

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)



**Hochauflösende Mikroskopie (*d*STORM) von
Plasmamembran-Glycanen auf primären Muskelzellen bei
GNE-Myopathie**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Maximilian Christoph Friedrich Sander
aus
München
2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Florian Heinen

Priv.-Doz. Dr. med. Rupert Egensperger

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	II
Abstract	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die GNE-Myopathie	2
1.1.1 Definition	2
1.1.2 Pathomechanismus	3
1.1.3 Klinisches Spektrum der GNE-Myopathie	5
1.1.4 Diagnostik und Therapie	5
1.2 Die dSTORM-Mikroskopie	7
2 Problemstellung	10
3 Materialien und Methoden	11
3.1 Mikroskopische Aufnahmetechnik	11
3.2 Die Mikroskoptechnik	12
3.3 Datenverarbeitung	13
3.4 Verwendete Substanzen zur Markierung von Glycokonjugaten	13
3.4.1 <i>N</i> -Acetyl-Hexosamin-Analoga Ac ₄ ManNAz / Ac ₄ GalNAz / Ac ₄ GlcNAz	13
3.4.2 Dibenzocyclooctyne (DBCO)-Cy5 und DBCO-PEG4-Biotin Konjugat zur bioorthogonalen Markierung	14
3.4.3 Probanden	16
3.4.4 Präparatherstellung	17
3.5 Protokollentwicklung zur metabolischen Markierung von primären Myoblasten mit <i>N</i> -Acetyl-Hexosamin-Analoga	19
3.5.1 Ausgangsprotokoll	19
3.5.2 Erste Protokollmodifikation	21
3.5.3 Weitere Protokollanpassungen	23
3.5.4 Abschließendes Standardprotokoll für primäre Myoblasten	25
3.6 Durchflusszytometrie	26
3.6.1 Der Vitalitätsfarbstoff Zombie-Violet	27
3.6.2 Lectinfärbungen	27
3.6.3 Inhibition der Glycosylierung	28
3.6.4 Neuraminidase-Behandlung	28
3.6.5 Auswahl von Untergruppen („Gating“-Strategie) in der FACS-Analyse	28
3.6.6 Reduktion des unspezifischen Hintergrunds	29
3.6.7 Statistische Analyse der FACS-Daten	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Datenerhebung der dSTORM-Analyse	31
4.1.1 Auswahl geeigneter Markierungsbedingungen	31

4.1.2	Messungen	31
4.2	Hochauflösende Mikroskopie und Analyse von Zelloberflächen- Glykokonjugaten	32
4.2.1	Kontrolle 1	33
4.2.2	Patient 1	34
4.2.3	Kontrolle 2	35
4.2.4	Patient 2	36
4.3	Explorative Datenanalyse der dSTORM-Experimente	37
4.3.1	Deskriptive Statistik	37
4.3.2	Test auf Normalverteilung	37
4.3.3	Lokalisationsbefunde	38
4.3.4	ANOVA	39
4.4	FACS-Analyse: ManNAz-Markierung mit Inhibition und Konkurrenz	41
4.5	FACS-Analyse: Lectinfärbung metabolisch markierter C2C12 Zelllinien	42
4.6	FACS der DBCO-Cy5-Färbung metabolisch markierter C2C12 Zelllinien	47
4.7	FACS-Analyse: Unspezifischer Hintergrund der DBCO-Cy5-Detektion	51
4.8	FACS-Analyse: SiaNAz-Detektion über DBCO-Biotin / Streptavidin-Cy3	54
4.8.1	Sialidase-Experiment mit nativen C2C12-Zellen	55
4.8.2	Transfektion mit GNE-Expressions-Konstrukten als Rescue-Experiment	56
4.8.3	Kinetik des SiaNAz-Signals im Zeitverlauf	57
5	Diskussion	58
5.1	Etablierung der dSTORM-Mikroskopie zur Evaluation von Sialinsäure- Biosynthese-Defekten	58
5.2	Differenzielle Reporter-Expression von Myoblasten bei GNE-Myopathie	59
5.3	Einschränkungen der Methodik	61
5.4	FACS-Analyse und statistische Auswertung	63
5.5	Effekte des Abbaus von Sialinsäure im Skelettmuskel	67
5.6	Glycoproteine als Degenerations- und Alterungsmarker	68
5.7	Schlussfolgerungen und Ausblick zur künftigen Therapie-Entwicklung für die GNE-Myopathie	70
6	Zusammenfassung	73
	Literatur	75
	Danksagung	87
	Erklärung an Eides Statt	88

Abstrakt

Die GNE-Myopathie ist eine seltene, bislang unheilbare erbliche Muskelerkrankung. Das beteiligte *GNE*-Gen kodiert das Schlüsselenzym der Sialinsäure-Biosynthese und kontrolliert die zelluläre Glykokonjugatexpression. Obwohl die genetische Ursache vor fast zwei Jahrzehnten entdeckt wurde, gibt es trotz intensiver Forschung keine wirksamen Therapie-Ansätze.

Die dynamischen Veränderungen der Glycoprotein-Oberflächenexpression und der subzellulären Lokalisation während der Pathogenese der GNE-Myopathie sind weitgehend unbekannt. In Zellkulturmodellen konnten Oberflächenglycane nach metabolischer Markierung durch Azido-Monosaccharide mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie (*d*STORM), Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie detektiert und quantifiziert werden.

Als wesentliches Ergebnis fanden sich Hinweise auf ein erhöhtes Sialinsäure-Signal in primären Patienten-Myoblasten und in murinen GNE-Knockout-Zellen (C2C12) im Vergleich zu Kontrollen. Interessanterweise erhöhte sich das Sialinsäure-Signal in den GNE-defizienten Mauszellen über das Wildtyp-Niveau nach Transfektion von GNE-Expressionskonstrukten.

Die unerwartet hohe Aufnahme der Sialinsäure-Vorläufersubstanz bei eingeschränkter GNE-Funktion könnte Autophagie-Wege beeinträchtigen und Alterungsprozesse beschleunigen, bei denen erhöhte Glykokonjugat Spiegel eine wesentliche Rolle spielen können und bietet darüber hinaus mögliche Erklärungsansätze, weshalb eine Substitutionstherapie bei GNE-Patienten in klinischen Studien erfolglos blieb.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Entschlüsselung der molekularen Pathogenese und ein detailliertes Verständnis der komplexen Regulation zellulärer Signalwege für die Planung klinischer Studien bei monogenen hereditären Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sind.

Abstract

GNE myopathy is a rare incurable hereditary muscle disease. The related *GNE* gene encodes the key enzyme of sialic acid biosynthesis and controls cellular glycoconjugate expression. Although the genetic cause was discovered almost two decades ago, no efficient treatment options are available despite the most extensive research.

Dynamically changing glycoprotein surface expression and subcellular localisation occurring over time in the etiology of GNE myopathy are largely unknown. In cell culture models, surface glycans could be detected after metabolic labelling by azido monosaccharides and quantified by high-resolution microscopy (*d*STORM), fluorescence microscopy and flow cytometry.

The main outcome revealed evidence for an enhanced sialic acid signal in primary myoblasts derived from patients' muscle and in murine GNE knockout cells (C2C12) as compared to controls. Interestingly, the sialic acid signal in GNE-deficient mouse cells exceeded wild-type levels after transfection of GNE expression constructs.

The unexpectedly high uptake of the sialic acid precursor along with impaired GNE function could adversely affect autophagy pathways and may accelerate aging processes where elevated glycoconjugate levels may play a major role. Furthermore, this study could provide possible explanations why substitution therapy in GNE patients has failed in clinical trials.

The work presented suggests that the underlying molecular pathogenesis and an in-depth insight into the intricate regulation of cellular signaling pathways is key to conceptual design of clinical trials in monogenic hereditary disorders.

 Abkürzungsverzeichnis

α MEM	Modified Minimum Essential Medium Eagle
Abb.	Abbildung
Ac ₄ GalNAz	1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- <i>N</i> -Azidoacetyl-D-galactosamin
Ac ₄ GlcNAz	1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- <i>N</i> -Azidoacetyl-D-glucosamin
Ac ₄ ManNAz	1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- <i>N</i> -Azidoacetyl-D-mannosamin
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E
ATE	Solution A und Trypsin-EDTA
B_xx	Background (Hintergrundmarkierung)
BT	Biotin
bzw.	beziehungsweise
C2C12	Mauszelllinie (Muskelzelllinie)
CAV3	Caveolin 3
CD56	Neuronal cell adhesion molecule (NCAM)
Cf	Control female
Cm	Control male
CMP-Neu5Ac	Cytidine-5'-Monophospho- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanin 3 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy5	Cyanin 5 (Fluoreszenzfarbstoff)
DBCO	Azadibenzocyclooctyne (ADIBO)
df	Degrees of freedom
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DIBAC	Dibenzoazacyclooctyne
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dSTORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
DTNB	Ellmanns Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FA-GA	4% Formaldehyd / 0,2% Glutaraldehyd
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GFAT	Glutamin-Fructose-6-phosphat Amidotransferase
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
<i>GNE</i>	Gen kodierend für die bifunktionale UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase <i>N</i> -Acetylmannosamin-Kinase
GPT	GlcNAc-Phosphotransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxythyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hGNE2	humane <i>GNE</i> Isoform 2
HPA	<i>Helix pomatia</i> -Agglutinin (Lectin)
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
IAM	Iodoacetamid
IBM	Inclusion Body Myopathy (Einschlusskörpermyopathie)
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knock-out
KOH	Kaliumhydroxid
LAMP1	Lysosom-assoziiertes Membranglycoprotein 1
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M 1-3	Membranlokalisationsausschnitt 1-3
MAA II	<i>Maakia amurensis</i> -Agglutinin (Lectin)
MACS	Magnetic activated cell sorting
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Mannosamin
ManNAc-Kinase	Enzym kodiert durch bicistronisches <i>GNE</i>
MEA	β -Mercaptoethylamin (Cysteamin)
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol
ml	Milliliter
mm	Millimeter
<i>MYH2</i>	Myosin Heavy Chain IIa-Gen
NaCl	Natriumchlorid

