

**Neuartige Mutation im Gen der UDP-galactose:*N*-acetylglucosamine  
β-1,4-galactosyltransferase I verursacht  
kongenitale Neutropenie und psychomotorische Retardierung**

**Veronika Obermeier**



Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Neuartige Mutation im Gen der UDP-galactose:*N*-acetylglucosamine  
β-1,4-galactosyltransferase I verursacht  
kongenitale Neutropenie und psychomotorische Retardierung**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Obermeier

aus

Eggenfelden

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Angela Abicht

Univ. Prof. Dr. Jovica Ninkovic

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2021

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Schwere kongenitale Neutropenie .....	1
1.1.1	Neutrophile Granulozyten .....	1
1.1.2	Klinisches Erscheinungsbild der schweren kongenitalen Neutropenie .....	2
1.1.3	Molekulare Ursachen und Pathogenese .....	3
1.1.4	Therapie der schweren kongenitalen Neutropenie .....	6
1.2	Kongenitale Erkrankungen der Glykosylierung .....	7
1.2.1	Mangel an $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 .....	9
1.2.2	Struktur und Funktion der $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 .....	10
2	ZIEL DER ARBEIT .....	12
3	MATERIAL .....	13
3.1	Chemikalien .....	13
3.2	Puffer .....	16
3.3	Oligonukleotide .....	17
3.4	Antikörper .....	20
3.4.1	Primäre Antikörper .....	20
3.4.2	Sekundäre Antikörper .....	21
3.5	Enzyme .....	21
3.6	Plasmide .....	22
3.7	Kits .....	23
3.8	Zelllinien .....	24
4	METHODEN .....	25
4.1	Exom-Sequenzierung .....	25
4.2	Sanger-Sequenzierung .....	25
4.3	Durchflusszytometrie .....	27
4.4	Zellkultur .....	29
4.4.1	Zellkulturbedingungen .....	29
4.4.2	Isolierung von neutrophilen Granulozyten und PBMCs .....	30
4.4.3	Etablierung von EBV-LCL Zellen .....	32
4.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	32
4.5.1	Isolierung von RNA .....	32
4.5.2	Reverse Transkription .....	33
4.5.3	Quantitative Echtzeit-PCR .....	34

4.6	Klonierung .....	34
4.6.1	Klonierung des GFP_hB4GALT1 Fusionskonstruktes (pRRL_GFP_B4GALT1)	35
4.6.2	Zielgerichtete Mutagenese .....	37
4.6.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	37
4.6.3.1	Minipräparation.....	37
4.6.3.2	Maxipräparation.....	38
4.7	Transiente Transfektion .....	38
4.8	Generierung von B4GALT1 CRISPR/Cas9 Knockout HeLa Zellen .....	38
4.8.1	CRISPR/Cas9 System.....	38
4.8.2	Transfektion und Isolierung von Einzelzellkolonien.....	40
4.8.3	Genotypisierung .....	40
4.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	41
4.10	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	42
4.11	Untersuchung der Enzymaktivität von B4GALT1 .....	43
5	ERGEBNISSE .....	45
5.1	Auswirkung eines $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1-Mangels in primären humanen Zellen .....	45
5.1.1	Klinische Daten .....	45
5.1.2	Immunologische Untersuchungen .....	47
5.1.3	Identifikation der Mutation.....	52
5.1.4	Bestätigung der Mutation.....	53
5.1.5	Proteinexpression und Lokalisation von B4GALT1 in EBV-LCL Zellen .....	53
5.1.5.1	mRNA Expression in EBV-LCL Zellen .....	54
5.1.5.2	Western Blot Analyse .....	54
5.1.5.3	Immunfluoreszenzanalyse .....	55
5.2	Untersuchung des $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1-Mangels in HeLa Zellen.....	57
5.2.1	Genotypisierung .....	57
5.2.2	Validierung der HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen.....	58
5.2.3	Lokalisation von B4GALT1 <sup>WT</sup> und B4GALT1 <sup>Arg21Trp</sup> in HeLa Zellen .....	60
5.2.4	Messung der enzymatischen Aktivität der $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 .....	64
6	DISKUSSION.....	66
6.1	Humaner B4GALT1-Mangel (1031-1032insC) verursacht mentale und psychomotorische Retardierung sowie Blutgerinnungsstörungen.....	67
6.2	Auswirkung eines B4GALT1-Mangels im Mausmodell.....	68
6.3	Schwere kongenitale Neutropenie mit neurologischer Beteiligung.....	69
6.4	Neue CDG mit neurologischer und hämatopoetischer Beteiligung.....	72

7	ZUSAMMENFASSUNG .....	73
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	74
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	80
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	83
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	84
12	DANKSAGUNG .....	87
13	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	88

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Schwere kongenitale Neutropenie

Die schwere kongenitale Neutropenie (severe congenital neutropenia, SCN) zählt zu den primären Immundefekten, die sich im Allgemeinen durch eine erhöhte Infektanfälligkeit auszeichnen. SCN umfasst eine Gruppe von angeborenen Immundefekten, bei denen ein Mangel an neutrophilen Granulozyten im Vordergrund steht. Der schwedische Kinderarzt Rolf Kostmann hat eine Form der schweren kongenitalen Neutropenie, die später auch als Kostmann-Syndrom bezeichnet wird, erstmals 1950 bei einer Familie in Schweden beschrieben. Die Forschungen zu den molekularen Grundlagen der SCN nahmen erst 40 Jahre später seinen Lauf (Klein 2009, Klein 2017). Mittlerweile wurden verschiedene Gendefekte mit unterschiedlichem Vererbungsmuster identifiziert. Dadurch wurden Anhaltspunkte zum Verständnis der Pathophysiologie geliefert und die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze gegeben (Schaffer and Klein 2007).

### 1.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen den Hauptteil der Leukozyten dar und sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie reagieren als erstes System bei der Abwehr von infektiösen Erregern wie Bakterien und Pilze (Mayadas, Cullere et al. 2014). Die Bildung und Differenzierung der unterschiedlichen Zellen des Blutes findet größtenteils im Knochenmark statt. Aus der myeloiden Stammzelle entwickeln sich in mehreren Stufen die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Abbildung 1). Die neutrophilen Granulozyten machen 50-70% der Leukozyten im peripheren Blut aus. Ihre Aufgabe besteht darin, Erreger durch Phagozytose und verschiedene zytotoxische Funktionen abzutöten. Außerdem produzieren sie Zytokine und andere Signalmoleküle und sind an der Entzündungsreaktion beteiligt (Horwitz, Duan et al. 2007, Mayadas, Cullere et al. 2014).

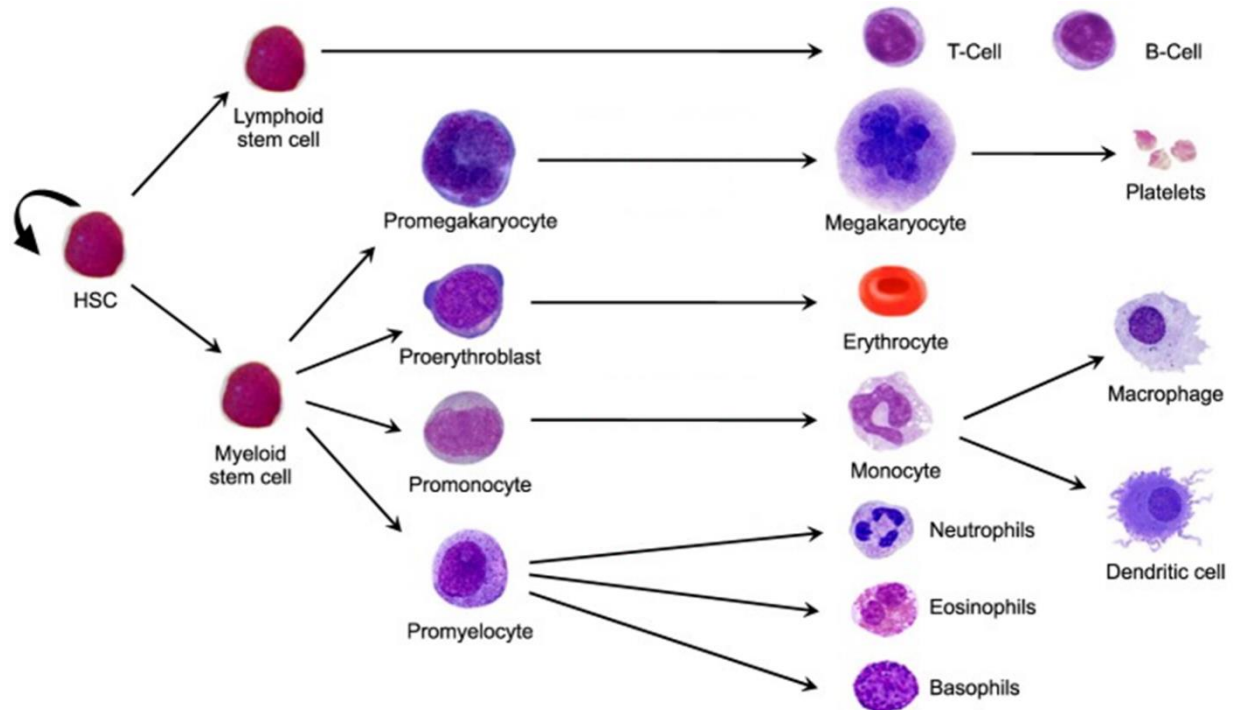


Abbildung 1: Hämatopoese; Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle in die verschiedenen Blutzellen; die lymphoide Stammzelle differenziert sich in T- und B-Zellen, aus der myeloiden Zelllinie gehen Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten hervor (Sarvothaman, Undi et al. 2015)

### 1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild der schweren kongenitalen Neutropenie

Der Begriff „Neutropenie“ bezeichnet eine Verminderung der Anzahl der absoluten neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut ( $<1500$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Bei einer absoluten Neutrophilenzahl von 1000-1500 pro  $\mu\text{l}$  Blut liegt eine milde, bei 500-1000 pro  $\mu\text{l}$  Blut eine moderate und unter 500 pro  $\mu\text{l}$  Blut eine schwere Neutropenie vor (Klein 2009). Des Weiteren zeigen Patienten mit einer SCN charakteristischerweise eine erhöhte Anzahl von Monozyten im Blut (Zeidler, Germeshausen et al. 2009). Neutrophile Granulozyten sind wichtig für die Abwehr von Bakterien und anderen infektiösen Erregern. Patienten mit einer schweren kongenitalen Neutropenie weisen daher eine hohe Infektanfälligkeit auf. Sie leiden an rezidivierenden bakteriellen Infektionen wie Mittelohrentzündungen, Bronchitiden, Pneumonien, Hautabszessen sowie verschiedenen Parodontopathien (Hauck and Klein 2013). Diese Infektionen treten bereits kurz nach der Geburt auf, so dass viele Kinder mit SCN früh eine Diagnose erhalten. Je nach molekularer Ursache der SCN können zusätzlich zum hämatopoetischen System auch andere Organsysteme betroffen sein (Boztug, Ding et al. 2010, Hauck and Klein 2013, Meerschaut, Bordon et al. 2015).



Patienten mit schwerer kongenitaler Neutropenie leiden nicht nur an bakteriellen Infektionen, ihre Erkrankung prädisponiert sie auch für die Entwicklung einer klonalen Expansion von Vorläuferzellen im Sinne eines myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder einer akuten Leukämie (Hauck and Klein 2013). Im Zusammenhang damit stehen oftmals somatische Mutationen im *CSF3R*-Gen, welches den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) Rezeptor kodiert. Veränderungen im G-CSF-Rezeptor haben einen Abbruch der C-terminalen Region des G-CSF-Rezeptors zur Folge. *CSF3R*-Mutationen führen zu einer erhöhten Proliferation der neutrophilen Granulozyten und zu einem Ausreifungsstopp auf Ebene der Promyelozyten (Dong, Brynes et al. 1995).

### 1.1.3 Molekulare Ursachen und Pathogenese

Für die Entstehung von schweren kongenitalen Neutropenien sind verschiedene Genmutationen verantwortlich. Vor allem in den letzten Jahren wurden mehrere Gendefekte identifiziert und deren Auswirkung auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten erforscht.

Das erste Gen, welches mit der SCN in Verbindung gebracht wurde, ist das Gen der neutrophilen Elastase (*ELANE/ELA2*). Bereits über 50 verschiedene heterozygote Mutationen wurden identifiziert. Die Mutationen werden entweder im autosomal dominanten Modus vererbt oder de novo erworben (Klein 2009). Eine Mutation im Gen der neutrophilen Elastase ist bei 50-60% der SCN-Patienten die Ursache ihrer Erkrankung (Horwitz, Duan et al. 2007, Klein 2009). Die neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, die hauptsächlich in myeloiden Zellen im Stadium der Promyelozyten synthetisiert wird. Sie ist vor allem in den azurophilen Körnchen der neutrophilen Granulozyten eingebettet, kann aber auch an der Zelloberfläche und Intrazellulärmembran lokalisiert sein (Dale, Person et al. 2000, Horwitz, Duan et al. 2007). Auch bei der Verarbeitung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren spielt die neutrophile Elastase eine wichtige Rolle (Horwitz, Corey et al. 2013). Mutationen im Gen der neutrophilen Elastase führen zu einer Fehllokalisierung des Proteins und verursachen einen erhöhten Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER), was wiederum zu einer gesteigerten Apoptose der neutrophilen Granulozyten führt (Hauck and Klein 2013, Horwitz, Corey et al. 2013).

Eine weitere Variante einer autosomal dominant vererbten SCN wird durch Mutationen im Gen des Transkriptionsfaktors Growth factor independent 1 (*GFI1*) verursacht (Karsunky, Zeng et al. 2002, Person, Li et al. 2003). *GFI1* ist ein Zink-Finger-Protein, das als Protoonkogen die Transkription von Genen unterdrückt und unter anderem die Differenzierung der hämatopoetischen myeloiden Stammzellen reguliert. Ein hemmender Einfluss von *GFI1* auf die Expression der neutrophilen Elastase wurde ebenfalls beschrieben (Grimes, Chan et al. 1996).

Rolf Kostmann hatte bei seiner Erstbeschreibung (Kostmann 1956) bereits erkannt, dass der Vererbungsmodus der Erkrankung seiner schwedischen Patienten einem autosomal rezessiven Muster folgt. Fünfzig Jahre nachdem der Kinderarzt die ersten Kinder mit SCN beschrieben hatte, wurde deren Erkrankung auf molekularer Ebene aufgeklärt. Eine genetische Analyse von drei kurdischen Familien ergab, dass die SCN durch homozygote Mutationen im Gen des HSC-L-associated protein X-1 (*HAX1*) verursacht wird. Eine Untersuchung der DNA von Patienten aus Schweden bestätigte, dass auch die von Dr. Rolf Kostmann erstmals beschriebenen Patienten Mutationen in *HAX1* hatten (Klein, Grudzien et al. 2007). *HAX1* ist ein mitochondriales Protein, das für die Aufrechterhaltung des inneren Membranpotentials der Mitochondrien von Bedeutung ist. Außerdem ist *HAX1* an der Signalübertragung und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt (Klein, Grudzien et al. 2007, Boztug and Klein 2009). Da *HAX1* als antiapoptotisches Protein für die Homöostase der myeloiden Zellen zuständig ist, zeigt sich bei Patienten mit *HAX1*-Mutationen eine erhöhte Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten. Einige Patienten zeigen auch neurologische Auffälligkeiten wie Entwicklungsverzögerung, kognitive Beeinträchtigungen oder Epilepsie (Rezaei, Chavoshzadeh et al. 2007, Boztug, Ding et al. 2010). Diese treten insbesondere dann auf, wenn beide Isoformen, *HAX1A* und *HAX1B* von der Mutation betroffen sind (Germeshausen, Grudzien et al. 2008).

Vor Kurzem wurden verschiedene Mutationen im Gen Jagunal homolog 1 (*JAGN1*) als Ursache der SCN entdeckt. *JAGN1* ist im ER lokalisiert und ist in den frühen Sekretionsweg integriert, der für die Differenzierung und Lebensfähigkeit von neutrophilen Granulozyten erforderlich ist. Außerdem übernimmt *JAGN1* eine Aufgabe, um eine korrekte Signalübertragung des G-CSF Rezeptors zu gewährleisten (Boztug, Jarvinen et al. 2014). Homozygote Mutationen im *JAGN1*-Gen führen zu einer fehlerhaften Glykosylierung von Proteinen und zu einer gesteigerten Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten (Boztug, Jarvinen et al. 2014, Wirnsberger, Zwolanek et al. 2014).

In allen bisher bekannten Formen der schweren kongenitalen Neutropenie mit Mutationen im *HAX1*-, *ELANE*-, *GFI1*- und *JAGN1*-Gen kommt es in der Differenzierungsphase der neutrophilen Granulozyten zu einem Ausreifungsstopp (Abbildung 2). Im Knochenmark zeigt sich typischerweise eine erhöhte Anzahl an Promyelozyten, im peripheren Blut ein Mangel an reifen neutrophilen Granulozyten (Klein 2011, Hauck and Klein 2013).

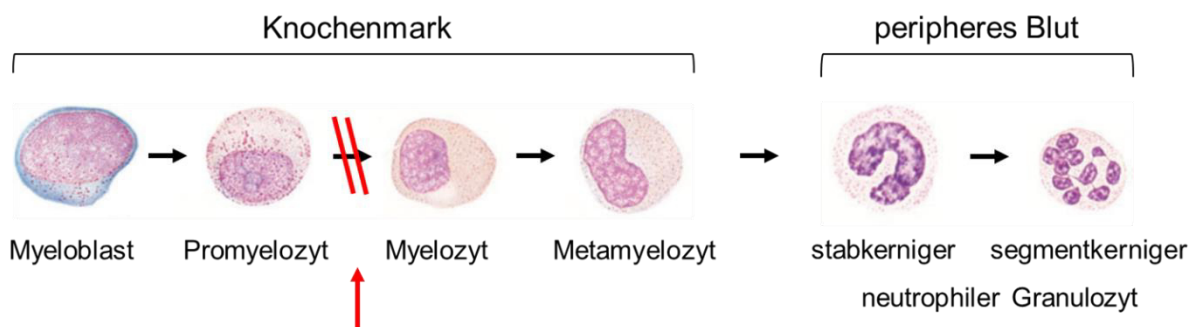


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Stadien der neutrophilen Granulozyten; Ausreifungsstopp auf Ebene der Promyelozyten (abgewandelt von Klein 2011)

Vacuolar protein sorting homolog 45 (*VPS45*) ist für den endosomalen Membrantransport und damit auch für eine Sortierung von Proteinen zuständig. Autosomal rezessive Mutationen im *VPS45*-Gen sind für die Entstehung einer SCN verantwortlich. Vermehrte Apoptose und eine Beeinträchtigung der Zellmotilität ist in *VPS45*-defizienten neutrophilen Granulozyten zu beobachten (Vilboux, Lev et al. 2013). Kürzlich wurden neue Mutationen im *VPS45*-Gen beschrieben, die nicht nur das hämatopoetische System betreffen, sondern auch neurologische Symptome zur Folge haben (Meerschaut, Bordon et al. 2015).

Eine weitere Ursache der SCN sind autosomal rezessive Mutationen im Gen der Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 (*G6PC3*), welche in der Membran des ER lokalisiert ist. Veränderungen im *G6PC3*-Gen verursachen erhöhten Stress im ER und Glykosylierungsdefekte und tragen somit zu Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten bei. Wie schon bei Mutationen im *ELANE*- oder *HAX1*-Gen beschrieben, ist eine vermehrte Apoptose der neutrophilen Granulozyten zu erkennen (Boztug, Appaswamy et al. 2009, Hayee, Antonopoulos et al. 2011). Patienten mit *G6PC3*-Mutationen zeigen neben einer variablen Thrombozytopenie typischerweise auch extrahämatopoetische Manifestationen wie angeborene Herz- und Urogenitalfehler (Hauck and Klein 2013).

Schwere kongenitale Neutropenie wird auch im Zusammenhang mit Mutationen im Gen der Adenylate kinase 2 (*AK2*) und des Wiskott-Aldrich syndrom protein (*WASP*) beschrieben. *AK2* ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und ist relevant für die Stabilisierung des Membranpotenzials und die Regulierung der Apoptose in myeloiden Zellen. *WASP* spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und reguliert die Proliferation und Apoptose in myeloiden Zellen (Boztug and Klein 2009, Klein 2009).

Angeborene Mutationen im *CSF3R*-Gen, das für den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) -Rezeptor kodiert, verursachen ebenfalls eine kongenitale Neutropenie. Im Knochenmark der Patienten mit *CSF3R*-Mutation ist jedoch keine Beeinträchtigung der Reifungsphase der neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Außerdem sprechen diese Patienten nicht auf die Therapie mit rekombinantem humanem G-CSF an (Triot, Jarvinen et al. 2014).

Mutationen im *CLPB*-Gen, welches die caseinolytische Peptidase B homolog kodiert, können ebenso mit einer kongenitalen Neutropenie assoziiert sein. CLPB interagiert mit der  $Ca^{2+}$ -ATPase SERCA2 des sarko-/endoplasmatischen Retikulums (ATP2A2), welches in den apoptotischen Prozess mit HAX1 involviert ist. Charakteristisch für CLPB-Mutationen ist eine 3-Methylglutaconazidurie. Des Weiteren sind Bewegungsstörungen, Katarakt und unterschiedlich schwere neurologische Defizite bekannt. Allerdings führen nicht alle Mutationen in diesem Gen zu einer Neutropenie (Wortmann, Zietkiewicz et al. 2015).

#### 1.1.4 Therapie der schweren kongenitalen Neutropenie

Das Ziel einer Therapie der schweren kongenitalen Neutropenie beruht in erster Linie auf der Wiederherstellung der Abwehrfunktion der neutrophilen Granulozyten durch eine Erhöhung ihrer Anzahl im Blut. Mittel der ersten Wahl ist die Therapie mit G-CSF. Das rekombinante humane G-CSF (rhG-CSF) wurde erstmals 1988 zur Behandlung einer SCN eingesetzt (Klein 2009, Donadieu, Fenneteau et al. 2011). G-CSF beschleunigt die Differenzierung und Reifung von neutrophilen Granulozyten und verringert deren Apoptoserate (Dale 1998). Die Gabe von G-CSF erfolgt subkutan mit einer täglichen Dosis von 3-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht und kann individuell angepasst werden. Die Anzahl der Neutrophilen sollte bei Behandlung mit G-CSF 1000-1500/ $\mu\text{l}$  oder mehr betragen, um einen ausreichenden Schutz vor Infektionen zu gewährleisten (Klein 2009). Patienten, die über einen längeren Zeitraum eine hohe G-CSF-Dosis ( $>6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ) erhalten, haben ein erhöhtes Risiko, ein MDS oder leukämische Veränderungen zu entwickeln. Mögliche Ursachen sind erworbene Mutationen im *CSF3R*-Gen (Rosenberg, Alter et al. 2006, Germeshausen, Ballmaier et al. 2007). Um eventuelle Mutationen im G-CSF Rezeptorgen frühzeitig zu erkennen, wird eine jährliche Untersuchung des Knochenmarks empfohlen (Klein 2009).

Die aktuell einzige kurative Therapiemöglichkeit der schweren kongenitalen Neutropenie ist die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT). Für Patienten, die nicht auf die Therapie mit dem Wachstumsfaktor G-CSF ansprechen, ist eine HSCT die einzige Möglichkeit, die rezidivierenden schweren Infektionen zu behandeln und die Neutropenie zu heilen und damit klar indiziert. Eine HSCT ist außerdem angezeigt,

wenn Patienten ein myelodysplastisches Syndrom oder eine Leukämie entwickeln (Donadieu, Fenneteau et al. 2011). Allerdings müssen Aspekte wie Verfügbarkeit von HLA-identen Spendern, eine gute Nachsorge (insbesondere bei Patienten aus Ländern ohne entsprechende Strukturen des Gesundheitswesens) sowie Komorbiditäten bei der Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation berücksichtigt werden.

## 1.2 Kongenitale Erkrankungen der Glykosylierung

Zu den angeborenen Glykosylierungsstörungen (congenital disorders of glycosylation, CDG) gehören Erkrankungen, die durch Defekte in der Synthese der Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen verursacht werden. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden, CDG-I und CDG-II. CDG-I umfasst Störungen im Aufbau der lipidgebundenen Oligosaccharid-Kette und dessen Transfer zum Protein. CDG-II beschreibt Defekte in der Verarbeitung der proteingebundenen Glykane (Grunewald, Matthijs et al. 2002). Bisher sind über 100 verschiedene kongenitale Glykosylierungsstörungen bekannt, die meist mehrere Organe betreffen. Auch das zentrale und periphere Nervensystem ist in ca. 80% der CDGs involviert (Freeze, Eklund et al. 2015). Eine Ausnahme ist die CDG-Ib, bei der überwiegend Leber und Gastrointestinaltrakt betroffen sind (Grunewald, Matthijs et al. 2002). Patienten mit einer CDG leiden oft an geistiger und psychomotorischer Entwicklungsverzögerung, zerebellären Dysfunktionen, muskulärer Hypotonie, peripherer Neuropathie und Stoffwechselstörungen in verschiedenen Organen. Die Schweregrade der jeweiligen Symptome können je nach Subtyp stark variieren (Grunewald, Matthijs et al. 2002, Freeze, Eklund et al. 2015). Es sind verschiedene Defekte bekannt, die im Zytosol (CDG-Ia, CDG-Ib), im Endoplasmatischen Retikulum (CDG-Ic, CDG-Id, CDG-Ie, CDG-If; CDG-IIb) und im Golgi-Apparat (CDG-IIa, CDG-IIc, CDG-IId) lokalisiert sind und auf unterschiedliche Weise zu Glykosylierungsstörungen führen. (Grunewald, Matthijs et al. 2002, Hansske, Thiel et al. 2002). Nach wie vor ist die isoelektrische Fokussierung (IEF) von Serumtransferrin die Standardmethode der CDG-Diagnostik. Dadurch erhält man erste Informationen über den Schweregrad des Glykosylierungsdefektes und kann diesen auch der CDGI oder CDGII zuordnen (Lefeber, Morava et al. 2011). In den letzten Jahren wurden weitere Gendefekte als Ursache einer CDG identifiziert (Scott, Gadomski et al. 2014). Im Folgenden werden die häufigsten und für diese Arbeit bedeutendsten kongenitalen Glykosylierungsstörungen kurz beschrieben.

Der häufigste Typ der kongenitalen Glykosylierungsstörungen ist CDG-Ia, von dem weltweit aktuell ca. 700 Patienten betroffen sind und dessen Ursache ein Mangel an Phosphomannomutase 2 (PMM2) ist (Grunewald, Matthijs et al. 2002, Monticelli, Ferro et al.

2016). CDG-Ia kann in drei Stufen eingeteilt werden, die im klinischen Phänotyp stark variieren. Die frühkindliche Form der CDG-Ia geht aufgrund schwerer Infektionen oder Organversagen mit einer Kindersterblichkeit von 20-25% einher. Die sich spät entwickelnde, adulte Form äußert sich durch leichte neurologische Defizite (Matthijs, Schollen et al. 1997, Grunewald, Matthijs et al. 2002, Resende, Carvalho et al. 2014).

Der selteneren Form eines CDG-Ib liegt ein Mangel an Phosphomannose Isomerase (PMI) zugrunde. Betroffene Patienten leiden vor allem an hepatischen und gastrointestinalen Symptomen, neurologisch sind meist keine Auffälligkeiten zu beobachten (Schollen, Dorland et al. 2000, Grunewald, Matthijs et al. 2002). Entscheidend ist eine frühe Diagnose, da Patienten mit CDG-Ib durch die orale Gabe von Mannose erfolgreich behandelt werden können (Grunewald, Matthijs et al. 2002).

Mutationen im Gen der  $\alpha$ -1,3-Glucosyltransferase (*ALG6*) verursachen CDG-Ic, die nach der CDG-Ia die häufigste Form der kongenitalen Glykosylierungsstörungen ist. CDG-Ic zeichnet sich hauptsächlich durch neurologische Störungen aus, die aber etwas milder als bei CDG-Ia ausfallen (Imbach, Grunewald et al. 2000).

