh. Die gesamte Laufdauer beträgt etwa 30 Minuten.

Nach Beendigung der Fokussierung werden am Gelrand – beginnend an der Kathode – im Abstand von 1,5 mm kleine Gelstückchen mit Pinzette und Skalpell vorsichtig vom Gelträger abgehoben und in 100 µl Aqua bid durch Schütteln aufgelöst. Mit einer pH-Elektrode wird der jeweilige pH-Wert bestimmt.

Für die spätere Immunodetektion von Transferrin werden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu hebt man das Gel mit dem Gel Backing Remover vorsichtig von seiner Unterlage ab, wobei Zerreißungen oder Verziehungen des Gels vermieden werden. Nun bringt man das Gel blasenfrei und gut abgetropft auf eine Nitrozellulosemembran auf, die zuvor 30 Minuten zur pH-Äquilibrierung in Transferpuffer eingeweicht wurde. Die Membran mit dem Gel wird vor mechanischen Reizen geschützt in das Transfergerät eingebracht, indem man sie von beiden Seiten mit Blotting-Papier bedeckt in einem aufklappbaren Gitter in das Transfergerät einsetzt. Das Gerät wird mit einer Transferpuffer-Lösung aufgefüllt und während des Laufes an eine Kühleinheit angeschlossen, die die Hitzedenaturierung der Proteine während des Transfers verhindert. Für eine Dauer von 30 Minuten wird das Protein bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 398 mA auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wird die Membran vorsichtig von dem Gel abgelöst und 5 min lang in reichlich Waschlösung geschwenkt.

Um das Transferrin unter den aufgetrennten Proteinen auf der Membran sichtbar zu machen, lässt man zunächst einen Antikörper gegen Transferrin binden. Ein zweiter gegen das Anti-Transferrin gerichteter Antikörper ist an Peroxidase gekoppelt. Inkubiert man diesen sekundären Antikörper mit einem Detektions-Reagenz, so leuchtet durch Chemolumineszenz die Stelle auf, an der sich das Transferrin befindet. Durch diese Lumineszenzreaktion können die Transferrinbanden schließlich auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Das Blocken dient dazu, unspezifische Proteinbindungen abzusättigen, um später durch das Auftragen des Antikörpers nur die Stelle sichtbar zu machen, an der sich das gesuchte Protein befindet. Zu diesem Zweck wird die Membran für 20 Minuten in einer bei 38°C erhitzten Blocking-Lösung geschwenkt. Anschließend wäscht man die Membran unter ständigem Schwenken mehrere Male jeweils in einem halben Liter TBS-Tween-Lösung, wobei die Waschlösung nach 5, 10 und 20 Minuten gewechselt werden sollte.

150 µl Anti-Transferrin-Lösung der Konzentration 1 mg/ml werden in 5 ml TBS-Tween-Lösung verdünnt. Anschließend wird die Membran nach Zugabe der Antikörper-Lösung in einer Petrischale inkubiert und 60 Minuten darin geschwenkt. Anschließend wird die Membran 20 min gewaschen.

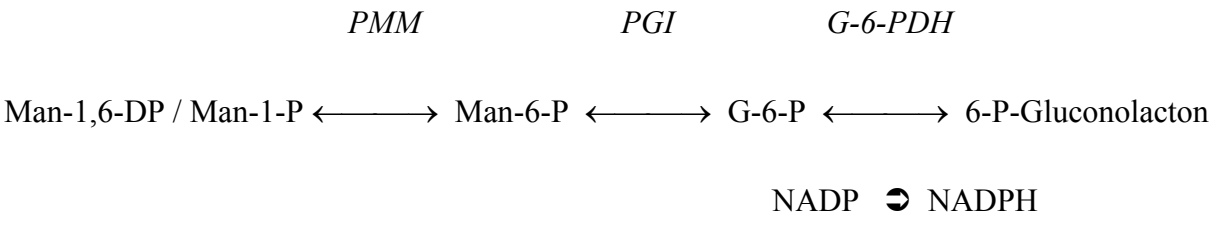
Der Peroxidase-gekoppelte Antikörper wird im Verhältnis 1:30 000 mit TBS-Tween verdünnt

(5 µl pro 1 ml; dann 75 µl dieser Lösung auf 10 ml). In einer Petrischale inkubiert man nun die Membran mit 10 ml dieser Verdünnung für eine Dauer von 20 Minuten unter ständigem Schwenken. Anschließend wird die Membran 20 min gewaschen.
Die Membran wird eine Minute in ECL Western Blotting Detection Reagents inkubiert und anschließend blasenfrei zwischen zwei Blättern Development Folders aufgebracht. Nachdem die überschüssige Flüssigkeit ausgestrichen wurde, kann die Membran in die Röntgenkassette eingeklebt werden. Nach ca. 20 Minuten exponiert man Röntgenfilme in einer Dunkelkammer der lumineszierenden Membran für 1, 2 und 5 Sekunden und entwickelt sie anschließend. Ist die Hintergrundstrahlung zu stark, so dass sich die Bandenmuster noch nicht deutlich differenzieren lassen, dann wird der Vorgang wiederholt, bis die Qualität der sich darstellenden Transferrinbanden zufriedenstellend ist.

3.2. Enzymanalyse

3.2.1.Phosphomannomutase

Die Phosphomannomutase ist ein wichtiges Enzym des Zellstoffwechsels und sorgt für die Bereitstellung von GDP-Mannose bei der N-Glykan-Synthese. Die PMM hydrolysiert Mannose-1,6-Bisphosphat und ist für die Umwandlung von Mannose-1-Phosphat in Mannose-6-Phosphat verantwortlich.
Folgende Reaktionskette gibt indirekt Aufschluss über die Aktivität dieses Enzyms:



Das Enzym Phosphoglukoisomerase wandelt Mannose-6-Phosphat in Glukose-6-Phosphat um. Dann folgt die Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonat, wobei das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase die Reaktion katalysiert. Hierbei wird NADP zu NADPH reduziert. Diese Reduktion kann spektrometrisch bei 340 nm erfasst werden und die Absorbtionsänderung ist somit ein indirektes Maß für die Umsatzrate des Enzyms Phosphomannomutase.

Reaktion

Reaktionsgemisch A enthält:

500 Teile Hepespuffer (pH 7,1)	100 mM
30 Teile Mannose-1-Phosphat	10 mM
50 Teile Glukose-1,6-Bisphosphat	4 mM
25 Teile NADP	10 mM
100 Teile Dithiothreithol	
2 Teile Phosphoglukomutase	1000 U / ml
4 Teile Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	250 U / ml
290 Teile H2O	
Hepespuffer pH 7,1: MgCl (10 mM), KCl (50 mM)	100 mM

Reaktionsgemisch B enthält

150 Teile Hepespuffer	100 mM
30 Teile NADP	10 mM
15 Teile Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	25 U / ml
15 Teile Phosphoglukoisomerase	100 µg / ml
60 Teile Probe	

Substrat : 30 Teile Mannose-1-Phosphat 10 mM

10 Teile Mannose-1,6-Bisphosphat

Die Probe ist ein Zellsonifikat, das mit 10 mM Dithiothreitollösung hergestellt wurde.

Testansatz

1 ml des Reaktionsgemisches A wird 60 min bei 37º C inkubiert. Anschließend stoppt man die Reaktion für 3 Minuten durch Hitzedenaturierung bei 95º C. Dann folgt die Herstellung von Reaktionsgemisch B. Hierbei startet man die Reaktion durch Zugabe des Substrates. (Als Leerwert wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, bei dem das Substrat Mannose-1-Phosphat durch Aqua dest. ersetzt wurde.) Das Substratgemisch wurde ebenfalls eine Stunde bei 37º C erwärmt und am Ende der Inkubationszeit für 3 Minuten bei 95º C durch Hitze denaturiert. Schließlich zentrifugiert man für 5 min bei 1100 Umdrehungen/min, um denaturiertes Protein aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wird nun für die photometrische Messung der Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 340 nm verwendet.

3.2.2.Phosphomannoisomerase

Prinzip, nach Jaeken und Schaftingen (42)

Die Phosphomannoisomerase ist ähnlich wie die Phosphomannomutase für die Bereitstellung von GDP-Mannose verantwortlich, indem sie Fructose-6-Phosphat in Mannose-6-Phosphat umwandelt. Sie ist somit ebenfalls an einem wichtigen Stoffwechselschritt der N-Glykansynthese beteiligt.
Folgende Reaktionskette erlaubt eine indirekte Messung der Enzymaktivität mittels spektrometrischer Erfassung der Absortionsänderung bei 340 nm:

PMI *PGI* *G-6-PDH*

Man-6-P ⟷ F-6-P ⟷ G-6-P ⟷ 6-P-Gluconolacton

NADP ➲ NADPH

Das Enzym Phosphoglukoisomerase wandelt Mannose-6-Phosphat in Glukose-6-Phosphat um. Dann folgt die Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonat, wobei das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase die Reaktion katalysiert. Hierbei wird NADP zu NADPH reduziert. Diese Reduktion kann spektrometrisch bei 340 nm erfasst werden und die Absorbtionsänderung ist somit ein indirektes Maß für die Umsatzrate des Enzyms Phosphomannoisomerase.

Reaktionsgemisch

150 Teile Hepespuffer	100 mM
30 Teile NADP	10 mM
15 Teile Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	25 U / ml
15 Teile Phosphoglukoisomerase	100 U / ml
60 Teile Probe	
Substrat: 30 Teile Manose-6-Phosphat	5 mM

Die Probe ist ein Zellsonifikat, das mit 10 mM Dithiothreitollösung hergestellt wurde.

Testansatz

Um die Reaktion zu starten, gibt man das Substrat zu den restlichen bereits zusammengefügten Reagenzien. Das Substratgemisch wurde 60 Minuten lang bei 37º C erwärmt und am Ende der Inkubationszeit für 3 Minuten bei 95º C denaturiert. Schließlich

zentrifugiert man für 5 min bei 1100 g, um ausgefälltes Protein von der übrigen Lösung zu trennen. Der Überstand wird nun für die photometrische Messung der Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 340 nm weiterverwendet.

3.3. Probenvorbereitung

3.3.1. Leukozytenpräparation

Leukozyten werden aus EDTA-Blut gewonnen. 5 ml Vollblut werden mit 1 ml Leukozytenlösung (5 g Dextran, 50 mg Heparin in 100 ml Aqua dest., 78 ml 0,9% NaCl (~ 0,7 g NaCl) vermischt, blasenfrei aufgestellt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn die Erythrozyten sich gesetzt haben, hebt man den leukozytenhaltigen Überstand ab und zentrifugiert ihn. Um im Leukozytensediment verbliebene Erythrozyten zu zerstören, wird das Leukozytensediment 20-30 Sekunden mit 1 ml eiskaltem Wasser stark geschüttelt und anschließend sofort mit 6 ml 0,9% NaCl gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes können die Leukozyten bis zum Testbeginn bei –20º C gelagert werden.