NCAM	Neuronal cell adhesion molecule = CD56
nm	Nanometer
NPL	Neuraminsäure-Pyruvat-Lyase
p.M743T	Punktmutation im <i>GNE</i> -Gen
p.R42W/p.F568I	Punktmutationen im <i>GNE</i> -Gen
PBS	Phosphate buffered saline
PE	R-phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
Pf	Patient female
PFA	Paraformaldehyd
Pm	Patient male
(P)RR	(Pro)renin-Rezeptor
<i>RENBP</i>	Gen kodierend für <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase
RnBP	Renin-bindendes Protein
rpm	Rounds per minute
S/N	Signal-to-Noise-Ratio
SA	Streptavidin
SGM	Skeletal muscle growth medium
SH	Sulfhydryl
SiaNAz	<i>N</i> -Azidosialinsäure
sIBM	Sporadische Einschlusskörpermyositis
SMLM	Single molecule localization microscopy
Sk-N-MC	Neuroblastomzelllinie
SNA	<i>Sambucus nigra</i> -Agglutinin (Lectin)
SPAAC	Strain promoted alkyne-azide cycloaddition
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TIRF	Total internal reflection microscopy
TU	Tunicamycin
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcNAc-2-Epimerase	Enzym kodiert durch bicistronisches <i>GNE</i>
UPR	Unfolded protein response
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Die physiologischen Eigenschaften von Zellen werden wesentlich von ihren Oberflächenmolekülen in der Membran bestimmt, die das Entwicklungsstadium, den Differenzierungszustand und die interzelluläre Kommunikation kontrollieren. So funktioniert die Plasmamembran nicht nur als passive Zellwand, sondern als Plattform für verschiedenste physiologische Vorgänge, wie Signal-Transduktion, Zelladhäsion und die Bildung von Gewebe. Aus diesem Grund sind die räumliche Verteilung von Plasmamembran-Komponenten sowie die molekularen Mechanismen, die ihrem Aufbau zugrunde liegen, für viele biologische Bereiche wie die Neurobiologie oder auch die Immunologie von großem Interesse.

Die ausgeprägte Strukturvielfalt der Glykokonjugate in der Zellmembran macht es zu einer großen Herausforderung, die räumliche Organisation, das Glycosylierungsmuster sowie die Größe, die Verteilung und die Zusammensetzung von Plasmamembran-Glycanen zu untersuchen.

Mit der neuen Technik, der hochauflösenden Mikroskopie (*d*STORM - direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) ist es möglich, Glycoproteine und Glycolipide an der Zelloberfläche sichtbar zu machen (van de Linde et al., 2011; van de Linde et al., 2008). Diese hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie ist derart sensitiv, dass Plasmamembran-Glykokonjugate auf Einzelmolekül-Ebene dargestellt werden können (Letschert et al., 2014).

Die Visualisierung und Quantifizierung der Glycane ist von besonderem Interesse bei vererbten, degenerativen Skelettmuskelerkrankungen, denen eine Störung im Glycanstoffwechsel zugrunde liegt. Mutationen im *GNE*-Gen, welches das bicistronische Schrittmacherenzym der Sialinsäurebiosynthese (UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-epimerase / *N*-Acetyl-Mannosamin-Kinase) kodiert, verursachen die *GNE*-Myopathie (Eisenberg et al., 2001; Pogoryelova et al., 2018).

Um die Pathogenese und den Mechanismus hinter dieser Erkrankung besser verstehen und bestehende Therapiestrategien zu evaluieren, sowie neue konzipieren zu können, stellt sich die Frage nach einer quantitativen oder qualitativen Veränderung der Glycoproteine und -lipide an der Oberflächenmembran der primären Muskelzellen von Patienten mit pathogenen Veränderungen im *GNE*-Gen. Dies wurde mit Hilfe der hochauflösenden *d*STORM-Mikroskopie in dieser Arbeit untersucht.

1.1 Die GNE-Myopathie

1.1.1 Definition

Die im Englischen als Inclusion Body Myopathy (IBM) bekannte Einschlusskörper-Myositis, wird in eine sporadische (sIBM) und verschiedene erbliche Formen (IBM1-3) unterteilt. Die s-IBM stellt eine der häufigsten Muskelerkrankungen bei Patienten über 50 Jahren dar und befällt initial die Finger- und Handgelenksbeuger, sowie den M. quadriceps femoris (Greenberg, 2019). Die Ursache der autosomal-dominant vererbten IBM1 sind Mutationen im Desmin-Gen (Goldfarb et al., 1998). Der IBM3 liegen autosomal-dominante Mutationen im Myosin Heavy Chain IIA-Gen (*MYH2*) zugrunde (Martinsson et al., 1999). Mit einer weltweiten Prävalenz von 1/1.000.000 ist die GNE-Myopathie (IBM2) hingegen eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Form der Einschlusskörpermyopathien und zeichnet sich durch einen Krankheitsbeginn im jungen Erwachsenenalter aus (Argov and Yarom, 1984).

Diese hereditäre IBM, auch als Nonaka-Distal-Myopathy, Inclusion-Body-Myopathy-type-2 (IBM2) oder Hereditary Inclusion Body Myopathy (HIBM) bekannt (Nonaka et al., 1981), ist eine fortschreitende Muskelerkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang. Verursacht durch einen erstmals im Jahr 2001 von Eisenberg et al. entdeckten molekularen Defekt im *GNE*-Gen, weisen die Patienten nicht-allosterische, biallelische Genveränderungen auf, die überwiegend auf Missense- und Nonsense-Mutationen beruhen (Eisenberg et al., 2001).

Bisher wurden über 150 verschiedene Mutationen bei der GNE-Myopathie identifiziert (Übersicht in Celeste et al., 2014), die über den gesamten kodierenden Bereich vorkommen. Die betroffenen Patienten häufen sich besonders in Regionen des Nahen und Mittleren Ostens, wobei hier überwiegend die homozygot vererbte Mutationsform auftritt. Die zusammengesetzt-heterozygote Form wurde hingegen auch bei Familien anderer Ethnien weltweit identifiziert (Celeste et al., 2014; Eisenberg et al., 2001).

Die Nonaka-Myopathie wurde 2002 als allelische Erkrankung beschrieben, als sich herausstellte, dass der zunächst bei japanischen Patienten beschriebenen Erkrankung ebenfalls Veränderungen im *GNE*-Gen zugrunde liegen (Nishino et al., 2002). In Japan kommen zwei *GNE*-Mutationen besonders häufig vor, c.1765G>C (p.V572L) und c.578A>T (p.D176V) (Cho et al., 2014; Tomimitsu et al., 2002).

1.1.2 Pathomechanismus

Sialinsäure findet sich normalerweise an den distalen Enden von N- und O-Glycanen und ist an vielfältigen biologischen Funktionen beteiligt, darunter der Stabilisierung der Glycokonjugatstruktur, der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Adhäsion und der Bildung oder Maskierung von Erkennungsdeterminanten auf der Zelloberfläche (Hinderlich et al., 2015).

Auch wenn der Pathomechanismus dieser Erkrankung nach bisheriger Forschung möglicherweise mit einer gestörten Sialylierung von Glycanen zusammenhängt, bleibt die exakte Pathophysiologie weiterhin unbekannt (Salama et al., 2005; Wang et al., 2006). Das *GNE*-Gen auf Chromosom 9 kodiert ein Protein, welches über zwei enzymatische Aktivitäten verfügt, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase und die ManNAc-Kinase, die die ersten beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Biosynthese der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) katalysieren (Hinderlich et al., 1997). Diese kommt im menschlichen Körper als physiologische Sialinsäure vor.

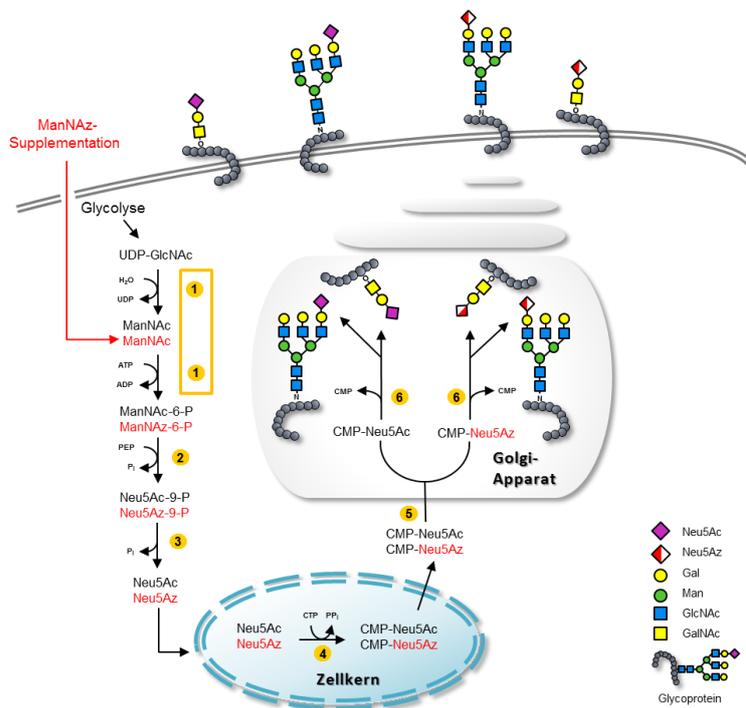


Abb. 1 Schematische Darstellung der *de novo* CMP-Sialinsäure-Synthese: Biosyntheseweg und metabolische Markierung von Sialinsäure. Enzyme: (1) UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (*GNE*); (2) *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (*NANS*), (3) *N*-Acylneuraminat-9-phosphatase (*NANP*), (4) CMP-Sialinsäure-Synthetase (*CMAS*), (5) *SLC35A1*-CMP-Sialinsäure-Transporter, (6) verschiedene Sialyltransferasen. ManNAz-Mannosamin, wobei sich z auf verschiedene funktionelle Gruppen beziehen kann, z. B. auf einen Azido-Rest (modifiziert nach Nagasundaram et al., 2020).