CDG-Id entsteht durch einen Mangel an  $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase (*ALG3*) und manifestiert sich vor allem durch neurologische Symptome. Schwere Epilepsie, Mikrozephalie und stark verzögerte psychomotorische Entwicklung stehen im Vordergrund (Grunewald, Matthijs et al. 2002, Rimella-Le-Huu, Henry et al. 2008).

Veränderungen im *DPM1*-Gen führen zu Funktionsbeeinträchtigungen der Dolicholphosphat Mannose Synthase und definieren CDG Typ Ie. Charakteristisch hierfür sind schwere Entwicklungsverzögerungen, dysmorphische Gesichtszüge und epileptische Krampfanfälle (Imbach, Schenk et al. 2000, Grunewald, Matthijs et al. 2002).

Gedeihstörungen, Krampfanfälle, schwere psychomotorische Retardierung und Sehstörungen sind charakteristisch für Patienten mit CDG-Ilf. Die Ursache dafür ist eine Mutation im *MPDU1* (Mannose-P-dolichol utilization defect 1) -Gen (Kranz, Denecke et al. 2001, Schenk, Imbach et al. 2001).

CDG-IIa beruht auf einem Mangel an N-Acetylglucosaminyltransferase II aufgrund einer Mutation im *MGAT2*-Gen. Patienten mit CDG-IIa zeigen kraniofaziale Dysmorphien und psychomotorische Retardierung unterschiedlichen Ausmaßes (Cormier-Daire, Amiel et al. 2000, Grunewald, Matthijs et al. 2002).

Ein Defekt der Glucosidase 1 verursacht CDG-IIb, eine äußerst schwere Form der kongenitalen Glykosylierungsstörungen. Dysmorphien, schwere Hypotonie, epileptische Krampfanfälle und schwerwiegende Entwicklungsverzögerungen sind die Folgen (De Praeter, Gerwig et al. 2000).



Geistige und motorische Entwicklungsverzögerung und rezidivierende Infekte sind die Hauptsymptome der CDG-IIc und entstehen durch eine Fehlfunktion des GDP-Fucose Transporters (Lubke, Marquardt et al. 2001).

CDG-IIId liegt ein Mangel des Enzyms  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 (B4GALT1) zugrunde, der sich durch Entwicklungsverzögerungen, Hydrozephalus, Myopathie und Blutgerinnungsdefekte auszeichnet (Hansske, Thiel et al. 2002, Peters, Penzien et al. 2002).

Mutationen im Phosphoglucomutase 3 (*PGM3*)-Gen verursachen eine neue Form der CDG mit immunologischer Beteiligung. Neben verschiedenen dysmorphischen Auffälligkeiten und geistigen Behinderungen sind auch rezidivierende Infekte und kongenitale Leukopenie zu beobachten (Stray-Pedersen, Backe et al. 2014).

### 1.2.1 Mangel an $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1

Peters und Kollegen beschrieben eine neue Form der kongenitalen Glykosylierungsstörungen, die als CDG-IIId bezeichnet wurde und der ein Mangel an  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 (B4GALT1) zugrunde liegt (Peters, Penzien et al. 2002). Charakteristische Symptome der CDG-IIId sind ein Hydrozephalus, Myopathie, mentale Retardierung, hepatische und gastrointestinale Probleme sowie Blutgerinnungsstörungen. Der erstbeschriebene Patient mit B4GALT1-Mangel hatte eine homozygote Insertion eines Nukleotids (1031-1032insC), was zu einem vorzeitigen Translationsstop des Proteins und zu einem Verlust der letzten 50 Aminosäuren am C-Terminus des Enzyms führt (Hansske, Thiel et al. 2002, Peters, Penzien et al. 2002). Immunfluoreszenzanalytische Untersuchungen zur Lokalisation des Golgi-Proteins in Fibroblasten des Patienten und in Zellen mit B4GALT1<sup>1031-1032insC</sup> Mutation zeigten eine Kolokalisation von B4GALT1 mit dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die 1031-1032insC-Mutation wird B4GALT1 im ER zurückgehalten und nicht zum Golgi-Apparat transportiert. Ebenso wurde eine verminderte Aktivität des Enzyms in den Patientenzellen gemessen (Hansske, Thiel et al. 2002).

Guillard et al. haben eine weitere Patientin mit identischer Mutation (1031-1032insC) im *B4GALT1*-Gen identifiziert. Faziale Dysmorphien, Hepatomegalie, Diarrhoe sowie Gerinnungsstörungen sind die Hauptsymptome. Sie zeigt keine neurologischen Auffälligkeiten, die psychomotorische Entwicklung ist nicht beeinträchtigt. Des Weiteren wird eine Normalisierung der Entwicklung des zuvor beschriebenen Patienten (Peters/Hansske) berichtet. Im Alter von elf Jahren sind keine neurologischen Symptome mehr zu beobachten und motorische Defizite sind nur noch geringfügig vorhanden. Die B4GALT1-CDG zeichnet sich somit bei älteren Patienten vor allem durch Blutgerinnungsstörungen, milde Myopathie und faziale Dysmorphien aus (Guillard, Morava et al. 2011).

### 1.2.2 Struktur und Funktion der $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1

Die UDP-galactose *N*:acetylglucosamine  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase I (B4GALT1) gehört zur Familie der Glykosyltransferasen, die für die Synthese von Glykokonjugaten zuständig sind (Ramakrishnan, Boeggeman et al. 2004). Glykosyltransferasen transportieren den Monosaccharidanteil eines aktivierten Zuckermoleküls zu einem Akzeptormolekül und bauen so eine Kette aus Mehrfachzuckern auf. Es sind sieben Mitglieder der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase-Familie bekannt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und in die Entstehung verschiedener Krankheiten involviert sind (Ramakrishnan, Boeggeman et al. 2004, Qasba, Ramakrishnan et al. 2008). B4GALT1 ist eine trans-Golgi Glykosyltransferase und überträgt Galaktose von UDP-Galaktose auf ein freies Zuckermolekül, zum Beispiel N-Acetylglucosamin (Abbildung 3).

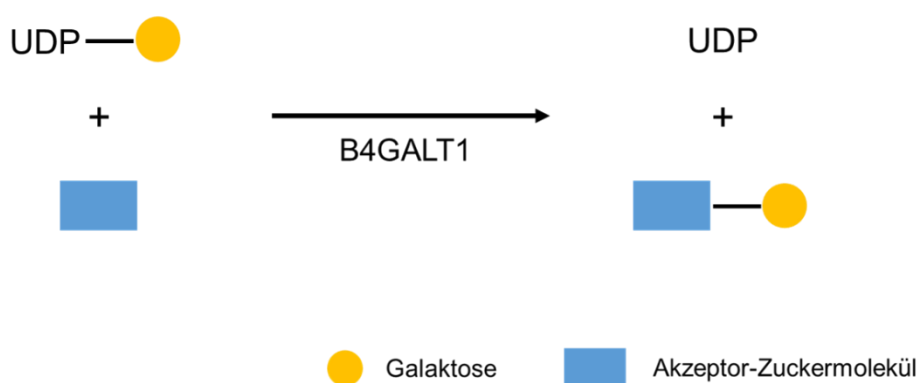


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der B4GALT1-Funktion; Galaktose wird durch B4GALT1 von UDP auf ein freies Zuckermolekül übertragen

Das Protein ist aber auch an der Zelloberfläche lokalisiert und dadurch in viele verschiedene biologische Funktionen der Zelle involviert. Eine weitere Funktion von B4GALT1 liegt in der Biosynthese von Laktose durch die Interaktion mit  $\alpha$ -Lactalbumin. Es ist ein Typ II Protein mit einem N-terminalen zytoplasmatischen Bereich, einer kurzen transmembranen Region, einem Stammbereich und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Abbildung 4). Weiterhin kann eine kurze von einer langen Form unterschieden werden. Der Unterschied besteht in der Länge der Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Membran. Die 13 zusätzlichen Aminosäuren sind für die Bindung des Proteins an der Zelloberfläche verantwortlich (Qasba, Ramakrishnan et al. 2008).





Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Domänen von B4GALT1;  
Zyt. = zytoplasmatisch, TM = transmembran (abgewandelt von Quasba 2008)

## 2 ZIEL DER ARBEIT

Das Labor von C. Klein hat im Rahmen genomweiter Untersuchungen bei Patienten mit kongenitaler Neutropenie eine neue Mutation im Gen der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 identifiziert. Der Patient zeigte neben der Neutropenie auch eine Thrombopenie sowie neurologische Symptome. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der neu identifizierten Mutation im *B4GALT1*-Gen auf die Funktion und Synthese des Proteins zu untersuchen.

Blutproben von Patient und gesunden Spendern wurden mittels Durchflusszytometrie immunologisch untersucht. Des Weiteren erfolgte die Etablierung einer immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinie aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Patient und gesunden Spendern. Anschließend wurde die Expression und Lokalisation von B4GALT1 in diesen Zellen analysiert.

Außerdem wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems ein HeLa B4GALT1 Knockout-Konstrukt generiert. HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen wurden mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfiziert und die Lokalisation des Proteins mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft.

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma, USA
2-Propanol	Roth / AppliChem, Deutschland
Agarose	AppliChem, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, USA
Ampicillin	AppliChem, Deutschland
Borsäure	Roth, Deutschland
Bovines Serumalbumin (Nimmo, Absalom et al.)	Sigma, USA
Bromphenol blau sodium salt	Roth, Deutschland
Chloroquine diphosphate salt	Sigma, USA
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad, USA
DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, USA
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Deutschland
DNA-ladder 1 kb	peqlab, USA
DNA-ladder 100 bp	Solis Biodyne, Estland
dNTPs	Thermo Scientific, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher, USA
Ethanol	Roth, Deutschland

Ethidiumbromid	AppliChem, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Deutschland
ExoSAP-IT™	Affymetrix, USA
Fast SYBR® Green Master Mix	Thermo Fisher, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, UK
Glutamin	Life Technologies, USA
Glycerin	Roth, Deutschland
Hepes Buffered Saline	Fluka, USA
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco, USA
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Deutschland
LB Medium	Roth, Deutschland
Loading dye 6X	Thermo Scientific, USA
Lysepuffer	Cell Signaling, USA
Lysing Solution 10X Concentrate	BD Biosciences, USA
Methanol	Roth, Deutschland
Milchpulver	Roth, Deutschland
Mounting medium	Dako, Deutschland
N-Acetyl-D-Glucosamin	Sigma, USA
Natriumchlorid	Roth, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco, USA
NP-40 Alternative	Calbiochem, Deutschland
Oligo(dT)primer	Thermo Scientific, USA

Ovalbumin, Alexa Fluor® 647 Conjugate	Thermo Fisher, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Paraformaldehyd (16%), EM Grade	VWR, USA
Penicillin / Streptomycin (5,000 U/ml)	Gibco, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alpha Diagnostics, USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Deutschland
pHrodo®Red <i>E.coli</i> BioParticles® Conjugate	Thermo Fisher, USA
Poly-D-Lysin	Sigma, USA
Polyplus JetPEI® DNA transfection reagent	Polyplus transfection, Frankreich
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma, USA
Proteinase K	Qiagen, Deutschland
Roti® Nanoquant 5X Konzentrat	Roth, Deutschland
Roti® Stock SDS 20%	Roth, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamide)	Roth, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Deutschland und Thermo Fisher, USA
Saponin	Sigma, USA
Stripping Puffer	Thermo Fisher, USA
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Deutschland
TRIS base	Roth, Deutschland
TRIS hydrochlorid	Roth, Deutschland
Trypanblau	Fluka/Gibco, USA
Trypsin EDTA	Gibco, USA
Tween-20	Sigma, USA
UDP-Galaktose	Sigma, USA

## 3.2 Puffer

Tabelle 2: Verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockier- und Permeabilisierungspuffer (Immunfluoreszenz)	5% BSA 0,05% Saponin PBS
Laemmli-Puffer (6x)	12% SDS 60% Glycerol 0,5 M Tris (pH 6,8) 0,004% Bromphenolblau dH <sub>2</sub> O
Lysepuffer	835 µl Nuklease-freies H <sub>2</sub> O 100 µl 10x Lysepuffer 60 µl Protease Inhibitor 5 µl PMSF
PBST	1x PBS 0,1% Tween-20
RIPA Puffer	150 mM NaCl 1% NP-40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 50 mM Tris (pH 8,0) 1x Protease Inhibitor dH <sub>2</sub> O
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris Base 35 mM SDS 1,92 M Glycin dH <sub>2</sub> O
TBE-Puffer (1x)	89 mM Tris Base 89 mM Borsäure 2mM EDTA dH <sub>2</sub> O

Transferpuffer (10x)	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin dH <sub>2</sub> O
Tris-HCl Puffer 0,5 M pH 6,8	72,8 g Tris-HCl 4,7 g Tris Base 1 l dH <sub>2</sub> O
Tris-HCl Puffer 1,5 M pH 8,8	36,9 g Tris-HCl 153,9 g Tris Base 1 l dH <sub>2</sub> O

### 3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 3: Primer für Sanger-Sequenzierung

Primer	Sequenz 5' → 3'
B4GALT1_Ex1_f	TCTGGCTGGCTGGAGGAG
B4GALT1_Ex1_r	GGGCCAGAATCCACGACT

Tabelle 4: qRT-PCR Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'
B4GALT1_f	CTAGCAACTTGACCTCGGT
B4GALT1_r	CATTGGGTTCTGCTTTGCC
B4GALT2_f	GCATAACGAACCTAACCCCTCAG

B4GALT2_r	GCCCAATGTCCACTGTGATA
B4GALT3_f	GTAACCTCAGTCACCTGCC
B4GALT3_r	ATTCCGCTCCACAATCTCTG
B4GALT4_f	ACTTCGTGGGTGCCATTCAAGAGA
B4GALT4_r	AAGGAGACACAGAAGGGCAGTTGT
B4GALT5_f	TGGAACAGAGTACAGAATGCAG
B4GALT5_r	CCTTGCCGTTCTTTTACTTC
B4GALT6_f	CTTCACATACTCACCATACCTCC
B4GALT6_r	CCCCTGGCTCAATATCTAAATCC
B4GALT7_f	ATGTTCCCCTCGCGGAGGAAA
B4GALT7_r	TCAGCTGAATGTGCACCA
GAPDH_f	TGCTGGGGAGTCCCTGCCACA
GAPDH_r	GGTACATGACAAGGTGCGGCTC
B4GALT1-F	AGTCGTGGATTCTGGCCCT
B4GALT1-R	GCCGCCATCTTCACATTT

Tabelle 5: Sequenzierprimer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
pRRL_f	GCTTCTGCTTCCCGAGCTCTA
pRRL_r	TACGCTATGTGGATACGCTGC
B4GALT1_sequ_F	TTTGTGTTTAGTGACGTGGACCTCA



Tabelle 6: Primer zur Amplifizierung von GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup>

Primer	Sequenz 5' → 3'
BamH1B4GALT1_F	AAGTGGATCCGCCACCATGAGGCTTCGGGAGCCGCT
SpeB4GALT1_R	ACTAGTACTAGTTTATCTGAGTCCGGACCTGT

Tabelle 7: Primer, die zur Einfügung der Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> in den pRRL\_GFP\_B4GALT1 Vektor benutzt wurden

Primer	Sequenz 5' → 3'
MutArg21TrpF	GTCCCTACAGTGGGCCTGCCG
MutArg21TrpR	CGGCAGGCCCACTGTAGGGAC

Tabelle 8: Oligonukleotide, welche zum Designen des B4GALT1 Knockout-Konstruktes mit dem CRISPR/Cas9 System verwendet wurden

Primer	Sequenz 5' → 3'
Target1_f	cctctctagTGGGCCCATGCTG
Target2_r	CCTGCCGTTGCGGAATGGAATG

Tabelle 9: Primer zur Sequenzierung der B4GALT1 Knockout-Klone

Primer	Sequenz 5' → 3'
B4GenotCrisprF	ACGTTGCCTCCCAGGAGGAG
B4GenotCrisprR	ATGCACACACACCCTCTCTCATT

### 3.4 Antikörper

#### 3.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper und Reagenzien für Western Blot (WB), Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) und Durchflusszytometrie (F)

Antikörper	Konzentration	Endverdünnung	Anwendung	Firma
Goat anti-hB4GALT1 (polyklonal)	0,2 mg/ml	1:1000	WB	R&D Systems, USA
Rabbit anti-hB4GALT1 (polyklonal)	0,1 mg/ml	1:500	IF	Abcam, UK
Mouse anti- $\beta$ -Actin, HRP konjugiert (C4)	200 $\mu$ g/ml	1:5000	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
Mouse anti-GM130 (35/GM130)	250 $\mu$ g/ml	1:250	IF	BD Biosciences, USA
Mouse anti-Calnexin (37/Calnexin)	250 $\mu$ g/ml	1:250	IF	BD Biosciences, USA
Alexa Fluor® 633 Phalloidin	6,6 $\mu$ M	1:300	IF	Life Technologies, USA
FITC Mouse Anti- Human CD14 (M5E2)		1:100	F	BD Biosciences, USA
APC anti-human CD33 (WM53)		1:50	F	BioLegend, USA
Anti-human CD45		1:200	F	

### 3.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IF)

Antikörper	Konzentration	Endverdünnung	Anwendung	Firma
Donkey anti-Goat, HRP konjugiert	200 µg/0,5 ml	1:2000	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
Goat anti-Rabbit, HRP konjugiert	65,7 µg/ml	1:5000	WB	Cell Signaling Technology, USA
Goat anti-Rabbit AlexaFluor®488 (polyklonal)	2 mg/ml	1:800	IF	Thermo Fisher, USA
Goat anti-Mouse AlexaFluor®633 (polyklonal)	2 mg/ml	1:800	IF	Thermo Fisher, USA

### 3.5 Enzyme

Tabelle 12: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Firma
Alkalische Phosphatase	NEB, USA
T4 DNA Ligase	Promega, USA
Q5® High Fidelity DNA Polymerase	NEB, USA
BamHI	Fermentas, USA
FastDigest BcuI (=Spel)	Thermo Fisher, USA
FastDigest DpnI	Thermo Fisher, USA

## 3.6 Plasmide

Tabelle 13: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Firma
hB4GALT1 pLenti_C_mGFP	Origene
pRRL_MCS2 empty	Freundlicherweise von Prof. A. Schambach (MHH Hannover) zur Verfügung gestellt

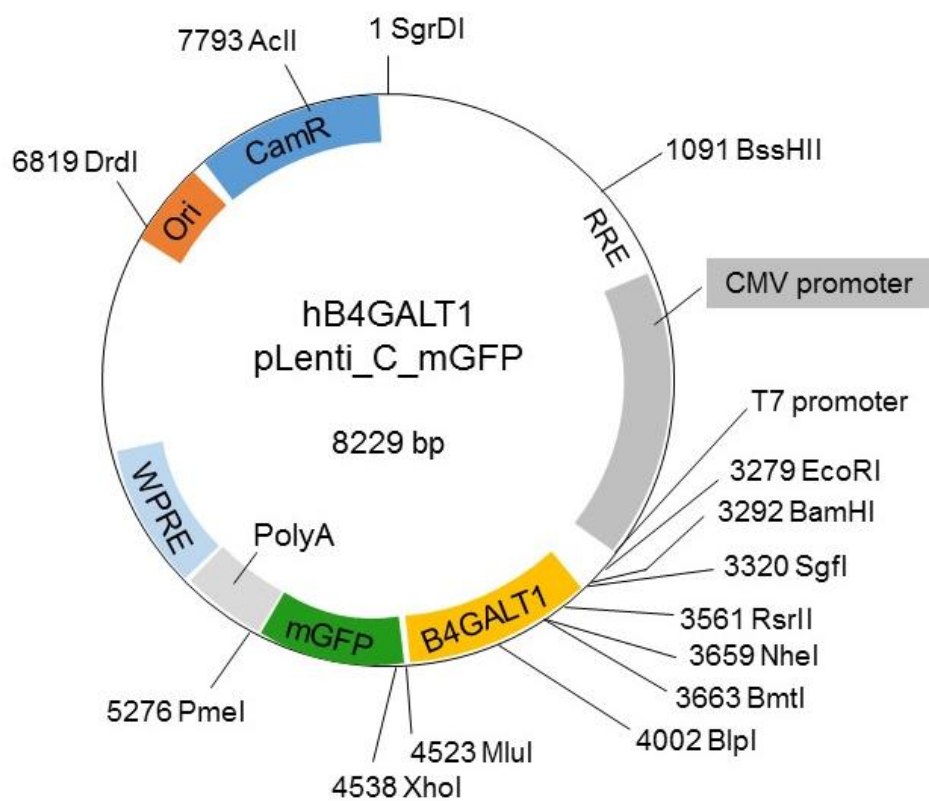


Abbildung 5: hB4GALT1 pLenti\_C\_mGFP Vektorkarte

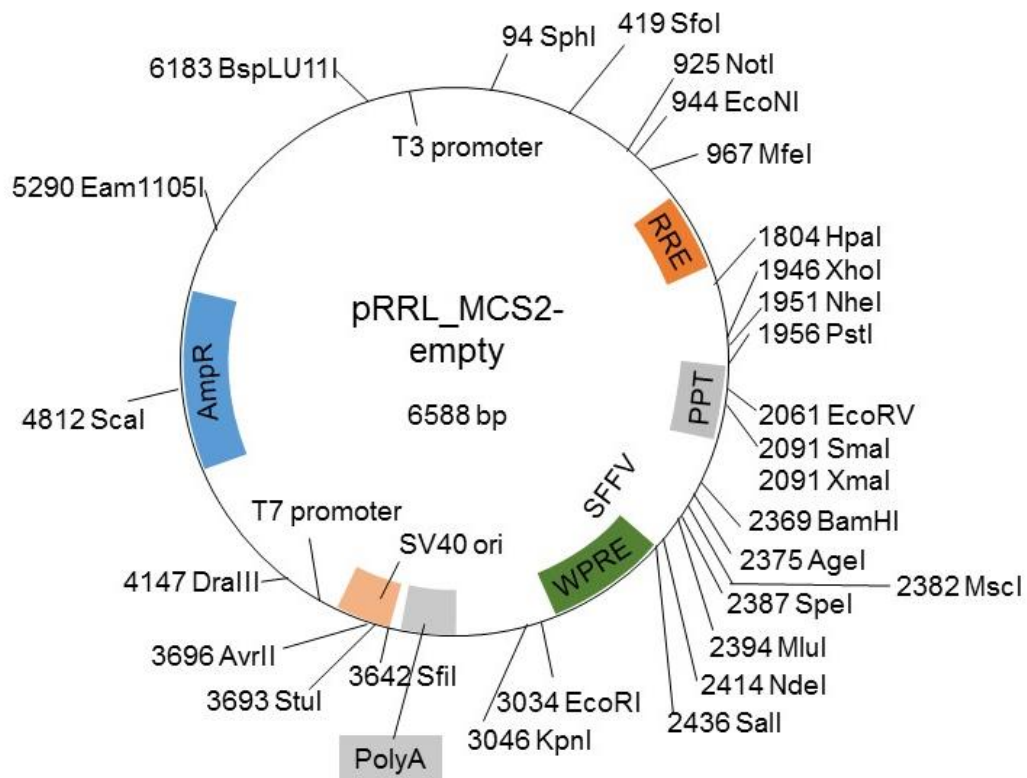


Abbildung 6: pRRL Vektorkarte mit Funktionen

### 3.7 Kits

Tabelle 14: Verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
Bursttest™ (Phagoburst™)	BD Biosciences, USA
Expand™ High Fidelity PCR Kit	Roche, Schweiz
Glycosyltransferase Activity Kit	R&D Systems, USA
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
QIAGEN® Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen, Deutschland
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Deutschland

---

Zymoclean™ Gel DNA recovery kit	Zymo, USA
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo, USA

### 3.8 Zelllinien

HeLa *Homo sapiens* (human), Cervix, Adenokarzinom

## 4 METHODEN

### 4.1 Exom-Sequenzierung

Next Generation Sequencing (NGS) umfasst verschiedene neue Methoden der DNA-Sequenzierung, durch die es möglich ist, tausende von DNA-Fragmenten parallel zu sequenzieren. Dazu zählt auch das Whole Exome Sequencing (WES), bei dem gezielt nur die Exone des Genoms untersucht werden. Das Exom, welches weniger als zwei Prozent des menschlichen Genoms ausmacht, setzt sich nur aus proteinkodierenden Sequenzen des Genoms zusammen. Da beim WES immer noch eine große Anzahl an Varianten existiert, werden speziell die Varianten genauer analysiert, die zu einer Aminosäure-Substitution oder einer Stopp-Mutation führen. Die weitere Analyse der übrigen Sequenz-Varianten erfolgt individuell. Die meisten Mutationen, die derzeit als Ursache genetisch bedingter Krankheiten bekannt sind, sind im Exom lokalisiert. Somit können im WES bestimmte Krankheiten gezielt auf bereits bekannte Mutationen hin überprüft werden oder neue Mutationen als Ursache einer Krankheit gefunden werden (Illumina 2016). Das WES wurde mit der NGS-Anlage in der Arbeitsgruppe von Prof. Christoph Klein im Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchgeführt.

### 4.2 Sanger-Sequenzierung

Mit der Sequenzierung nach Sanger, auch Didesoxymethode nach Sanger genannt, können einzelne DNA-Fragmente gezielt untersucht werden. Die Sanger-Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode, bei der durch den Einsatz von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) die Polymerisationsreaktion abgebrochen wird, da ddNTPs keine 3'Hydroxygruppe besitzen. Nach altem Verfahren werden vier Reaktionen mit je einem radioaktiv markierten ddNTP angesetzt und die PCR-Produkte anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Eine neuere Methode beruht auf einem einzigen Ansatz mit allen vier ddNTPs, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und können anhand der unterschiedlichen Farben analysiert werden (Abbildung 7) (Shendure, Porreca et al. 2011, Park and Kim 2016).