3.3.2. Kultivierung der Fibroblasten

Die für die Fibroblastenkultivation aseptisch entnommene Hautbiopsie wird in 1-2 mm grosse Stücke zerkleinert und in eine Petrischale mit Nährmedium gesetzt. Anschließend wird die Petrischale in den Brutschrank bei 37º C für ca. 20 min inkubiert und mit Nährmedium aufgefüllt. Nach ca. 7 Tagen muss im Brutschrank das erste Mal ein Mediumwechsel vorgenommen werden; danach alle 3 Tage. Wenn die Zellen einen Hof von ca. 2 cm um das Explantat erreicht haben, können sie weiter subkultiviert werden (27).

Subkultivierung

Bedeckt ein dichter Zellrasen den Boden der Kulturflasche, kann man die später zu erntende Menge an Fibroblasten verdoppeln, indem man die Zellen von einem Brutkasten auf zwei Kulturflaschen aufteilt. Zuerst wird das alte Medium aus dem Brutkasten entfernt. Anschließend werden die Zellen mit 5 ml PBS gespült, um tote Zellen und Verunreinigungen zu entfernen. Dann gibt man 5 ml Trypsin in den Brutkasten und lässt es 3 Minuten bei 37º C inkubieren, um so die Fibroblasten von ihrer Unterlage zu lösen. Die Zugabe von 5 ml

Medium stoppt den Ablösevorgang. Die Zellen werden nun vollständig in ein Röhrchen abpipettiert und 5 Minuten bei 500 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes können die sedimentierten Fibroblasten nun mit 5 ml Medium suspendiert werden. Diese Suspension wird anschließend zu je 2,5 ml auf zwei Brutkästen aufgeteilt und mit 10 ml Medium zu 12,5 ml aufgefüllt. Indem man die Brutkästen für eine halbe Stunde mit leicht geöffneten Deckeln in den Brutschrank stellt, wird eine ausreichende Versorgung der Zellen mit CO2 gewährt.

Gewinnung der Fibroblastenpellets

Vorraussetzung für die Zellernte ist, dass ein dichter Rasen an Fibroblasten den Boden der Kulturflasche bedeckt. Hierzu entfernt man zuerst das alte Medium und spült dann den Brutkasten 3-4 mal mit 5ml 0,9% NaCl-Lösung aus. Anschließend füllt man ihn mit 5 ml NaCl-Lösung auf und löst die Zellen mit Hilfe eines Scapers durch intensives Schaben ab. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 2-3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment aus Fibroblasten wird durch Aufschwemmen mit 1 ml 0,9% NaCl in ein Eppendorfhütchen überführt und kann nach erneuter Zentrifugation und Absaugen von Flüssigkeitsresten bis zumTestbeginn bei – 20º C gelagert werden.

3.3.3. Kultivierung von Chorionzotten

Die Verwendung von hormonsubstituiertem Chang-Medium (Chang 1982) brachte eine Erleichterung in der Kultivation von Chorionzotten mit sich (16). Die für die Kultur bestimmten Chorionzotten werden für eine Stunde in 0,02% Trypsin-EDTA-Lösung und anschließend nach Zerkleinerung evtl. verbliebener größerer Gewebeteile erneut in Chang-Medium mit 1 mg/ml Kollagenase (Sigma) gebracht. Ein paar Stunden später wird diese Suspension für ca. 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und die Zellen werden erneut in frischem Chang-Medium resuspendiert. Je 1,5 ml Zellsuspension werden zum Kulturansatz in Leighton tubes mit Deckglas gebracht. Nach 7-tägiger Kulturdauer wird das Medium erstmals gewechselt, anschließend zweimal wöchentlich.

Subkultvieren

Die Subkultivation der Chorionzotten verläuft wie bei den Fibroblasten (3.3.2.) mit dem entsprechenden Nährmedium.

Gewinnung der Chorionzottenpellets

Dieser Vorgang läuft identisch ab; wie zuvor für die Fibroblasten in 3.3.2. beschrieben, mit für die kleineren Kulturflaschen entsprechend geringeren Mengen an 0,9% NaCl-Lösung .

3.3.4. Proteinbestimmung nach Lowry

Um die spezifische Enzymaktivität im Homogenat berechnen zu können, ist zusätzlich zur Ermittlung der Substratumsatzrate eines bestimmten Enzyms die Bestimmung der im Homogenat befindlichen Proteinkonzentration erforderlich. Hierzu eignet sich die auf der Photometrie beruhende Mikrimethode der Proteinmessung nach Lowry et al.(30) :
Folgende Lösungen werden für die Proteinbestimmung verwendet:

- A : 2% Na2CO3 (wasserfrei) gelöst in 1% NaOH
- B : 5,5g CuS4 / 100ml
- C : 1,35 g Seignettesalz / 100ml H2O
- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
- 2% Na2CO3

Das Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz wird mit 2% Na2Co3 imVerhältnis 1:2 zusammengebracht und gerüttelt, um freiwerdendes CO2 aus der Lösung zu entfernen.

- Reaktonsgemisch D : immer frisch und in folgender Reihenfolge pipettiert:
    1) 10 µl Lösung A
    2) 100µl Lösung B
    3) 5000µl Lösung C

Für das Erstellen der Eichkurve braucht man zusätzlich Referenzverdünnungen. Sie wurden aus einer Rinderalbuminlösung (5mg Protein\ml) hergestellt: Da die höchste Messgenauigkeit dieses Tests im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 0,25 mg\ml liegt, werden die Homogenate zunächst entsprechend verdünnt.

Arbeitsgang

Je 20 µl der verdünnten Proben und der Standards (in aufsteigender Reihenfolge) werden mit 250 µl Reaktionsgemisch D in ein Eppendorf-Hütchen pipettiert, sofort auf dem Rüttler vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann gibt man 20 µl Folin-

Ciocalteus- Phenol-Na2CO3-Reagenz hinzu, mischt sofort und inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Intensität des entstehenden farbigen Komplexes kann nun bei 772 nm Wellenlänge photometrisch erfasst werden.

3.3.5. Berechnung der Enzymaktivität

Für die Berechnung der Aktivität in nmol/mg Protein /min findet folgende Formel Verwendung:

$$\frac{\text{E (Absorbtionsänderung von Probe – Leerwert) x Gesamtvolumen x 1000}}{\text{Extinktionskoeffizient x Probenvolumen x Proteinkonzentration x Inkubationszeit (min)}}$$

$$= \frac{\text{Delta A x 0,31 x 10}}{\text{6 x 0,06 x 60 min x Proteinkonzentration}}$$

4. MATERIAL

4.1. Isoelektrofokussierung

- Anti-Human –Transferrin (developed in goat)
- Peroxidase-conjugated Affini Pure Rabbit (Anti-goat)
- Transfer-Puffer (pH 7,6)
- 3,3 g Trizma base
- 14,4 g Glycine
- 200 ml Methanol
- 800 ml Aqua dest.
- TBS-Tween (pH 8,3)
    - 40 g NaCl
    - 12 g Trizma base
    - Tween 20
    - 5 l Aqua dest.
- Liquid Block
- ECL Western Blotting Detection Reagents
- Phast Gel IEF 4-6,5
- Phast Gel Sample Well Stamp
- Phast Gel Sampe Appl. 12/ 0,3
- Phast Gel Sample Appl. 8/ 0,5
- Hybond blotting paper
- Photo Gene Development Folders
- Hyperfilm
- Phast System Separation and Control Unit
- Electrophoresis Power Supply
- TE Series Transfer Electrophoresis Unit
- Thermomix
- Frigomix

4.2. Enzymmessung

- alpha-D-(+)-Mannose-1-Phosphat

- alpha-D- Glucose-1,6-Diphosphat
- Phosphoglucomutase
- D-6-Mannose
- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- Phosphogluco-Isomerase
- NADP
- Di-Thio-Threitol
- MgCl
- KCl
- Waage
- Schüttler
- Zentrifuge
- Heizblock

4.3. Kultivierung der Fibroblasten und Chorionzotten

Nährmedium:

- Dulbecco`s MEM 500ml + 50ml Fetal Bovine Serum + 5ml L-Glutamin
- Chang Medium 100ml + 1,5 ml Penicillin–Streotomycin-Solution
- Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
- Versen-Trypsin ohne Phenolrot
- Tissue Culture Flask 75 cm²
- Tissue Culture Flask 25 cm²
- Stripette 5ml und 10ml
- Conical Centrifuge Tube 15 ml
- Rotanta P

5. PATIENTEN

5.1. CDG

Patient 1

Die 2 Monate alte Patientin 1 aus Belgien leidet an Glukosidase-I-Mangel (CDG IIb) und weist einige dafür als typisch beschriebene Symptome auf (37). Es fällt eine Hypotonie und Hypomotilität der Muskulatur mit tonisch-klonischen Krämpfen auf. Elektrophysiologische Studien wiesen eine demyelinisierende Polyneuropathie mit verminderter Nervenleitgeschwindigkeit in den Armen nach. Desweiteren fallen faziale Dysmorphien wie ein prominentes Okkziput, kurze Lidspalten, hoher Gaumen sowie generalisierte Ödeme und ein hypoplastisches Genital auf. Ihre Finger überlappen sich und sie leidet an einer deutlichen Skoliose. Hypoventilation und häufige Apnöen, die bereits bei der Geburt einsetzten, führten zur respiratorischen Insuffizienz und machten eine Intubation mit künstlicher Beatmung ab dem 28. Lebenstag notwendig.

Patient 2

Dieser Patient zeigt halbmondförmige Augen, beidseitiges Einwärtsschielen und eingezogene Brustwarzen. Neben diesen für CDG Ia typischen Dysmorphien hat er eine ausgeprägte neurologische Symptomatik. Die in Belgien gemessenen Aktivitäten der PMM in Leukozyten und Fibroblasten waren deutlich erniedrigt und bestätigten somit die klinische Diagnose.

Patient 3 und 4

Bei der 25 jährigen belgischen Patientin 3 und ihrem Zwillingsbruder Patient 4 legte die neurologische Klinik mit Schwäche der unteren Gliedmaßen und einer ausgeprägten zerebellären Ataxie sowie einigen charakteristischen Dysmorphien die Diagnose CDG nahe. Die Patienten sind beide seit ihrer Kindheit an den Rollstuhl gebunden und leiden an einer zunehmenden Kyphoskoliose der Wirbelsäule. Die Patientin 3 zeigt laborchemisch einen FSH-Mangel mit hypergonadotropem Hypogonadismus. Die in Belgien durchgeführte Enzymmessung der PMM in Leukozyten und Fibroblasten wies eine deutliche Aktivitätsminderung nach.

Patient 5

Bei unserem 2 Jahre alten brasilianischen Patienten legte seine auffällige Klinik mit

typischem Gesicht, Gedeihstörung, Strabismus convergens und geistiger Retardierung die Verdachtsdiagnose CDG nahe.