Neu5Ac ist ein charakteristischer Bestandteil der Oligosaccharidseitenketten von Glycoproteinen und Glycolipiden und somit von entscheidender Bedeutung für Zell-Zell-Interaktionen, wie auch für den Schutz der Proteine vor dem Abbau durch Proteasen (Übersicht in Pogoryelova et al., 2018).

Wird GNE zu gering exprimiert, kann dies zu Einschränkungen in der Sialinsäure-Synthese führen. Ein niedriges Sialinsäure-Niveau kann über eine beginnende Muskelschwäche zum Verlust von Muskelkraft, -funktion und -regeneration führen. Ob Mutationen des *GNE*-Gens zu einer Hyposialylierung von Muskelglycoproteinen führen, wird noch diskutiert (Malicdan et al., 2009; Salama et al., 2005; Sela et al., 2020; Tajima et al., 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die das menschliche *GNE*-Gen mit der p.D176V-Mutation oder der p.V572L-Mutation auf einem *Gne*-Knockout-Hintergrund [*Gne*(-/-)hGNED176V-Tg bzw. *Gne*(-/-)hGNEV572L-Tg] exprimieren, einen reduzierten Sialinsäuregehalt im Serum und anderen Geweben aufweisen und eine Myopathie mit einem ähnlichen Phänotyp wie beim Menschen entwickeln (Malicdan et al., 2007b, c). Der Skelettmuskel dieser Mäuse zeigte histopathologisch gerahmte Vakuolen (rimmed vacuoles) und zytoplasmatische Einschlüsse in den Muskelfasern. Interessanterweise reichern die histopathologisch veränderten Muskelfasern von *Gne*(-/-)hGNED176V-Tg- oder *Gne*(-/-)hGNEV572L-Tg Mäusen A β an, was anderen Anomalien wie z. B. der Bildung von rimmed vacuoles vorangeht (Malicdan et al., 2007b, c). In diesen Tiermodellen fand sich der gesamte Sialinsäuregehalt in Leber, Milz und Niere stärker reduziert als beim Skelettmuskel, obwohl dieser das einzige klinisch betroffene Gewebe war.

Die Tiermodelle unterstützen die Hypothese, dass der Skelettmuskel möglicherweise empfindlicher auf Störungen im Sialinsäurestoffwechsel reagieren kann. Sie lieferten jedoch bislang keine Erklärung, weshalb der M. quadriceps beim Menschen bei der GNE-Myopathie relativ ausgespart bleibt.

Die Mutation M743T in der Kinase-Domäne von GNE führte zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität um 30% einer *in vitro* exprimierten Mutante (Hinderlich et al., 2004; Penner et al., 2006). Betroffene Patienten, bei denen diese Mutation homozygot vorliegt, leiden oft an einer rasch progredienten Verlaufsform der Myopathie. Auf molekularer Ebene entsteht mit der Einführung von Threonin eine zusätzliche mögliche Phosphorylierungs- oder O-GlcNAcylierungs-Stelle. Es konnte bestätigt werden, dass

das mutierte M743T GNE vermehrt O-GlcNAcyliert war. Die Abspaltung dieses Restes führte wieder zu normaler GNE-Aktivität (Bennmann et al., 2016).

1.1.3 Klinisches Spektrum der GNE-Myopathie

Die zumeist distal in den Beinen besonders am M. peroneus und M. tibialis anterior beginnende Symptomatik der GNE-Myopathie beim Menschen äußert sich häufig zunächst als Fußheberparese, infolge der progredienten Muskelschwäche mit Muskelatrophie und zunehmenden Schwierigkeiten beim Gehen, Laufen oder Treppensteigen (Chamova et al., 2015). Eine aktuelle Studie belegt, dass das Beevor-Zeichen, eine Symptomatik die auch bei anderen neuromuskulären Erkrankungen wie der Fazioscapulo-humeralen Muskeldystrophie (FSHD) oder der Amyotrophen Lateralsklerose auftritt und eine kraniale Verschiebung des Bauchnabels bei Flexion des Nackens durch eine Schwäche der unteren Bauchmuskulatur aufzeigt, regelmäßig bei GNE-Myopathie-Patienten auftritt (Preethish-Kumar et al., 2016). Aufgrund der langsamen Progression werden die Patienten meist erst spät in der dritten oder vierten Lebensdekade rollstuhlpflichtig und pflegebedürftig. Im Verlauf breiten sich die Symptome über die Schulter-, die distale Arm- und Nackenmuskulatur auf die obere Extremität bis hin zur Atemmuskulatur aus (Pogoryelova et al., 2018). Eine Besonderheit dieser, im Gegensatz zur sIBM bereits im frühen Erwachsenenalter einsetzenden Erkrankung, liegt in der, selbst in fortgeschrittenen Phasen nachweisbaren, relativen oder vollständigen, symmetrischen bzw. asymmetrischen Aussparung des Quadriceps femoris (Argov and Yarom, 1984; Chaouch et al., 2014).

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der GNE-Myopathie basiert derzeit neben der klinischen Symptomatik auf der Histologie von Muskelbiopsien und dem molekulargenetischen Nachweis von *GNE*-Mutationen. Histopathologisch zeigt sich dabei eine Variabilität in der Muskelfasergröße, wobei die atrophierenden Fasern sogenannte Cluster bilden. Des Weiteren lassen sich neben autophagischen (sogenannten „red-rimmed“) Vakuolen, charakteristische filamentöse Einschlusskörper von verschiedenen Proteinen (β -Amyloid, Ubiquitin, ApoE) nachweisen. In einigen Fällen konnten entzündliche,

überwiegend CD8-positive Infiltrate nachgewiesen werden (Krause et al., 2003; Yabe et al., 2003). Der Nachweis einer Muskel-Inflammation spricht nicht gegen das Vorliegen einer hereditären Myopathie. Bei anderen monogenen Muskelerkrankungen wie z. B. der Dysferlinopathie findet sich häufiger Entzündungszeichen in der Muskelhistologie (Nguyen et al., 2007). Da die GNE-Myopathie äußerst selten auftritt und auch valide, nicht-invasive diagnostische Testverfahren bis heute nicht zur Verfügung stehen, wird die Diagnose häufig erst sehr spät gestellt (Pogoryelova et al., 2018).

Die bildgebende Darstellung der Skelettmuskulatur mit Hilfe der Magnetresonanztomographie stellt ein weiteres mögliches diagnostisches Verfahren zur Erkennung der GNE-Myopathie dar. Sowohl in der T1-, wie auch der T2-Gewichtung können die relativ frühen Muskelschäden der distalen Beinmuskulatur, insbesondere im anterioren Bereich, identifiziert werden. Während der M. quadriceps femoris über einen langen Zeitraum von der Degeneration verschont bleibt, wird der posteriore Bereich der Hüftmuskulatur degenerativ durch Fettgewebe ersetzt (Pogoryelova et al., 2018).

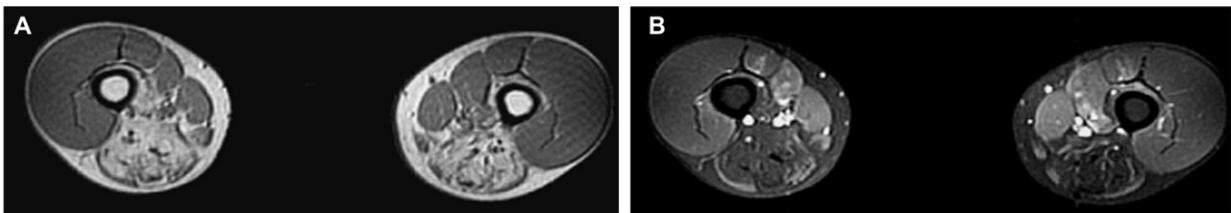


Abb. 2 MRT-Bildgebung A (T1-Gewichtung), B (T2-Gewichtung) der Oberschenkelmuskulatur eines GNE-Myopathie-Patienten mit Aussparung der Quadrizepsmuskulatur ("Quadriceps sparing myopathy") und degenerativ veränderter dorsaler Oberschenkelmuskulatur (Krause et al., 2003).

Aktuell gibt es keine zugelassene Therapie der GNE-Myopathie mit einem kurativen Anspruch. Mögliche Therapiestrategien waren Gegenstand aktueller klinischer Studien, wie sie u. a. von Ultragenyx Pharmaceutical, USA (www.ultragenyx.com) und dem National Institute of Health (USA) durchgeführt wurden [ClinicalTrials.gov identifier (NCT number): NCT02377921; NCT01784679]. Therapieansätze beruhten auf dem Versuch, das Sialinsäure-Niveau durch exogene Sialinsäure-/Vorläufersubstanz-Substitution oder mittels intravenöser Gabe von Immunglobulinen, stark sialylierten Biomolekülen, zu erhöhen und somit die Stabilität der Muskelzellen zu gewährleisten. Diese Behandlungsansätze wurden von dem vermuteten Pathomechanismus und in verschiedenen Tierversuchsstudien bestätigt (Malicdan et al., 2009; Yonekawa et al., 2014). Die Supplementationstherapie hat jedoch keinen therapeutischen Effekt gezeigt

(Bedrosian, 2020; Carrillo et al., 2018). Weitere supportive Maßnahmen zur Linderung der Symptomatik umfassen u. a. Fortbewegungshilfen, Schmerzmedikation, sowie Physiotherapie und psychologische Betreuung der Patienten.

Die konventionellen Therapieansätze wirkten allerdings nur kurzfristig symptomlindernd, da weder ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert, noch ein Stillstand oder eine Heilung erreicht werden konnte (Bedrosian, 2020; Pogoryelova et al., 2018).