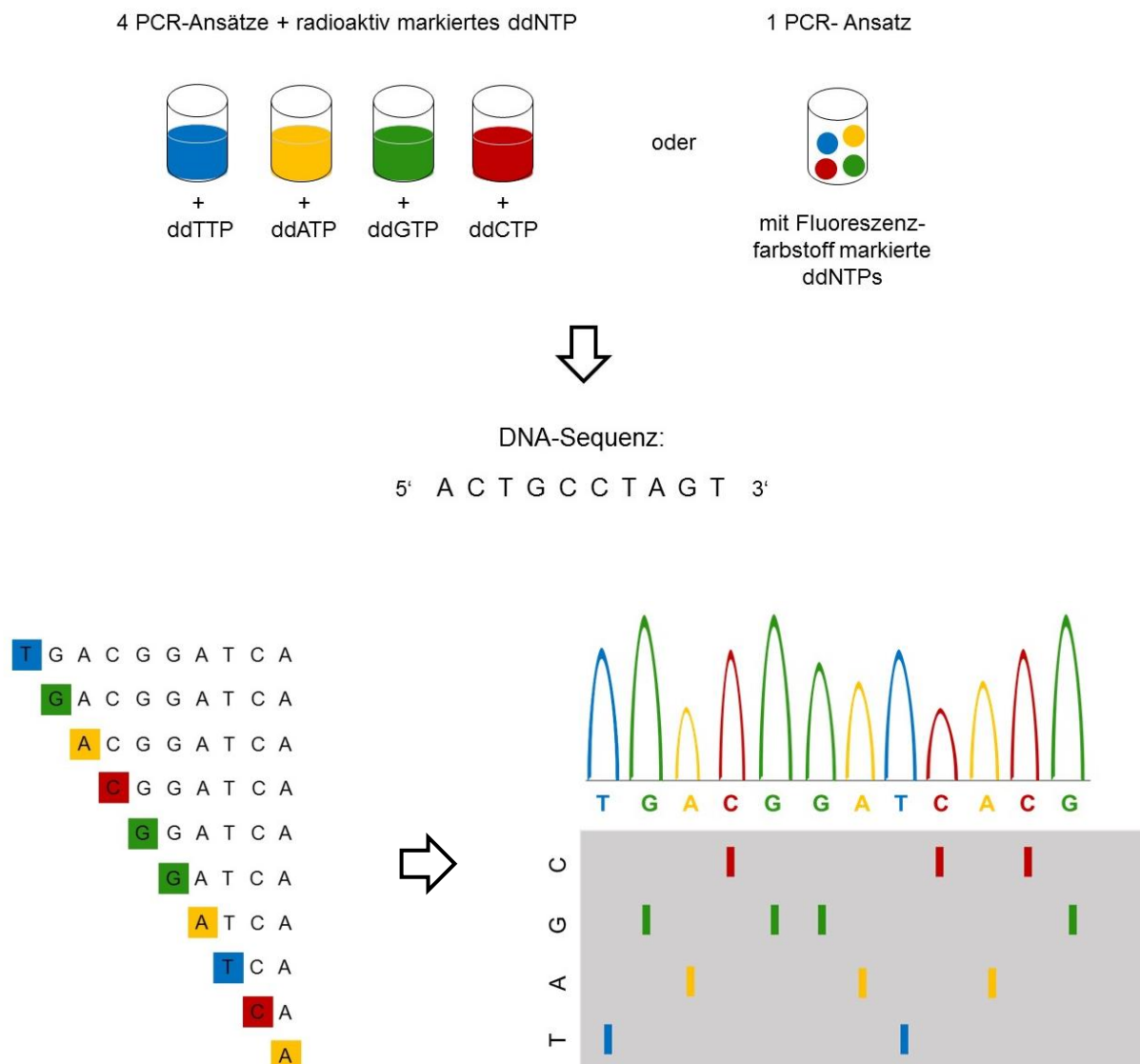


Abbildung 7: Prinzip der Sanger-Sequenzierung; zu sehen sind die zwei verschiedenen Ansatzmöglichkeiten der PCR sowie die daraus entstehenden Kettenabbruchprodukte, die anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden können (erstellt nach Shendure, Porreca et al. 2007, Park and Kim 2016)

Das im WES entdeckte Kandidatengen des Patienten wurde mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung gezielt auf krankheitsverursachende Sequenzveränderungen überprüft. Ebenso wurden DNA-Proben von Eltern und Geschwistern des Patienten sequenziert, um Aufschluss über das Vererbungsmuster der Krankheit zu bekommen. Mittels PCR wurde zuerst der gewünschte Abschnitt amplifiziert und anschließend mit ExoSAP-IT™ aufgereinigt. Für die PCR wurde das Expand™ High Fidelity PCR Kit verwendet. Jede Reaktion erfolgte mit 50 ng DNA, 2,5 µl Puffer, 2,5 µl dNTPs (2 mmol), 2,5 µl Vorwärtsprimer (10 µM), 2,5 µl



Rückwärtsprimer (10  $\mu$ M), 1,25  $\mu$ l DMSO, 0,125  $\mu$ l Polymerase und NF H<sub>2</sub>O. Die Primer, welche für die PCR und die nachfolgende Sequenzierung verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Anfangsdenaturierung	5 min bei 95°C	
Denaturierung	30 s bei 95°C	30 Zyklen
Annealing	30 s bei 58°C	
Elongation	45 s bei 72°C	
finale Elongation	8 min bei 72°C	
Kühlung / Lagerung	4°C	

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt zusammen mit den entsprechenden Sequenzierprimern (Tabelle 3) zur Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) geschickt, um die Sanger-Sequenzierung durchzuführen.

### 4.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen in einer Suspension vom Durchflusszytometer aufgenommen und an einem Lichtstrahl vorbeigeleitet werden. Dabei wird jede einzelne Zelle von diesem erfasst. Die Art der Streuung des Lichtes ergibt Aufschluss über die Eigenschaft der Zelle (Abbildung 8). Mit diesem Analyseverfahren können spezifische Eigenschaften von Zellen wie Größe oder Granularität gemessen werden. Außerdem können Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, um weitere physikalische und biochemische Eigenschaften zu untersuchen (Fuller, Linden et al. 2016).

In den Blutproben von Patient, Familienmitgliedern und gesunden Kontrollen wurden die verschiedenen Zellpopulationen differenziert. Zusätzlich wurde die Phagozytose- und Endozytoseleistung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten überprüft.

Mit dem Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) kann die Granularität der Zellen ermittelt werden. CD14 ist ein Oberflächenprotein, das vor allem von Monozyten und Makrophagen gebildet wird. Anhand dieser Parameter können die Zellen nach ihrer Größe und Granularität sortiert werden.

Bei der Phagozytose setzen neutrophile Granulozyten und Makrophagen reaktive Sauerstoffmetabolite frei. Dieser sogenannte „oxidative Burst“ kann mit dem Phagoburst-Test quantitativ gemessen werden. Als Stimulantien werden opsonierte *E. coli* Bakterien, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) verwendet. In dieser Arbeit wurde der Phagoburst-Test von Glycotope Biotechnology gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt und die Burst-Aktivität durchflusszytometrisch gemessen.

Fluoreszenzmarkiertes Ovalbumin (OVA-Ax647) dient als Endozytosemarker und wurde zur Bestimmung der Endozytoseleistung von Monozyten verwendet. 100 µl Vollblut wurden mit 62,5 µg/ml OVA-Ax647 für einen angegebenen Zeitraum (20/40/60 Minuten) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen eines Zellysepuffers (Lysing solution 10X Concentrate, BD) gestoppt, wodurch die Erythrozyten lysiert werden. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C und 1200 Umdrehungen/min für zehn Minuten zentrifugiert und mit den Antikörpern aCD14, aCD33 und aCD45 (Tabelle 10) für zehn Minuten angefärbt. Das Leukozyten-Pellet wurde in 50 µl FACS Puffer (3% FCS in PBS) resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Die Phagozytoseleistung von Monozyten und Neutrophilen wurde untersucht, indem die Aufnahme von mit pHrodo® Farbstoffkonjugat markierten *E. coli* Partikeln gemessen wurde. Nach Beendigung der Phagozytose oder Endozytose ändert sich der pH-Wert von neutral zu sauer. Dadurch erhöht sich auch die Fluoreszenz in den markierten Partikeln und die Phagozytoseleistung kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Hierfür wurden 100 µl Blut mit pHrodo® Red *E.coli* BioParticles® Conjugate für einen bestimmten Zeitraum (20/40/60 Minuten) inkubiert. Die Zellen wurden, wie im vorherigen Absatz beschrieben, lysiert, zentrifugiert und mit den Antikörpern (Tabelle 10) gefärbt. Das Pellet wurde in 50 µl FACS Puffer resuspendiert und anschließend mit dem Durchflusszytometer analysiert.

BD FACSAria (FACS = fluorescence-activated cell sorting) ist ein Zellsortierer, der mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern spezifische Zellen aus einer heterogenen Suspension isolieren kann. Die Isolierung der B4GALT1\_GFP HeLa Knockout-Klone erfolgte mittels FACS. Die zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff GFP markierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in Medium resuspendiert und gefiltert. GFP-positive Zellen wurden zu Einzelzellkolonien in eine mit Medium vorbereitete 96-Well Platte sortiert und expandiert.

Die Analyse aller durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo v9.3.

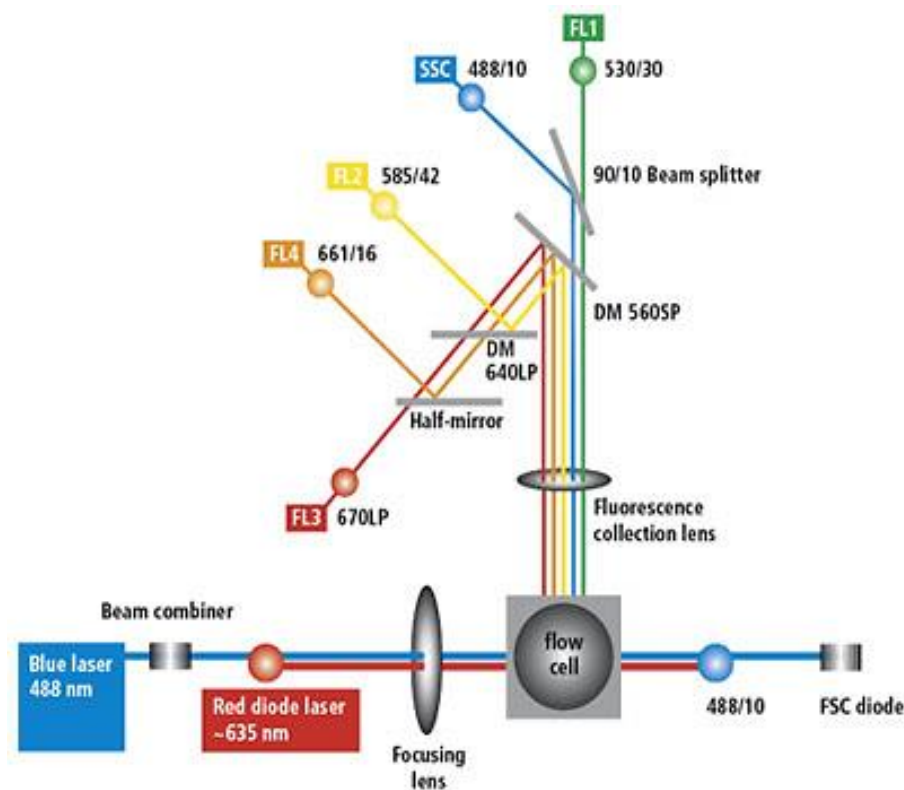


Abbildung 8: Darstellung des Lasersystems eines Durchflusszytometers (BD FACSCalibur™, BD Biosciences, USA)

## 4.4 Zellkultur

### 4.4.1 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinie HeLa erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 10 mM HEPES ergänzt wurde. Um die adhärennten Zellen zu lösen, wurde Trypsin-EDTA benutzt. Trypsin schädigt die Zellmembran sowie zelluläre und interzelluläre Mucoproteine, EDTA löst als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator die Zell-Zell-Verbindungen, sodass sich die Zellen voneinander und von der Kulturunterlage lösen. Die Hemmung von Trypsin/EDTA erfolgt durch Zugabe von FCS.

Die EBV-LCL Zellen wurden im Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium gezüchtet, dem 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES und 1% Natriumpyruvat hinzugefügt wurde.

Die zum Medium hinzugefügten Substanzen sind wichtig für das Wachstum und die Vermehrung der Zellen. FCS enthält Proteine, Hormone und Lipide, welche das Wachstum und die Teilung der Zellen fördern. Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin werden eingesetzt, um mit ihrer kombinierten Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien eine Kontamination der Zellkulturen zu verhindern. HEPES ist ein organischer Puffer und dient zur Stabilisierung des pH-Wertes. Natriumpyruvat wird hinzugefügt, um zusätzliche Energie bereitzustellen und somit das Wachstum der Zellen zu fördern. L-Glutamin dient ebenfalls als Energiequelle für schnellwachsende Zellen.

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet und circa ein Fünftel davon weiterkultiviert.

Die Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 4.4.2 Isolierung von neutrophilen Granulozyten und PBMCs

Die Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und neutrophilen Granulozyten erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und Ficoll Paque PLUS. Ficoll besteht aus synthetisch hergestellten Polymeren aus Saccharose und dient als Lösung zur Trennung der einzelnen Bestandteile des Blutes. Neutrophile Granulozyten und PBMCs wurden aus dem Blut eines gesunden Spenders isoliert. Aus dem Blut des Patienten und dessen Familie erfolgte nur die Isolierung der PBMCs und die anschließende Etablierung von Epstein-Barr-Virus-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien (EBV-LCL). Die Blutproben (10-15 ml) wurden in einem Röhrchen mit PBS auf 40 ml aufgefüllt, langsam auf 12 ml Ficoll geschichtet und bei 20°C, 1600 Umdrehungen/min für 25 Minuten zentrifugiert. Um einer Verwirbelung der Schichten vorzubeugen, wurde die Zentrifuge langsam abgebremst. Die Aufteilung der unterschiedlichen Bestandteile des Blutes ist in Abbildung 9 dargestellt.

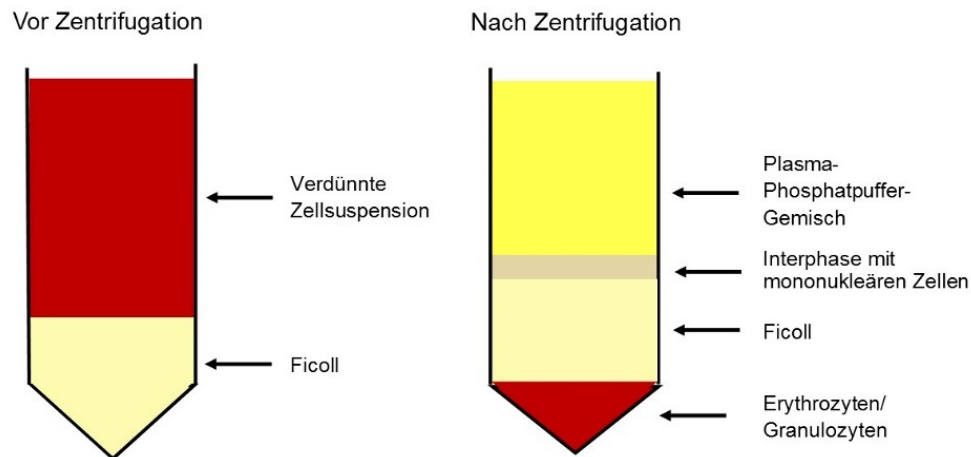


Abbildung 9: Darstellung der unterschiedlichen Schichten vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation

Nach Absaugen des Plasma-Phosphatpuffer-Gemischs wurde die Schicht mit den mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert, in zwei neue Falcons transferiert und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4°C und 1200 Umdrehungen/min wurde der Überstand abgesaugt und beide Zellpellets zusammen in 5 ml PBS resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zählung der Zellen. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:5 mit Trypanblau verdünnt. Da Trypanblau nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird, können diese bei der Zellzählung ausgeschlossen werden. Die Anzahl der Zellen wurde in vier Quadranten der Zählkammer mit dem Mikroskop bestimmt und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen in 4 Quadranten}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor } 5 * 10^4$$

Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 1200 Umdrehungen/min für fünf Minuten konnte das Zellpellet nach Entfernen des Überstandes bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert oder direkt für Western Blot oder andere Analyseverfahren eingesetzt.

Um die Neutrophilen zu isolieren, wurden die restlichen Schichten bis zur Erythrozyten/Granulozyten enthaltenden Schicht abgesaugt. Zur Entfernung der restlichen Erythrozyten wurde eine hypotone Lyse durchgeführt. Nach Zugabe von 12 ml eiskaltem Wasser und 4 ml KCl (0,6 M) wurde mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 4°C, 1200

Umdrehungen/min für zehn Minuten zentrifugiert. Die Lyse wurde zwei- bis dreimal wiederholt, bis ein weißes Pellet zu sehen war. Dieses wurde in 2 ml PBS resuspendiert, auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei 4°C und 6000 Umdrehungen/min für zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt oder direkt für Western Blot oder andere Analyseverfahren eingesetzt.

#### 4.4.3 Etablierung von EBV-LCL Zellen

Durch die Infektion der PBMCs mit dem Epstein-Barr-Virus (Salem, Langlais et al.) wurden diese immortalisiert und unbegrenzt proliferierende B-Zelllinien etabliert. Zur Herstellung dieser lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) wurden ca.  $5 \times 10^6$  PBMCs bei 1200 Umdrehungen/min abzentrifugiert und in 1,25 ml B-Zell Medium resuspendiert. Nach Auftauen des Epstein-Barr-Virus wurde dieser zu den Zellen hinzugegeben und im Wasserbad bei 37°C für zwei Stunden oder über Nacht inkubiert. Danach wurden 2,5 ml B-Zell Medium und 5 µl Cyclosporin A (1 µg/ml) hinzugefügt. Cyclosporin A hemmt als Immunsuppressivum die Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten (Wall, Henkel et al. 1995). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C im Inkubator.

#### 4.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Um die Expression von Genen auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real time PCR, qRT-PCR) angewendet. Im Gegensatz zur klassischen PCR wird bei der qRT-PCR die Menge der DNA nach jedem Zyklus mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) gemessen. Das zunehmende Signal des Farbstoffes ist direkt proportional zur amplifizierten Menge des PCR-Produktes. Zur späteren Quantifizierung der Ergebnisse wird zusätzlich ein Referenzgen eingesetzt. Für die qRT-PCR erfolgte zuerst die Isolierung von RNA, die im Anschluss durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt wurde.

##### 4.5.1 Isolierung von RNA

RNA wurde von Neutrophilen Granulozyten und PBMCs aus dem Blut eines gesunden Spenders sowie von HeLa und EBV-LCL Zellen extrahiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl Lysepuffer (RLT

plus buffer) resuspendiert und die RNA gemäß dem Protokoll des RNeasy® Plus Mini Kit isoliert. Die Ausfällung der RNA erfolgte mit 70%-igem Ethanol. Für die RNase-reichen Zellen wurden pro 1 ml Lysepuffer 10 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Eluierung erfolgte mit 40 µl NF H<sub>2</sub>O, die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektrophotometer (NanoDrop2000) gemessen.

#### 4.5.2 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit durchgeführt. Dazu wurden pro Reaktion 500 ng RNA, 2 µl 10x RT Puffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primer, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase verwendet und mit NF H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Die anschließende PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Schritt 1:	10 min bei 25°C
Schritt 2:	120 min bei 37°C
Schritt 3:	5 min bei 85°C
Schritt 4:	Lagerung bei 4°C

Die cDNA wurde entweder direkt für die qRT-PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 4.5.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurden pro Reaktion 5  $\mu$ l SYBR® Green Master Mix, 1  $\mu$ l cDNA, 1,5  $\mu$ l NF H<sub>2</sub>O, 1,25  $\mu$ l Vorwärtsprimer (10  $\mu$ M) und 1,25  $\mu$ l Rückwärtsprimer (10  $\mu$ M) verwendet. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Einstellungen des Cyclers erfolgten wie folgt:

Anfangsdenaturierung	2 min bei 95°C	
Denaturierung	15 s bei 95°C	40 Zyklen
Annealing	30 s bei 60°C	
Elongation	15 s bei 72°C	
Schmelzkurve	15 s bei 60°C	
	1 min von 60°C - 95°C	
	15 s bei 95°C	
Kühlung / Lagerung	4°C	

Um die Spezifität der Primer zu beurteilen, wurden die Schmelzkurven analysiert. Die  $C_t$ -Werte des zu untersuchenden Gens wurden ins Verhältnis zum  $C_t$ -Wert eines Kontroll-Gens (housekeeping gene), hier GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), gesetzt. Aus dem daraus resultierenden  $\Delta C_t$  wurde die relative Abweichung mit der Formel  $2^{\Delta C_t}$  berechnet (qPCR Handbuch, Thermo Fisher Scientific).

### 4.6 Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. Dabei kann das DNA-Fragment einem ganzen Gen oder einer bestimmten cDNA-Sequenz entsprechen und in ein Plasmid oder einen viralen Vektor eingebracht werden. Der gewünschte DNA-Abschnitt kann zum Beispiel aus dem ursprünglichen Vektor ausgeschnitten oder mittels PCR amplifiziert werden und anschließend durch Ligation in den vorher linearisierten Zielvektor eingefügt werden. Das neu entstandene Plasmid mit der gewünschten DNA kann nun vervielfältigt und für unterschiedliche molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden.



#### 4.6.1 Klonierung des GFP\_hB4GALT1 Fusionskonstruktes (pRRL\_GFP\_B4GALT1)

Um B4GALT1 in einen pRRL Vektor einzufügen, wurde GFP\_B4GALT1 zuerst aus dem pLenti\_C\_mGFP, der die hB4GALT1-cDNA (bezogen von der Firma Origene) enthält (Tabelle 13), mit den entsprechenden Primern (Tabelle 6) amplifiziert. Für die PCR wurde die Q5® High Fidelity Polymerase verwendet und der Thermocycler wie folgt eingestellt:

Anfangsdenaturierung	5 min bei 95°C	
Denaturierung	30 s bei 95°C	} 28 Zyklen
Annealing	30 s bei 59°C	
Elongation	2,5 min bei 72°C	
finale Elongation	8 min bei 72°C	
Kühlung / Lagerung	4°C	

Zur Überprüfung der PCR wurden anschließend 5 µl des PCR-Produktes auf einem 1%-igen Agarosegel (1 g Agarose, 100 ml 1x TBE-Puffer) aufgetrennt. Der Verdau des PCR-Produktes und des leeren pRRL Vektors (Tabelle 13) erfolgte mit den Restriktionsenzymen BamHI und SpeI für 30 Minuten bei 37°C. Zum Ansatz des pRRL Vektors wurde zusätzlich eine alkalische Phosphatase hinzugegeben, um eine Re-Zirkulation des Vektors zu verhindern. Nach dem Verdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach Herstellerprotokoll extrahiert. Für die Ligation von Vektor und DNA-Fragment wurde ein Verhältnis von 1:3 (Vektor:DNA-Fragment) und die T4-DNA Ligase verwendet und der Ligationsansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Selbstligierung des Vektors auszuschließen, wurde zusätzlich ein Kontrollansatz, der nur die Vektor-DNA enthält, angesetzt. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 10 zu sehen. Die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien (NEB® 5-alpha Competent *E. coli*, NEB) erfolgte mit 10 µl des Ligationsansatzes. Nach 20 Minuten auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für eine Minute angewendet und der Transformationsansatz wieder auf Eis gestellt. 1 ml LB-Flüssigmedium wurde hinzugegeben und die Zellen wurden im Thermomixer für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden ca. 900 µl Überstand verworfen, das Pellet mit dem Rest des Überstandes resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Ligation zu überprüfen, wurden von den Platten Bakterienkolonien gepickt und mit den pRRL Primern (Tabelle 5) und dem Expand™ High Fidelity PCR Kit eine PCR durchgeführt. Bei Erfolg

wurden dieselben Kolonien für die Plasmid-Minipräparation bzw. Maxipräparation verwendet (siehe 4.6.3).

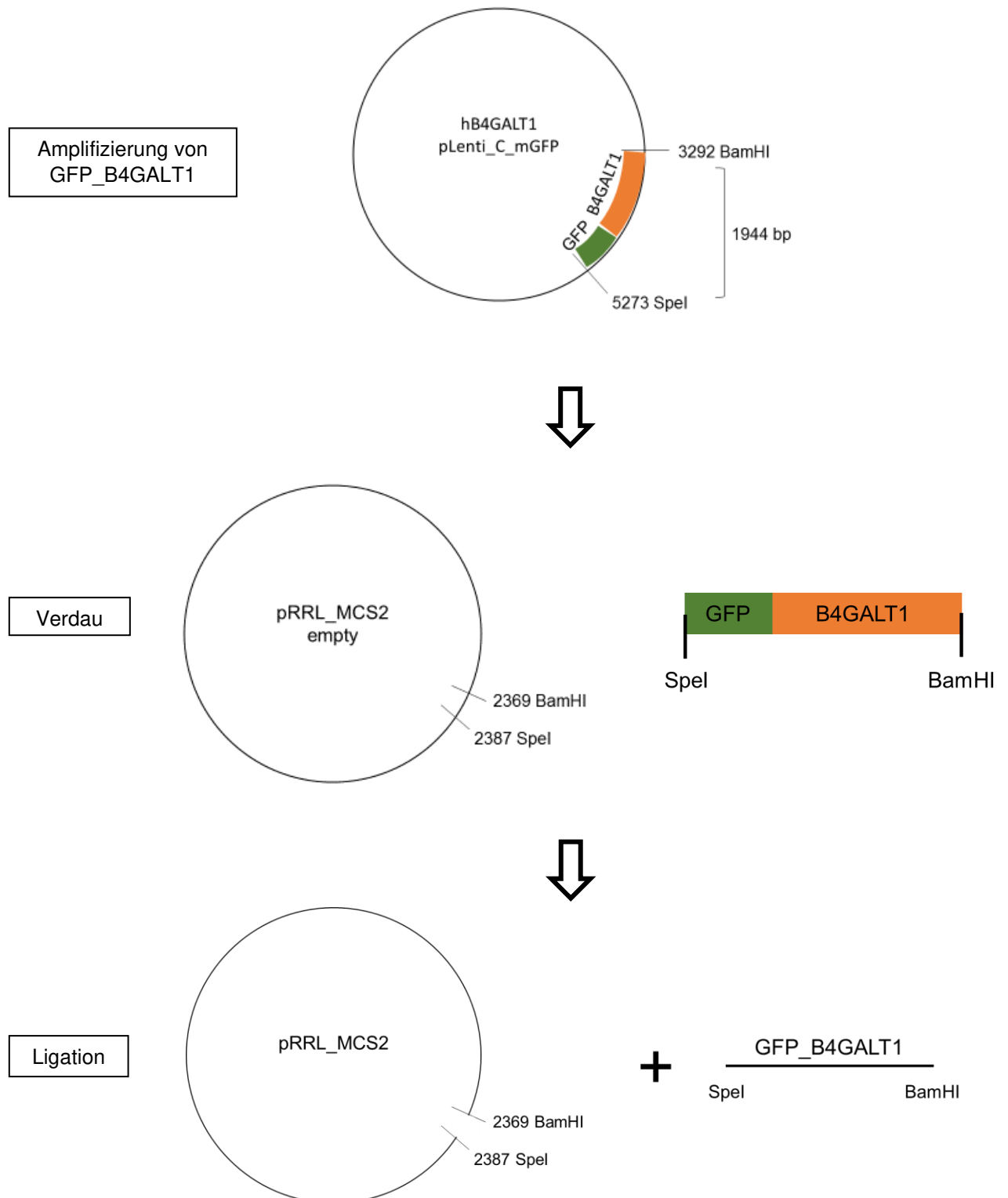


Abbildung 10: Klonierung von GFP\_B4GALT1 in den pRRL Vektor

#### 4.6.2 Zielgerichtete Mutagenese

Die Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> wurde durch zielgerichtete Mutagenese in pRRL\_GFP\_B4GALT1 eingefügt. Dazu wurde eine PCR mit der Q5® High Fidelity Polymerase und den Oligonukleotiden (Tabelle 7), welche die Punktmutation Arg21Trp enthalten, angesetzt und unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Anfangsdenaturierung	30 s bei 98°C	
Denaturierung	10 s bei 98°C	18 Zyklen
Annealing	30 s bei 69°C	
Elongation	8 min bei 72°C	
finale Elongation	10 min bei 72°C	
Kühlung / Lagerung	4°C	

Das PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym DpnI für 20 Minuten bei 37°C verdaut. Da DpnI spezifisch methylierte DNA schneidet, wird nur das ursprüngliche Plasmid, das aus Bakterien gewonnen wurde, verdaut. Das unmethylierte und somit unverdaute PCR-Produkt konnte anschließend in kompetente E. Coli Zellen transformiert werden (siehe 4.6.1). Für die Minipräparation (4.6.3.1) wurden Einzelkolonien gepickt, die DNA isoliert und mit den pRRL Primern (Tabelle 5) die Sequenz mit der eingefügten Punktmutation überprüft.

#### 4.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA

##### 4.6.3.1 Minipräparation

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid DNA wurde die Minipräparation mit dem Zymo™ Plasmid Mini Prep Kit durchgeführt. Hierfür wurden 2-3 ml LB-Flüssigmedium plus Ampicillin (100 µg/ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde zwei- bis dreimal zentrifugiert und das Pellet in 600 µl NF H<sub>2</sub>O resuspendiert. Das weitere Verfahren erfolgte nach dem Protokoll des Mini Prep Kits. Die Ausfällung der DNA erfolgte hier mit Isopropanol. Zum Schluss wurde die DNA mit 30 µl NF H<sub>2</sub>O eluiert, die Konzentration mittels NanoDrop2000 bestimmt und bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.6.3.2 Maxipräparation

Für die Maxipräparation wurden 100 ml LB-Flüssigmedium (mit Ampicillin) entweder mit dem Rest der Starterkultur oder mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen® Plasmid Plus Maxi Kit. Die Ausfällung der DNA wurde mit Ethanol erreicht. Die DNA wurde mit 100 µl NF H<sub>2</sub>O gelöst und nach Messung der Konzentration bei -20°C gelagert.