Patient 6

Ähnlich wie Patient 5 leidet der 2,5-jährigen Patient 6 aus Wuppertal in Deutschland an Strabismus konvergens und geistiger Retardierung. Neben einer muskulären Hypotonie fielen bei ihm bereits nach der Geburt Gedeihstörungen und Schwierigkeiten beim Füttern auf.

Patientin 7

Das 6 Jahre alte Mädchen aus Erlangen weist einige typische Symptome des CDG Ia Syndroms auf. Sie zeigt neben einer psychomotorische Retardierung, ein auffälliges Gesicht mit prominentem Kinn, halbmondförmigen Augen und Srabismus konvergens. In der Isoelektrofokussierung von Transferrin zeigte sie ein für CDG Ia charakteristisches Bandenmuster.

Tabelle 2 faßt die Daten der CDG-Patienten zusammen.

Tabelle 2 Daten der CDG-Patienten

Patient	Nationalität	Alter	Erkrankung	Enzymmangel
1	Belgien	2 Monate	CDG IIb	Glukosidase-I
2	Belgien	10 Jahre	CDG Ia	PMM
3	Belgien	25 Jahre	CDG Ia	PMM
4	Belgien	25 Jahre	CDG Ia	PMM
5	Brasilien	2 Jahre	CDG	nicht bekannt
6	Deutschland	2,5 Jahre	CDG	nicht bekannt
7	Deutschland	6 Jahre	CDG Ia	PMM

5.2. Epimerase-Mangel

Die Patienten Nummer 8 bis 13 haben alle eine sehr niedrige Epimerase-Aktivität in Erythrozyten. Bei Patieten 8 – 11, die zwischen 5 und 9 Monaten alt sind und zum Zeitpunkt der Diagnose bereits für längere Zeit eine galaktosearme Diät erhalten haben, bewegt sich die in Erythrozyten gemessene Konzentration des Galaktose-1-Phosphat (GALP) zwischen 0,1 und 0,5 mg/dl. Die Patientin 12, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 11 Tage alt war, und die 5 Wochen alte Patientin 13 zeigten beide höhere GALP-Konzentrationen mit Werten von 1,6 und 2,0 mg/dl.

Die Tabelle 3 stellt die Daten der Patienten mit Epimerase-Mangel im Überblick dar.

Tabelle 3 Patienten mit Epimerase-Mangel

Patient	Nationalität	Alter	Epimerase	GALP
8	Deutschland	5 Monate	↓↓↓	0.1
9	Deutschland	9 Monate	↓↓↓	0.2
10	Türkei	5 Monate	↓↓↓	0.5
11	Deutschland	6 Monate	↓↓↓	0.3
12	Deutschland	11 Tage	↓↓↓	1.6
13	Deutschland	5 Wochen	↓↓↓	2.0

5.3. Galaktosämie durch Uridyltransferase-Mangel

Alle vier Patienten stammen aus Deutschland und leiden an Galaktosämie. Die Diagnose wurde bereits beim Neugeborenen-Screening gestellt, nachdem die Kinder die erste Milchnahrung zu sich genommen hatten. Sie erhalten eine lebenslange galaktosefreie Diät.

Die Patienten 14 bis 16 sind homozygote Genträger. Der GALP-Wert des 3 Monate alten deutschen Patienten 14 beträgt 3,0 mg/dl. Der Patient Nummer 15 ist 2 Wochen alt, besitzt einen homozygoten Genotyp und hat eine GALP-Konzentration von 6,5 mg/dl. Die ebenfalls für das Galaktose-Gen homozygote Patientin Nummer 16 ist bereits 8 Jahre alt. Bei ihr wurde ein GALP-Wert von 2,7 mg/dl gemessen. Der zwei Wochen alte Patient Nummer 17 ist ein heterozygoter Genträger der Duarte-Variante mit einer GALP-Konzentration von 5,2 mg/ dl. Tabelle 4 zeigt einen Überblick der Galaktosämie-Patienten.

Tabelle 4 Patienten mit Uridyltransferase-Mangel

Patient	Nationalität	Alter	GALP	Genotyp
14	Deutschland	3 Monate	3,0 mg/dl	G/G
15	Deutschland	2 Wochen	6.5 mg/dl	G/G
16	Deutschland	8 Jahre	2.7 mg/dl	G/G
17	Deutschland	2 Wochen	5.2 mg/dl	D2/G

6. ERGEBNISSE

6.1. Isoelektrofokussierung von Plasma-Transferrin (IEFT)

Auf den Abbildungen 1 bis 3 sieht man das wenig auffällige Muster eines Patienten mit Glukosidase-I-Mangel (CDG IIb), das dem einer gesunden Kontrollperson gleicht (Patient 1). Die Banden von Patient 2, 3 und 4 zeigen jeweils eine deutliche Erhöhung der Disialotransferrin-Fraktion und stammen von Patienten, die an CDG Ia leiden. Die Untersuchung des Transferrins von Patient 5 ergab zusätzlich zu einem sehr deutlich pathologischen Disialotransferrin eine Erhöhung der Asialotransferrin-Fraktion über die Norm. Wie bei Patient 5 (Abbildung 1 + 2) stellt sich bei Patient 6 in der IEFT ein ausgeprägtes CDG-I-Banden-Muster dar, wobei beide Patienten an CDG Ia-typischen Symptomen leiden, ohne dass ein Enzymmangel nachgewiesen werden konnte.

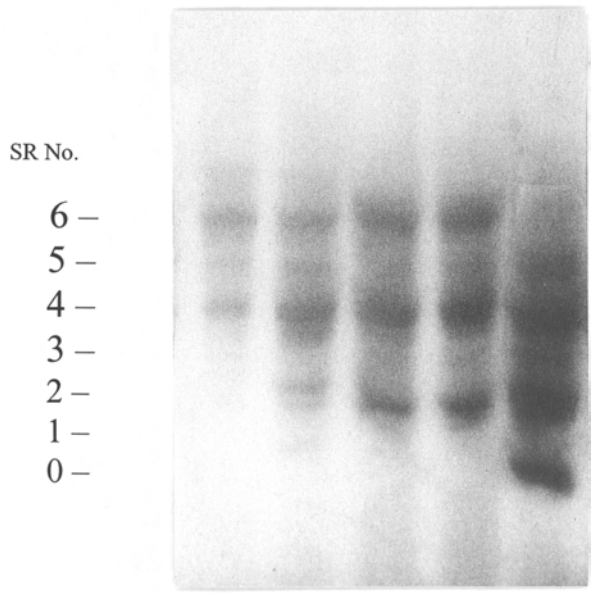
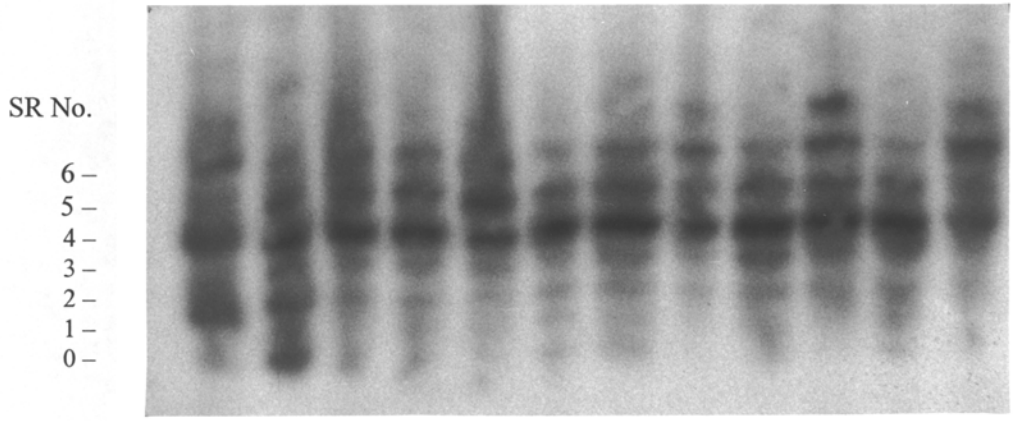
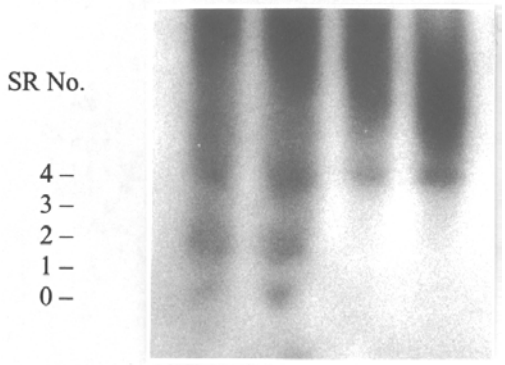


Abbildung 1 PhastSystem Mini-IEF-Muster von Patienten mit CDG-Syndrom; SR No.: Anzahl der Sialinsäurereste



Patient **3** **5** n n n n n n n n n **1**

Abbildung 2 PhastSystem Mini-IEF-Muster von Patienten mit CDG-Syndrom
n = gesunde Kontrolle



Patient **6** **6** n n

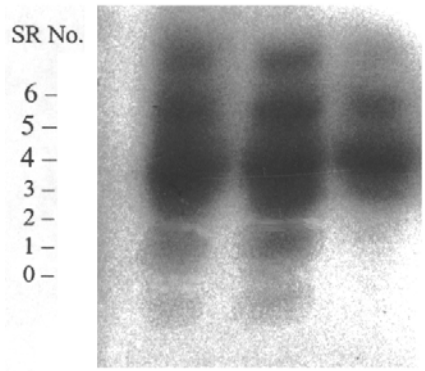
Abbildung 3 PhastSystem Mini-IEF-Muster von einem Patienten mit CDG Syndrom

Abbildung 1 – 3 zeigen eindeutig die typischen Transferrin-Banden bei Patienten mit CDG Ia (2, 3, 4). Bei Patienten 5 und 6, bei denen keine CDG-Typisierung möglich war, wurden noch stärkere Asialotransferrin-Banden gefunden.
Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Patienten mit CDG zusammen.