1.2 Die dSTORM-Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, zelluläre Prozesse nicht-invasiv und mit hoher zeitlicher Auflösung zu untersuchen (van de Linde et al., 2011). Mittels neuer Technik war es erstmals möglich, einzelne Glycoproteine und -lipide auf Membranen menschlicher Zellen sichtbar zu machen und damit wesentlich höher auflösende Aufnahmen zu erstellen als dies vorher möglich war. Dabei wurde ein sogenannter bioorthogonaler Prozess genutzt („Click-Chemie“), also eine chemische Reaktion, die in lebenden Systemen auftreten kann, ohne in die natürlichen Prozesse einzugreifen, um die membran-assoziierten Glykokonjugate zu markieren (Letschert et al., 2014).

Zucker-analoge-Strukturen, wie die tetraacetylierten (per-O-acetylierten) Verbindungen *N*-Azidoacetyl-D-Mannosamin (ManNAz), *N*-Azidoacetyl-D-galactosamin (GalNAz) und *N*-Azidoacetyl-D-glucosamin (GlcNAz), wurden zum Kulturmedium der jeweiligen Zellen hinzugegeben.

Nach dem Eintritt von z. B. ManNAz in die Zellen wird das Produkt O-deacetyliert, in die entsprechende *N*-Azidoacetylneuraminsäure (Neu5Az) umgewandelt, anschließend in die aktivierten CMP-Zucker und schließlich in Zelloberflächenglycane auf menschlichen oder anderen Zellen eingebaut.

Das gebundene Neu5Az kann durch eine kupferfreie Clickchemie-Reaktion mit Cyclooctin-Reagenz, z. B. konjugiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent angehängt und somit sichtbar gemacht werden. Dieses Färbeverfahren ist nicht toxisch und kann in kultivierten Zellen und in lebenden Mäusen durchgeführt werden (Heilemann et al., 2005; Saxon and Bertozzi, 2000).

Bemerkenswert ist, dass die verschiedenen biosynthetischen Enzyme des Sialinsäure-Stoffwechselwegs und der nachfolgenden Schritte, die normalerweise an der Umwandlung von ManNAc in gebundenes Neu5Ac beteiligt sind, die unnatürlichen

Substrate tolerieren. Metabolische Oligosaccharid-Konstruktion mit Hilfe nicht-natürlicher Hexose-Derivate (Metabolic Oligosaccharide Engineering, MOE) wurde erstmals vor fast 30 Jahren etabliert, als die Arbeitsgruppe von Professor Werner Reutter demonstrierte, dass der Säugetier-Sialinsäure-Biosyntheseweg eine ausreichende Substrat-Toleranz für nicht-natürliche Analoga von *N*-Acetylmannosamin hat (Kayser et al., 1992).

Die Moleküle wurden durch Laserbestrahlung aus dem nicht-fluoreszierenden ‚AUS-Zustand‘ in einen aktiven, leuchtenden ‚AN-Zustand‘ transferiert. Um zu verhindern, dass die einzelnen Fluorophore bei Laserbestrahlung einfach ausgehen und um ihnen einen Wechsel zwischen den ‚AN‘-, ‚AUS‘- und Übergangszuständen, das sogenannte ‚Photoswitching‘, zu ermöglichen, wurde ein Schaltpuffer verwendet, der jeweils vor den Versuchen hinzugefügt wurde (van de Linde et al., 2008).

Mikroskopiemethoden, mit denen sich einzelne Moleküle lokalisieren lassen, lesen die Emissionen von individuellen Fluorophoren zufallsbedingt aus. Dies wird mit Hilfe von Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge und einer Intensität erreicht, die den Großteil der geclickten Moleküle in einen reversiblen ‚AUS‘-Zustand transferiert und einer darauffolgenden stochastischen Aktivierung (‚AN‘-Zustand) von individuellen Farbstoffmolekülen.

Die Fluorophore befinden sich also in einem momentanen ‚zufällig-blinkenden‘ Zustandswechsel, der in einer Großzahl von Bildern festgehalten wird. Um eine möglichst präzise Lokalisationsbestimmung gewährleisten zu können, liegen die aktivierten Moleküle optimaler Weise weiter auseinander als die Auflösungsgrenze der Bilder. Befinden sich zu viele solcher Signale innerhalb eines bestimmten Bereiches, entstehen sogenannte Cluster.

Es ist also eine ‚ausreichend geringe‘ Anzahl an Molekülen im ‚AN‘-Zustand nötig, um ein hochauflösendes Gesamtbild zu erstellen. Dieses entsteht letztendlich über eine vielfache Wiederholung dieses Vorgangs mit darauffolgender digitaler Zusammensetzung der Einzelbilder, die typischerweise aus millionenfachen Molekül-Lokalisationen besteht.

Eine Herausforderung bei der Durchführung dieses Prozesses lag darin, die Schädigung der Proben durch ein sogenanntes ‚Photobleaching‘ zu vermeiden. Mithilfe eines Lasers wurden die Moleküle bestrahlt und in einen aktiven Zustand versetzt (‚AN-Zustand‘). Wurde die Dauer der für die Bilder benötigten Bestrahlung überschritten und weiterhin mit hoher Intensität beleuchtet, so kam es zu einem ‚Ausbleichen‘ der Proben.

Die in diesem Ausschnitt bestrahlte Zelle, beziehungsweise deren Oberflächenmoleküle, waren daraufhin nicht mehr vom Hintergrund zu differenzieren und für weitere Untersuchungen unbrauchbar. Die Dauer der Laserexposition wurde daher bei jeder Bild-Erstellung so niedrig wie möglich gehalten (van de Linde et al., 2011).

2 PROBLEMSTELLUNG

Die Visualisierung und Quantifizierung der Plasmamembran-Glycane ist von besonderem Interesse bei erblichen, degenerativen Skelettmuskelerkrankungen, denen eine Störung im Glycanstoffwechsel zugrunde liegt. Die GNE-Myopathie ist durch Mutationen im *GNE*-Gen verursacht, das das bicistronische Schrittmacherenzym der Sialinsäurebiosynthese (UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-epimerase/*N*-Acetyl-Mannosamin-Kinase) kodiert. Sialinsäuren finden sich häufig an den endständigen Positionen vieler Glycokonjugate und bestimmen die Oberflächeneigenschaften von Zellen.

Fragestellungen:

1. Sind die Glycoproteine/Glycolipide bei der GNE-Myopathie an der Oberflächenmembran von primären humanen Muskelzellen quantitativ oder qualitativ verändert?
2. Welche dynamischen Veränderungen des Glycokonjugatmusters finden sich im murinen Zellkulturmodell von GNE Knockout-Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp?

Die Klärung dieser wesentlichen Fragestellungen mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie und FACS-Analyse soll dazu beitragen, die Vorgänge einer Supplementationstherapie bei der GNE-Myopathie eingehender zu verstehen.

Eine detailliertere Aufklärung der molekularen Pathogenese im Sialinsäure-Stoffwechsel wird die Etablierung spezifischer therapeutischer Ansätze bei der bisher unheilbaren GNE-Myopathie ermöglichen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Mikroskopische Aufnahmetechnik

Zur Bilddarstellung wurde auf dem Rechner die Software „Andor Solis 64-bit“ verwendet. Vor den Bildaufnahmen wurde zunächst mit Hilfe des EPI-Illuminationsmodus, bei dem die gesamte Zelle bestrahlt wird, eine für die Untersuchung geeignete Zelle gesucht. Hierbei wurde sich an Zellen orientiert, die eine myoblastenähnliche Morphologie aufwiesen, mit einzelnen, am Rand gelegenen Zellkernen und mindestens 50 μm^2 Fläche. Eine genaue Positionsbestimmung der Moleküle ist für die Aufnahme von qualitativ hochwertigen Bildern essenziell. Daher ist es besonders wichtig, neben einer hell leuchtenden Zelle, möglichst wenig Hintergrundmarkierung zu erzielen und so einen deutlichen Kontrast zwischen Zelle und Objektträger zu erzeugen.

Um diesen Hintergrund zu kontrollieren und anschließend die richtige Ebene für die Aufnahme einzustellen, wurde nach Fixierung des gewählten Zellausschnitts, das Mikroskop in den TIRF-Modus (total internal reflection fluorescence) geschaltet und die ersten paar 100 nm belichtet. Vor dem Start der *d*STORM-Aufnahme, wurde für den späteren Vergleich und zur Kontrolle des eingestellten Zellabschnittes noch eine Standardfluoreszenzaufnahme gemacht.

Der Raum wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Zellen komplett abgedunkelt und der Mehrkammerobjektträger mit fixierten Zellen von einem Lichtschutzkästchen bedeckt. Nach einer einminütigen Belichtungszeit mit 200 mW um die Moleküle in einen angeregten, blinkenden Zustand zu versetzen, wurde die fünfminütige *d*STORM-Aufnahme mit einer Laserleistung von 400 mW gestartet. Die Datei wurde gesichert und mittels *rapid*STORM verarbeitet (siehe unten).