#### 4.7 Transiente Transfektion

Um die Expression von B4GALT1 in HeLa Zellen zu untersuchen, wurden die GFP\_B4GALT1 Konstrukte mittels Transfektion in die HeLa Zellen eingebracht. Die transfizierten Zellen exprimieren zwar das Gen, integrieren dieses aber nicht in ihr Genom. Somit findet keine Vervielfältigung des Gens statt und es wird nur einige Tage von den Zellen exprimiert. HeLa Wildtyp (WT) und HeLa B4GALT1 Knockout (KO) Zellen wurden in einer 24-Well Platte (0,4x10<sup>5</sup> Zellen/Well) ausgesät und am nächsten Tag mit 1 µg DNA transfiziert. Dazu wurde das JetPEI® Transfektions Reagenz verwendet und die Transfektion nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Zellen wurden mit GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup> und der Patientenmutation GFP\_B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfiziert.

#### 4.8 Generierung von B4GALT1 CRISPR/Cas9 Knockout HeLa Zellen

##### 4.8.1 CRISPR/Cas9 System

Die CRISPR/Cas9 Methode wird verwendet, um DNA-Sequenzen gezielt zu schneiden und zu verändern. Mit dieser Methode ist es möglich, Gene einzufügen, auszuschalten oder zu entfernen (Abbildung 11). Das CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) System wird von vielen Bakterien als Abwehrmechanismus eingesetzt. Mithilfe der Cas9 (CRISPR assoziierte) Endonuklease und einer „guide“ RNA (gRNA) können die Zielsequenzen eingefügt und die ursprüngliche DNA verändert werden (Sander and Joung 2014). In dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9 System zur Generierung von HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen verwendet (Konstrukte entworfen von Dr. Y. Liu). Die verwendete Ziel-DNA führte im B4GALT1 Gen zu einer Deletion und dadurch zu einem vorzeitigen Stopcodon und einem Funktionsverlust des Gens (Abbildung 12).

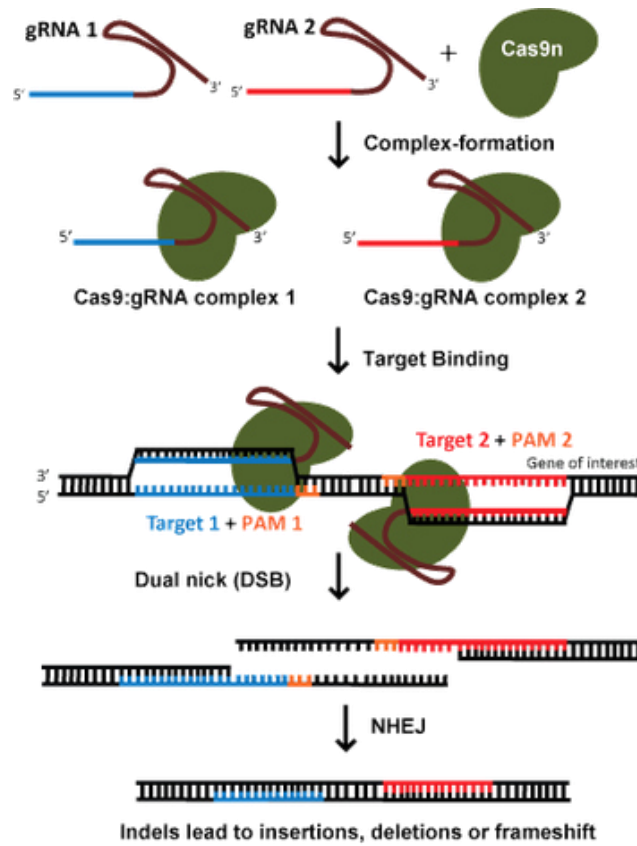


Abbildung 11: Allgemeines Schema zur Generierung einer Knockout-Zelllinie mit der CRISPR/Cas9 Methode (CRISPR/Cas9 Guide, addgene, USA)

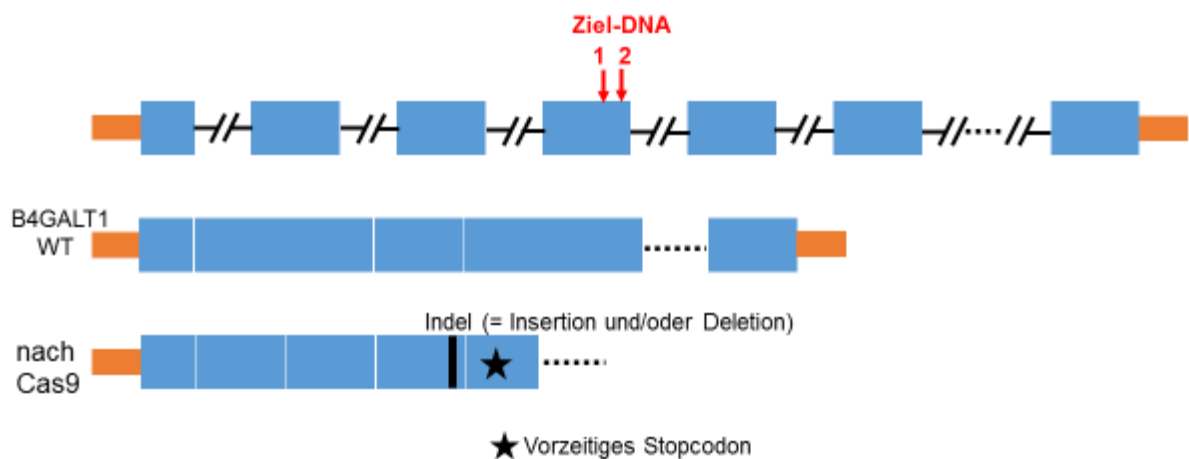


Abbildung 12: Schema des CRISPR/Cas9 Konstruktes zur Generierung des B4GALT1 Knockout-Konstruktes (abgewandelt von Dr. Y. Liu)

#### 4.8.2 Transfektion und Isolierung von Einzelzellkolonien

HeLa Zellen ( $0,2 \times 10^6$ ) wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 6-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit 3  $\mu\text{g}$  DNA transfiziert, dazu wurde das JetPEI® Transfektions Reagenz benutzt. Als DNA dienten CRISPR/Cas9 Plasmide, die Zielsequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen mittels FACS in eine 96-Well Platte zu Einzelzellkolonien sortiert und bei 37°C im Inkubator expandiert.

#### 4.8.3 Genotypisierung

Zur Bestimmung der B4GALT1 Knockout-Zellen wurden vom zu typisierenden Klon 10  $\mu\text{l}$  Medium inklusive Zellen in ein PCR Gefäß transferiert, mit 20  $\mu\text{l}$  DNA-Extraktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,45% NP40, 0,45% Tween20) und 0,5  $\mu\text{l}$  Proteinase K (20 mg/ml) gemischt, kurz zentrifugiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden sie 15 Minuten bei 99°C erhitzt und wiederum kurz abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5  $\mu\text{l}$  für die PCR verwendet, welche mit den Sequenzierprimern (Tabelle 9) und dem Expand™ High Fidelity PCR Kit unter folgenden Konditionen durchgeführt wurde:

Anfangsdenaturierung	5 Min. bei 95°C	
Denaturierung	30 Sek. bei 95°C	} 28 Zyklen
Annealing	30 Sek. bei 58°C	
Elongation	90 Sek. bei 72°C	
Finale Elongation	7 Min. bei 72°C	
Kühlung/Lagerung	4°C	

Das fertige PCR-Produkt wurde auf einem 1%-igen Agarosegel (1 g Agarose, 100 ml TBE-Puffer) aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit isoliert und mit den entsprechenden Primern (Tabelle 9) zum Sequenzieren geschickt.

#### 4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen und können dann mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden.

Um Proteine aus den Zellen zu extrahieren, wurden diese mit PBS gewaschen, das Zellpellet in RIPA-Puffer oder Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation bei 4°C, 15000 Umdrehungen/min für 15 Minuten wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Bradford-Methode angewandt (Roti® Nanoquant). Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben wurden für zehn Minuten bei 95°C gekocht und anschließend auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

<b>Trenngel 10%</b>	<b>Sammelgel 5%</b>
4 ml NF H <sub>2</sub> O	2 ml NF H <sub>2</sub> O
3,3 ml Acrylamid	487,5 µl Acrylamid
2,5 ml Tris-HCL (1,5 M, pH 8,8)	360 µl Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)
0,1 ml SDS (10%)	28,75 µl SDS (10%)
50 µl APS (20%)	18,75 µl APS (20%)
4 µl TEMED	2,075 µl TEMED

Die Elektrophorese wurde bei 80-120 V für ungefähr zwei Stunden durchgeführt. Nach Beenden der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 400 mA für 90 Minuten in einem Tank-Blot-System (Bio-Rad). Um die Bindung von unspezifischen Proteinen zu verhindern, wurde die Membran mit 5% Milchpulver in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern (Tabelle 10), welche mit 2,5% Milchpulver in PBS verdünnt wurden, inkubiert. Nach einem Waschgang mit PBS-T (3x10 Minuten) wurde die Membran mit den sekundären Antikörpern (Tabelle 11) in 2,5% Milchpulver

in PBS für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nochmals gewaschen, für fünf Minuten mit einem ECL-Substrat inkubiert und mit dem ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio-Rad) detektiert.

Um die gebundenen Antikörper von der PVDF-Membran zu entfernen und weitere Proteine mit anderen Antikörpern nachzuweisen, wurde die Membran 15 Minuten mit einem Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschgang mit PBS-T und die Membran konnte mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

#### 4.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der Immunfluoreszenzmethode kann die Lokalisation von Proteinen mikroskopisch bestimmt werden. Dazu werden die Antigene mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, angefärbt und können anschließend im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert werden. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Klone in 24-Well Platten ( $0,4 \times 10^5$  Zellen / Well) auf Deckgläsern ( $\varnothing$  12mm) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup> und GFP\_B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfiziert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 3,5% PFA für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimal gewaschen. Anschließend wurden sie 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl gequenched, erneut mit PBS gewaschen und mit 5% BSA und 0,05% Saponin in PBS für 60 Minuten permeabilisiert und geblockt. Alle Antikörper wurden mit 1% BSA und 0,05% Saponin in PBS verdünnt. Die primären Antikörper (Tabelle 10) wurden entweder über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei- bis dreimal Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (Tabelle 11) abgedunkelt für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Zellkernmarker DAPI (300 nM), der 1:6000 verdünnt wurde, für zwei Minuten angefärbt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit Mounting Medium auf vorbereitete Objektträger befestigt.

Da EBV-LCL Zellen keine adhärenen Zellen sind und somit nicht am Boden haften bleiben, wurden die Deckgläser mit Poly-D-Lysin beschichtet. Auf jedes Deckglas im 24-Well wurden 300 µl Polylysin (0,1 mg/ml) pipettiert und bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nach fünf Mal Waschen mit PBS wurden die Wells bei offenem Deckel getrocknet. Im Anschluss konnten ca.  $3 \times 10^6$  Zellen pro Well ausgesät werden. Nach Zentrifugation bei 20°C, 1500 Umdrehungen/min für zehn Minuten wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend für

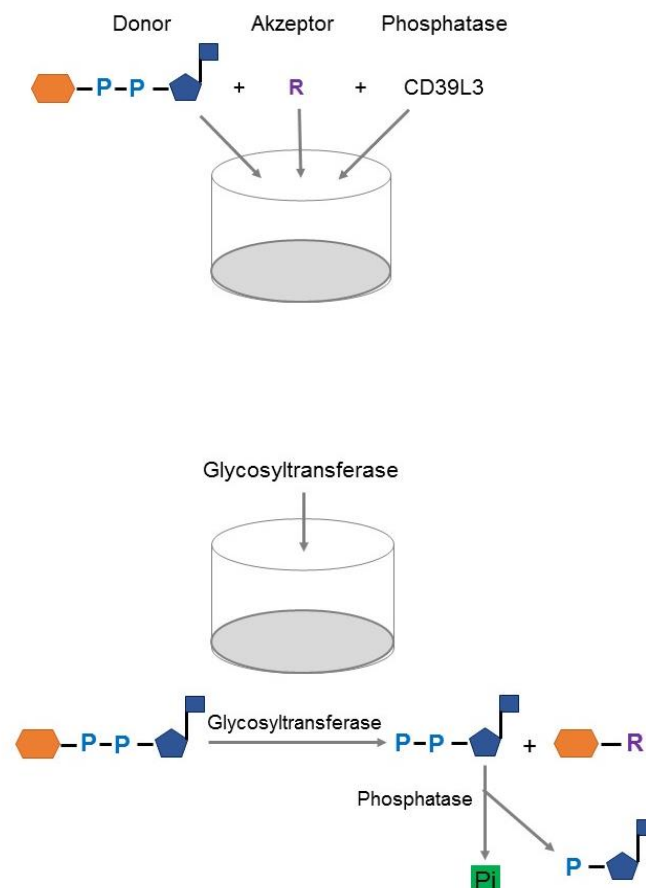


15 Minuten mit 3,5% PFA fixiert. Das Blocken und die Antikörperfärbung erfolgten wie oben beschrieben.

Die Bilder wurden mit dem Leica TCS SP5 Konfokal Mikroskop aufgenommen und die Analyse erfolgte mit den Programmen LAS-AF Lite und ImageJ.

#### 4.11 Untersuchung der Enzymaktivität von B4GALT1

Die enzymatische Aktivität von B4GALT1 wurde mit Hilfe des Glycosyltransferase Activity Kits (R&D Systems) gemessen. Hierbei wird eine spezifische Phosphatase (Coupling Phosphatase 1) eingesetzt, um anorganisches Phosphat quantitativ vom abgehenden Nukleotiddiphosphat zu entfernen. Das gelöste anorganische Phosphat wird dann durch das sogenannte *Malachite Green phosphate detecting reagent* erfasst (Abbildung 13). Dabei entspricht die Menge an gelöstem anorganischem Phosphat dem verbrauchten Nukleotidzucker bzw. dem erzeugten Glykokonjugatprodukt. Die Absorption von Malachitgrün bei 620 nm wird photometrisch bestimmt (R&D Systems).



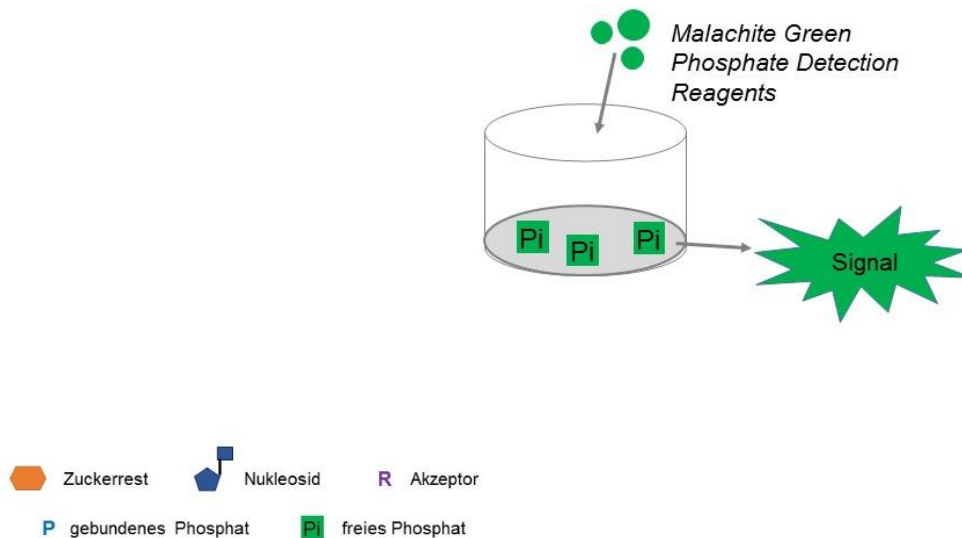


Abbildung 13: Prinzip des Glykosyltransferase-Aktivitätstestes (abgewandelt von R&D Systems)

Um die Aktivität von B4GALT1 zu messen, wurde zuerst eine Phosphat-Standardkurve gemäß dem Protokoll bestimmt. Anschließend wurde die Enzymaktivität von B4GALT1 in HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Klonen entsprechend der eingesetzten Menge an Protein (2.5, 5, 10, 20, 40 µg/µl) gemessen. Dabei diente UDP-Galaktose als Donor-Substrat und N-Acetyl-Glucosamin als Akzeptor-Substrat. Die Zellen wurden mit RIPA-Puffer (ohne SDS und Natrium deoxycholate) 30 Minuten auf Eis lysiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15000 Umdrehungen/min wurde nur der Überstand für das weitere Vorgehen verwendet. Die Vorbereitung der Puffer und Lösungen sowie der weitere Ablauf der Messung erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Die spezifische Aktivität der β-1,4-Galaktosyltransferase 1 wurde mit folgender Formel berechnet

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{S (OD/\mu\text{g}) \times CF (pmol/OD)}{\text{Zeit (Minuten)}}$$

und mit Excel grafisch dargestellt.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Auswirkung eines $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1-Mangels in primären humanen Zellen

#### 5.1.1 Klinische Daten

Die klinischen Informationen über die Patienten sowie Blutproben von Patienten, Familienmitgliedern und gesunden beduinischen Spendern erhielten wir durch die Zusammenarbeit von Ärzten und Wissenschaftlern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals mit Prof. Dr. H. Tamary (Schneider Children's Medical Center, Israel). Die Einverständniserklärung der einzelnen Spender erhielten wir durch die Hilfe von Prof. Dr. H. Tamary und erfolgte gemäß dem israelischen Gesetz sowie unter Beachtung der Deklaration von Helsinki. Die Untersuchungen im Dr. von Haunerschen Kinderspital wurden von der Ethikkommission der LMU genehmigt (Ethikvotum 66-14, Titel: „Genetische Charakterisierung angeborener Störungen der Blutbildung und des Immunsystems“).

Der neunjährige Patient (II.1) ist das Kind blutsverwandter Eltern beduinischer Herkunft. Bereits nach der Geburt ließ sich im Blutbild eine Neutropenie sowie eine Thrombozytopenie erkennen. Er leidet seit dem ersten Lebensjahr an epileptischen Krampfanfällen, die mit Antikonvulsiva behandelt werden. Weiterhin zeigt sich eine psychomotorische Retardierung, aufgrund derer der Patient auf eine Unterstützung beim Gehen angewiesen ist. Außerdem neigt er durch die niedrige Thrombozytenzahl zu Blutungen, die hinsichtlich des motorischen Defizites und der daraus resultierenden Stürze verschlimmert werden. Teilweise können die Blutungen mit Thrombozytentransfusionen und Romiplostim, einem Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten, gestillt werden. Im aktuellen Blutbild des Patienten lässt sich eine moderate Neutropenie sowie eine schwere Thrombozytopenie erkennen (Tabelle 16).

Beim 18-jährigen Bruder (II.9) des Patienten lässt sich klinisch eine Entwicklungsverzögerung erkennen. Es sind keine Epilepsien bekannt und das Blutbild weist keine Auffälligkeiten auf (Tabelle 16).

Der elfjährige Junge (B.1) hat ebenfalls blutsverwandte Eltern mit beduinischen Wurzeln. Seit seiner Geburt leidet er an schweren epileptischen Krampfanfällen. Aufgrund schwerer psychomotorischer Retardierung ist er unfähig zu gehen und auf einen Rollstuhl angewiesen. Des Weiteren treten bei ihm rezidivierende Blutungen an Schleimhäuten und vor allem

Nasenbluten (Epistaxis) auf, welche auf die schwere Thrombozytopenie zurückzuführen sind und mit Thrombozytentransfusionen therapiert werden können. Im aktuellen Blutbild zeigt sich eine schwere Thrombozytopenie, jedoch keine Neutropenie (Tabelle 16).

Tabelle 16: Klinische Informationen über Patient (II.1) und dessen Bruder (II.9) sowie über einen weiteren betroffenen Jungen (B.1)

	Symptome	blutsverwandt	WBC/ $\mu$ l	ANC/ $\mu$ l	PLT/ $\mu$ l	Hb g/dl
<b>Patient II.1</b> ♂ 9 J	<ul style="list-style-type: none"> <li>• psychomotorische Retardierung</li> <li>• schwere epileptische Krampfanfälle</li> <li>• Blutungsneigungen -&gt; Thrombozytentransfusionen; Romiplostim</li> </ul>	ja	2.730	710	8.000	12,3
<b>II.9</b> ♂ 18 J	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entwicklungsverzögerung</li> </ul>	ja	5.550	2.940	225.000	12,2
<b>B.1</b> ♂ 11 J	<ul style="list-style-type: none"> <li>• schwere psychomotorische Retardierung</li> <li>• schwere epileptische Krampfanfälle</li> <li>• rezidivierende Blutungen (v.a. Schleimhäute, Epistaxis) -&gt; Thrombozytentransfusionen</li> </ul>	ja	6.190	3.030	8.000	

WBC = Leukozyten (8.000-12.000/ $\mu$ l); ANC = absolute Neutrophilenzahl (2.800-8.400/ $\mu$ l); PLT = Thrombozyten (150.000-400.000/ $\mu$ l); Hb=Hämoglobin (11,9-14,7 g/dl); Normwerte in Klammern

### 5.1.2 Immunologische Untersuchungen

Blutproben von Patient, Familienmitgliedern und gesunden Kontrollen wurden mittels Durchflusszytometrie immunologisch untersucht. Neben der Bestimmung der verschiedenen Zellpopulationen (Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten) wurde die Phagozytose- und Endozytoseleistung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten untersucht (siehe 4.3).

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den Familienmitgliedern ist beim Patienten (II.1) eine verminderte Anzahl von neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Außerdem zeigt sich eine Erhöhung der Monozyten, die typisch für Patienten mit einer Neutropenie ist (Abbildung 14). Bruder II.9, der symptomatisch lediglich Entwicklungsverzögerungen aufweist, zeigt hier keine Anzeichen für eine Neutropenie.

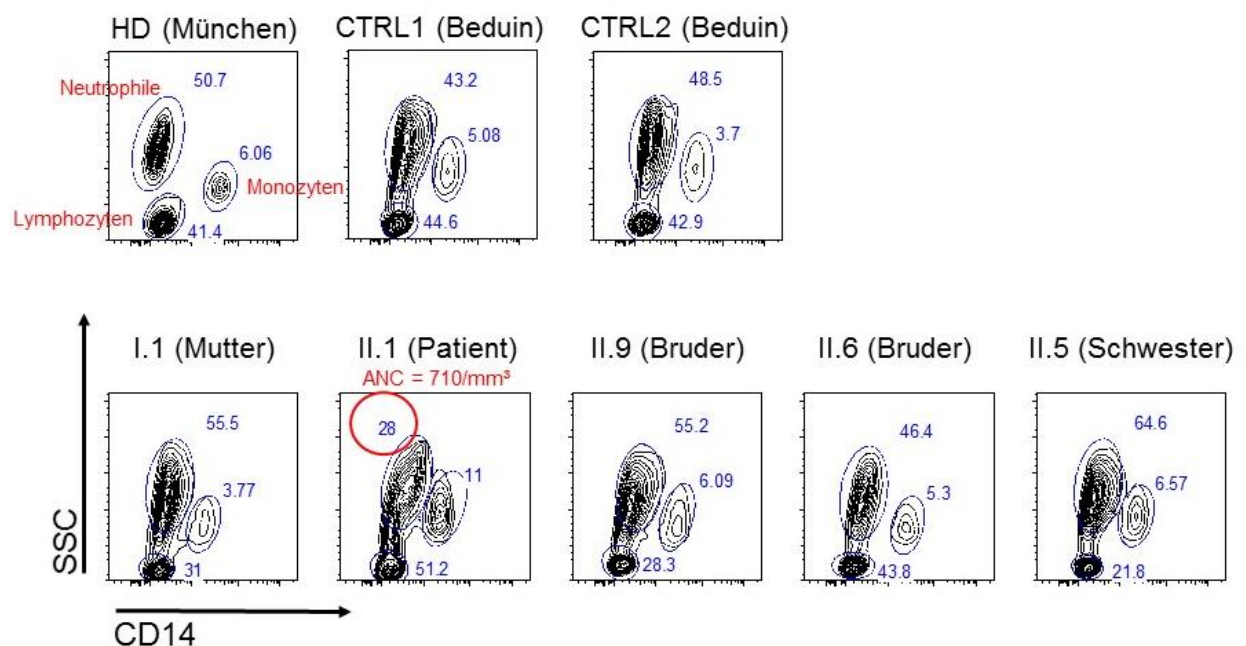


Abbildung 14: Darstellung der unterschiedlichen Zelllinien in Blutproben von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); SSC=side scatter; CD14=Cluster of differentiation 14

Mit dem Phagoburst-Test erfolgte die quantitative Messung der oxidativen Burst-Aktivität von neutrophilen Granulozyten.

Beide beduinischen Kontrollen und die Familienmitglieder zeigen eine starke Reaktion auf die Stimulation mit E. coli im Vergleich zum gesunden Spender (HD). Der Patient zeigt eine verminderte Antwort auf fMLP und E. coli verglichen mit der Antwort der Kontrollen (Abbildung 15).

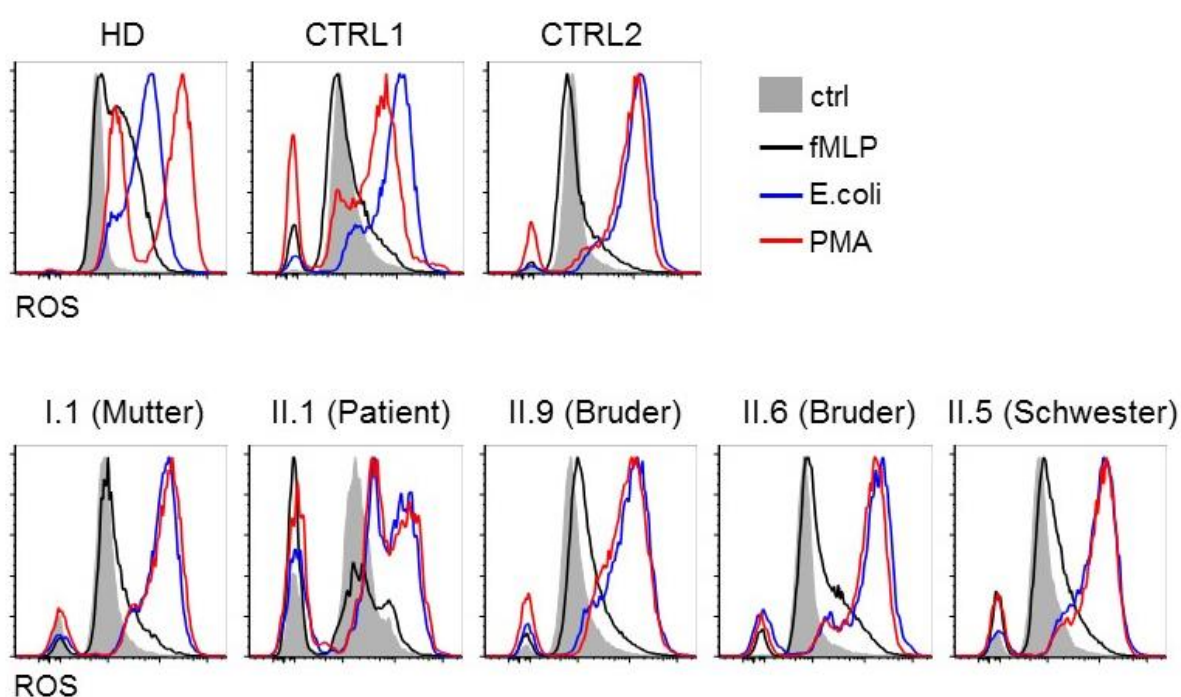


Abbildung 15: Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); ROS = reaktive Sauerstoffmetabolite; ctrl = negative Kontrolle; fMLP = N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, E.coli = Escherichia coli; PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

Die Endozytose-Leistung der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Monozyten der Kontrollpersonen sowie die von Mutter und Geschwister des Patienten zeigen keinen Unterschied in der Aufnahme von Ovalbumin. Bei den Monozyten des Patienten ist jedoch eine verminderte Endozytose von Ovalbumin zu sehen (Abbildung 16).