Tabelle 5 Patienten mit CDG

Patient	CDG-Banden	Erkrankung	Enzymmangel
1	—	CDG IIb	Glukosidase-I
2	+++	CDG Ia	PMM
3	+++	CDG Ia	PMM
4	+++	CDG Ia	PMM
5	++++	CDG	Nicht bekannt
6	++++	CDG	Nicht bekannt
7	+++	CDG Ia	PMM-Mangel

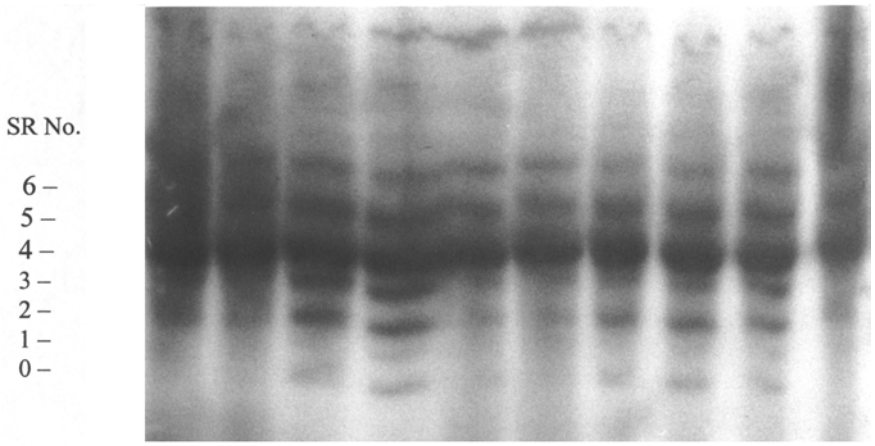
Abbildung 4 – 7 zeigen die Transferrin-Banden bei Galaktosämie-Patienten mit Epimerase- sowie Uridyltransferase-Mangel. Charakteristisch für einige Patienten mit Epimerasemangel (z.B. Patienten 8 + 9) ist die Erhöhung der Transferrin-Banden mit nur 0 – 3 Sialinsäureresten. Bei Patient 10, 11 und 12 ist das Muster etwas schwächer, aber die Mono- und die Disialotransferrin-Fraktion sind eindeutig zu erkennen. Die Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 5 und 9 Monaten alt und hatten schon seit längerem eine diätetische Therapie erhalten. Die IEFB sind hier weniger stark ausgeprägt als bei CDG-Patienten. Die Transferrin-Banden eines 11 Tage alten Kindes (Patient 12) stellen sich unauffällig dar. Insbesondere die behandelte klassische Galaktosämie (Patient 14 – 16) zeigt keine pathologischen IEFB, ähnlich wie bei CDG IIb (Abb. 1). Allerdings konnte man bei diesen Patienten in der Neugeborenenperiode vor der diätetischen Behandlung ein auffälliges Muster nachweisen. Patient 17, ein „compound“ heterozygoter Galaktosämie-Patient, weist in der IEFT leichte CDG-Banden auf (Abb. 7).



Patient **8** **8** n

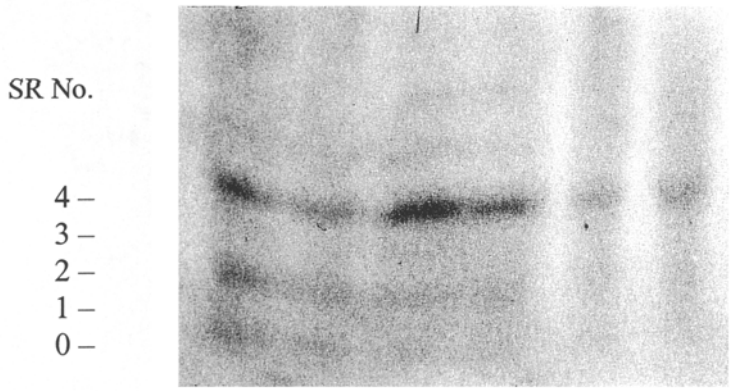
n = gesunde Kontrolle

Abbildung 4 PhastSystem Mini-IEF-Muster von einem Patienten mit Epimerase-Mangel



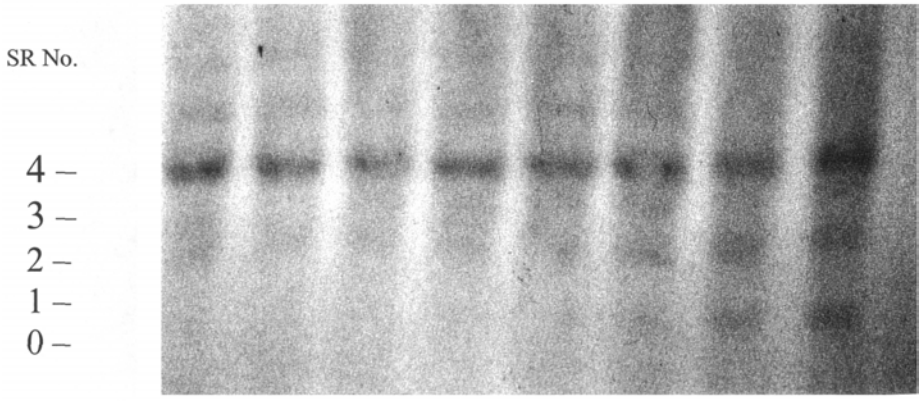
Patient n n **9 9 12 12 10 10 11 11**

Abbildung 5 PhastSystem Mini-IEF-Muster von Patienten mit Epimerase-Mangel



Patient **6 6** n n **14 14**

Abbildung 6 PhastSystem Mini-IEFB-Muster von einem Patienten mit klassischer Galaktosämie.



Patient **15 15 16 16 17 17 13 13**

Abbildung 7. PhastSystem Mini-IEF-Muster von Patienten mit Galaktosämie.

Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der Mini-IEF bei Patienten mit Galaktosämie zusammen.

Tabelle 6 Patienten mit Galaktosämie

Enzymstörung	Patienten:	GALP(mg/dL)	CDG Banden
Epimerasemangel	8	0,1	+++
	9	0,2	+++
	10	0,5	++
	11	0,3	++
	12	1,6	—
	13	2,0	++
Uridyltransferasemangel	14	3,0	—
	15	6,5	—
	16	2,7	—
	17	5,2	+

Abbildung 8 zeigt abschließend eine grafische Darstellung der IEF-Muster der Mini-Isoelektrofokussierung von Plasma-Transferrin.

Auf der ersten Auftragsposition des Gels ist das typische Muster einer gesunden Kontrollperson dargestellt. Im Vergleich hierzu erkennt man rechts daneben das charakteristische Bandenmuster eines Patienten mit CDG Ia. Die Fraktion mit 2 und 0 Sialinsäureresten des Transferrins ist deutlich erhöht. Das Bild von CDG IIb an der zweiten Stelle von rechts zeigt dagegen einen normalen Befund, wie wir ihn auch bei Patienten mit behandelter Galaktosämie gefunden haben. Ganz rechts im Bild sieht man das Bandenmuster, wie wir es bei Patienten mit Epimerase-Mangel (z.B. Patient 8) gefunden haben: Die Fraktionen mit 0 bis 3 Sialinsäureresten sind über die Norm erhöht, allerdings ist die Asialo- und Disialotransferrinfraktion etwas schwächer ausgeprägt als bei Patienten mit CDG-Syndrom Typ Ia.

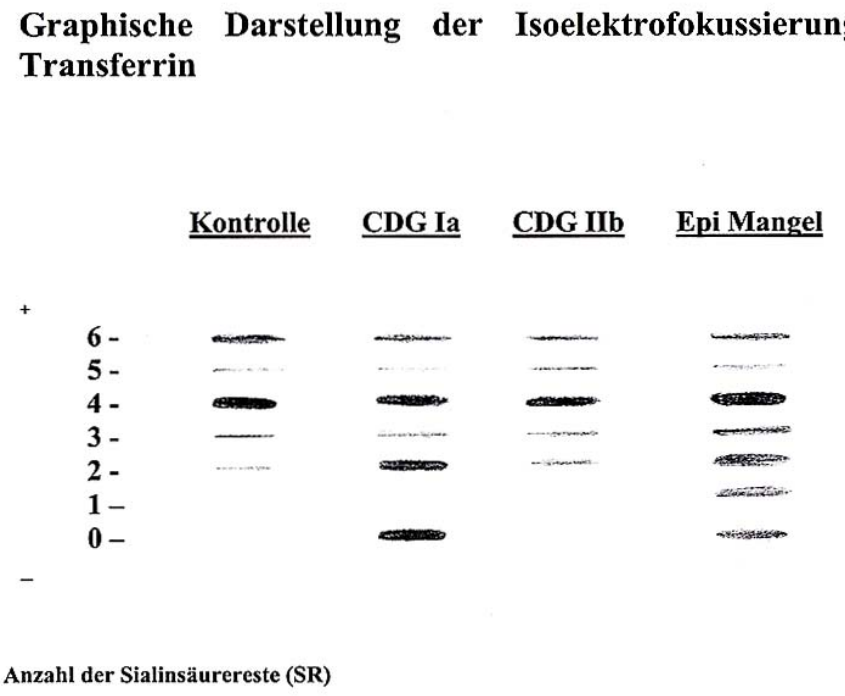


Abbildung 8 Graphische Darstellung der Isoelektrofokussierung von Transferrin.

6.2. Biochemische Charakterisierung von PMM und PMI

6.2.1 Proteinabhängigkeit

Phosphomannomutase

Die Abbildungen 9 a -c zeigen die Proteinabhängigkeit der PMM in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten: Bis zu einem Proteingehalt von ca.1 - 2 mg/ml verlaufen die Kurven annähernd linear. Für die Routine-Untersuchung wurde ein Proteingehalt von ca. 1-1,5 mg/ml gewählt.

Abb.9 a Proteinabhängigkeit der PMM in Leukozyten.