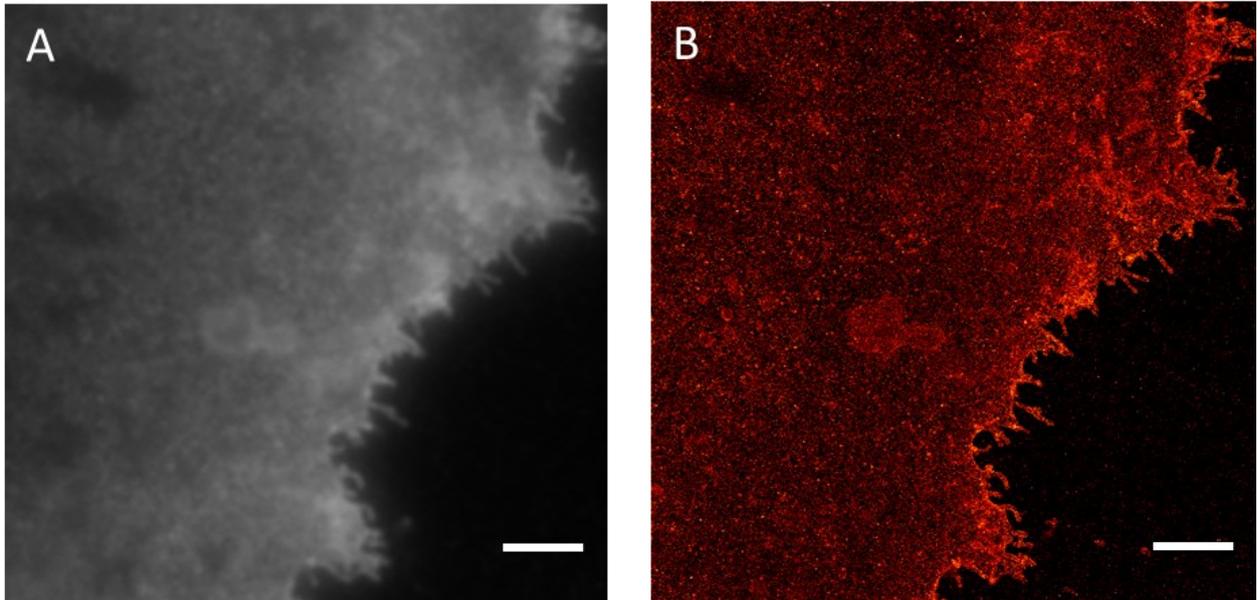


Abb. 3 Standard-Fluoreszenz-Aufnahme (A) eines Patientenzellenausschnitts. Im Vergleich dazu der entsprechende Zellausschnitt als *d*STORM-Aufnahme (B). Maßstabsbalken, 1 μ m.

3.2 Die Mikroskoptechnik

Für ein reversibles ‚Photoswitching‘ von Cy5 wurde ein PBS-basierter Schaltpuffer (pH 7,4) verwendet, der sich aus 80 mM β -Mercaptoethylamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und einem Sauerstoff-Speicher-System zusammensetzt, das aus 3% (w/v) Glukose, 4 U/ml Glukose-Oxidase und 80 U/ml Katalase besteht. Die hochauflösenden Bildaufnahmen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (van de Linde et al., 2008). Verwendet wurde hierbei ein Olympus IX-71 invertiertes Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das mit einem Öl-Immersion-Objektiv (APON 60XOTIRF, Olympus) und einem Nosepiece-Objekttisch (IX2-NPS, Olympus) ausgestattet war. Der Farbstoff Cy5 wurde mit einem Laser-System, bestehend aus einem Genesis MX 639, einem MX 561 (beide Coherent, Göttingen, Deutschland) und einem iBeam smart 488 nm (Toptica, Gräfelfing, Deutschland) angeregt. Das Anregungslicht wurde von einem Bandpass-Filter geleitet und dann auf das Objektiv fokussiert. Um zwischen den verschiedenen Beleuchtungs-Modi (EPI- und TIRF-Illumination) wechseln zu können, wurde das Linsen-System und der Spiegel in eine lineare Translationsebene gebracht.

Zur Trennung des anregenden Laserlichts vom emittierten Fluoreszenz-Licht, wurde ein polychromatischer Spiegel (HC 410/504/582/669, Semrock, Rochester, NY, USA)

verwendet. Die Fluoreszenz-Emission wurde über dasselbe Objektiv gesammelt und über einen dichroitischen ‚Beam-Splitter‘ (635 LP, Semrock) und verschiedene Detektionsfilter übertragen, bevor es auf zwei CCD-Kameras (beide iXon Ultra 897, Andor, Belfast, UK) projiziert wurde. Zur Aktivierung der Fluorophore wurde die Ausgangsleistung des Lasers auf 400 mW angepasst, die Belichtungszeit auf 0,02 Sekunden, also 20 Millisekunden gestellt, sowie die Anzahl der Bilder (Frames), die innerhalb der fünfminütigen Aufnahme gemacht wurden, auf 15.000 festgelegt (van de Linde et al., 2011).

3.3 Datenverarbeitung

Zur Aufarbeitung und Rekonstruktion der aufgenommenen Single-Molecule-Localisation-Microscopy (SMLM) Daten wurde das Programm *rapidSTORM* verwendet. Eine detaillierte Beschreibung des Algorithmus und der Funktionsweise findet sich bei Wolter et al., 2012.

RapidSTORM identifiziert die Anzahl und Positionen der Emissionen von Einzelmolekülen. Die wahrscheinlichste Position jedes Fluorophors wird mittels zweidimensionalem Gaußschen-Algorithmus determiniert und alle Lokalisationen letztendlich in ein rekonstruiertes, hochauflösendes Bild zusammengerechnet und verarbeitet (Wolter et al., 2012).

3.4 Verwendete Substanzen zur Markierung von Glycokonjugaten

3.4.1 *N*-Acetyl-Hexosamin-Analoga Ac₄ManNAz / Ac₄GalNAz / Ac₄GlcNAz

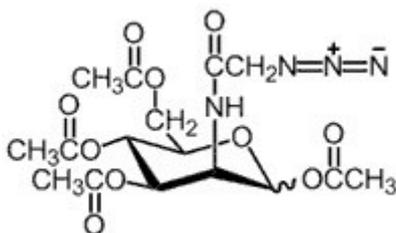


Abb. 4 Strukturformel von *N*-Azidoacetyl-D-Mannosamin

Die von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogenen Substanzen 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*N*-Azidoacetylmannosamin, -galactosamin und -glucosamin sind mit der gering reaktiven Azid-Gruppe verbundene Monosaccharide. Sie sind Analoga der Glycan-Vorläufer-Reste zur Markierung von N-Glycanen und dienen über die Azid-Gruppe als Verbindungsstück zum fluoreszierenden Cy5-Farbstoff-DBCO-Konjugat.

Besonders interessant ist hierbei das ManNAz, da es im Gegensatz zu GalNAz und GlcNAz die wenigsten Reaktionsschritte zur Umwandlung in Sialinsäure (CMP-Neu5Ac) benötigt.

GalNAz und GlcNAz können auch in alternativen biochemischen Wegen weiter verstoffwechselt werden. GalNAz wird zur metabolischen Markierung von *O*-Glycanen verwendet. GlcNAz findet sich auch in *O*-GlcNAz-modifizierten (Glyco)konjugaten.

3.4.2 Dibenzocyclooctyne (DBCO)-Cy5 und DBCO-PEG4-Biotin Konjugat zur bioorthogonalen Markierung

Indodicarbocyanine Cy5 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ist ein heller, weit im roten Spektrum angesiedelter, fluoreszierender Farbstoff. Er wird für zur Darstellung von Protein- oder Nukleinsäure-Konjugaten oder zur Durchflusszytometrie verwendet. Aufgrund seines optimalen Anregungsbereichs zwischen 633 nm (Helium/Neon-Laser) bis 647 nm (Krypton/Argon-Laser), seinem Anregungsmaximum von 650 nm und Emissionsmaximum von 670 nm, wurde dieser Farbstoff für die *d*STORM-Mikroskopie verwendet (Thermo Fisher Scientific).

Die Dibenzocyclooctyne (DBCO)-Komponente, auch unter den Namen ADIBO (Azadibenzocyclooctyne) oder DIBAC (Dibenzoazacyclooctyne) bekannt, ermöglicht eine bioorthogonale und kupferfreie Click-Reaktion. Das Cyclooctin DBCO reagiert dabei schnell und selektiv in vielen Reaktionsumgebungen (*in vitro* und *in vivo*) mit Aziden zu den entsprechenden Triazolverbindungen. DBCO-Cy5 wurde zuvor im polaren Medium Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht.

Bei der kupferfreien Click-Chemie-Reaktion wird zur Biokonjugation die Cycloaddition genutzt, die im Gegensatz zur kupferkatalysierten Click-Chemie nicht auf Übergangsmetallionen als Katalysatoren angewiesen ist. Hierzu zählt das Verfahren der „strain promoted alkyne–azide cycloaddition“ (spAAC) zwischen Aziden und gespannten

Cycloalkinen. Der Abbau der sterischen Ringspannung ist eine wesentliche Triebkraft dieser Reaktion.

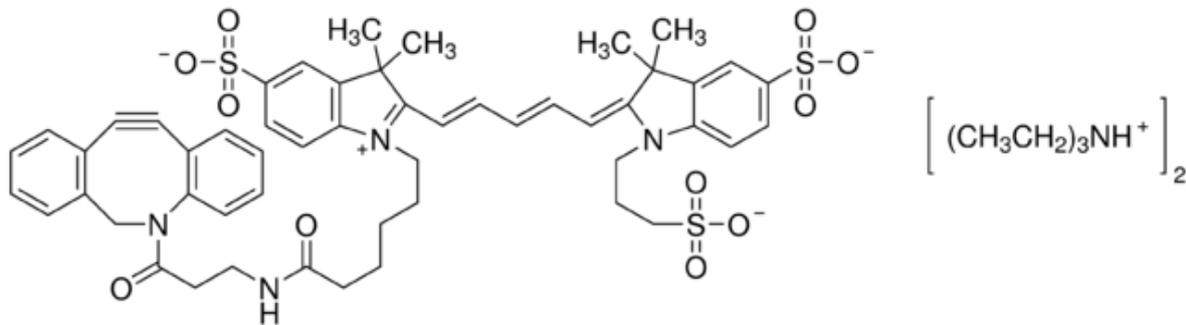


Abb. 5 Strukturformel von Dibenzylocyclooctyne (Cy5)-Fluoreszenzfarbstoff.