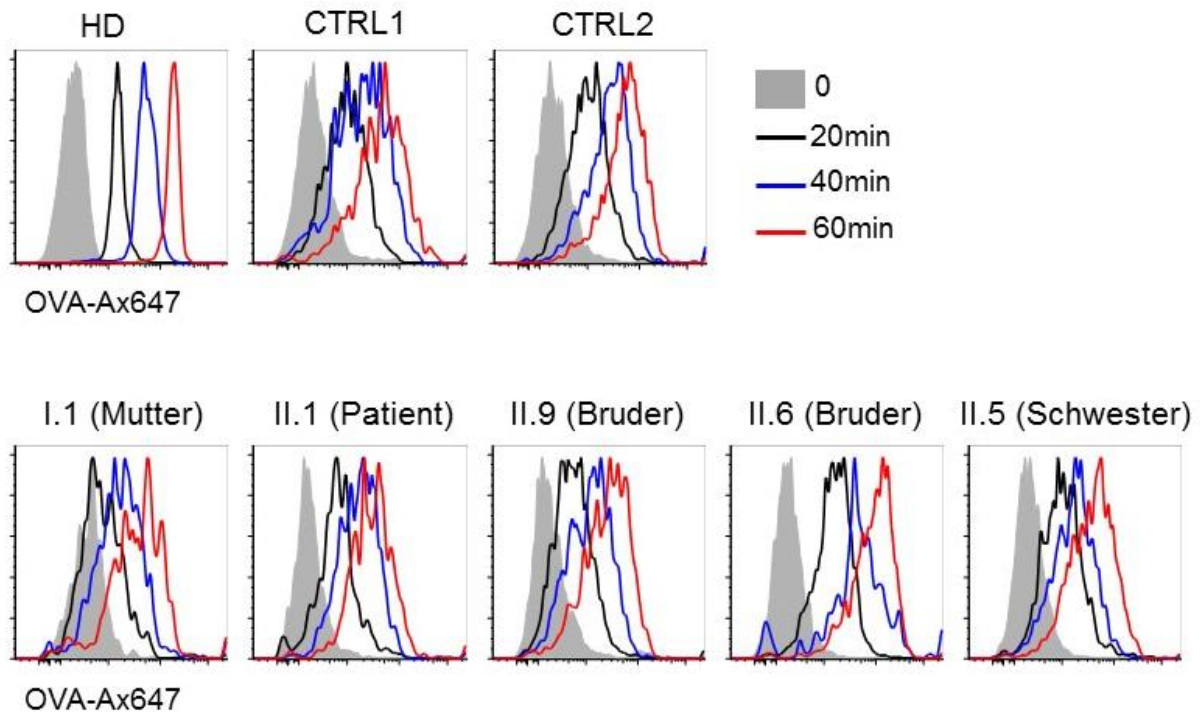


Abbildung 16: Endozytose von Ovalbumin (OVA-Ax647) durch Monozyten; dargestellt ist die Endozytoseleistung der Monozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten



Die Phagozytose von *E. coli* durch Monozyten und neutrophile Granulozyten wurde ebenfalls mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Die Monozyten des Patienten zeigen eine ähnliche phagozytäre Leistung wie die Monozyten der Kontrollen (Abbildung 17). Auch die Phagozytose-Leistung der neutrophilen Granulozyten weist keinen signifikanten Unterschied zwischen Patient und Kontrollen auf (Abbildung 18).

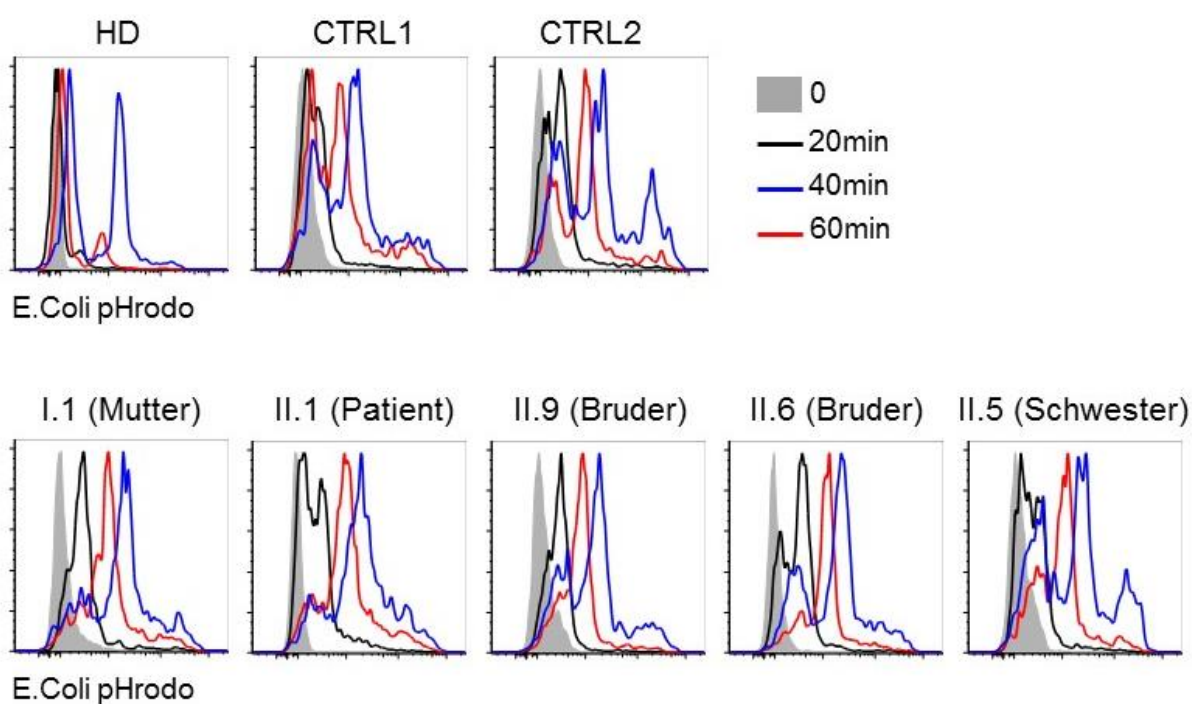


Abbildung 17: Phagozytose von *E. coli* durch Monozyten; dargestellt ist die Phagozytoseleistung der Monozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten



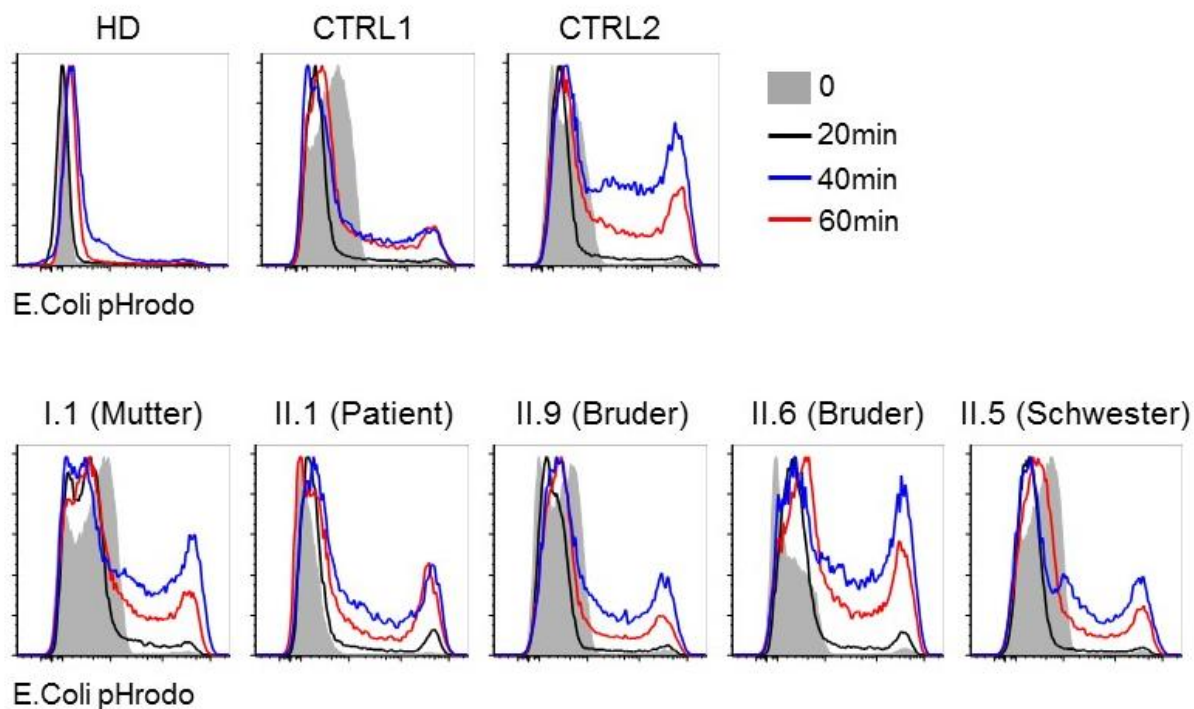


Abbildung 18: Phagozytose von E.coli durch neutrophile Granulozyten; dargestellt ist die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten

Wir identifizierten zwei Patienten mit einer neuen Mutation im *B4GALT1*-Gen mit psychomotorischer Retardierung und Thrombozytopenie. Einer der Patienten (Patient II.1) wies außerdem eine milde Neutropenie auf.

Die immunologischen Untersuchungen der Neutrophilen des Patienten II.1 zeigten einen verminderten „oxidativen Burst“, aber eine normale Phagozytoseleistung. Die Endozytose- und Phagozytoseaktivität der Monozyten blieb unverändert.

### 5.1.3 Identifikation der Mutation

Durch das WES und die anschließende Sanger Sequenzierung wurde eine neue Mutation im Gen der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 in der DNA des Patienten identifiziert. Der Patient ist homozygot für diese Mutation.

Die Eltern des Patienten sind blutsverwandt und heterozygot für die Mutation im B4GALT1-Gen, phänotypisch sind sie gesund. Eine Schwester und ein Bruder des Patienten weisen ebenfalls eine heterozygote Mutation auf, wobei nur die Schwester phänotypisch gesund ist (Abbildung 19).

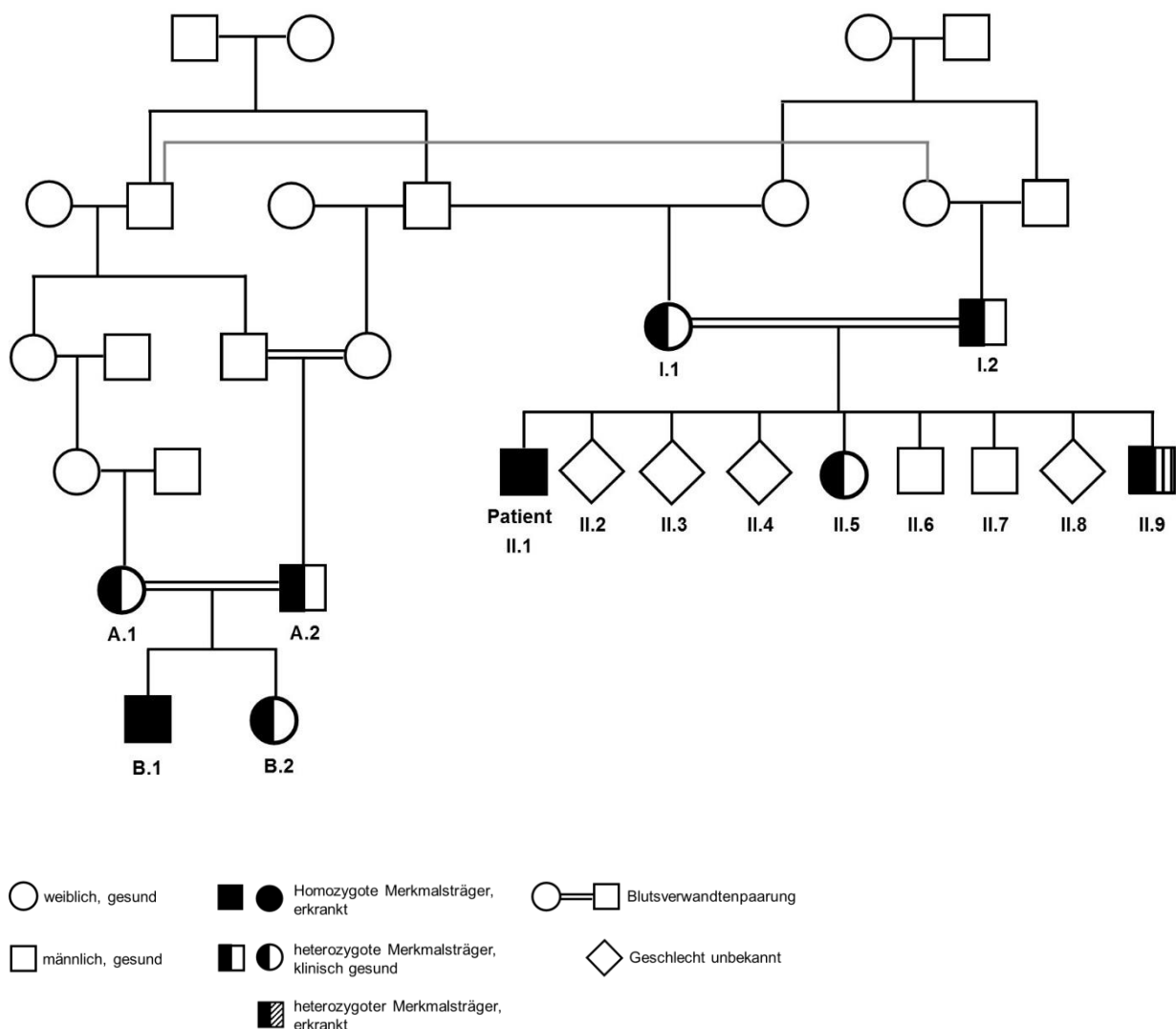


Abbildung 19: Familienstammbaum von Patient II.1 und B.1 mit Legende

#### 5.1.4 Bestätigung der Mutation

Mit der Sequenzierung nach Sanger wurde die im Whole Exome Sequencing entdeckte Mutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> von Patient II.1 nochmals gezielt untersucht. Außerdem wurden zwei Familienmitglieder (I.1 und II.9) und eine Kontrolle (CTRL1) sequenziert. Die Kontrolle diente als Beispiel eines Wildtyps, Mutter und Bruder des Patienten zeigten beide eine heterozygote Mutation (Abbildung 20). Bei der Mutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> des Patienten handelt es sich um eine Punktmutation im Exon 1 der humanen  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1, wodurch die Aminosäure Arginin gegen Tryptophan (CGG  $\rightarrow$  TGG) ausgetauscht wird.

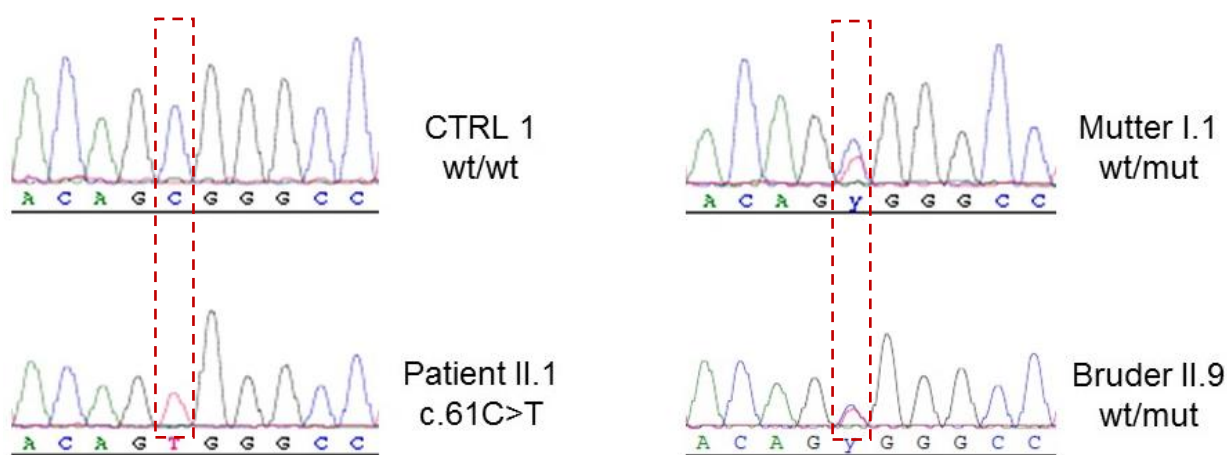


Abbildung 20: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung; Kontrolle (CTRL1) als Beispiel eines Wildtyps; homozygote Punktmutation im B4GALT1-Gen des Patienten, heterozygote Mutationen bei Mutter und Bruder

#### 5.1.5 Proteinexpression und Lokalisation von B4GALT1 in EBV-LCL Zellen

Nach der Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut des Patienten und zweier gesunder Spender (K1, K2) erfolgte die Etablierung von EBV-LCL Zellen (siehe dazu 4.4.3). Dadurch war es möglich, die Expression von B4GALT1 auf mRNA- und Proteinebene sowie die Lokalisation in den Zellen des Patienten mit B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup>-Mutation zu untersuchen und mit denen von gesunden Kontrollen (K1, K2) zu vergleichen.

### 5.1.5.1 mRNA Expression in EBV-LCL Zellen

Mit der quantitativen Echtzeit-PCR wurde die mRNA-Expression von B4GALT1 in den EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen gemessen. Es konnte weder eine stark erhöhte noch erniedrigte mRNA-Expression in den Patientenzellen beobachtet werden. Außerdem zeigte sich kein bedeutender Unterschied zu der mRNA-Expression von B4GALT1 in den Zellen gesunder Spender (Abbildung 21). Daraus lässt sich schließen, dass die Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> keinen Einfluss auf die Transkription und somit mRNA Expression von B4GALT1 hat.

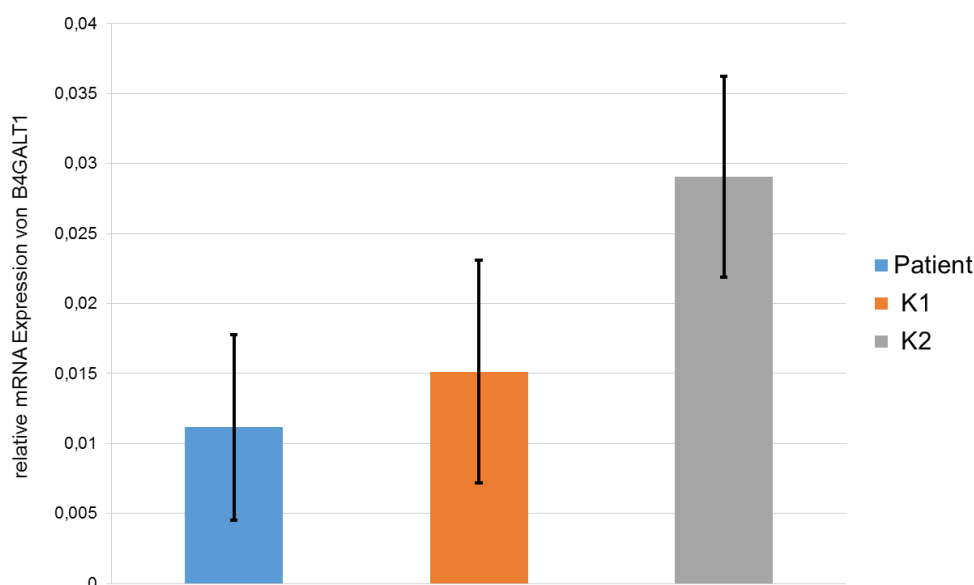


Abbildung 21: relative B4GALT1 mRNA Expression in EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen (K1, K2); die Ergebnisse wurden an die mRNA Expression eines Kontrollgens (GAPDH) angeglichen; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten

### 5.1.5.2 Western Blot Analyse

Nachdem die B4GALT1 Expression auf mRNA-Ebene keinen signifikanten Unterschied zwischen Patient und Kontrollen zeigte, sollte diese zusätzlich auf Proteinebene überprüft werden. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von B4GALT1 in den EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen untersucht. Hier ließ sich ein Unterschied in der B4GALT1 Expression in EBV-LCL Zellen des Patienten und denen gesunder Spender erkennen. Die Analyse zeigte, dass die Expression von B4GALT1 in den Zellen des Patienten verglichen mit den Kontrollen K1 und K2 geringer ist. Da die Banden von Patient und Kontrollen auf der Membran die gleiche Größe aufweisen, liegt kein Verlust von Aminosäuren vor (Abbildung 22).

Dies lässt vermuten, dass B4GALT1 durch die Mutation Arg21Trp in den Patientenzellen nicht stabil exprimiert wird.

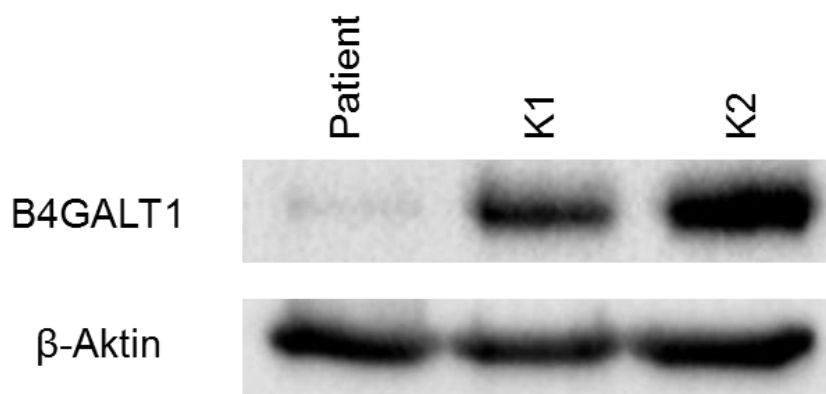


Abbildung 22: Western Blot Analyse von B4GALT1 in EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen (K1, K2); Aktin diente als Ladekontrolle

### 5.1.5.3 Immunfluoreszenzanalyse

Um die Lokalisation von B4GALT1 in den EBV-LCL Zellen zu analysieren, wurden diese auf sterile, mit Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläser ausgesät (siehe 4.10). Die Zellen wurden mit einem anti-B4GALT1 Antikörper gefärbt. B4GALT1 ist ein Protein, das im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Qasba, Ramakrishnan et al. 2008). Daher wurden die Zellen zusätzlich mit dem Golgi-Marker GM130 angefärbt, um die Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat zu überprüfen.

Die Lokalisation von B4GALT1 in den Zellen der Kontrollen zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit dem Signal des anti-GM130-Antikörpers. In den Patientenzellen ließ sich ebenfalls eine Kolokalisation von B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> und dem Golgi-Apparat erkennen, jedoch war das Signal schwächer als in den Kontrollzellen (Abbildung 23). Die Immunfluoreszenzanalyse bekräftigte die Vermutung der Western Blot Analyse, dass die Patientenmutation Arg21Trp im B4GALT1 die Expression des Proteins nur gering beeinträchtigt. Das weniger exprimierte, aber noch vorhandene B4GALT1 in den Zellen mit Arg21Trp-Mutation ist an den Golgi-Apparat gebunden und wird nicht im ER zurückgehalten, was bei einem anderen Patienten mit unterschiedlicher Mutation im B4GALT1 Gen beschrieben wurde (Hansske, Thiel et al. 2002).

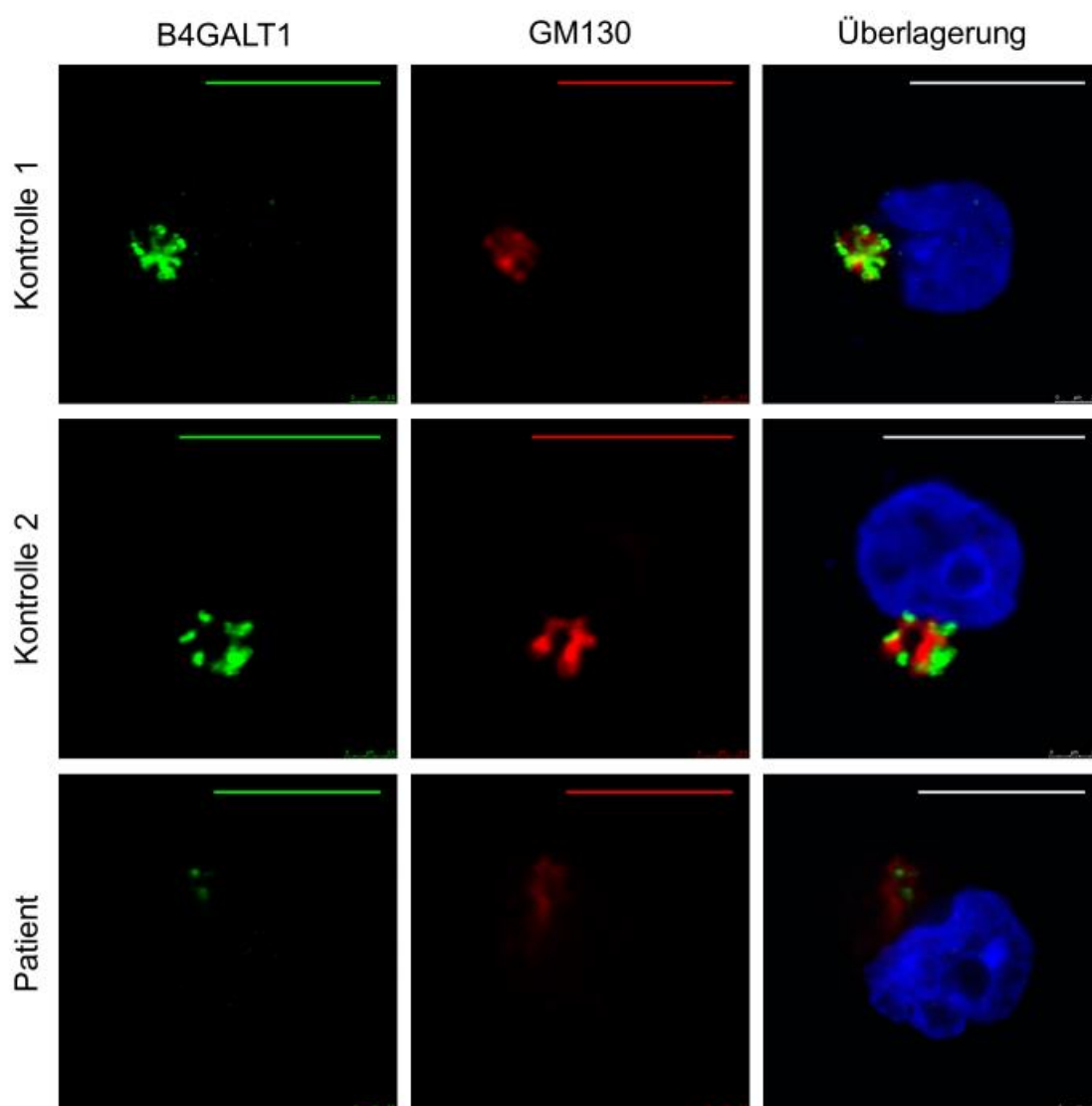


Abbildung 23: Immunfluoreszenzanalyse der EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrolle 1+2; B4GALT1 (grün) und Golgi-Apparat (GM130, rot) sind dargestellt; DAPI (De Leeneer, Van Bockstal et al.) wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm

## 5.2 Untersuchung des $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1-Mangels in HeLa Zellen

### 5.2.1 Genotypisierung

Die expandierten Einzelzellkolonien der CRISPR/Cas9 transfizierten HeLa Zellen wurden auf ihren Genotyp hin untersucht. Nachdem die DNA isoliert wurde, wurden die entsprechenden Sequenzen mittels PCR und Agarosegelelektrophorese amplifiziert und analysiert. In Abbildung 24 ist ein Beispiel eines Agarosegels mit Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Zellen dargestellt.