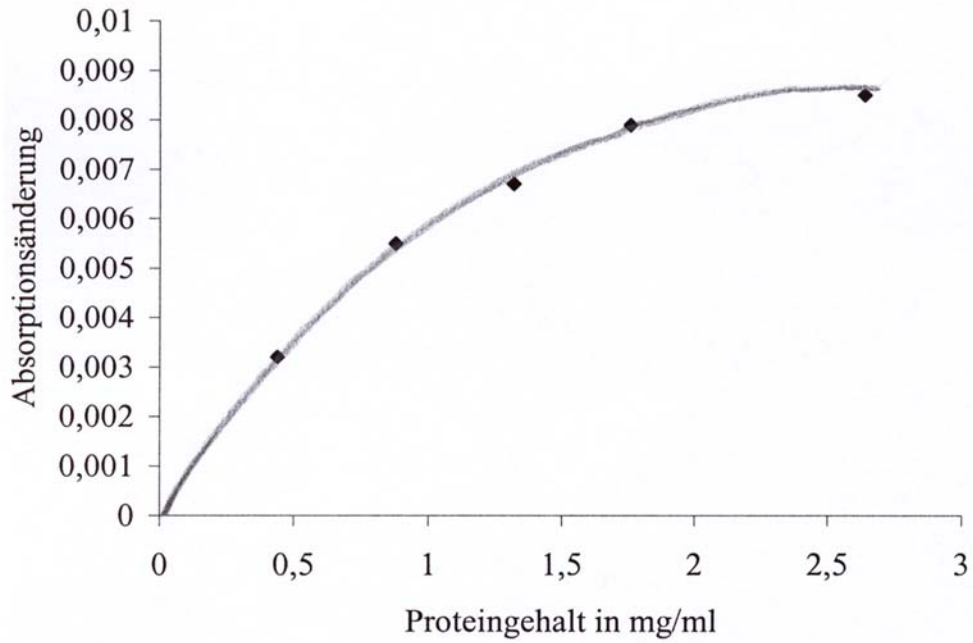


Abb.9 b Proteinabhängigkeit der PMM in Fibroblasten

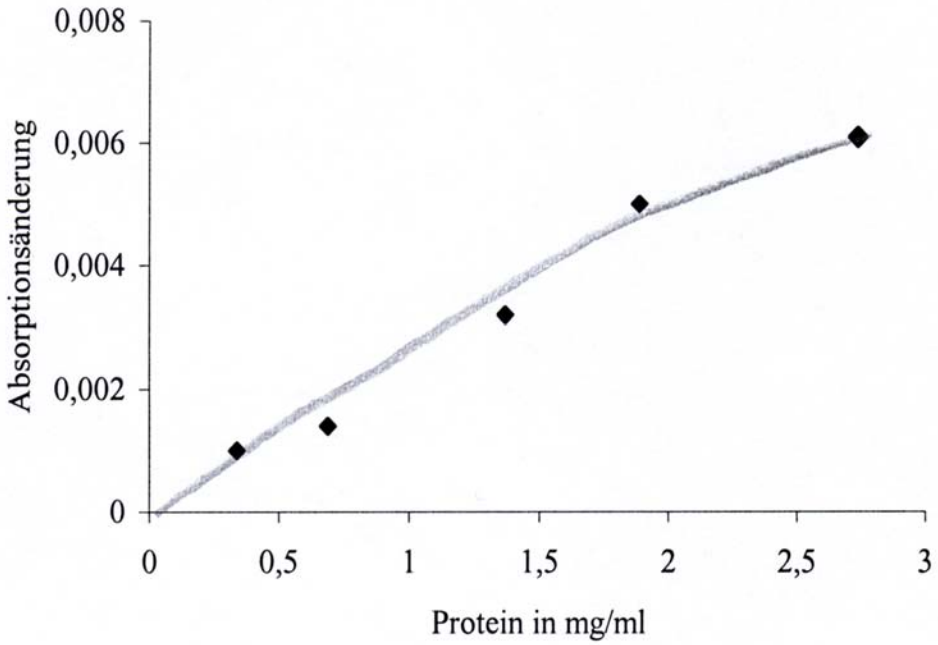
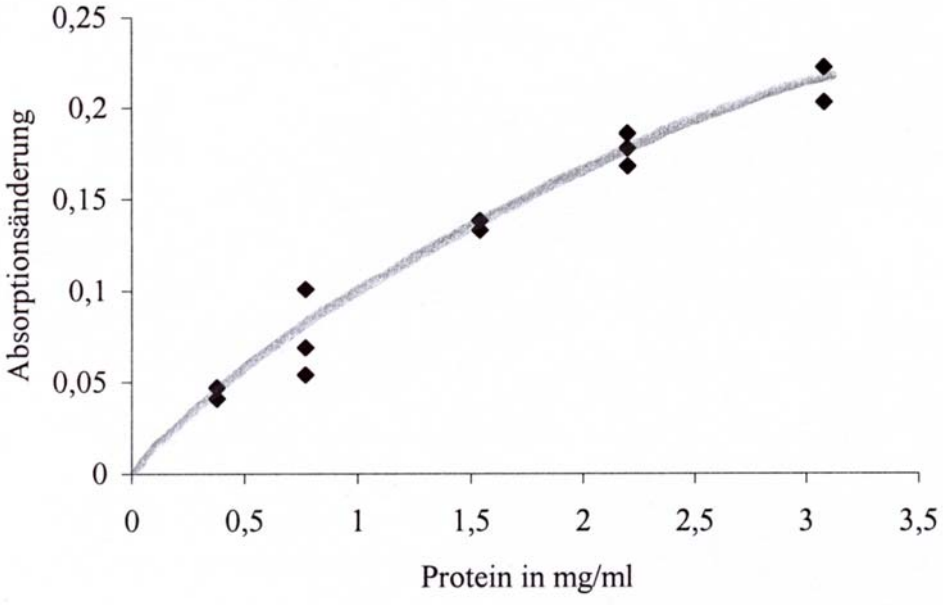


Abb.9 c Proteinabhängigkeit der PMM in Chorionzotten.



Phosphomannoisomerase

Die Abbildungen 10 a-c zeigen die Proteinabhängigkeit der PMI in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten: Bis zu einem Proteingehalt von ca.1 - 2 mg/ml verlaufen die Kurven annähernd linear. Für die Routine-Untersuchung wurde ein Proteingehalt von ca. 1-1,5 mg/ml gewählt.

Abb.10 a Proteinabhängigkeit der PMI in Leukozyten

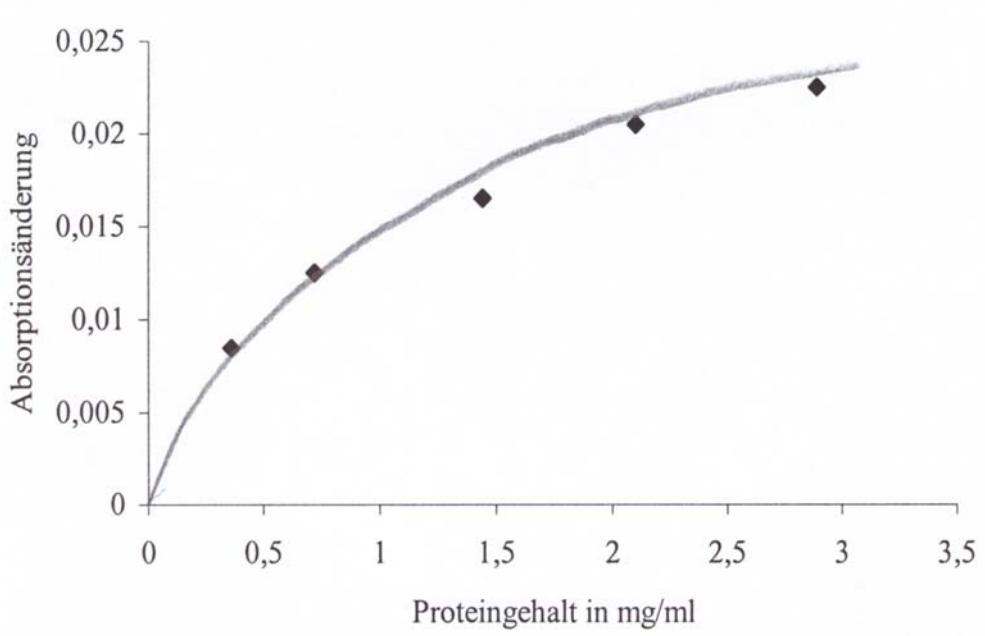


Abb.10 b Proteinabhängigkeit der PMI in Fibroblasten

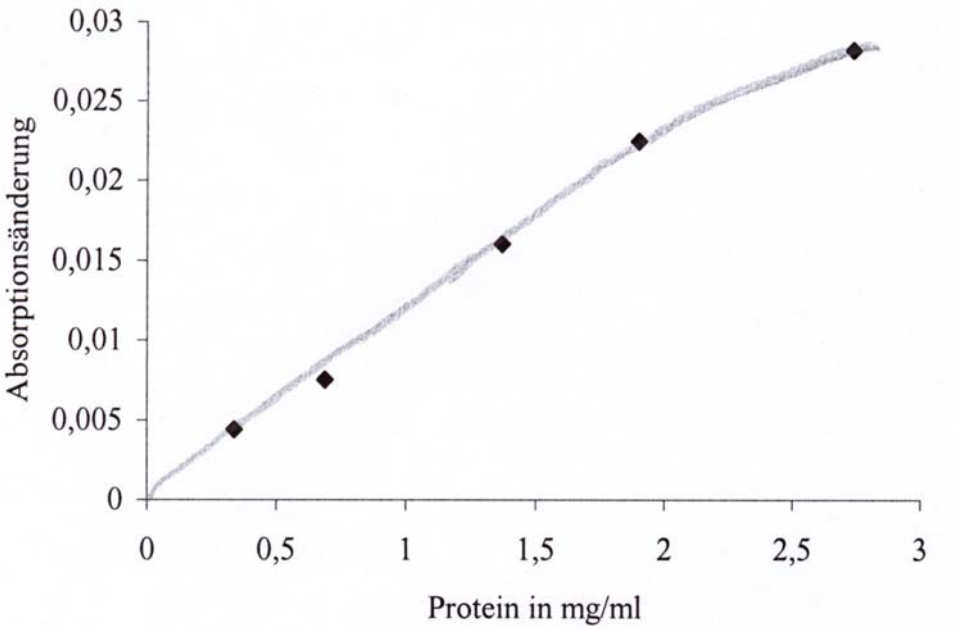
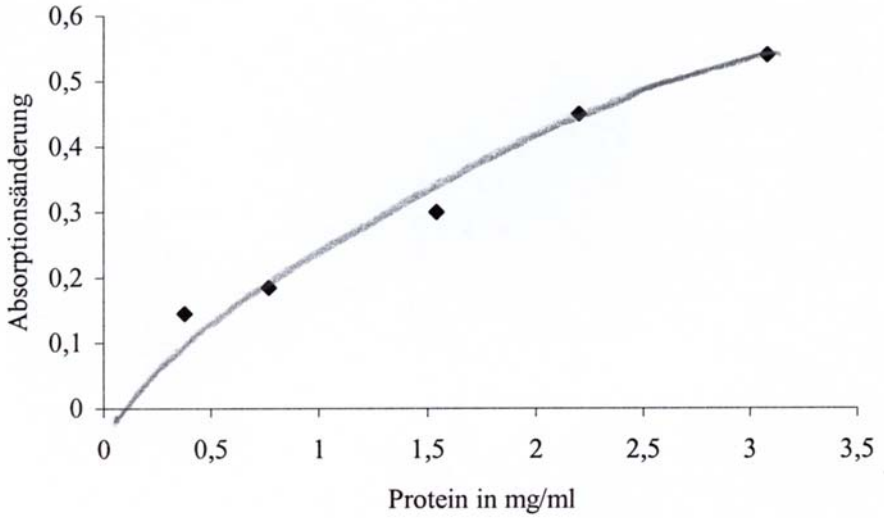


Abb.10 c Proteinabhängigkeit der PMI in Chorionzotten.



6.2.2. Kinetische Eigenschaft

Phosphomannomutase

Die mit ansteigenden Konzentrationen an Mannose-1-Phosphat durchgeführten Aktivitätsbestimmungen der PMM in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten werden in doppeltreziproker Darstellung nach Lineweaver und Burk in den Abbildungen 11 a-c dargestellt: Der Km-Wert in diesen Geweben ist ähnlich und beträgt zwischen 0,12 und 0,19 mM/l. Für die Substratabhängigkeit der PMM in Chorionzotten scheinen zwei Isoenzyme A und B mit jeweils unterschiedlichen Km-Werten zu existieren. Der Km-Wert des einen Isoenzyms lag bei ca. 0,15 mM/l und des anderen bei ca. 2,4 mM/l.

Abb.11 a Enzymkinetik für PMM in Leukozyten.