Als zweite unabhängige Nachweismethode zur Detektion von *N*-Acetyl-Hexosamin-Analoga in metabolisch markierten Zellen, wurde alternativ Dibenzylocyclooctyne-PEG-Biotin (CLK-A105P4-10, Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland) nur in der Durchflusszytometrie verwendet (s. 3.6).

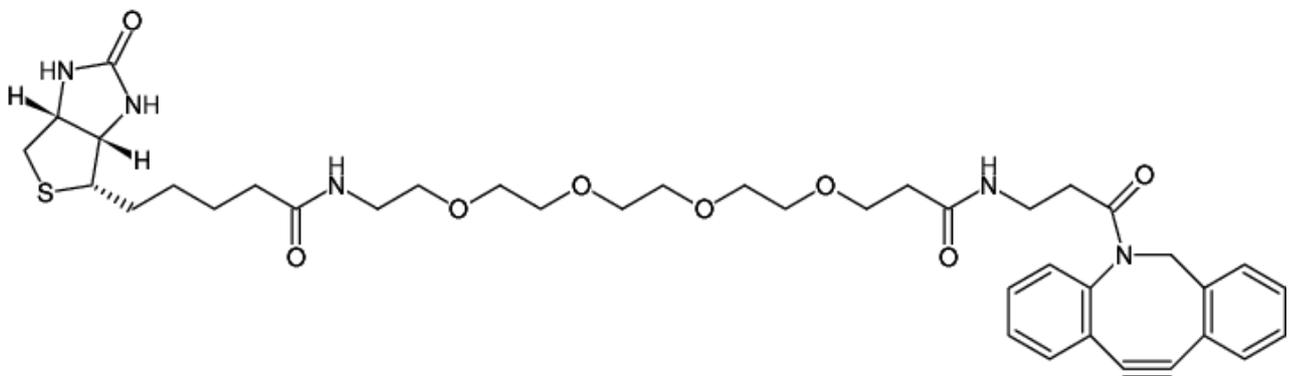


Abb. 6 Strukturformel des Dibenzylocyclooctyne (DBCO)-PEG4-Biotin-Konjugats.

Die Detektion erfolgte in einer abschließenden Inkubation mit Fluorochrom-(Cy3)-gekoppeltem Streptavidin (Cy3-conjugated Streptavidin, 016-160-084, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK). Die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung gehört zu den stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen und wird bei einer Reihe von Nachweis- und Präparations-Methoden in der Molekularbiologie, Immunologie und Biochemie genutzt. Der hydrophile PEG 4-Linker [22,8 Å (19 Atome)] hat den Vorteil, dass er mögliche Aggregation und Ausfällung während des

Markierungsprozesses reduziert oder eliminiert, indem er die Hydrophilie des Zielmoleküls erhöht. Aufgrund der extrem hohen Affinität von Biotin zu Streptavidin ($KD = 10^{-15}$ M), ist die biotinylierte Molekül-Streptavidin-Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen im Wesentlichen irreversibel und erlaubt eine effiziente Visualisierung der markierten Glykokonjugate.

3.4.3 Probanden

	Geschlecht	Erst-symptomatik (Jahre)	Alter bei Biopsie (Jahre)	Serum -CK (U/l)	Paresen	Reflexe	GNE-Mutation	EMG
Patient 1	w	19	21	257	oEx, uEx	abgeschwächt	p.R42W/ p.F568I	Neurogen
Patient 2	m	29	34	500	oEx, uEx	abgeschwächt	p.M743T	Neurogen
Control 1	w	-	29	71	keine	o.p.B.	-	o.p.B.
Control 2	m	-	36	<170	keine	o.p.B.	-	o.p.B.

Tab. 1 Klinische Charakteristika von Patienten und Kontrollen. Abkürzungen: oEx obere Extremität, uEx untere Extremität, o.p.B. ohne pathologischen Befund, Serum-CK-Normwert <170 U/l.

Für eine optimale Auswertung wären Biopsien des gleichen Muskels sowohl bei Patient, wie auch bei der Kontrolle nötig. Aufgrund der Seltenheit der GNE-Myopathie lässt sich allerdings nur aus einem sehr kleinen Kontingent an Proben bzw. Patienten schöpfen. Die hier untersuchten humanen Myoblasten stammten aus diagnostischen Muskelbiopsien mit schriftlichem Einverständnis der Patienten (Ethikvotum Projekt 045-14, Amendments vom 04.08.2014, 15.10.2015 und 05.02.2018). Die Zellen wurden im weiteren Verlauf mit der Nummer des LabTek Mehrkammer-Objektträgers bezeichnet.

- LabTek 8: weiblich, M. tibialis anterior, Kontrolle
nachfolgend Control 1/Cf
- LabTek 13: weiblich, M. tibialis anterior, heterozygote Mutation p.R42W/p.F568I
nachfolgend Patient 1/Pf
- LabTek 11: männlich, M. gastrocnemius, Kontrolle
nachfolgend Control 2/Cm
- LabTek 12: männlich, M. gastrocnemius, homozygote Mutation p.M743T
nachfolgend Patient 2/Pm

Nach der neuen hGNE2-Nomenklatur (Huizing et al., 2014) definiert sich die homozygote Mutation M743T bei Patient 2 anhand eines Austauschs der Aminosäure Methionin durch Threonin an der Position 743 der Kinase-Domäne. Diese Mutation findet sich vor allem in den vorderasiatisch-jüdischen, persischen und muslimischen Ethnien (Eisenberg et al., 2003).

Die Nomenklatur der Mutation bei Patient 1 ergibt sich nach demselben System, wobei die GNE-Protein-Domäne dieser Mutation für das Epimeraseenzym kodiert und besonders bei indischen Ethnien vertreten ist (Celeste et al., 2014).

Kohortenstudien beschreiben die Erkrankungsschwere im Sinne von Erkrankungsalter, Symptomatik und Progression als abhängig von der jeweiligen Punktmutation. Beide in dieser Arbeit behandelten Genotypen äußern sich bei den Patienten durch einen sehr schwerwiegenden Phänotyp (Pogoryelova et al., 2018).

3.4.4 Präparatherstellung

3.4.4.1 Zellkultur

Zur Herstellung einer primären Myoblastenkultur wurde ein ca. erbsengroßes steril entnommenes Biopsiestück bei 4°C in einer Solution A (500 ml Lösung aus 400 ml Aqua dest., 3,6 g HEPES, 3,8 g NaCl, 0,112 g KCl, 0,99 g Glucose und 0,000567 g Phenolrot, pH-Wert 7,6) gelagert. Die Zellkultur wurde in folgenden Schritten angelegt:

1. Muskelstück in leere 100 mm Petri-Schale geben und Überstand absaugen
Muskel mit Skalpell in kleine Stückchen schneiden (passend für 25 ml Pipette);
2. 5 ml ATE (40,5 ml Solution A + 4,5 ml Trypsin-EDTA) zugeben und in Wheaton-Flasche (spezielles Rührgefäß mit Magnet-Rührfisch) pipettieren;
3. Petri-Schale zweimal mit 5 ml ATE spülen und jeweils in Wheaton-Flasche pipettieren (Gesamtvolumen: 15 ml);
4. Wheaton-Flasche 15 min bei Raumtemperatur stark rühren lassen, gleichzeitig drei 50 ml Röhrchen mit jeweils 15 ml Waschmedium (DMEM + 10% FCS + 40 µg/ml Gentamicin) vorbereiten;
5. Überstand der Wheaton-Flasche vorsichtig in das erste 50 ml Röhrchen überführen, der Bodensatz verbleibt;

6. Wheaton-Flasche wieder mit 15 ml ATE füllen, 15 min rühren lassen und anschließend in das zweite 50 ml-Röhrchen abgießen, Prozedur ein drittes Mal wiederholen;
7. Alle drei 50 ml Röhrchen bei Raumtemperatur 10 min bei ca. 1200 rpm zentrifugieren (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland);
8. Überstand absaugen und die Pellets mit 5 ml SGM-Medium nacheinander resuspendieren, komplett in eine 60 mm Petri-Schale transferieren und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ wachsen lassen;
9. Mediumwechsel frühestens nach 24 Stunden, spätestens am 3. Tag, nach zwei Tagen ist ein dreimaliges Spülen mit PBS möglich, um Zellreste zu beseitigen
10. Erste Myoblasten sind meist nach 48 Stunden sichtbar.
11. Bei ausreichender Konfluenz empfiehlt sich ein Aufteilen der Zellen auf mehrere Schalen nach Ablösung mittels 0,05% Trypsin-EDTA, um ein weiteres Wachstum der Zellen zu ermöglichen.
12. Ein langsames Einfrieren der passagierten Zellen ist mit Hilfe eines Isoliergefäßes bei -80°C möglich. Die Lagerung erfolgt langfristig in der Gasphase von flüssigem Stickstoff (-155°C bis -150°C).

3.4.4.2 Zellpassage

Es stehen verschiedene Möglichkeiten zur weiteren Zellpassage zur Verfügung:

- A. Zur Förderung des Wachstums ist ein Mediumwechsel frühestens nach 24 Stunden und spätestens am 3. Tag indiziert.
 1. Absaugen des Mediums, dreimal mit PBS spülen zur Beseitigung toter Zellen;
 2. Zugabe von 4 ml SGM-Medium.

- B. Präsentieren sich die Zellen in kleineren Gruppierungen, so empfiehlt sich ein Loslösen dieser mittels Trypsin, um eine weitere Kultivierung zu fördern.
 1. Absaugen des Mediums und Zugabe von 2 ml 0,05% Trypsin-EDTA.
 2. Absaugen von 1,8 ml Trypsin mit Belassen von 0,2 ml und Inkubation der Petrischale bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Minuten.
 3. Die Zellen werden „angedaut“ und mobilisiert, sodass sie sich in der Schale neu verteilen und mit einer Zugabe von 3,5 ml SGM weiterwachsen können.