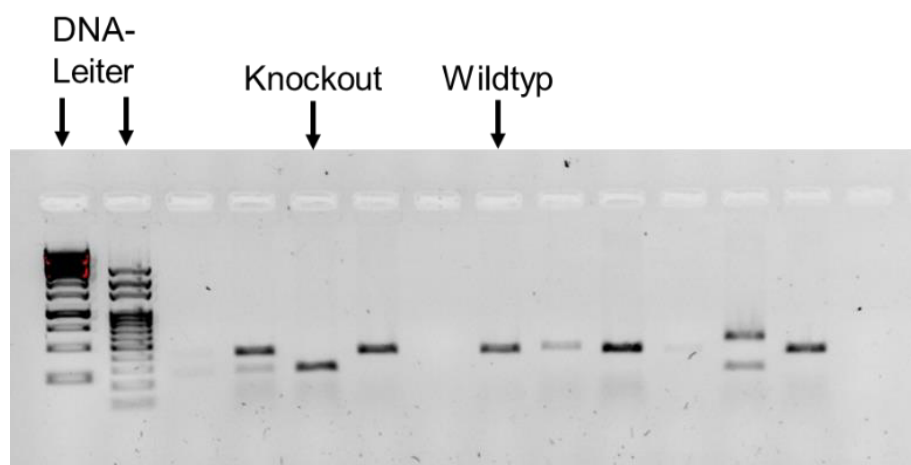


Abbildung 24: Agarosegel mit DNA Banden; eine DNA-Leiter zur Größenbestimmung der DNA in den Proben wurde aufgetragen; die DNA-Bande eines HeLa Wildtyp und eines HeLa B4GALT1 Knockout-Klones ist zu erkennen

Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA extrahiert und zum Sequenzieren geschickt. Die Analyse bestätigte die Generierung von insgesamt sechs B4GALT1 Knockout-Klonen. Abbildung 25 zeigt den Abschnitt der Sequenz des B4GALT1-Gens, der durch die CRISPR/Cas9 Methode entfernt werden soll. In Abbildung 26 sind die Sequenzen von zwei B4GALT1 Knockout-Klonen, mit denen auch die weiteren Experimente durchgeführt wurden, dargestellt.

Teilsequenz des B4GALT1-Gens:

...gcctgctaacttctccctccctccacctctctagTGGGCCCCATGCTGATTGAGTTTAAACATGC  
 CTGTGGACCTGGAGCTCGTGGCAAAGCAGAACCCAAATGTGAAGATGGGCGG  
 CCGCTATGCCCCAGGGACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCATCATCATTC  
 CATTCCGCAACCGGCAGGAGCACCTCAAGTACTGGC.....

Abbildung 25: Ausschnitt aus der Sequenz des B4GALT1 Gens; der geplante, zu entfernende Abschnitt der Sequenz (156 Basenpaare) ist rot hinterlegt

A12

Allel 1: tccacctctct.....CCGGCAGGAGC (147bp del)

Allel 2: tccacctct.....CCGGCAGGAGC (149bp del)

C4

Allel 1: tccacctctc.....CCGGCAGGAGC (148bp del)

Allel 2: tccacctctc.....GGCAGGAGC (149bp del)

Abbildung 26: Sequenzen der B4GALT1 Knockout-Klone A12 und C4; die Basenpaare, die entfernt wurden, sind rot hinterlegt; in Klammer steht die Anzahl der Basenpaare, die entfernt wurden

### 5.2.2 Validierung der HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen

Um die Genotypisierung der HeLa Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Klone zu bestätigen, wurde die mRNA- und Proteinexpression dieser Klone mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR und des Western Blots untersucht.

Die mRNA Expression wurde in HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Klonen gemessen. In HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen konnte im Gegensatz zu den HeLa Wildtyp Zellen keine mRNA Expression von B4GALT1 gemessen werden (Abbildung 27). Somit wurden die B4GALT1 Knockout-Klone auf mRNA-Level bestätigt.



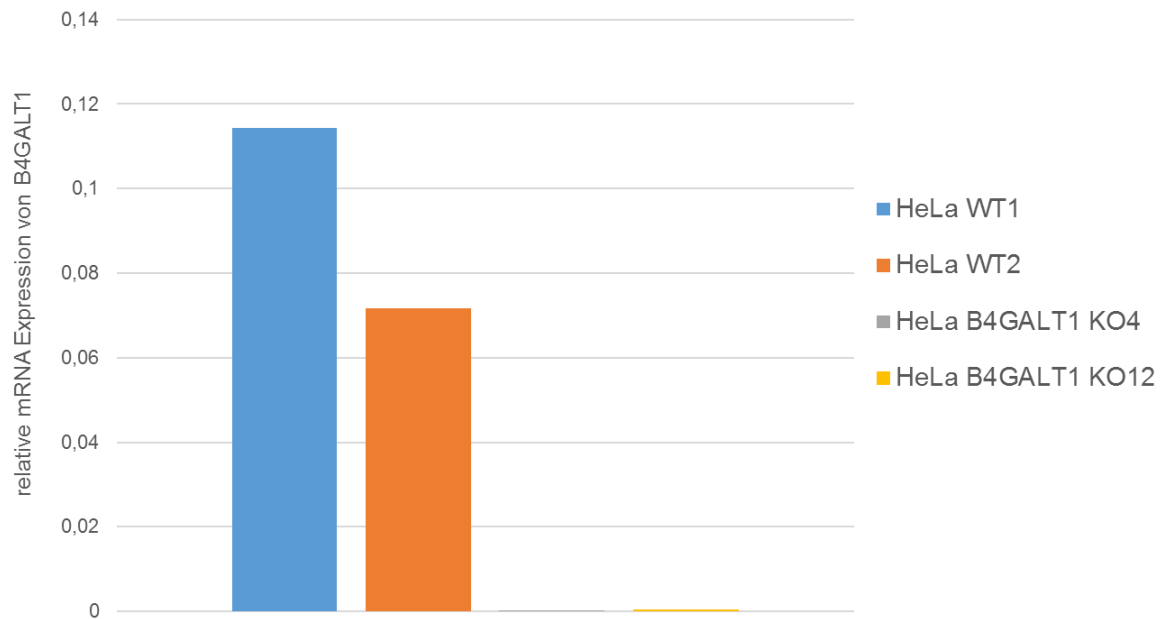


Abbildung 27: relative mRNA Expression von B4GALT1 in HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO-Klonen; GAPDH diente als Kontrollgen

Um das Ergebnis der qPCR zu bestätigen, wurden HeLa WT und HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen auch auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. In den HeLa Wildtyp Zellen sind eindeutige Banden des B4GALT1 Proteins zu erkennen. HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen hingegen weisen keine Banden auf, was bedeutet, dass B4GALT1 hier nicht exprimiert wird (Abbildung 28). Demnach wurde auch auf Proteinebene die Ausschaltung des B4GALT1 Gens in den HeLa B4GALT1 Knockout-Klonen bestätigt.

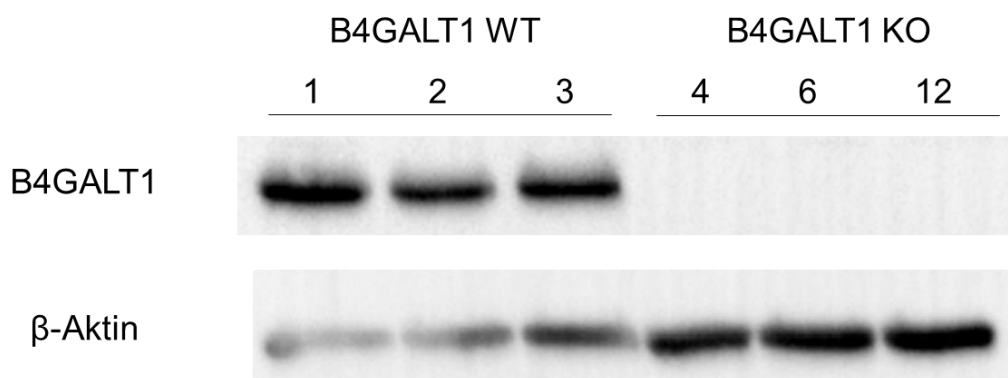


Abbildung 28: Western Blot Analyse: Bestätigung der HeLa B4GALT1 Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Klone; Aktin diente als Ladekontrolle

### 5.2.3 Lokalisation von B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> in HeLa Zellen

Die Auswirkung der Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> auf die Lokalisation in der Zelle wurde in HeLa B4GALT1 Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Klonen im Konfokalmikroskop untersucht. Dafür wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern ausgesät und jeweils mit GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup> und GFP\_B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfiziert (4.10). Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Marker für den Golgi-Apparat (anti-GM130), das Endoplasmatische Retikulum (Calnexin) und F-Aktin (Phalloidin) gefärbt, um eine potenzielle Kolokalisation zu überprüfen.

Die mit B4GALT1<sup>WT</sup> transfizierten HeLa WT Zellen wiesen eine eindeutige Überlappung mit dem Signal des Golgi Marker GM130 auf, wodurch die Lokalisation von B4GALT1 im Golgi-Apparat bestätigt wurde. HeLa B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> Zellen zeigten ebenfalls eine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat. In wenigen Ausnahmen ließ sich ein zerstreutes Verteilungsmuster des Proteins in den B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> Zellen erkennen (Abbildung 29). Zwischen den B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Beide zeigten zwei unterschiedliche Expressionsmuster: eine deutliche Überschneidung mit dem GM130 Signal und eine diffuse Verteilung um den Nukleus (Abbildung 31). Die Kolokalisation mit dem Golgi Marker belegte die Annahme, dass die Mutation Arg21Trp keine Auswirkung auf die Lokalisation von B4GALT1 hat.

Das ER-Protein Calnexin zählt zu den Chaperonen und ist unter anderem für die Faltung neu synthetisierter Glykoproteine zuständig (Wang, Groenendyk et al. 2015). Bei der Anfärbung des ER mit anti-Calnexin zeigt sich im Mikroskop eine netzartige Verteilung rund um den Nukleus. Da sich die Expression von B4GALT1 in den HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen teilweise als zerstreute Verteilung um den Zellkern äußerte, wurden die mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfizierten HeLa Zellen mit anti-Calnexin angefärbt. Die Analyse des Expressionsmusters von B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> in HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO-Zellen mit dem Konfokal Mikroskop ergab keine Kolokalisation mit Calnexin (Abbildung 30 und Abbildung 32).

Da B4GALT1 in den HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen ein untypisches Verteilungsmuster zeigte, wurde Phalloidin als zusätzlicher Marker eingesetzt, um eine Kolokalisation von B4GALT1 mit F-Aktin zu überprüfen. F-Aktin-Filamente erscheinen gebündelt im Zytoplasma und tragen als Bestandteil des Zytoskeletts zur Stabilität und Form der Zelle bei. Mit B4GALT1<sup>WT</sup> transfizierte HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO-Zellen wurden mit Phalloidin gefärbt. Die Expression von B4GALT1 zeigte keine Kolokalisation mit F-Aktin (Abbildung 33).

Die zerstreute Expression von B4GALT1 um den Zellkern ließ eine Beeinträchtigung der Funktion von B4GALT1 durch GFP vermuten.

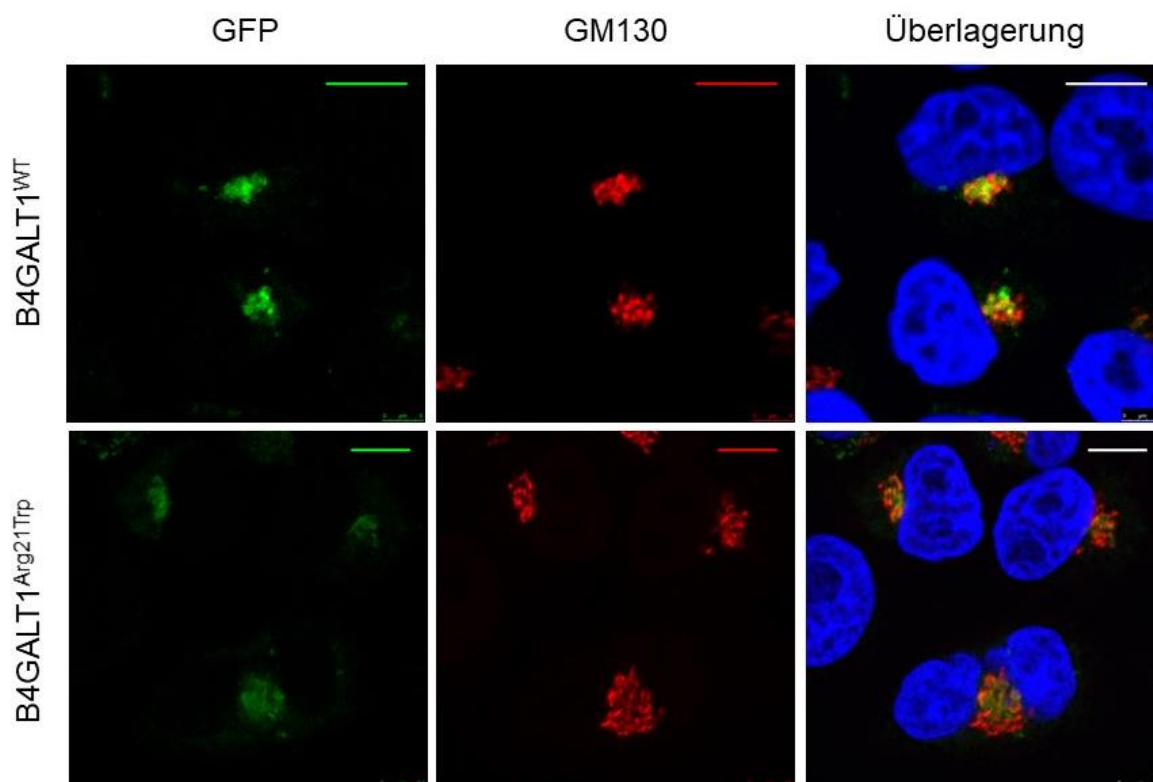


Abbildung 29: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT Zellen nach Transfektion mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> (GFP\_B4GALT1, grün); Darstellung des Golgi-Apparates mit GM130 (rot); DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm

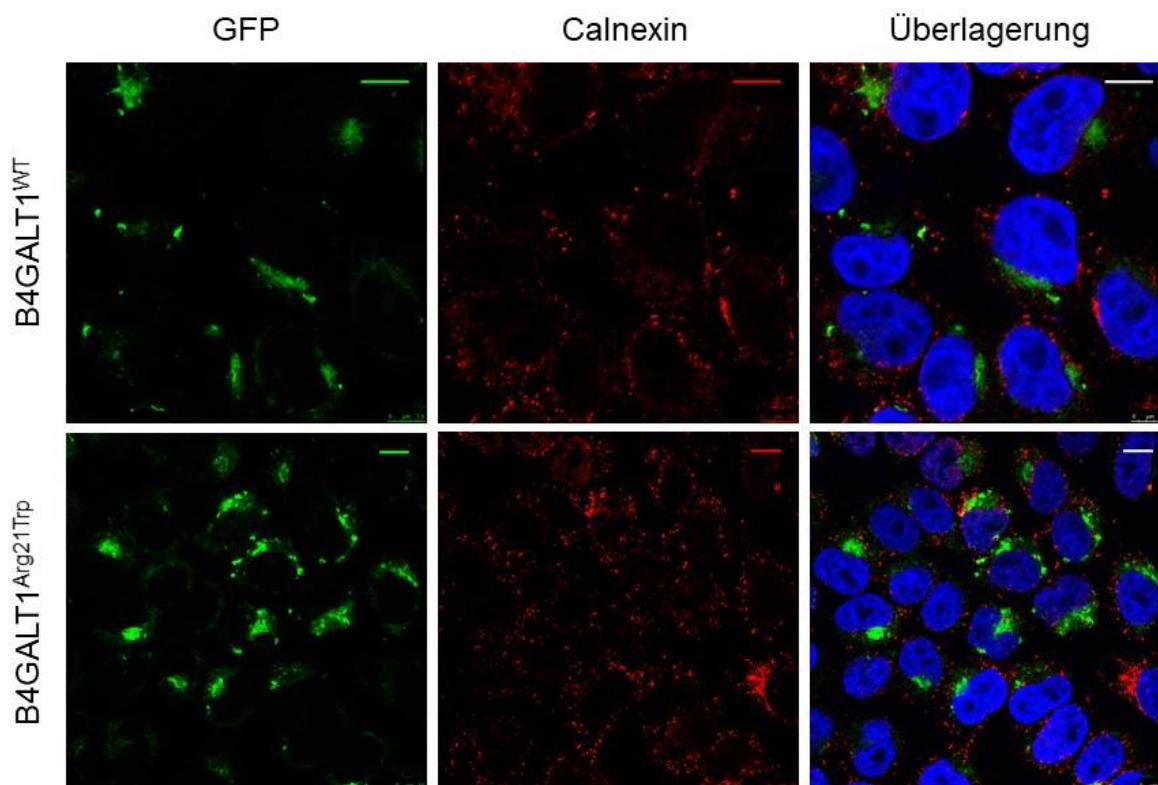


Abbildung 30: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT Zellen nach Transfektion mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> (GFP\_B4GALT1, grün), Darstellung des ER (Calnexin; rot); DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm

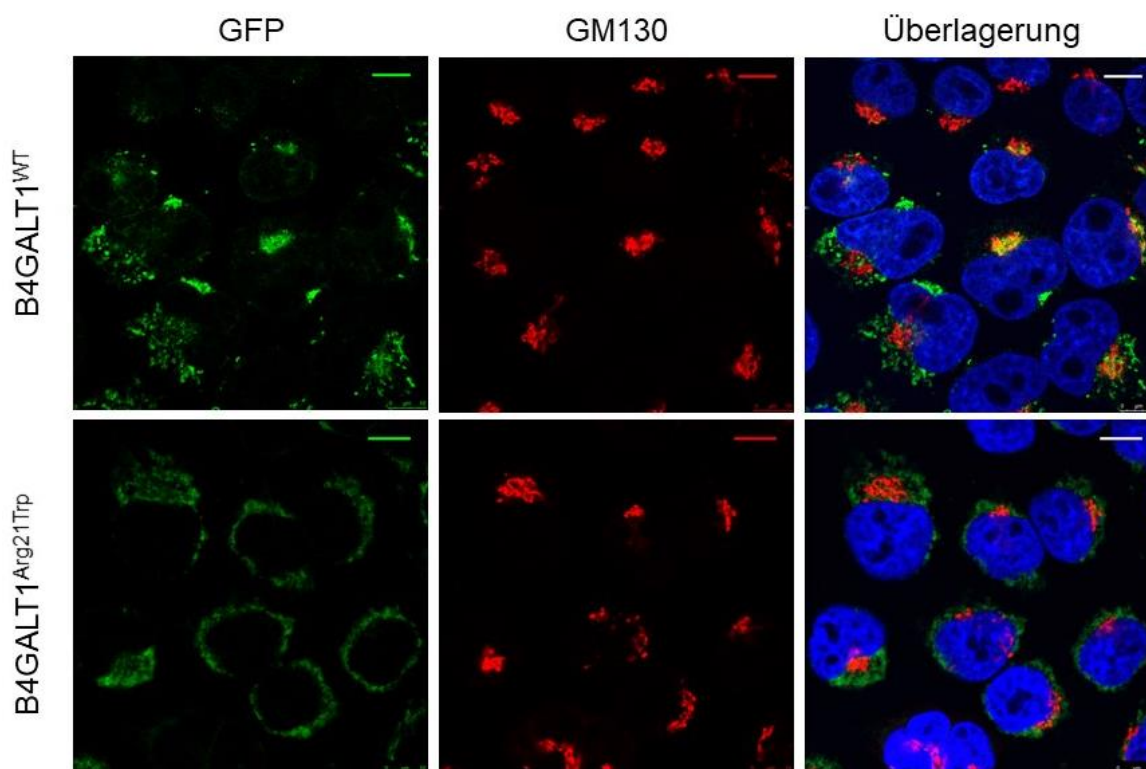


Abbildung 31: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa B4GALT1 KO Zellen nach Transfektion mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> (GFP\_B4GALT1, grün), Golgi-Apparat ist dargestellt (GM130, rot), DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm

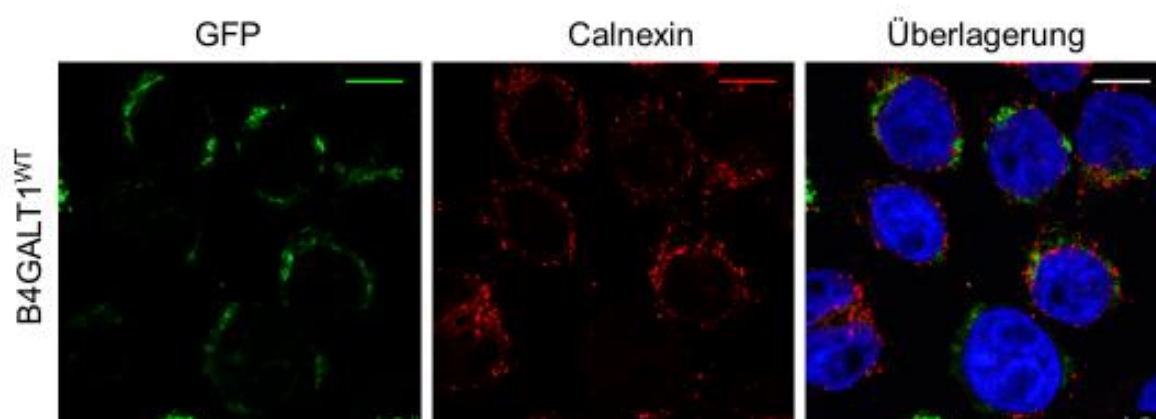


Abbildung 32: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa B4GALT1 KO Zellen nach Transfektion mit B4GALT1<sup>WT</sup> (GFP\_B4GALT1, grün), Darstellung des ER (Calnexin, rot), DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm

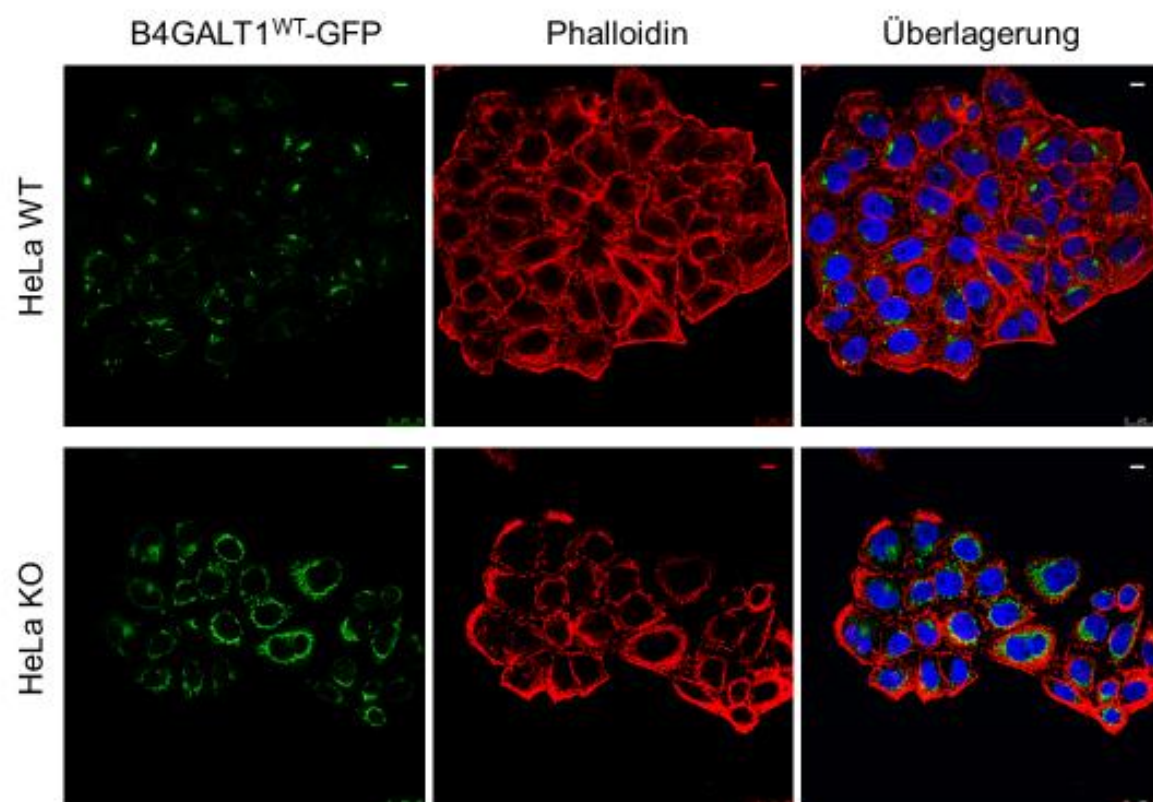


Abbildung 33: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO (HeLa KO) Zellen transfiziert mit GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup> (grün), F-Aktin ist dargestellt (Phalloidin, rot), als Zellkernmarker wurde DAPI verwendet; Maßstab 10  $\mu$ m

### 5.2.4 Messung der enzymatischen Aktivität der $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1

Nach der Analyse der Proteinexpression von B4GALT1 mittels Western Blot und der Lokalisation im Konfokalmikroskop, wurde die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 untersucht. Die Enzymaktivität von B4GALT1 in HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout-Klonen wurde, wie unter 4.11 beschrieben, mit dem Glycosyltransferase Activity Kit (R&D) gemessen. Die spezifische Aktivität von B4GALT1 in HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen zeigte keinen Unterschied zu der Aktivität in HeLa B4GALT1 Wildtyp Zellen (Abbildung 34). Die enzymatische Aktivität in den HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen war wider Erwarten nicht beeinträchtigt, was auf einen Ausgleich durch andere Galaktosyltransferasen schließen lässt.

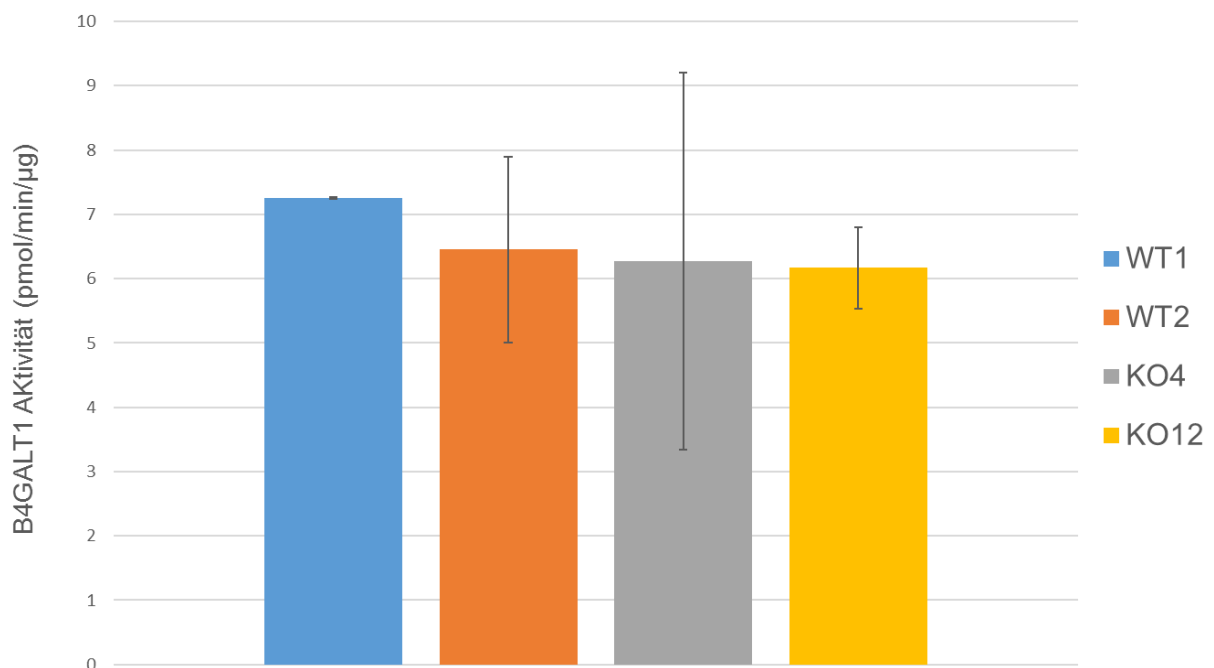


Abbildung 34: Messung der enzymatischen Aktivität von B4GALT1 in HeLa Wildtyp (WT1 + WT2) und HeLa B4GALT1 Knockout (KO4 + KO12) Klonen; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten



Um den Ausgleich der Enzymaktivität durch andere Galaktosyltransferasen in den HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferasen 1-7 in HeLa Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Zellen gemessen. Dazu wurde eine qPCR (siehe 4.5) mit den entsprechenden Primern (Tabelle 4) durchgeführt.