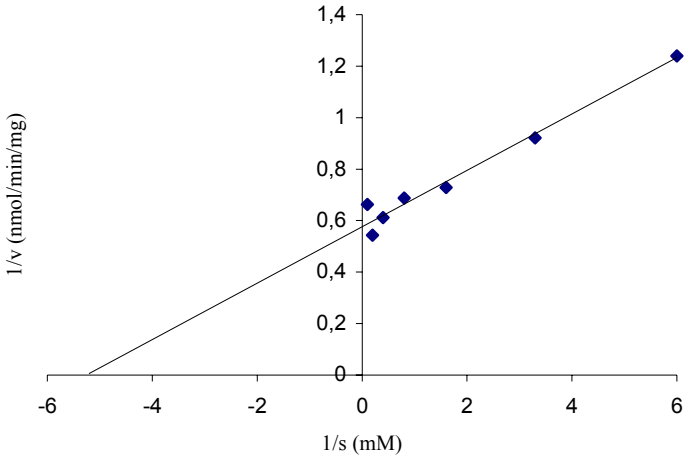


Abb.11 b Enzymkinetik für PMM in Fibroblasten.

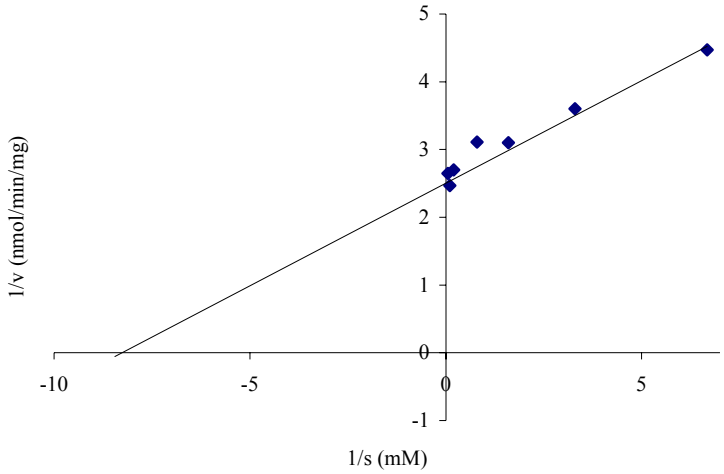
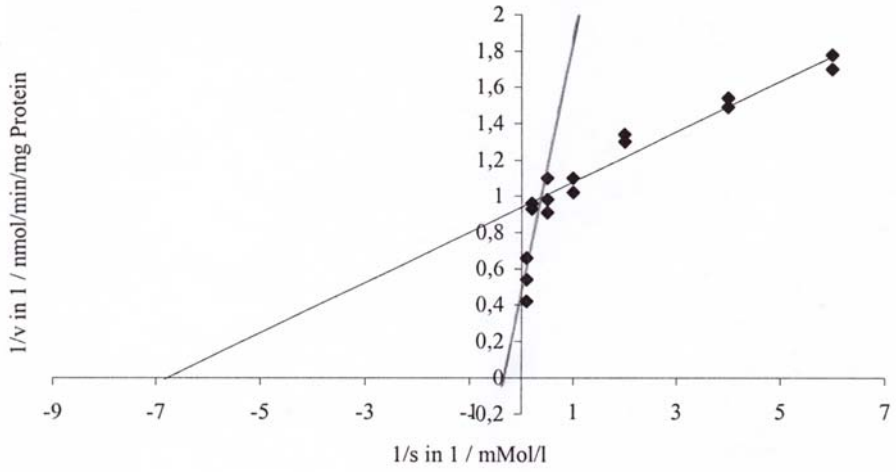


Abb.11 c Enzymkinetik für PMM in Chorionzotten.



Phosphomannoisomerase

Abbildung 12 a-c zeigen die Ergebnisse für Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten. Der Km-Wert liegt bei den drei Zellarten zwischen.1,1 mM/l. und 1,2 mM/l.

Abb.12 a Enzymkinetik für PMI in Leukozyten.

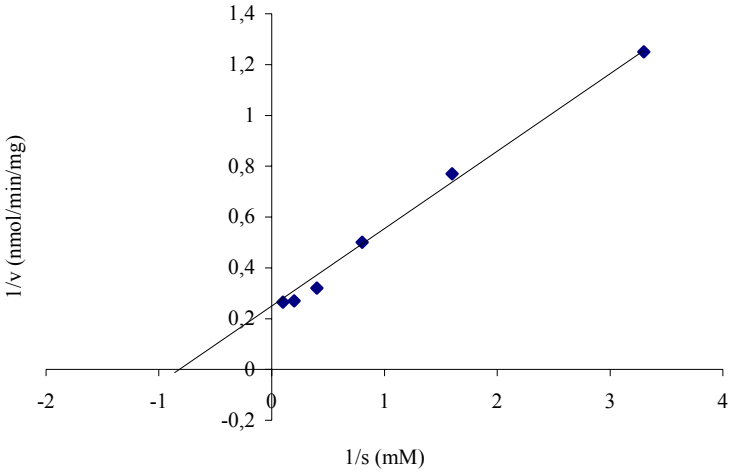


Abb.12 b Enzymkinetik für PMI in Fibroblasten.

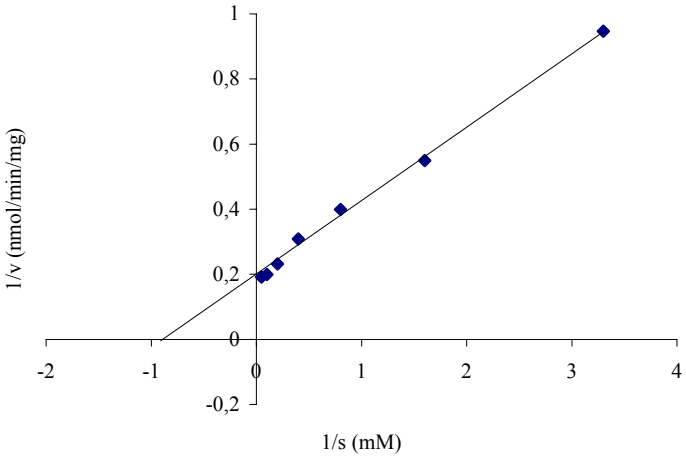
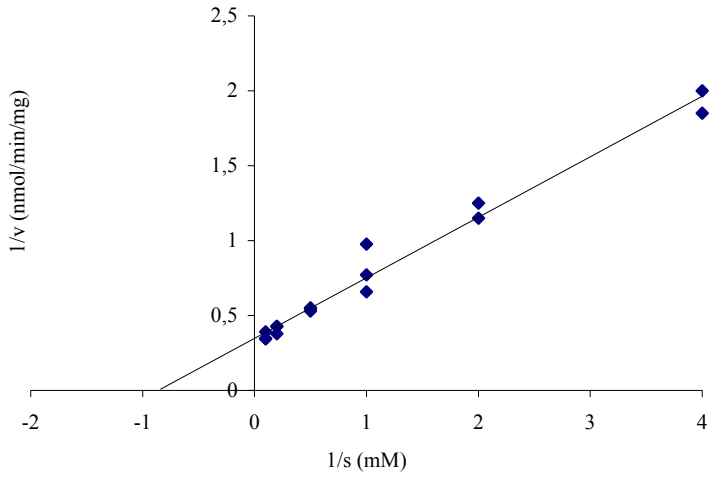


Abb.12 c Enzymkinetik für PMI in Chorionzotten



6.3. Aktivitätsbereich

Zur Bestimmung des normalen Aktivitätsbereiches wurden Zellen von Probanden untersucht, die bezüglich der für CDG Ia- und Ib-typischen Klinik keine Störungen aufwiesen.

6.3.1. PMM-Aktivität

Die Aktivität der Phosphomannomutase in 13 Leukozyten betrug im Mittel 3,33 nmol/min/mg bei einer Standardabweichung von 0,81. Die in 4 Fibroblastenproben gemessene PMM lag zwischen 1,99 und 3,52 nmol/min/mg. Der Mittelwert beträgt 2,78 nmol/min/mg. Die Enzymaktivität der PMM, die in vier verschiedenen Chorionzottenkulturen bestimmt wurde, liegt mit einem Mittelwert von ca. 2,99 nmol/min/mg ebenfalls im Aktivitätsbereich der Leukozyten und Fibroblasten.

6.3.2. PMI-Aktivität

Die mittlere Aktivität der PMI in Leukozyten liegt bei 5,82 nmol/min/mg. Die Aktivität der PMI, die wir in vier Fibroblastenkulturen gemessen haben, beträgt zwischen 4,11 und 5,99 nmol/min/mg bei einer durchschnittlichen Aktivität von 5,05 nmol/ min/mg. Diese Werte liegen im Bereich der von uns gemessenen Aktivität für Leukozyten (1,74 - 8,33

nmol/min/mg Protein). Die Enzymaktivitäten der PMI in drei verschiedenen Chorionzottenkulturengemessen maßen ca. 3,85 nmol/min/mg und bewegen sich somit im Bereich der Leukozyten und Fibroblasten.

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der normalen Enzymaktivitäten zusammen.

Tabelle 8 Normwerte für PMM und PMI

Zellart	**PMM**	**PMI**
Leukozyten: n	*13*	*13*
Bereich:	**1,70 - 5,46**	**3,52 - 13,81**
Mittelwert:	**3,33**	**5,82**
Standardabweichung:	0,81	1,51
Fibroblasten		
A	**1,99**	**4,78**
B	**3,34**	**5,32**
C	**2,22**	**4,11**
D	**3,52**	**5,99**
Mittelwert:	**2,76**	**5,05**
Chorionzotten		
A	**2,97**	**3,28**
B	**3,44**	**2,92**
C	**2,56**	**5,36**
Mittelwert:	**2,99**	**3,85**

6.3.3. PMM und PMI bei Patienten mit CDG-typischem Muster in der Mini-IEF

Bei zwei unserer Patienten (Patient 5 und 6), die in der Mini-Isoelektrofokussierung des Plasma-Transferrins ein deutlich pathologisches CDG-Bandenmuster mit auffälligen Di- und Asialotransferrinfraktionen erkennen ließen (Abb.1 und Abb.3), fanden wir in der Aktivitätsmessung von PMM und PMI in Leukozyten normale Werte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um eine Gruppe „CDG-X“, unter der man heute all diejenigen Patienten zusammenfasst, die eine auffällige, für CDG typische Klinik besitzen, deren zugrundeliegender Enzymmangel aber noch nicht diagnostiziert werden konnte.
Bei Patient 7 war die in Leukozyten gemessene PMM-Aktivität von 0,22 nmol/min/mg sehr niedrig und bestätigte die Diagnose CDG Ia. Die Eltern der Patientin hatten ebenfalls erniedrigte Werte für PMM. Die Aktivität der Phosphomannoisomerase in Leukozyten war bei der Patientin sowie bei den Eltern normal hoch. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab.9 PMM- und PMI-Aktivität in Leukozyten bei Patienten mit CDT