- C. Bei gutem Zellwachstum ist ein Transfer in eine 92 mm Petrischale möglich.
1. Absaugen des Mediums und Zugabe von 2 ml 0,05% Trypsin-EDTA.
 2. Absaugen von 1,6 ml Trypsin und Inkubation der Petrischale bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Minuten.
 3. Die Zellen werden mit 5 ml SGM-Medium in die größere Schale transferiert.
 4. Zugabe von zusätzlich 5 ml SGM-Medium.

Ein Einfrieren der passagierten Zellen ist mit folgenden Schritten für eine Lagerung von bis zu 7 Tagen möglich:

1. Absaugen des Mediums und Spülen der Schale mit 10 ml PBS;
2. Absaugen der Spüllösung und Zugabe von 1,5 ml Trypsin mit anschließender Inkubation der Petrischale bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Minuten;
3. Zugabe von 8,5 ml Wasch-Medium (DMEM + 10% FCS + 40 µg/ml Gentamicin) und Transfer des gesamten Inhalts in ein Zentrifugenröhrchen;
4. Zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 Minuten bei 12°C;
5. Absaugen der überstehenden Flüssigkeit;
6. Resuspension des Pellets mit 6 ml Einfrier-Medium (DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) und Verteilen von je 1,5 ml auf vier 2 ml Cryo-Röhrchen;
7. Einfrieren in Isolierbox schrittweise bis zu -80°C;
8. Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -155°C.

3.5 Protokollentwicklung zur metabolischen Markierung von primären Myoblasten mit *N*-Acetyl-Hexosamin-Analoga

3.5.1 Ausgangsprotokoll

Protokolle zur Färbung biologischer Zielstrukturen mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie müssen für jede Zellart neu angepasst und optimiert werden. Ein schrittweises Vorgehen ist essenziell, um für die dSTORM-Mikroskopie möglichst geeignete Präparate herzustellen.

Da keine etablierten Protokolle für Muskelzelllinien oder für primäre Myoblasten existierten, wurde zur Orientierung zunächst ein Basisprotokoll der Arbeitsgruppe von

Prof. Sauer verwendet, das für die Untersuchung von SK-N-MC Zellen (Neuroblastomzelllinie) verwendet wurde (Letschert et al., 2014):

1. Aussäen der Zellen auf LabTek II 8-well Objektträger (Thermo Fisher Scientific, 154534)
 - Zunächst $1-2 \times 10^4$ Zellen pro Kammer;
 - Die Zellzahl ist von der Zelllinie abhängig;
2. Hinzufügen des modifizierten Zuckers (z. B. Ac_4ManNAz) und vorsichtiges Vermischen (Endkonzentration $25 \mu\text{M}$);
3. Als negative Kontrolle eine Kammer ohne Zuckeranalogon;
4. Zellwachstum für zwei Tage;
5. Entfernung des Mediums und einmaliges Waschen der Zellen mit PBS;
6. Hinzufügen von $200 \mu\text{l}$ $25 \mu\text{M}$ Cy5-DBCO in PBS und Inkubation für 10-15 Minuten bei 4°C ;
7. Dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS bei 4°C ;
8. Fixieren der Zellen mit 4%igem Formaldehyd + 0,2%igem Glutaraldehyd in PBS für 60 Minuten bei 4°C ;
9. Dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS;
10. Aufbewahren der Zellen in PBS bei 4°C . Für längeres Aufbewahren Hinzufügen von Azid, Versiegeln des Objektträgers zum Transport mittels Parafilm;
11. Fluoreszenzsignal-Kontrolle der Zellen mittels Standard-Fluoreszenz-Mikroskop oder Laser-Scanning-Mikroskop (LSM), der passenden Wellenlänge des Lichts ($\sim 640 \text{ nm}$) und den Filtereinstellungen für den Farbstoff Cy5 (Abbildung 7).

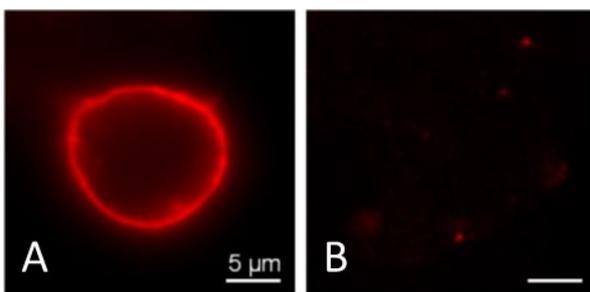


Abb. 7 Laser-Scanning Mikroskop-Aufnahmen einer korrekt mittels Ac_4GlcNAz und Cy5-DBCO gefärbten Membran (A). Es ist keine Fluoreszenz innerhalb der Zelle nachweisbar. Im Vergleich eine Zelle der nicht markierten Kontrolle ohne Zucker-Analogon (B) mit fehlender Membranfärbung (Letschert S et al., persönliche Mitteilung).

Die Färbung der Zellen erfolgte hier stets nach der Kupfer-freien Methode, um die Zellen nicht der toxischen Wirkung des Kupfers auszusetzen (Mateos-Gil et al., 2016).

3.5.2 Erste Protokollmodifikation

Um auf einem Objektträger verschiedene Protokollvarianten und -ausführungen simultan analysieren zu können, wurden in vorliegender Arbeit 8-Kammer-Objektträger verwendet (8-well-Labtek). Die Bezeichnung einer untersuchten Probe erfolgte jeweils anhand der Spalten 1 – 4 (SGM, DMEM/2%HS, alpha-MEM/2%Ultroser G und alpha-MEM/0,4% Ultroser G) und der Reihe A bzw. B: ManNAz und ohne Markierung (Abb. 8). Jede Myoblastenprobe erhielt einen eigenen Objektträger.

Im ersten Protokolldurchlauf erfolgte die Aussaat der Patientenzellen auf die Kammern mit jeweils insgesamt 2 ml SGM, einem Wachstumsmedium zur Muskelzellvermehrung, nach dem Schema 20% / 80%, was bei 200 µl Zellen einer Aufteilung in 40 µl und 160 µl entspricht.

Die Hypothese war, dass die Aussaat mit geringerer Zelldichte eine Proliferation der undifferenzierten Myoblasten fördern würde, wohingegen die Myoblasten in denjenigen Kammern mit höherer Zelldichte parallel in Fusionsmedium differenziert werden könnten, das 2% Pferdeserum (HS) anstelle von FCS enthält (DMEM, 2% HS). Die Differenzierung erfordert eine Konfluenz (Zelldichte) der Myoblasten von ca. 95%.

	+ Serum Proliferation SGM	Differenzierung DMEM/2% HS	serumfrei Proliferation alpha-MEM/2% Ultroser G	Differenzierung alpha-MEM/0,4% Ultroser G
ManNAz 25 µM	20%	80%	20%	80%
ohne Markierung	20%	80%	20%	80%

Abb. 8 Versuchsanordnung nach erster Protokollmodifikation mit Aufteilung der Behandlung auf die jeweiligen Kammern des 8-Well-LabTek Mehrkammer-Objektträgers.

Die fusionierten, mehrkernigen Zellen sollten die Auswirkungen der metabolischen Markierung auf differenzierte Myotuben zeigen. Letztere zeigten sich allerdings als technisch kompliziert, da sie bei späteren Auswertungen nach Fluoreszenzfarbstoffmarkierung mittels Click-Chemie eine erhöhte spurenförmige Hintergrundfärbung der Objektträger zeigten. Eine mögliche Ursache hierfür wäre eine erhöhte Zellmotilität bei der Fusion der Zellen, wobei Membranreste auf dem Glasobjektträger zurückblieben, die angefärbt wurden.

Pro Kammer wurde jeweils ein 0,5 µl Aliquot der Zucker-Analoga, hier ManNAz, zu je 500 µl Wachstumsmedium gegeben, um eine bessere Aufnahme der Moleküle in die Muskelzellen zu gewährleisten.

Wegen der limitierten Verfügbarkeit der humanen primären Zellen wurde parallel auf dem gleichen Objektträger getestet (Spalte 3 und 4), ob eine serumfreie Kultivierung möglich ist. Denn sowohl FCS als auch HS enthalten große Mengen an Glykokonjugaten, die nach Aufnahme durch die Myoblasten durch Ab- und Umbauvorgänge in den Zellen variable Mengen an Hexosamin-Vorläufern liefern könnten. Damit kommen diese als Quelle für Sialinsäure in Betracht, was zu einer unkontrollierten Verfälschung der Ergebnisse führen könnte.

Um definierte Bedingungen zur Markierung zu erreichen, wurde hierbei bei ansonsten gleichbleibendem Versuchsaufbau - anstatt des Serumzusatzes in SGM und DMEM - der Serumersatz Ultrosor G (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) mit einer Endkonzentration von 2% verwendet. Diese Konzentration entspricht 10% FCS.

Die Schritte 3 – 9 wurden nach dem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe von Prof. M. Sauer durchgeführt. Um die erfolgreiche Markierung in der oberen Kammerreihe zu kontrollieren und die unspezifische Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu überprüfen, blieb die untere Reihe unmarkiert.

In den ersten Aufnahmen sowohl mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM), bei dem sich rot gefärbte Zellmembranen zeigten, als auch bei der dSTORM-Mikroskopie bestätigte sich die effiziente Markierung mit dem Cy5-Farbstoff im Bereich der Zellmembran (Abb. 9). In den dSTORM-Aufnahmen äußerte sich zudem eine starke, die spätere Quantifizierung der mit ManNAz markierten Glykokonjugate erschwerende Hintergrundfärbung auf den Objektträgeroberflächen.