Im Gegensatz zu den HeLa B4GALT1 Wildtyp Zellen konnte in den HeLa B4GALT1 Knockout-Zellen keine mRNA-Expression von B4GALT1 gemessen werden. Jedoch ist eine erhöhte mRNA-Expression von B4GALT2 und B4GALT5 in den B4GALT1 KO-Zellen zu sehen (Abbildung 35).

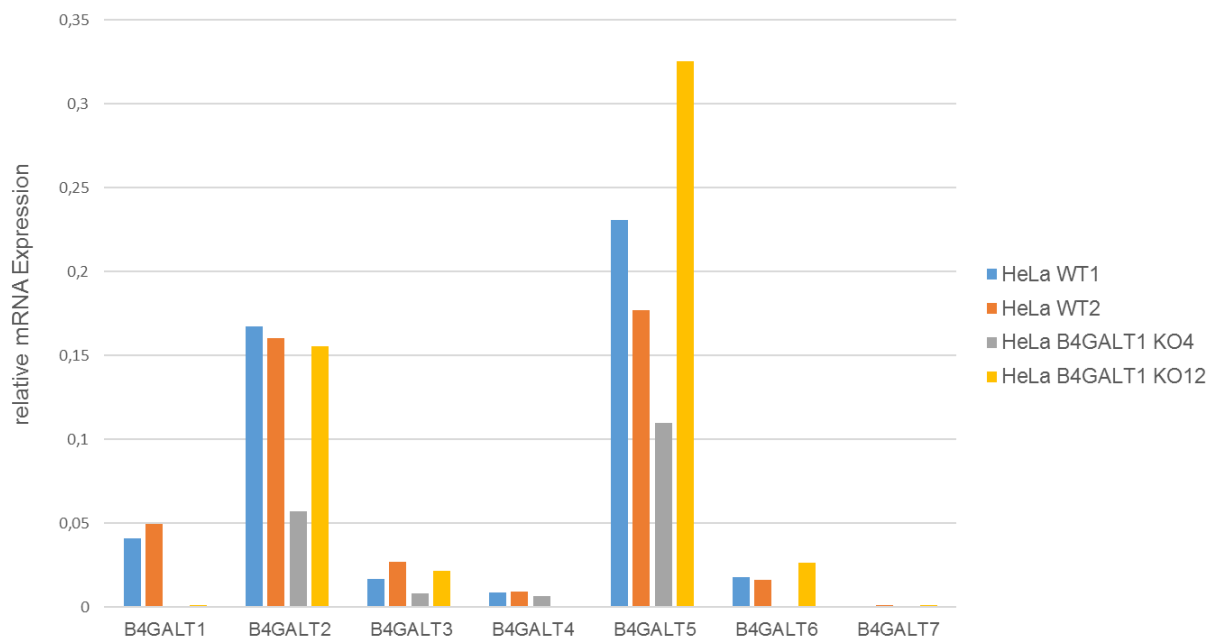


Abbildung 35: relative mRNA Expression der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferasen 1-7 in HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout Zellen; GAPDH diente als Kontrollgen

Die Ergebnisse der Messung zeigen, dass dieser Test nicht spezifisch für B4GALT1 ist, sondern auch die Aktivität anderer Glykosyltransferasen misst. Insofern kann über die enzymatische Aktivität von B4GALT1 in HeLa WT und B4GALT1 KO-Zellen mit diesem Test keine Aussage getroffen werden.

## 6 DISKUSSION

Psychomotorische Retardierung, schwere epileptische Krampfanfälle, milde Neutropenie und schwere Thrombozytopenie sind die Hauptsymptome der in dieser Arbeit beschriebenen Patienten. Mittels WES und Sanger-Sequenzierung konnte eine Punktmutation (Arg21Trp) im Gen der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 identifiziert werden.

Die Auswirkungen der Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> wurden genauer untersucht, indem aus den PBMCs von Patient, Familienmitgliedern und gesunden Spendern immortalisierte B-Zellen etabliert wurden. Weiterhin wurde ein HeLa B4GALT1 CRISPR/Cas9 Knockout Konstrukt generiert und dieses mit B4GALT1<sup>WT</sup> und B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> transfiziert. Die Expression von B4GALT1 auf mRNA und Proteinebene wurde sowohl in diesen Zellen als auch in den EBV-LCL Zellen untersucht. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von B4GALT1 in Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Zellen sowie in den EBV-LCL Zellen von Patient und gesunden Spendern ermittelt. Die enzymatische Aktivität von B4GALT1 wurde mit Hilfe eines Glykosyltransferase-Aktivitätstests gemessen.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

- Eine neue krankheitsauslösende Mutation (B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup>) konnte beschrieben werden (Seite 45-46)
- Die Phagozytose- und Endozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten weist keinen signifikanten Unterschied zwischen Patient und gesunden Kontrollen auf (Seite 48 - 51)
- Die Patientenmutation B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> zeigt keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von B4GALT1 (Seite 54)
- Die subzelluläre Lokalisation des Proteins in B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup>-mutierten Zellen ist unauffällig (Seite 55 - 56)
- Die enzymatische Aktivität von B4GALT1 ist mit einem kommerziellen Kit nicht spezifisch zu bestimmen (Seite 64 - 65)
- Die Mutation führt zu einer verminderten Proteinexpression, was vermutlich die Ursache der Erkrankung ist (Seite 54 - 55)



## 6.1 Humaner B4GALT1-Mangel (1031-1032insC) verursacht mentale und psychomotorische Retardierung sowie Blutgerinnungsstörungen

Peters und Kollegen identifizierten eine neue Form der kongenitalen Glykosylierungsstörung Typ IId, der eine Mutation im *B4GALT1*-Gen zugrunde liegt. Im Vordergrund stehen ein Hydrozephalus, mentale und psychomotorische Retardierung, Myopathie sowie Defekte in der Blutgerinnung. Die Ursache ist eine Insertion eines Nukleotids (1031-1032insC), die zu einem vorzeitigen Translationsstopp und somit zu einem Verlust von Aminosäuren führt (Hansske, Thiel et al. 2002, Peters, Penzien et al. 2002). Die Mutation zeigte auch eine Beeinträchtigung der Lokalisation von B4GALT1. Das Protein wird nicht zum Golgi-Apparat transportiert, sondern im ER zurückgehalten. Außerdem zeigte sich eine verminderte enzymatische Aktivität von B4GALT1 in den Patientenzellen (Hansske, Thiel et al. 2002).

Eine weitere Patientin mit derselben Mutation (1031-1032insC) wurde von Guillard und Kollegen identifiziert. Hier wurden vor allem gastrointestinale und hepatische Manifestationen, Blutgerinnungsdefekte und faziale Dysmorphien beobachtet. Neurologische Auffälligkeiten oder psychomotorische Entwicklungsverzögerungen werden nicht beschrieben. Es wird außerdem eine Normalisierung des von Peters und Kollegen beschriebenen Patienten berichtet. Dieser wies im Alter von elf Jahren eine normale geistige Entwicklung auf und zeigte nur noch geringe motorische Defizite. Gemeinsamkeiten sind somit dysmorphe Gesichtszüge, muskuläre Hypotonie und Blutgerinnungsstörungen (Guillard, Morava et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue homozygote Mutation im *B4GALT1*-Gen identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch führt (Arg21Trp). Gemeinsame phänotypische Merkmale der Patientenmutationen  $B4GALT1^{Arg21Trp}$  und  $B4GALT1^{1031-1032insC}$  sind motorische Entwicklungsverzögerungen und Blutgerinnungsstörungen. In den Patientenzellen mit  $B4GALT1^{Arg21Trp}$  Mutation zeigte sich auf Proteinebene eine verminderte Expression von B4GALT1. Allerdings führt diese Patientenmutation (Arg21Trp) zu keinem Abbruch der Proteinsynthese und somit zu keinem Verlust von Aminosäuren. Die Immunfluoreszenzanalyse bestätigte dieses Ergebnis des Western Blots. Die Untersuchung der Lokalisation von B4GALT1 in EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen sowie in HeLa Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Zellen, transfiziert mit  $B4GALT1^{WT}$  und  $B4GALT1^{Arg21Trp}$ , zeigte keinen Unterschied. Jedoch war ein deutlich vermindertes Signal in Zellen mit der Patientenmutation  $B4GALT1^{Arg21Trp}$  zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwei verschiedene Mutationen  $B4GALT1^{Arg21Trp}$  und  $B4GALT1^{1031-1032insC}$  ähnliche phänotypische Manifestationen hervorrufen.

Dennoch bestehen phänotypische Unterschiede zwischen den oben beschriebenen Mutationen, die sich durch Neutropenie, epileptische Krampfanfälle und mentale

Entwicklungsverzögerung bei Patienten mit B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup>-Mutation äußern. Diese unterschiedlichen Manifestationen lassen sich vermutlich auf die zwei verschiedenen Mutationen B4GALT1<sup>Arg21Trp</sup> und B4GALT1<sup>1031-1032insC</sup> zurückführen. Bekannt ist, dass die Insertion eines einzigen Nukleotids (1031-1032insC) im *B4GALT1*-Gen zu einem vorzeitigen Translationsstopp und dadurch zu einem Verlust von Aminosäuren führt. Möglicherweise kommt es dadurch zur Fehllokalisierung des Proteins, was wiederum einen Funktionsverlust des Enzyms zur Folge haben könnte. Die in dieser Arbeit untersuchte Punktmutation (Arg21Trp) im *B4GALT1*-Gen führte zu einer verminderten Proteinexpression von B4GALT1. Dies zeigte sich sowohl im Western Blot als auch im Immunfluoreszenzmikroskop. Die Lokalisation von B4GALT1 wurde durch die Punktmutation nicht beeinträchtigt. Somit lässt sich vermuten, dass die Funktion des verbleibenden Proteins erhalten bleibt und eine, wenn auch wahrscheinlich eingeschränkte, Enzymaktivität vorhanden ist.

In der Literatur sind einige Fälle aufgeführt, in denen Mutationen im selben Gen zu heterogenen Phänotypen führen (Rezaei, Chavoshzadeh et al. 2007, Meerschaut, Bordon et al. 2015, Wortmann, Zietkiewicz et al. 2015). Ferner gibt es auch Proteine wie z.B. HAX1 und CLPB, die im selben Zellkompartiment lokalisiert sind und miteinander interagieren, aber deren Fehlfunktionen unterschiedliche phänotypische Merkmale hervorrufen. Wie in Kapitel 6.3 näher beschrieben, ist die klinische Kombination von Neutropenie und neurologischen Symptomen durch Mutationen in verschiedenen Genen bereits bekannt. In Tabelle 17 sind diese zusammengefasst.

## 6.2 Auswirkung eines B4GALT1-Mangels im Mausmodell

Asano und Kollegen generierten B4GALT1 Knockout-Mäuse, um die Auswirkungen eines B4GALT1-Mangels *in vivo* zu untersuchen. Die B4GALT1 Knockout-Mäuse zeigten ein vermindertes Wachstum und ungefähr die Hälfte verstarb innerhalb weniger Tage. Des Weiteren wurden ungewöhnliche Veränderungen in der Proliferation und Differenzierung von epithelialen Zellen beobachtet (Asano, Furukawa et al. 1997). Zu einem späteren Zeitpunkt wurden weitere Untersuchungen an diesem B4GALT1 KO-Mausmodell durchgeführt. Diese zeigten eine verminderte Neutrophileninfiltration an den Entzündungsstellen und somit eine Abnahme der Entzündungsreaktion bei B4GALT1-defizienten Mäusen (Asano, Nakae et al. 2003).

Lu und Kollegen generierten ebenfalls ein B4GALT1 KO-Mausmodell. Die meisten B4GALT1 KO-Mäuse verstarben in der Neonatalperiode, phänotypisch ließen sich eine Wachstumsretardierung, dünne Haut und Haare, Dehydrierung und Hypophyseninsuffizienz

erkennen. Mäuse, welche die Neonatalperiode überlebt haben, zeigten eine Normalisierung des Wachstums und des äußerlichen Erscheinungsbildes (Lu, Hasty et al. 1997).

Im Gegensatz zu den bekannten Patientenfällen mit hB4GALT1-Mangel wurden in Mausmodellen keine neurologischen Auffälligkeiten beobachtet. Detaillierte Untersuchungen zum Immunsystem dieser Mäuse wurden nicht berichtet. Auch gibt es keine Informationen über die Auswirkungen auf die Hämatopoese bzw. Granulopoese der B4GALT1-defizienten Mäuse.

### 6.3 Schwere kongenitale Neutropenie mit neurologischer Beteiligung

In den bisher identifizierten Mutationen im *B4GALT1*-Gen stehen vor allem neurologische Symptome im Vordergrund. Jedoch sind in der Medizin bereits einige Fälle bekannt, bei denen sowohl eine Neutropenie als auch neurologische Symptome beschrieben werden. Mutationen in *HAX1*, *CLPB* und *VPS45* sind als Ursache einer SCN bekannt, die sich auch durch zusätzliche neurologische Manifestationen charakterisieren lassen.

Das mitochondriale Protein HAX1 spielt neben der Aufrechterhaltung des inneren Membranpotentials der Mitochondrien eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des apoptotischen Prozesses während der Reifung neutrophiler Granulozyten. *HAX1*-Mutationen in Exon 2 beeinträchtigen ausschließlich die Isoform A und verursachen eine autosomal rezessive schwere kongenitale Neutropenie. Mutationen in anderen Exons, die beide Isoformen (A und B) betreffen, weisen zusätzlich eine neurologische Beteiligung auf, da Isoform B hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert wird (Klein, Grudzien et al. 2007, Klein 2017). Entwicklungsverzögerungen, motorische Defizite und schwere epileptische Krampfanfälle sind phänotypische neurologische Manifestationen (Rezaei, Chavoshzadeh et al. 2007, Boztug, Ding et al. 2010).

*CLPB* kodiert für die caseinolytische Peptidase B homolog und trägt vermutlich als mitochondriales Chaperon zum Abbau von fehlgefalteten Proteinen bei (Saunders, Smith et al. 2015). Zudem interagiert CLPB mit ATP2A2, welches wiederum in den apoptotischen Prozess mit HAX1 involviert ist (Vafiadaki, Arvanitis et al. 2009, Wortmann, Zietkiewicz et al. 2015). Alle Patienten mit einer *CLPB*-Mutation weisen eine 3-Methylglutaconazidurie auf. Kongenitale Neutropenie, neurologische Defizite von leichter intellektueller Einschränkung bis hin zu einer pränatalen Enzephalopathie mit progressiver Hirnatrophie, Epilepsien, Entwicklungsverzögerungen, Bewegungsstörungen und bilateraler Katarakt sind weitere charakteristische Manifestationen. Die neurologischen Symptome können je nach Mutation

stark variieren, sind jedoch meist schwerwiegender ausgeprägt als bei *HAX1*-Mutationen (Wortmann, Zietkiewicz et al. 2015).

*VPS45* ist unter anderem für die Apoptosekontrolle und die Zellmotilität der neutrophilen Granulozyten zuständig (Vilboux, Lev et al. 2013). Auch bei Patienten mit Mutationen in *VPS45* werden neben einer SCN neurologische Manifestationen beschrieben. Faziale Dysmorphien, Mikrozephalie sowie neurologische und motorische Entwicklungsverzögerungen sind bekannt (Meerschaut, Bordon et al. 2015).

Die in dieser Arbeit beschriebene neue homozygote Mutation im *B4GALT1*-Gen (Arg21Trp) verursacht psychomotorische Entwicklungsverzögerung, schwere epileptische Krampfanfälle, eine milde Form der Neutropenie und eine ausgeprägte Thrombozytopenie. Mutationen in *HAX1*, *CLPB* und *VPS45* werden ebenso mit neurologischen Entwicklungsverzögerungen assoziiert. Epilepsien treten zudem bei Mutationen in *HAX1* und *CLPB* auf. Betrachtet man diese Gemeinsamkeiten der verschiedenen Gendefekte, könnte bei der neu entdeckten *B4GALT1*<sup>Arg21Trp</sup>-Mutation durchaus ein neues Gen als Ursache einer SCN in Betracht gezogen werden. Die Neutropenie hingegen äußert sich bei unserem Patienten nur in einer milden Form, während in den bekannten Fällen mit *HAX1*-, *CLPB*- und *VPS45*-Mutationen die Neutropenie gravierender ist. Um die möglichen Beziehungen zwischen *B4GALT1* und den bekannten Neutropeniegenen zu studieren, müssten noch weitere Untersuchungen und Experimente durchgeführt werden.

Tabelle 17: Bekannte genetische Defekte einer SCN mit extrahämatopoetischen Manifestationen

Gen	Proteinlokalisierung	Funktion	Hämatopoetische Manifestationen	Extrahämatopoetische Manifestationen	Referenz
HAX1	Mitochondrium	Aufrechterhaltung des inneren mitochondrialen Membranpotentials, Beteiligung am Aufbau des Zytoskeletts, Apoptosekontrolle während Reifung neutrophiler Granulozyten	Neutropenie	Entwicklungsverzögerung, kognitive Beeinträchtigung, Epilepsien	Klein, Grudzien et al. 2007, Boztug, Ding et al. 2010
CLPB	Mitochondrium	Abbau fehlgefalteter Proteine	Neutropenie	Entwicklungsverzögerungen, Epilepsien, leichte intellektuelle Einschränkungen bis hin zu progressiven Himatrophien durch pränatale Enzephalopathie	Saunders, Smith et al. 2015, Wortmann, Zietkiewicz et al. 2015
VPS45	Endosomen	Endosomaler Membrantransport und Sortierung von Proteinen	Neutropenie	Faziale Dysmorphien, neurologische und motorische Entwicklungsverzögerung	Vilboux, Lev et al. 2013, Meerschaut, Bordon et al. 2015
B4GALT1	Golgi-Apparat	Biosynthese von Laktose und Glykokonjugaten	Neutropenie, Thrombozytopenie	Leichte faziale Dysmorphien, Psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Myopathie, Epilepsien	Hansske, Thiel et al. 2002, Peters, Penzien et al. 2002
JAGN1	ER	u.a. Beteiligung an der Differenzierung der neutrophilen Granulozyten und Signalübertragung des G-CSF Rezeptors	Neutropenie	Extramedulläre Hämatopoese, Entwicklungsverzögerungen, Osteoporose	Boztug, Jarvinen et al. 2014
ELANE	ER	u.a. Verarbeitung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren	Neutropenie	keine bekannt	Horwitz, Corey et al. 2013
G6PC3	ER	Glykosylierung von Proteinen, die für die Funktion neutrophiler Granulozyten bedeutend sind	Neutropenie, Thrombozytopenie	Herz- und Urogenitalfehlbildungen	Boztug, Appaswamy et al. 2009, Hauck and Klein 2013
WAS	Zytoskelett	Aufrechterhaltung des Zytoskeletts, Regulierung der Proliferation und Apoptose myeloider Zellen	Neutropenie	keine bekannt	Klein 2009

#### 6.4 Neue CDG mit neurologischer und hämatopoetischer Beteiligung

CDGs charakterisieren sich phänotypisch vorwiegend durch neurologische Symptome und Stoffwechselstörungen in verschiedenen Organen, die je nach Subtyp unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Auch das hämatopoetische System kann betroffen sein. (Grunewald, Matthijs et al. 2002, Freeze, Eklund et al. 2015).

Stray-Pedersen und Kollegen beschreiben eine neue Form der CDG, PGM3-CDG. Neben typischen CDG-Manifestationen wie Intelligenzminderung und verschiedenen dysmorphischen Veränderungen wurden auch rezidivierende Infekte, kongenitale Leukopenie inklusive Neutropenie und B- und T-Zell-Lymphopenie sowie Knochenmarksinsuffizienz beobachtet (Stray-Pedersen, Backe et al. 2014).

Es bleiben auch nach Abschluss dieser Arbeit Fragen offen. Es wäre interessant zu prüfen, welche Glykoproteine in neutrophilen Granulozyten und anderen Zellen von der reduzierten Aktivität der *B4GALT1* betroffen sind. Hierzu müssten detaillierte Glykoproteomstudien durchgeführt werden. Angesichts der begrenzten Verfügbarkeit humaner Blutproben wäre es auch interessant, ein entsprechendes Tiermodell zu generieren, um die Effekte der Arg21Trp-Mutation im *B4GALT1*-Gen nachzubilden. Dies wäre mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode in murinen Oozyten möglich und würde in den nachkommenden Mäusen erlauben, die Auswirkungen dieser Mutation auf das Immunsystem und weiterer Organsysteme detailliert darzustellen.

Diese Arbeit dient als Beispiel dafür, wie bedeutend genetische Analysen in der Diagnose von primären Immundefekten sind und welche entscheidende Rolle sie in der Bestimmung von neuen Krankheitsbildern haben, die wertvolle Informationen für Klinik und Wissenschaft bereitstellen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die schwere kongenitale Neutropenie stellt eine heterogene Gruppe von genetisch verursachten Erkrankungen dar. Aufgrund eines Fehlens bzw. einer starken Reduktion neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut zeigen die betroffenen Patienten eine Neigung zu schweren bakteriellen Infektionen. In dieser Arbeit wird die  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 (kodiert im *B4GATL1*-Gen) im Zusammenhang mit einer kongenitalen Neutropenie untersucht.

Bislang wurde erst eine einzige pathogene Mutation (1031-1032insC) beschrieben, die bei zwei bekannten Familien zu einer kongenitalen Glykosylierungsstörung führt (CDG-IIId). In der hier vorliegenden Arbeit wird eine Familie mit einer homozygoten *B4GALT1*-Mutation beschrieben, die zu einem Aminosäureaustausch (Arg21Trp) führt.

Immunologische Untersuchungen zeigten beim Patienten eine verminderte Anzahl von neutrophilen Granulozyten sowie einen Anstieg der Monozyten. Weder die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten noch die Phagozytose von Monozyten war beeinträchtigt.

Auf Proteinebene konnte in Patientenzellen mit *B4GALT1*<sup>Arg21Trp</sup>-Mutation eine verminderte Expression des Proteins festgestellt werden. Das Ergebnis des Western Blots wurde in der Immunfluoreszenzanalyse bestätigt. Entgegen unserer Hypothese und im Gegensatz zu den beschriebenen Befunden bei der 1031-1032insC-Mutation war die subzelluläre Lokalisation des *B4GALT1*<sup>Arg21Trp</sup>-Proteins im Vergleich zum Wildtyp nicht gestört.

Um die enzymatische Funktion der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1 zu untersuchen, wurden Extrakte von HeLa *B4GALT1* Wildtyp Zellen und HeLa *B4GALT1* Knockout Zellen mit dem Glycosyltransferase Activity Kit gemessen. Allerdings stellte sich heraus, dass die Enzymaktivität der *B4GALT1* Knockout Zellen gegenüber den Wildtyp Zellen nicht reduziert war. Folglich ist der Assay nicht spezifisch für die Enzymaktivität der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass es weitere krankheitsauslösende Mutationen in *B4GALT1* gibt, deren Mechanismus anders geartet ist als der Mechanismus bei der 1031-1032insC-Mutation. Es liegt nahe, dass diese neue Form der kongenitalen Glykosylierungsstörung auch zu einer hämatologischen Beteiligung im Sinne einer kongenitalen Neutropenie und Thrombozytopenie führt, deren detaillierte Pathophysiologie allerdings noch im Rahmen weiterführender Studien zu untersuchen ist.



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Asano, M., K. Furukawa, M. Kido, S. Matsumoto, Y. Umesaki, N. Kochibe and Y. Iwakura (1997). "Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells." Embo j **16**(8): 1850-1857.

Asano, M., S. Nakae, N. Kotani, N. Shirafuji, A. Nambu, N. Hashimoto, H. Kawashima, M. Hirose, M. Miyasaka, S. Takasaki and Y. Iwakura (2003). "Impaired selectin-ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in beta-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice." Blood **102**(5): 1678-1685.

Boztug, K., G. Appaswamy, A. Ashikov, A. A. Schaffer, U. Salzer, J. Diestelhorst, M. Germeshausen, G. Brandes, J. Lee-Gossler, F. Noyan, A. K. Gatzke, M. Minkov, J. Greil, C. Kratz, T. Petropoulou, I. Pellier, C. Bellanne-Chantelot, N. Rezaei, K. Monkemoller, N. Irani-Hakimeh, H. Bakker, R. Gerardy-Schahn, C. Zeidler, B. Grimbacher, K. Welte and C. Klein (2009). "A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3." N Engl J Med **360**(1): 32-43.

Boztug, K., X. Q. Ding, H. Hartmann, L. Ziesenitz, A. A. Schaffer, J. Diestelhorst, D. Pfeifer, G. Appaswamy, S. Kehbel, T. Simon, A. Al Jefri, H. Lanfermann and C. Klein (2010). "HAX1 mutations causing severe congenital neutropenia and neurological disease lead to cerebral microstructural abnormalities documented by quantitative MRI." Am J Med Genet A **152A**(12): 3157-3163.

Boztug, K., P. M. Jarvinen, E. Salzer, T. Racek, S. Monch, W. Garncarz, E. M. Gertz, A. A. Schaffer, A. Antonopoulos, S. M. Haslam, L. Schieck, J. Puchalka, J. Diestelhorst, G. Appaswamy, B. Lescoeur, R. Giambruno, J. W. Bigenzahn, U. Elling, D. Pfeifer, C. D. Conde, M. H. Albert, K. Welte, G. Brandes, R. Sherkat, J. van der Werff Ten Bosch, N. Rezaei, A. Etzioni, C. Bellanne-Chantelot, G. Superti-Furga, J. M. Penninger, K. L. Bennett, J. von Blume, A. Dell, J. Donadieu and C. Klein (2014). "JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia." Nat Genet **46**(9): 1021-1027.

Boztug, K. and C. Klein (2009). "Novel genetic etiologies of severe congenital neutropenia." Curr Opin Immunol **21**(5): 472-480.

Cormier-Daire, V., J. Amiel, S. Vuillaumier-Barrot, J. Tan, G. Durand, A. Munnich, M. Le Merrer and N. Seta (2000). "Congenital disorders of glycosylation IIa cause growth retardation, mental retardation, and facial dysmorphism." J Med Genet **37**(11): 875-877.

Dale, D. C. (1998). "The discovery, development and clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor." Trans Am Clin Climatol Assoc **109**: 27-36; discussion 36-28.

Dale, D. C., R. E. Person, A. A. Bolyard, A. G. Aprikyan, C. Bos, M. A. Bonilla, L. A. Boxer, G. Kannourakis, C. Zeidler, K. Welte, K. F. Benson and M. Horwitz (2000). "Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia." Blood **96**(7): 2317-2322.

De Praeter, C. M., G. J. Gerwig, E. Bause, L. K. Nuytinck, J. F. Vliegthart, W. Breuer, J. P. Kamerling, M. F. Espeel, J. J. Martin, A. M. De Paepe, N. W. Chan, G. A. Dacremont and R. N. Van Coster (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.