Patient	PMM (nmol/min/mg)	PMI (nmol/min/mg)	CDG-Banden
5	4,94	9,50	++++
6	2,74	5,33	++++
7	**0,22**	6,9	+++
Mutter	**1,07**	7,2	—
Vater	**0,88**	7,8	—
Normbereich	1,70 - 5,46	3,52 – 13,81	—

7. DISKUSSION

7.1. Mini-Isoelektrofokussierung im PhastSystem

Die Isoelektrofokussierung ist eine gutetablierte Screeningmethode zur differentialdiagnostischen Untersuchung von Glykosylierungsstörungen. Sie wurde bereits in vielen Studien beschrieben und kann als wissenschaftlich etablierte Methode angesehen werden. Die Mini-Isoelektrofokussierung mit dem Mini-PhastSystem stellt gegenüber herkömmlichen isoelektrischen Separationsmethoden eine technische Neuerung dar und bedeutet eine Verkürzung der Separationszeit um den Faktor 6 bis 10. Zum ersten Mal haben wir hier diese Methode zur Diagnostik des CDG-Syndroms angewandt. Mit der Mini-Isoelektrofokussierung von Transferrin haben wir eine schnelle und zuverlässige Screening-Methode entwickelt, die es ermöglicht, binnen kurzer Zeit CDG-Banden mit 0-3 Sialinsäureresten aufzudecken. Um die diagnostische Aussage zu verfeinern, könnte man im Anschluss an die Isoelektrofokussierung eine densitometrische Messung der Proteinbanden zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Sialotransferrin-Fraktionen durchführen. Die Mini-Isoelektrofokussierung mit dem PhastSystem stellt also eine sehr schnelle und sichere Methode für den ersten diagnostischen Schritt bei Patienten mit Verdacht auf CDG-Syndrom und anderen Glykosylierungsstörungen dar.

Vier Patienten mit enzymatisch gesichertem PMM-Mangel zeigten in der Isoelektrofokussierung ihres Transferrins das charakteristische Typ-I-Muster mit einer zusätzlichen Bande am pI des Disialotransferrins (6.1 Abb.1, Nr. 2, 3, 4). Bei zwei Patienten mit dringendem Verdacht auf CDG I waren die Banden des Asialotransferrins noch stärker ausgeprägt als bei den oben genannten Patienten (6.1 Abb.1, Nr. 5; Abb.3, Nr. 6). Das Muster mit der zusätzlichen Di- und Asialotransferrin-Fraktion, auch als „CDG-I-Bande“ bezeichnet, wird normalerweise bei Patienten mit CDG Ia gefunden. Da beide Enzymmängel, PMM und PMI, bei den 2 Patienten ausgeschlossen sind, könnte man vermuten, dass es einige andere Typen der CDG-Varianten gibt, bei denen noch stärkere Glykosylierungsdefekte vorkommen. Diese Gruppe wird heute „CDG-X“ genannt und fasst Patienten zusammen, die ein klassisches Bandenmuster in der Isoelektrofokussierung aufweisen, deren zugrundeliegender pathophysiologischer Defekt im Stoffwechselweg aber bislang nicht aufgeklärt werden konnte (39).

Bei Galaktosämie-Patienten mit Epimerase-Mangel fanden wir IEFT-Muster mit 0 – 3

Sialinsäureresten, allerdings waren diese Banden schwächer ausgeprägt als bei CDG Ia. Ob zwischen diesem Phänomen und der spät einsetzenden neurologischen Symptomatik ein näherer Zusammenhang besteht, sollte weiter erforscht werden. Das Transferrin-Muster von Patienten mit behandeltem Uridyltransferase-Mangel zeigte unauffällige Banden, was mit den Befunden bei CDG IIb (Abb.1) übereinkommt.

7.2. Charakterisierung der Enzyme

In dieser Arbeit wurde die Chrakterisierung der zwei Enzyme PMM und PMI durchgeführt. Während sich der Proteingehalt zur Absorptionsänderung im Bereich von Proteinkonzentrationen bis ca. 1,5 – 2,0 mg/ml linear verhält, flacht die Kurve beider Enzyme in höheren Proteinbereichen bei allen drei Zellarten zunehmend ab.
Die Substrataffinität der Phosphomannomutase erwies sich in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten als ähnlich, wobei sich die Michaelis-Menten-Konstante im Bereich von 0,12 und 0,19 mM/l bewegte (Abb.11 a – c). Neben einem im Bereich der anderen Zellarten liegenden Km-Wert von 0,14 mM/l fanden wir bei den Chorionzotten zusätzlich einen auffallend hohen Km-Wert von 2,4 mM/l (Abb.11 c). Dieser Wert könnte auf ein Isoenzym der Chorionzotten mit relativ niedriger Substrataffinität zurückzuführen sein. Bei der Phosphomannoisomerase ist die Substrataffinität der verschiedenen Zellarten ebenfalls vergleichbar hoch, mit Km-Werten zwischen 1,10 und 1,20 mM/l, wobei sich die Substrathemmung, im Vergleich zur PMM erst bei einer höheren Substratkonzentration einstellte (Abb.12 a – c).
Während die Fibroblasten und Leukozyten eine zuverlässige und effektive Quelle für die postnatale Diagnostik darstellen, untersuchten wir zum ersten Mal Chorionzotten. Wie im Kapitel Enzymcharakteristik beschrieben, waren die Eigenschaften der Chorionzotten denen in Leukozyten und Fibroblasten ähnlich und können möglicherweise für diagnostische Schritte in der Pränatalperiode herangezogen werden.

7.3. Aktivität der PMM und PMI

Unser Mittelwert von 3,33 nmol/min/mg Protein, der die Aktivität der Phosphomannomutase in Kontrolleukozyten näher beschreibt, liegt in dem von J.Jaeken in einer Studie (41) gemessene Aktivitätsbereich für Leukozyten von 1,7- 4,0 nmol/min/mg Protein. Der von uns gemessene Mittelwert der PMM in Fibroblastenkulturen von 2,76 nmol/min/mg Protein

kommt dem in der Literatur angegebenen Wert von 3,77 nmol/min/mg Protein von Jaeken J. (8) sehr nahe. Der Mittelwert der PMI in Leukozyten von 4,81 liegt nahe dem in der Literatur angegebenen Wert von 4,08 nmol/min/mg Protein (35). Allerdings differieren die Angaben in der Literatur sehr stark. Der von J.Jaeken in einer Studie mit Leukozyten (21) gemessene Mittelwert von 18,1 nmol/min/mg Protein mit einem Aktivitätsbereich von 16,6-20,4 nmol/min/mg Protein liegt deutlich höher. Möglicherweise sind die Unterschiede auf Messmethoden zurückzuführen. In unserer Arbeit lag die Aktivität der Phosphomannoisomerase von Fibroblastenkulturen in einem Bereich von 1,99 und 3,52 nmol/min/mg Protein. Die Angaben in der Literatur zur PMI-Aktivität in Fibroblasten variieren auch stark und reichen von 8,81 nmol/min/mg Protein (2) bis zu 21,9 nmol/min/mg Protein (35). Die erstmals gemessene Aktivität der Enzyme Phosphomannomutase und Phosphomannoisomerase in Chorionzotten liegt im Bereich der Werte von Leukozyten bzw. Fibroblasten.
Bei Patient 7 war die PMM-Aktivität in Leukozyten stark vermindert und sogar bei den Eltern lag die Aktivität unter dem Normbereich. Dies deutet auf die Entdeckung der Heterozygoten durch die einfache PMM-Bestimmung in Leukozyten hin. Nach Prof. Jaeken sollte die Enzymbestimmung der Leukozyten eine bessere diagnostische Möglichkeit bieten als die der Fibroblasten, da deren Enzymaktivität stark von der Kulturtechnik abhängig ist.

Zusammenfassend ist es mit der Mini-IEF möglich, Aberrationen der Glykosylierung von Proteinen aufzudecken, nicht nur bei CDG-Patienten sondern auch bei anderen Stoffwechsel-Patienten, unter anderem bei einigen Patienten mit Epimerase-Mangel. Zur weiterführenden Diagnostik sind CDG Ia und Ib in Leukozyten enzymatisch gut nachweisbar. Die Enzymmessung in Chorionzotten stellt zudem eine Möglichkeit der pränatalen Diagnose dar.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren wurden einige angeborene Stoffwechselerkrankungen entdeckt, deren Ursache in einer defekten Synthese von N-gebundenen Glykoproteinen liegt, so genannte „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG). Die klassische Galaktosämie und der Fruktosemangel führen auf ähnliche Weise zu sekundären Glykosylierungsstörungen.

Um Patienten mit CDG-Syndrom und anderen Stoffwechselerkrankungen auf eine Glykosylierungsstörung hin zu untersuchen, haben wir im ersten Teil der Arbeit eine Methode zur Isoelektrofokussierung von Transferrin entwickelt. Die IEF im Mini-PhastSystem ist hier besonders schnell und zuverlässig. Die charakteristischen Bandenmuster des mit einer verminderten Anzahl an Sialinsäureresten glykosylierten Transferrins liefern erste differentialdiagnostische Erkenntnisse.
Zwei unserer Patienten zeigten in der Mini-PhastSystem-IEF ein Muster, wie es normalerweise bei Patienten mit CDG Ia gefunden wird. Entgegen der Erwartung erwiesen sich aber die Enzyme Phosphomannomutase sowie auch die Phosphomannoisomerase als normal hoch im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den genannten Patienten um eine Gruppe handelt, die an einer seltenen Form des CDG-Syndroms leidet, „CDG-X“ genannt. Die Patienten zeigen in der Isoelektrofokussierung ein klassisches Bandenmuster, wobei der zugrundeliegende pathophysiologische Defekt im Stoffwechselweg bislang nicht aufgeklärt werden konnte (39).

Neben typischen Mini-IEFT-Mustern von Patienten mit CDG Ia haben wir auch Patienten mit folgender interessanter Befundkonstellation gefunden: Einige Neugeborene mit Epimerase-Mangel zeigten überraschenderweise CDG Banden mit 0-3 SR. Diese Banden korrelierten nicht mit der Höhe der Galaktose-Metaboliten und verschwanden auch nicht nach einer diätetischen Behandlung. Diese Befunde unterscheiden sich von den Befunden der klassischen Galaktosämie, da hier die pathologischen IEFT Muster nach diätetischen Maßnahmen verschwunden sind. Das Screening der Serum IEFT Banden mittels dieser schnellen Mini-IEFT Technik kann als sinnvolle Methode für die Überwachung und Nachbetreuung des Epimerase-Mangels verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die biochemische Charakterisierung der Enzyme Phosphomannomutase und Phosphomannoisomerase in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten. Diese beiden Enzyme sind für die häufigsten Formen des CDG-Syndroms,

Typ Ia und Ib, verantwortlich, welche bei ca. 80% der gesamten CDG-Patienten vorliegen. Während die Enzymdiagnostik in Fibroblasten und Leukozyten auf einer bereits etablierten Methode beruht und eine zuverlässige und effektive Quelle für die postnatale Diagnostik darstellt, untersuchten wir erstmals Chorionzotten, um zusätzlich die Möglichkeit einer pränatalen Kontrolle beurteilen zu können. Die Km-Werte und andere kinetische Eigenschaften der Enzyme waren in Leukozyten, Fibroblasten und Chorionzotten ähnlich und ermöglichen somit eine gute post- sowie eine pränatale Diagnostik der Enzymdefekte.

Zusammenfassend stellt die Mini- IEF von Transferrin eine einfache und schnelle Screeningmethode zum Nachweis von Glykosylierungsstörungen, klassischer Galaktosämie und Epimerase-Mangel dar. Die Enzymmessung der PMM und PMI in Leukozyten und Fibroblasten nach der Geburt kann in der weiterführenden Diagnostik durch die pränatale Untersuchung von Chorionzotten sinnvoll ergänzt werden. Die Tatsache, dass wir Patienten mit ausgeprägten Typ I IEFT-Banden bei normalen Enzymwerten gefunden haben, lässt vermuten, dass es CDG-Varianten mit noch stärkeren Glykosylierungsdefekten gibt.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGAMANOLIS D.P., POTTER J.L.: Lipoprotein disorder, cirrhosis, and olivo-pontocerebellar degeneration in two siblings. *Neurology* 36 (Suppl.5): 674-81,

2. BABOVIC-VUKSANOVIC D., PATTERSON M.C.: Severe hypoglycemia as a presenting symptom of carbohydrate-deficient glycoproteinsyndrome. *J Pediat* 135 (Suppl.6): 775-781, 1999

3. CARCHON H., VAN SCHACHTINGEN E.: Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia (phosphomannomutase-deficiency). *Biochim Biophys Acta* 1455 (Suppl. 2-3):155-65, 1999

4. CHANG Y., TWISS J.L.: Inherited syndrome of infantile olivopontocerebellar atrophy, micronodolar cirrhosis, and renal tubular microcystis: review of literature and a report of an additional case. *Acta Neuropathol* , 86 (Suppl. 4): 399-404, 1993

5. CLAYTON P.T., WINCHESTER B.G.: Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis*, 15 (Suppl. 6): 857-86, 1992

6. ENDRES W.; SHIN Y.S.: Fortschritte in Diagnostik und Therapie der Glykogenosen. *Stoffwechselerkrankungen im Kindesalter*, Perimed-Verlag, Erlangen:141-147, 1987

7. FERNANDES J., SAUDUBRAY J.M. Inborn Metabolic Diseases. *Diagnosis and Treatment* 1616, 2000

8. FREEZE H.H., AEBI M.: Molecular basis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes type I with normal phosphomannomutase activity. *Biochim Biophys Acta* 1455: 167-178, 1999

9. GITZELMANN R., STEINMANN B.: Uridine diphosphate galactose 4-epimerase deficiency: II. Clinical follow-up, biochemical studies and family investigation. *Helv Paediatr Acta* 28: 497, 1973

10. GUERRERO N.V.: Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *Journal of Pediatrics* 137 (6): 833-841, 2000

11. HAGBERG B.A., BLANNOW G.: Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: peculiar group of new disorders. *Pediat Neurol* 9: 255-262, 1993

12. HARDING B.N., GRANT,D.B.: Familial olivopontocerebellar atrophy with neonatal onset: a recessively inherited syndrome with systemic and biochemical abnormalities. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 51: 385-390, 1988

13. HINMAN A.R.: The importance of Newborn Screening. *Pediatrics* 108 (Suppl.3): 821, 2001

14. HOLTON J.B.,.GILLET M.B: Galactosemia: A new variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* 56: 885-887, 1981

15. HOLTON J.B., TYFIELD L.: Prenatal diagnosis of inherited metabolic diseases. Williams D, Marks V (eds): *Scientific Foundations of Biochemistry in Clinical Practice.* Oxford, Butterworth Heinemann Ltd: 237, 1994

16. HOLZGREVE V.W., MINY P.: Weiterverarbeitung der Chorionzotten. *Chorionzotten-diagnostik* : 101, 1987

17. HORSLEN S.P., CLAYTON P.T.: Olivopontocerebellar atrophy of neonatal omset and disialotransferrin developmental deficiency syndrome. *Arch Dis Child* 66 (Suppl. 9): 1027-1032, 1991

18. JAEKEN J., VANDERSCHUEREN- LODEWEYCK M., ET AL.: Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediat Res* 14: 179, 1980

19. JAEKEN J., VAN EIJK H.G.: Sialic acid deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 144: 245-247, 1984

20. JAEKEN J., EGGERMONT E.: An apparent homozygous x-linked disorder with carcohydrate deficient serum glycoproteins. (Letter) Lancet II: 1398, 1987

21. JAEKEN J., MATTHIJS G.: Phosphomannose isomerase deficiency: a carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with hepatic-intstinal presentation. *Am.J.Hum.Genet* 62: 1535-1539, 1998

22. JAEKEN J.: Congenital Defects of Glycosylation: Disorders of N-Glycan Synthesis. *Inborn Metabolic Diseases, diagnosis and treatment*, third edition, chapter 38: 433-437, 2000

23. JAEKEN J., MATTHIJS G., VAN SCHAFTLINGEN E.: Deficient N-Glycosylation in genetic diseases of carbohydrate metabolism. Defects of N-Glycan Synthesis. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* 74: 1601-2622, 2001

24. KOLETZKO B.: von Harnack *Kinderheilkunde*, Springer-Verlag: 166, 1999

25. LACEY J.M., BERGEN H.R.: Rapid Determination of Transferrin Isoforms by Immunoaffinity Liquid Chromatography anf Electrospray Mass Spectrometry. *Clin Chem* 47: 513-518, 2001

26. LEVY H.L., SEPE S.J.: Galactose-1-phosphate uridyl transferase deficiency due to Duarte/ galactosemia combined variation: Clinical and biochemical studies. *The Journal of Pediatrics* 92: 390-393, 1987

27. LIDL T., BAUER J.: Primärkulturen aus frischen Hautproben (Biopsien) menschlichen Ursprungs. *Zell-und Gewebekultur*: 88, 1987

28. DE LONLAY P., CUER M.: Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign phosphomannoisomerase deficiency: A new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. *J Pediat*, 135 (Suppl.3): 379-383, 1999

29. DE LONLAY P., SETA N.: A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorder of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet* 38: 14-19, 2001

30. LOWRY D.H., ROSENBROUGH N.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951

31. MACERATESI P.; DAUDE N. ET AL.: Human UDP-galactose 4´-epimerase gene and identification of five missense mutations. *Moecular Genetics of Metabolism* 63: 26-30, 1988

32. MATTHIJS G., SCHOLLEN E.: Mutations in PMM 2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genet* 16: 88-92, 1997

33. MATTHIJS G., SCHOLLEN E.: PMM (PMM I), the human homologue of SEC 53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* 40: 41-47, 1997

34. MERCK Manual of diagnosis and therapy 19: Genetic abnormalities of carbohydrate metabolism. Galactosemia. *Pediatrics* 269. Endocrine and metabolic disorders

35. NIEHUES R., HASILIK M.: Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib.Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 101 (Suppl.7): 1414-142, 1998

36. ORLEAN P. : Congenital disorder of glycosylation caused by defects in mannose addition during N-linked oligosaccharide assembly. *J Clin Invest* 105 (Suppl.2): 131-132, 2000

37. DE PRATER C.M., GERWIG G.J., BAUSE E.: A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet* 66: 1744-1756, 2000

38. PIRARD M., MATTHIS G., ET AL.: Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Letters* 452 : 319-322, 1999

39. PODSKARBI T; SHIN Y.S.: Newborn Screening of galactosemia and phenyketonuria. *Diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism*: Asian Europian Workshop on Inborn Errors of Metabolism: 17-22, 1996

40. PRIETSCH V., PETERS V.: A new case of CDG-x with stereotyped dystonic hand movements and optic atrophy. *J Inher Metab Dis* 25: 131-132, 2002

41. SARDHARWALLA I.B., WRAITH J.E.: A patient with severe type of epimerase deficiency galactosaemia. J *Inher Metab Dis* 11: 249-251, 1988

42. VAN SCHAFTLINGEN E., JAEKEN J.: Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Letters* 377: 318-320, 1995

43. SCRIVER C.R., BEAUDET A.L.: Galactosemia, GALT deficiency. *The metabolic and olecular bases of inherited disease* 72: 1561-1574, 2001

44. SCRIVER C.R., BEAUDET A.L.: Galactosemia, GALE deficiency. *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 72: 1575-1587, 2001

45. SHIN Y.S., ENDERES W., RIEHT M.: Prenatal diagnosis of galactosemia and properties of galactose-1-phosphate uridyltransferase in erythrocytes of galactosemic variants as well as in human fetal and adult organs. *Clin Chem Acta* 128: 271-281, 1983

46. SHIN Y.S.: Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. ed. *Techniques in Diagnostic Human Biomedical Genetics,* New York, Wiley-Liss: 267-284, 1990

47. SHIN Y.S. PODSKARBI T.: Pathogenetic mechanisms of long-term complications in classical galactosemia. Diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism*,* Asian Europian Workshop on Inborn Errors of Metabolism*:* 140-148, 1996

48. SHIN Y.S., KORENKE G.-C., ET AL.: UDPgalactose epimerase in lens and fibroblasts: Activity expression in patients with cataracts and mental retardation. *J Inher Metab Dis* 23: 383-386, 2000

49. SUTTON V.R.: Galactosemia. Up to date. 2002

50. WOHLERS T.M., CHRISTACOS N.C: Identification and characterization of a mutation in the human UDP-galactose-4-epimerase gene associated with generalized epimerase deficiency galactosemia. *American Journal of Human Genetics* 64 : 462-470, 1999

51. ZSCHOCKE J., HOFFMANN G.F.: Vademecum Metabolicum, *Manual of Metabolic Paediatrics* 72, 1999

Lebenslauf

Name	Christina Elisabeth Wiescher
Geboren	am 10.08.1977 in Fürstenfeldbruck
Mutter	Rosemarie Wiescher, Lehrerin
Vater	Dr. Klaus Wiescher, Internist
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	römisch-katholisch

Bildungsweg

1984-87	Besuch der Grundschule am Niederbronner Weg in Fürstenfeldbruck (1.Klasse übersprungen)
1987-96	Besuch das Graf-Rasso-Gymnasiums in Fürstenfeldbruck
1996	Abitur, Note 1,1
1997-2002	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1999 März	Physikum
2000 März	1.Staatsexamen, Note 2
2002 März	2.Staatsexamen, Note 2
2002-2003	Praktisches Jahr:
1.Tertial	Gynäkologie und Geburtshilfe in Rosenheim
2.Tertial	Chirurgie in Traunstein
3.Tertial	Innere Medizin in Traunstein
2003 März	3.Staatsexamen, Note 1