- Donadieu, J., O. Fenneteau, B. Beaupain, N. Mahlaoui and C. B. Chantelot (2011). "Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management." Orphanet J Rare Dis **6**: 26.
- Dong, F., R. K. Brynes, N. Tidow, K. Welte, B. Lowenberg and I. P. Touw (1995). "Mutations in the gene for the granulocyte colony-stimulating-factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia." N Engl J Med **333**(8): 487-493.
- Freeze, H. H., E. A. Eklund, B. G. Ng and M. C. Patterson (2015). "Neurological aspects of human glycosylation disorders." Annu Rev Neurosci **38**: 105-125.
- Fuller, K., M. D. Linden, T. Lee-Pullen, C. Fragall, W. N. Erber and K. J. Röhrig (2016). "An active, collaborative approach to learning skills in flow cytometry." Advances in Physiology Education **40**(2): 176-185.
- Germeshausen, M., M. Ballmaier and K. Welte (2007). "Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey." Blood **109**(1): 93-99.
- Germeshausen, M., M. Grudzien, C. Zeidler, H. Abdollahpour, S. Yetgin, N. Rezaei, M. Ballmaier, B. Grimbacher, K. Welte and C. Klein (2008). "Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations." Blood **111**(10): 4954-4957.
- Grimes, H. L., T. O. Chan, P. A. Zweidler-McKay, B. Tong and P. N. Tschlis (1996). "The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal." Mol Cell Biol **16**(11): 6263-6272.
- Grunewald, S., G. Matthijs and J. Jaeken (2002). "Congenital disorders of glycosylation: a review." Pediatr Res **52**(5): 618-624.
- Guillard, M., E. Morava, J. de Ruijter, T. Roscioli, J. Penzien, L. van den Heuvel, M. A. Willemsen, A. de Brouwer, O. A. Bodamer, R. A. Wevers and D. J. Lefeber (2011). "B4GALT1-congenital disorders of glycosylation presents as a non-neurologic glycosylation disorder with hepatointestinal involvement." J Pediatr **159**(6): 1041-1043 e1042.
- Hansske, B., C. Thiel, T. Lubke, M. Hasilik, S. Honing, V. Peters, P. H. Heidemann, G. F. Hoffmann, E. G. Berger, K. von Figura and C. Korner (2002). "Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId." J Clin Invest **109**(6): 725-733.
- Hauck, F. and C. Klein (2013). "Pathogenic mechanisms and clinical implications of congenital neutropenia syndromes." Curr Opin Allergy Clin Immunol **13**(6): 596-606.
- Hayee, B., A. Antonopoulos, E. J. Murphy, F. Z. Rahman, G. Sewell, B. N. Smith, S. McCartney, M. Furman, G. Hall, S. L. Bloom, S. M. Haslam, H. R. Morris, K. Boztug, C. Klein, B. Winchester, E. Pick, D. C. Linch, R. E. Gale, A. M. Smith, A. Dell and A. W. Segal (2011). "G6PC3 mutations are associated with a major defect of glycosylation: a novel mechanism for neutrophil dysfunction." Glycobiology **21**(7): 914-924.
- Horwitz, M. S., S. J. Corey, H. L. Grimes and T. Tidwell (2013). "ELANE mutations in cyclic and severe congenital neutropenia: genetics and pathophysiology." Hematol Oncol Clin North Am **27**(1): 19-41, vii.

- Horwitz, M. S., Z. Duan, B. Korkmaz, H. H. Lee, M. E. Mealiffe and S. J. Salipante (2007). "Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia." Blood **109**(5): 1817-1824.
- Illumina (2016). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
- Imbach, T., S. Grunewald, B. Schenk, P. Burda, E. Schollen, R. A. Wevers, J. Jaeken, J. B. de Klerk, E. G. Berger, G. Matthijs, M. Aebi and T. Hennet (2000). "Multi-allelic origin of congenital disorder of glycosylation (CDG)-Ic." Hum Genet **106**(5): 538-545.
- Imbach, T., B. Schenk, E. Schollen, P. Burda, A. Stutz, S. Grunewald, N. M. Bailie, M. D. King, J. Jaeken, G. Matthijs, E. G. Berger, M. Aebi and T. Hennet (2000). "Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie." J Clin Invest **105**(2): 233-239.
- Karsunky, H., H. Zeng, T. Schmidt, B. Zevnik, R. Kluge, K. W. Schmid, U. Duhrsen and T. Moroy (2002). "Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1." Nat Genet **30**(3): 295-300.
- Klein, C. (2009). "Congenital neutropenia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 344-350.
- Klein, C. (2011). "Genetic defects in severe congenital neutropenia: emerging insights into life and death of human neutrophil granulocytes." Annu Rev Immunol **29**: 399-413.
- Klein, C. (2017). "Kostmann's Disease and HCLS1-Associated Protein X-1 (HAX1)." Journal of Clinical Immunology **37**(2): 117-122.
- Klein, C., M. Grudzien, G. Appaswamy, M. Germeshausen, I. Sandrock, A. A. Schaffer, C. Rathinam, K. Boztug, B. Schwinzer, N. Rezaei, G. Bohn, M. Melin, G. Carlsson, B. Fadeel, N. Dahl, J. Palmblad, J. I. Henter, C. Zeidler, B. Grimbacher and K. Welte (2007). "HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease)." Nat Genet **39**(1): 86-92.
- Kostmann, R. (1956). "Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria." Acta Paediatr Suppl **45**(Suppl 105): 1-78.
- Kranz, C., J. Denecke, M. A. Lehrman, S. Ray, P. Kienz, G. Kreissel, D. Sagi, J. Peter-Katalinic, H. H. Freeze, T. Schmid, S. Jackowski-Dohrmann, E. Harms and T. Marquardt (2001). "A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If)." J Clin Invest **108**(11): 1613-1619.
- Lefeber, D. J., E. Morava and J. Jaeken (2011). "How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation." J Inherit Metab Dis **34**(4): 849-852.
- Lu, Q., P. Hasty and B. D. Shur (1997). "Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality." Dev Biol **181**(2): 257-267.
- Lubke, T., T. Marquardt, A. Etzioni, E. Hartmann, K. von Figura and C. Korner (2001). "Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency." Nat Genet **28**(1): 73-76.
- Matthijs, G., E. Schollen, E. Pardon, M. Veiga-Da-Cunha, J. Jaeken, J.-J. Cassiman and E. V. Schaffingen (1997). "Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13 in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome)." Nat Genet **16**(1): 88-92.

- Mayadas, T. N., X. Cullere and C. A. Lowell (2014). "The Multifaceted Functions of Neutrophils." Annu Rev Pathol **9**: 181-218.
- Meerschaut, I., V. Bordon, C. Dhooge, P. Delbeke, A. V. Vanlander, A. Simon, C. Klein, R. F. Kooy, R. Somech and B. Callewaert (2015). "Severe congenital neutropenia with neurological impairment due to a homozygous VPS45 p.E238K mutation: A case report suggesting a genotype-phenotype correlation." Am J Med Genet A **167A**(12): 3214-3218.
- Monticelli, M., T. Ferro, J. Jaeken, V. Dos Reis Ferreira and P. A. Videira (2016). "Immunological aspects of congenital disorders of glycosylation (CDG): a review." J Inherit Metab Dis **39**(6): 765-780.
- Nimmo, A. F., A. R. Absalom, O. Bagshaw, A. Biswas, T. M. Cook, A. Costello, S. Grimes, D. Mulvey, S. Shinde, T. Whitehouse and M. D. Wiles (2019). "Guidelines for the safe practice of total intravenous anaesthesia (TIVA): Joint Guidelines from the Association of Anaesthetists and the Society for Intravenous Anaesthesia." Anaesthesia **74**(2): 211-224.
- Park, S. T. and J. Kim (2016). "Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing." Int Neurourol J **20**(Suppl 2): S76-83.
- Person, R. E., F. Q. Li, Z. Duan, K. F. Benson, J. Wechsler, H. A. Papadaki, G. Eliopoulos, C. Kaufman, S. J. Bertolone, B. Nakamoto, T. Papayannopoulou, H. L. Grimes and M. Horwitz (2003). "Mutations in proto-oncogene GF11 cause human neutropenia and target ELA2." Nat Genet **34**(3): 308-312.
- Peters, V., J. M. Penzien, G. Reiter, C. Korner, R. Hackler, B. Assmann, J. Fang, J. R. Schaefer, G. F. Hoffmann and P. H. Heidemann (2002). "Congenital disorder of glycosylation IIId (CDG-IIId) -- a new entity: clinical presentation with Dandy-Walker malformation and myopathy." Neuropediatrics **33**(1): 27-32.
- Qasba, P. K., B. Ramakrishnan and E. Boeggeman (2008). "Structure and function of beta - 1,4-galactosyltransferase." Curr Drug Targets **9**(4): 292-309.
- R&D, S. "Glycosyltransferase Activity Assay Protocol."
- Ramakrishnan, B., E. Boeggeman, V. Ramasamy and P. K. Qasba (2004). "Structure and catalytic cycle of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase." Current Opinion in Structural Biology **14**(5): 593-600.
- Resende, C., C. Carvalho, A. Alegria, D. Oliveira, D. Quelhas, A. Bandeira and E. Proenca (2014). "Congenital disorders of glycosylation with neonatal presentation." BMJ Case Rep **2014**.
- Rezaei, N., Z. Chavoshzadeh, O. R. Alaei, I. Sandrock and C. Klein (2007). "Association of HAX1 Deficiency with Neurological Disorder." Neuropediatrics **38**(05): 261-263.
- Rimella-Le-Huu, A., H. Henry, I. Kern, S. Hanquinet, E. Roulet-Perez, C. J. Newman, A. Superti-Furga, L. Bonafe and D. Ballhausen (2008). "Congenital disorder of glycosylation type Id (CDG Id): phenotypic, biochemical and molecular characterization of a new patient." J Inherit Metab Dis **31 Suppl 2**: S381-386.
- Rosenberg, P. S., B. P. Alter, A. A. Bolyard, M. A. Bonilla, L. A. Boxer, B. Cham, C. Fier, M. Freedman, G. Kannourakis, S. Kinsey, B. Schwinzer, C. Zeidler, K. Welte and D. C. Dale (2006). "The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy." Blood **107**(12): 4628-4635.

- Salem, S., D. Langlais, F. Lefebvre, G. Bourque, V. Bigley, M. Haniffa, J. L. Casanova, D. Burk, A. Berghuis, K. M. Butler, T. R. Leahy, S. Hambleton and P. Gros (2014). "Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8(K108E) mutation." Blood **124**(12): 1894-1904.
- Sander, J. D. and J. K. Joung (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotech, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. **32**: 347-355.
- Sarvothaman, S., R. B. Undi, S. R. Pasupuleti, U. Gutti and R. K. Gutti (2015). "Apoptosis: role in myeloid cell development." Blood research **50**(2): 73-79.
- Saunders, C., L. Smith, F. Wibrand, K. Ravn, P. Bross, I. Thiffault, M. Christensen, A. Atherton, E. Farrow, N. Miller, S. F. Kingsmore and E. Ostergaard (2015). "CLPB variants associated with autosomal-recessive mitochondrial disorder with cataract, neutropenia, epilepsy, and methylglutaconic aciduria." Am J Hum Genet **96**(2): 258-265.
- Schaffer, A. A. and C. Klein (2007). "Genetic heterogeneity in severe congenital neutropenia: how many aberrant pathways can kill a neutrophil?" Curr Opin Allergy Clin Immunol **7**(6): 481-494.
- Schenk, B., T. Imbach, C. G. Frank, C. E. Grubenmann, G. V. Raymond, H. Hurvitz, I. Korn-Lubetzki, S. Revel-Vik, A. Raas-Rotschild, A. S. Luder, J. Jaeken, E. G. Berger, G. Matthijs, T. Hennet and M. Aebi (2001). "MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If." J Clin Invest **108**(11): 1687-1695.
- Schollen, E., L. Dorland, T. J. de Koning, O. P. Van Diggelen, J. G. Huijmans, T. Marquardt, D. Babovic-Vuksanovic, M. Patterson, F. Imtiaz, B. Winchester, M. Adamowicz, E. Pronicka, H. Freeze and G. Matthijs (2000). "Genomic organization of the human phosphomannose isomerase (MPI) gene and mutation analysis in patients with congenital disorders of glycosylation type Ib (CDG-Ib)." Hum Mutat **16**(3): 247-252.
- Scott, K., T. Gadomski, T. Kozicz and E. Morava (2014). "Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting." J Inherit Metab Dis **37**(4): 609-617.
- Shendure, J. A., G. J. Porreca, G. M. Church, A. F. Gardner, C. L. Hendrickson, J. Kieleczawa and B. E. Slatko (2011). "Overview of DNA sequencing strategies." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 7**: Unit7 1.
- Stray-Pedersen, A., P. H. Backe, H. S. Sorte, L. Morkrid, N. Y. Chokshi, H. C. Erichsen, T. Gambin, K. B. Elgstoen, M. Bjoras, M. W. Wlodarski, M. Kruger, S. N. Jhangiani, D. M. Muzny, A. Patel, K. M. Raymond, G. S. Sasa, R. A. Krance, C. A. Martinez, S. M. Abraham, C. Speckmann, S. Ehl, P. Hall, L. R. Forbes, E. Merckoll, J. Westvik, G. Nishimura, C. F. Rustad, T. G. Abrahamsen, A. Ronnestad, L. T. Osnes, T. Egeland, O. K. Rodningen, C. R. Beck, G. Baylor-Johns Hopkins Center for Mendelian, E. A. Boerwinkle, R. A. Gibbs, J. R. Lupski, J. S. Orange, E. Lausch and I. C. Hanson (2014). "PGM3 mutations cause a congenital disorder of glycosylation with severe immunodeficiency and skeletal dysplasia." Am J Hum Genet **95**(1): 96-107.
- Triot, A., P. M. Jarvinen, J. I. Arostegui, D. Murugan, N. Kohistani, J. L. Dapena Diaz, T. Racek, J. Puchalka, E. M. Gertz, A. A. Schaffer, D. Kotlarz, D. Pfeifer, C. Diaz de Heredia Rubio, M. A. Ozdemir, T. Patiroglu, M. Karakukcu, J. Sanchez de Toledo Codina, J. Yague, I. P. Touw, E. Unal and C. Klein (2014). "Inherited biallelic CSF3R mutations in severe congenital neutropenia." Blood **123**(24): 3811-3817.

- Vafiadaki, E., D. A. Arvanitis, S. N. Pagakis, V. Papalouka, D. Sanoudou, A. Kontrogianni-Konstantopoulos and E. G. Kranias (2009). "The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival." Mol Biol Cell **20**(1): 306-318.
- Vilboux, T., A. Lev, M. C. V. Malicdan, A. J. Simon, P. Järvinen, T. Racek, J. Puchalka, R. Sood, B. Carrington, K. Bishop, J. Mullikin, M. Huizing, B. Z. Garty, E. Eyal, B. Wolach, R. Gavrieli, A. Toren, M. Soudack, O. M. Atawneh, T. Babushkin, G. Schiby, A. Cullinane, C. Avivi, S. Polak-Charcon, I. Barshack, N. Amariglio, G. Rechavi, J. van der Werff ten Bosch, Y. Anikster, C. Klein, W. A. Gahl and R. Somech (2013). "A Congenital Neutrophil Defect Syndrome Associated with Mutations in VPS45." New England Journal of Medicine **369**(1): 54-65.
- Wall, F. E., R. D. Henkel, M. P. Stern, H. B. Jenson and M. P. Moyer (1995). "An efficient method for routine Epstein-Barr virus immortalization of human B lymphocytes." In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**(2): 156-159.
- Wang, Q., J. Groenendyk and M. Michalak (2015). "Glycoprotein Quality Control and Endoplasmic Reticulum Stress." Molecules **20**(8): 13689-13704.
- Wirnsberger, G., F. Zwolanek, J. Stadlmann, L. Tortola, S. W. Liu, T. Perlot, P. Jarvinen, G. Durnberger, I. Kozieradzki, R. Sarao, A. De Martino, K. Boztug, K. Mechtler, K. Kuchler, C. Klein, U. Elling and J. M. Penninger (2014). "Jagunal homolog 1 is a critical regulator of neutrophil function in fungal host defense." Nat Genet **46**(9): 1028-1033.
- Wortmann, S. B., S. Zietkiewicz, M. Kousi, R. Szklarczyk, T. B. Haack, S. W. Gersting, A. C. Muntau, A. Rakovic, G. H. Renkema, R. J. Rodenburg, T. M. Strom, T. Meitinger, M. E. Rubio-Gozalbo, E. Chrusciel, F. Distelmaier, C. Golzio, J. H. Jansen, C. van Karnebeek, Y. Lillquist, T. Lucke, K. Ounap, R. Zordania, J. Yapliito-Lee, H. van Bokhoven, J. N. Spelbrink, F. M. Vaz, M. Pras-Raves, R. Ploski, E. Pronicka, C. Klein, M. A. Willemsen, A. P. de Brouwer, H. Prokisch, N. Katsanis and R. A. Wevers (2015). "CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder." Am J Hum Genet **96**(2): 245-257.
- Zeidler, C., M. Germeshausen, C. Klein and K. Welte (2009). "Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia." Br J Haematol **144**(4): 459-467.

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AK2	Adenylatkinase 2
ANC	<i>absolute neutrophil count</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
B4GALT1	β-1,4-Galaktosyltransferase 1
bp	<i>base pairs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CDG	<i>Congenital disorder of glycosylation</i>
CRISPR/Cas9	<i>short palindrome repeat</i>
CSF3R	<i>colony stimulating factor 3 receptor</i>
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM1	Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase Subunit 1
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELANE	neutrophile Elastase
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-CSFR	G-CSF-Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat

GF11	<i>growth factor independent 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM130	Golgi Marker 130
G6PC3	Glucose-6-Phosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAX1	<i>HCLS1-associated protein X1</i>
Hb	Hämoglobin
HeLa	Henrietta Lacksa
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IEF	isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
JAGN1	<i>Jagunal homolog 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MGAT2	Alpha-1,6-Mannosyl-Glycoprotein 2-beta-N-Acetylglucosaminyltransferase
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPDU1	<i>Mannose-P-Dolichol utilization defect 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF H <sub>2</sub> O	Nuklease-freies Wasser
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nM	Nanomolar
PBMC	<i>periphere blood mononuclear cells</i>



PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGM3	Phosphoglucomutase 3
PIC	<i>proteinase inhibitor cocktail</i>
PMI	Phosphomannose-Isomerase
PMM2	Phosphomannomutase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	<i>side scatter</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VPS45	<i>vesicular protein sorting 45 homolog</i>
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
WB	Western Blot
WBC	<i>white blood cells</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	13
Tabelle 2: Verwendete Puffer .....	16
Tabelle 3: Primer für Sanger-Sequenzierung .....	17
Tabelle 4: qRT-PCR Primer .....	17
Tabelle 5: Sequenzierprimer .....	18
Tabelle 6: Primer zur Amplifizierung von GFP_B4GALT1 <sup>WT</sup> .....	19
Tabelle 7: Primer, die zur Einfügung der Patientenmutation B4GALT1 <sup>Arg21Trp</sup> in den pRRL_GFP_B4GALT1 Vektor benutzt wurden .....	19
Tabelle 8: Oligonukleotide, welche zum Designen des B4GALT1 Knockout-Konstruktes mit dem CRISPR/Cas9 System verwendet wurden .....	19
Tabelle 9: Primer zur Sequenzierung der B4GALT1 Knockout-Klone .....	19
Tabelle 10: Primäre Antikörper und Reagenzien für Western Blot (WB), Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) und Durchflusszytometrie (F) .....	20
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) .....	21
Tabelle 12: Verwendete Enzyme .....	21
Tabelle 13: Verwendete Plasmide .....	22
Tabelle 14: Verwendete Kits .....	23
Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele .....	41
Tabelle 16: Klinische Informationen über Patient (II.1) und dessen Bruder (II.9) sowie über einen weiteren betroffenen Jungen (B.1) .....	46
Tabelle 17: Bekannte genetische Defekte einer SCN mit extrahämatopoetischen Manifestationen .....	71

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hämatopoese; Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle in die verschiedenen Blutzellen; die lymphoide Stammzelle differenziert sich in T- und B-Zellen, aus der myeloiden Zelllinie gehen Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten hervor (Sarvothaman, Undi et al. 2015) .....	2
Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Stadien der neutrophilen Granulozyten; Ausreifungsstopp auf Ebene der Promyelozyten (abgewandelt von Klein 2011)....	5
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der B4GALT1-Funktion; Galaktose wird durch B4GALT1 von UDP auf ein freies Zuckermolekül übertragen .....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Domänen von B4GALT1; Zyt. = zytoplasmatisch, TM = transmembran (abgewandelt von Quasba 2008) ...	11
Abbildung 5: hB4GALT1 pLenti_C_mGFP Vektorkarte.....	22
Abbildung 6: pRRL Vektorkarte mit Funktionen .....	23
Abbildung 7: Prinzip der Sanger-Sequenzierung; zu sehen sind die zwei verschiedenen Ansatzmöglichkeiten der PCR sowie die daraus entstehenden Kettenabbruchprodukte, die anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden können (erstellt nach Shendure, Porreca et al. 2007, Park and Kim 2016) .....	26
Abbildung 8: Darstellung des Lasersystems eines Durchflusszytometers (BD FACSCalibur™, BD Biosciences, USA) .....	29
Abbildung 9: Darstellung der unterschiedlichen Schichten vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation .....	31
Abbildung 10: Klonierung von GFP_B4GALT1 in den pRRL Vektor.....	36
Abbildung 11: Allgemeines Schema zur Generierung einer Knockout-Zelllinie mit der CRISPR/Cas9 Methode (CRISPR/Cas9 Guide, addgene, USA).....	39
Abbildung 12: Schema des CRISPR/Cas9 Konstruktes zur Generierung des B4GALT1 Knockout-Konstruktes (abgewandelt von Dr. Y. Liu).....	39
Abbildung 13: Prinzip des Glykosyltransferase-Aktivitätstestes (abgewandelt von R&D Systems) .....	44
Abbildung 14: Darstellung der unterschiedlichen Zelllinien in Blutproben von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); SSC=side scatter; CD14=Cluster of differentiation 14 .....	47
Abbildung 15: Burst-Aktivität der neutrophilen Granulozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); ROS = reaktive Sauerstoffmetabolite; ctrl = negative Kontrolle; fMLP = N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, E.coli = Escherichia coli; PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat .....	48
Abbildung 16: Endozytose von Ovalbumin (OVA-Ax647) durch Monozyten; dargestellt ist die Endozytoseleistung der Monozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten .....	49
Abbildung 17: Phagozytose von E.coli durch Monozyten; dargestellt ist die Phagozytoseleistung der Monozyten von gesundem Spender (HD),	

beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten .....	50
Abbildung 18: Phagozytose von E.coli durch neutrophile Granulozyten; dargestellt ist die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten von gesundem Spender (HD), beduinischen gesunden Kontrollen (CTRL1+2), Patient (II.1) und dessen Familie (I.1; II.5; II.6; II.9); die Messung erfolgte nach 20/40/60 Minuten .....	51
Abbildung 19: Familienstammbaum von Patient II.1 und B.1 mit Legende .....	52
Abbildung 20: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung; Kontrolle (CTRL1) als Beispiel eines Wildtyps; homozygote Punktmutation im B4GALT1-Gen des Patienten, heterozygote Mutationen bei Mutter und Bruder .....	53
Abbildung 21: relative B4GALT1 mRNA Expression in EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen (K1, K2); die Ergebnisse wurden an die mRNA Expression eines Kontrollgens (GAPDH) angeglichen; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten .....	54
Abbildung 22: Western Blot Analyse von B4GALT1 in EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrollen (K1, K2); Aktin diente als Ladekontrolle .....	55
Abbildung 23: Immunfluoreszenzanalyse der EBV-LCL Zellen von Patient und Kontrolle 1+2; B4GALT1 (grün) und Golgi-Apparat (GM130, rot) sind dargestellt; DAPI (De Leeneer, Van Bockstal et al.) wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm .....	56
Abbildung 24: Agarosegel mit DNA Banden; eine DNA-Leiter zur Größenbestimmung der DNA in den Proben wurde aufgetragen; die DNA-Bande eines HeLa Wildtyp und eines HeLa B4GALT1 Knockout-Klones ist zu erkennen .....	57
Abbildung 25: Ausschnitt aus der Sequenz des B4GALT1 Gens; der geplante, zu entfernende Abschnitt der Sequenz (156 Basenpaare) ist rot hinterlegt .....	58
Abbildung 26: Sequenzen der B4GALT1 Knockout-Klone A12 und C4; die Basenpaare, die entfernt wurden, sind rot hinterlegt; in Klammer steht die Anzahl der Basenpaare, die entfernt wurden.....	58
Abbildung 27: relative mRNA Expression von B4GALT1 in HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO-Klonen; GAPDH diente als Kontrollgen .....	59
Abbildung 28: Western Blot Analyse: Bestätigung der HeLa B4GALT1 Wildtyp und B4GALT1 Knockout-Klone; Aktin diente als Ladekontrolle.....	59
Abbildung 29: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT Zellen nach Transfektion mit B4GALT1 <sup>WT</sup> und B4GALT1 <sup>Arg21Trp</sup> (GFP_B4GALT1, grün); Darstellung des Golgi-Apparates mit GM130 (rot); DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm .....	61
Abbildung 30: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT Zellen nach Transfektion mit B4GALT1 <sup>WT</sup> und B4GALT1 <sup>Arg21Trp</sup> (GFP_B4GALT1, grün), Darstellung des ER (Calnexin; rot); DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm.....	61
Abbildung 31: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa B4GALT1 KO Zellen nach Transfektion mit B4GALT1 <sup>WT</sup> und B4GALT1 <sup>Arg21Trp</sup> (GFP_B4GALT1, grün), Golgi-Apparat ist dargestellt (GM130, rot), DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm .....	62
Abbildung 32: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa B4GALT1 KO Zellen nach Transfektion mit B4GALT1 <sup>WT</sup> (GFP_B4GALT1, grün), Darstellung des ER (Calnexin, rot), DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet; Maßstab 10 µm.....	62

- Abbildung 33: Immunfluoreszenzanalyse der HeLa WT und HeLa B4GALT1 KO (HeLa KO) Zellen transfiziert mit GFP\_B4GALT1<sup>WT</sup> (grün), F-Aktin ist dargestellt (Phalloidin, rot), als Zellkernmarker wurde DAPI verwendet; Maßstab 10 µm..... 63
- Abbildung 34: Messung der enzymatischen Aktivität von B4GALT1 in HeLa Wildtyp (WT1 + WT2) und HeLa B4GALT1 Knockout (KO4 + KO12) Klonen; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten ..... 64
- Abbildung 35: relative mRNA Expression der  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferasen 1-7 in HeLa Wildtyp und HeLa B4GALT1 Knockout Zellen; GAPDH diente als Kontrollgen .... 65

## 12 DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Christoph Klein bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe im Dr. von Haunerschen Kinderspital durchzuführen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klein für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor, für die großartige Arbeitsatmosphäre und die Aktivitäten außerhalb der Arbeit.

Vor allem bedanke ich mich bei meinen Betreuern Natalia und Marcin, die mich im Labor und beim Schreiben der Arbeit immer unterstützt haben. Ein großes Dankeschön auch an Laura, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir sowohl im Labor als auch beim Verfassen der Arbeit eine große Hilfe war.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, dass sie immer für mich da sind. Vor allem danke ich meinen Eltern für ihren großartigen Rückhalt und ihre Unterstützung in jeder Situation.

## 13 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Veronika Obermeier, erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Neuartige Mutation im Gen der  
UDP-galactose:N-acetylglucosamine  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase I  
verursacht kongenitale Neutropenie und psychomotorische Retardierung“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Eggenfelden, 13.03.2021

Veronika Obermeier