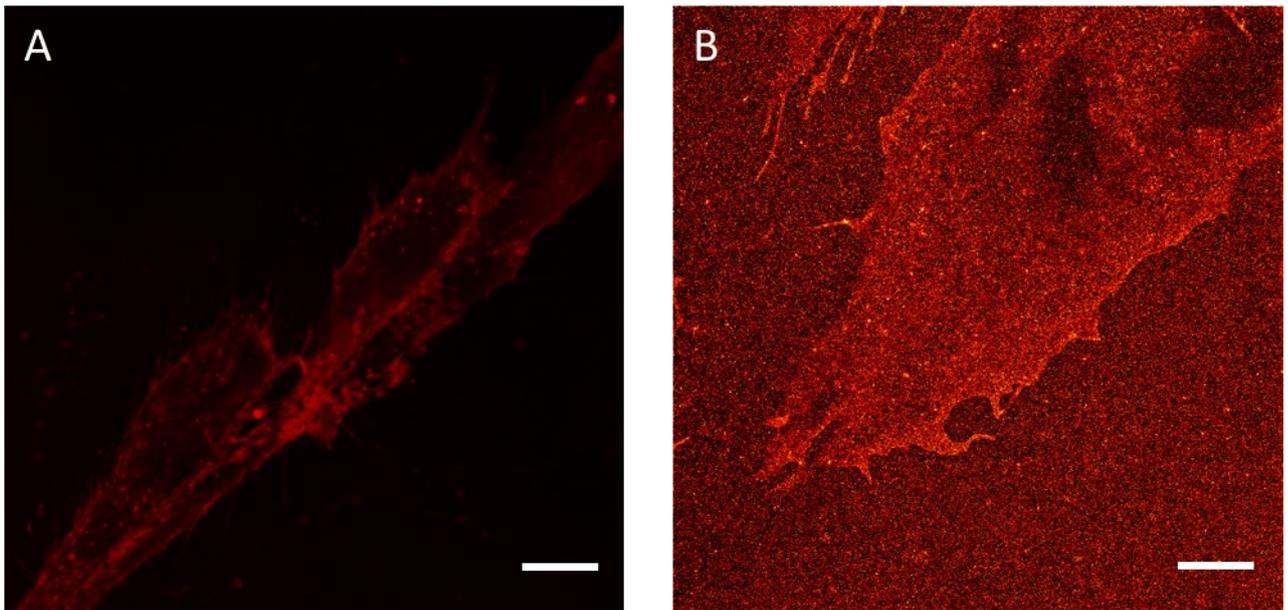


Abb. 9 LSM-Aufnahme einer nach dem ersten Protokollschema erfolgreich markierten Zelle (A). In der entsprechenden δ STORM-Aufnahme ist eine erhöhte Hintergrundmarkierung auffällig (B). Maßstabsbalken 1 μ m.

3.5.3 Weitere Protokollanpassungen

Es wurden im Verlauf mehrere Versuchsanordnungen durchgeführt. Wichtige Ergebnisse und Anpassungen aus den neuen Erkenntnissen werden im Folgenden hervorgehoben.

3.5.3.1 Versuchsanordnung Nr. 5

Um bei der weiteren Methodenfindung Patientenzellen zu sparen, wurden zunächst für die folgenden Protokollanpassungen myogene Mauszellen der Myoblasten-Zelllinie C2C12 verwendet. Um eine gute Reduzierung des Hintergrunds zu erreichen, wurde zunächst die Zelldichte von 20% bzw. 80% auf 25% bzw. 75% angepasst und dabei besonderes Augenmerk auf die Kammern mit dem serumfreien Medium mit Ultrosor G gelegt. Um weitere Artefakte durch Membranpartikel abgewaschener Zellen zu vermeiden, wurde probatorisch die Beschichtung der Glasoberfläche von Laminin auf Poly-L-Lysin (0,01% P4707, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) umgestellt. Für eine bessere Flüssigkeitsverteilung und somit geringeres „Abperlen“ der Zellen von der Objektträgeroberfläche, wurde bei dieser Versuchsanordnung zunächst der

Objektträger mittels 1M Kaliumhydroxid (KOH) gewaschen. Nach Entfernen des KOH und 2-3 Waschsritten mit dH₂O, wurden die Mehrkammerobjektträger über 12 Stunden bei 4°C mit 2-4 Tropfen Poly-L-Lysin pro Kammer inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS gemäß dem Standardprotokoll weiterverwendet.

Der durch das Poly-L-Lysin positiv geladene Kammerboden verlieh den negativ geladenen Zellen mehr Substrathaftung und führte dadurch zu einer Reduktion der spurförmigen Hintergrundfärbungen an der Glasoberfläche.

Die zunächst vorgenommene Reduktion der Zuckerkonzentration von 5 µM wurde nicht beibehalten, da sich die Hypothese einer absoluten Sättigung bei 25 µM, bei deren Erreichen die Zellen nicht mehr in der Lage wären, weitere Zuckermoleküle aufzunehmen, nicht bestätigte. Es zeigte sich zudem bei 5 µM eine wesentlich schlechtere Abgrenzung der Zellmembran zum Hintergrund und eine wesentlich effizientere Markierung bei metabolischer Markierung mit 25 µM Zuckeranalogon.

3.5.3.2 Versuchsanordnung Nr. 7

Bei Objektträger 7 wurden die Patientenzellen mittels Trypsin von der Petrischale gelöst und in einen 6-Kammer-Objektträger zur „Click“-Chemie ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte der Transfer der markierten Zellen auf den 8-Kammer-Objektträger um zu prüfen, ob so die Hintergrundmarkierung vollständig zu umgehen ist. Dieser erwies sich allerdings bei der Kontrolle als konsistent, wohingegen sich die Zellen durch die Transfer-Belastung wesentlich schlechter präsentierten als bei den vorherigen Untersuchungen.

3.5.3.3 Versuchsanordnung Nr. 8

Auf Objektträger 8 wurden die Patientenzellen der weiblichen Kontrolle des M. tibialis anterior ausgesät. Intrazelluläre Signale, am ehesten durch Endozytose der Zellen induziert, stellten im ersten Protokollansatz ein weiteres Problem dar. Um dies zu umgehen, wurde auf diesem Objektträger versucht, die Click-Chemie auf einem in Eis gekühlten Metallblock durchzuführen und so mit Hilfe von Kälte die

Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der Zellen zu verlangsamen, um die Internalisierung von Membranbestandteilen (Endozytose) in die Zellen zu verringern.

Eine Verkürzung des Markierungsvorgangs von zwei Tagen auf einen Tag sollte dem Zuckeranalogon zudem weniger Möglichkeit geben, sich unspezifisch auf der Objektträgeroberfläche abzusetzen und so zu weniger Hintergrundmarkierung bei den Aufnahmen führen.

Die Aufnahmen von Control 1, besonders der Kammern 2A und 4A stellten sich ausgesprochen gut markiert dar und führten zur Festlegung des abschließenden Protokolls, das im Folgenden für alle weiteren Proben verwendet wurde.

3.5.4 Abschließendes Standardprotokoll für primäre Myoblasten

	+ Serum SGM/15%FCS 5 μ M (0,5 μ l stock + 2.500 μ l Medium) in 500 μ l 1 d SGM/15%FCS		serumfrei alpha-MEM/2% Ultrosor G 5 μ M (0,5 μ l stock + 2.500 μ l Medium) in 500 μ l 1 d DMEM/2% Ultrosor G	
	25 μ M (0,5 μ l stock + 500 μ l Medium) in 500 μ l	25 μ M (0,5 μ l stock + 500 μ l Medium) in 500 μ l	25 μ M (0,5 μ l stock + 500 μ l Medium) in 500 μ l	25 μ M (0,5 μ l stock + 500 μ l Medium) in 500 μ l
ManNAz	75%	25%	75%	25%
GalNAz	75%	25%	75%	25%

Abb. 10 Versuchsanordnung des optimierten und endgültigen Standardprotokolls. Die metabolische Markierung mit Hilfe des modifizierten Monosaccharids erfolgte über 24 Stunden.

1. Vorbereitung eines mit Poly-L-Lysin-beschichteten Mehrkammerobjektträgers;
2. Aussäen der Zellen auf LabTek II 8-well Objektträger (Thermo Fisher Scientific, 154534) mit 10^4 Zellen pro Kammer bei einer Aufteilung von 75% (150 μ l) bzw. 25% (50 μ l) der Zellsuspension in einem Gesamtvolumen von je 2 ml pro Reihe (0,5 ml pro Kammer);
3. Hinzufügen des modifizierten Monosaccharids (z. B. Ac₄ManNAz in Reihe A) und vorsichtiges Vermischen (Endkonzentration 25 μ M). Als Vergleich die untere Reihe mit Ac₄GalNAz;
4. Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) über 24 h;
5. Entfernung des Mediums und einmaliges Waschen der Zellen mit PBS;

6. Äquilibrieren der Zellen bei Raumtemperatur für 10 Minuten;
7. Inkubation der Zellen auf Eis-/Metallblock für 10 Minuten;
8. Hinzufügen von 200 µl 25 µM Cy5-DBCO in PBS auf Eis-/Metallblock;
9. Inkubation über weitere (10-)15 min auf Eis-/Metallblock;
10. Dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS bei 4°C;
11. Fixieren der Zellen mit 4%igem Formaldehyd + 0,2%igem Glutaraldehyd in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur;
12. Dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS;
13. Aufbewahren der Zellen in PBS bei 4°C, für langfristiges Aufbewahren Hinzufügen von 0.02% Azid. Versiegeln des Objektträgers zum Transport mittels Parafilm.

3.6 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf substrat- oder flussbasierten Messungen von Emissionen. Diese Emissionen können intrinsischer oder, durch hinzugefügte Farbstoffe wie Cy5, extrinsischer Natur sein. Eine Zelle emittiert bei Passage eines Laserstrahls optische Signale, die von einem Detektor aufgefangen und ausgewertet werden. So ist innerhalb von kürzester Zeit die Analyse von über 10^5 Zellen bzgl. Zellzahlmessung, Messung verschiedener Parameter, sowie Zellsortierung nach bestimmten Eigenschaften zur weiteren Analyse möglich.

Zur Analyse von Zelleigenschaften wird speziell das Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) verwendet. Hierbei wird ein elektrostatischer Zellsortiermechanismus genutzt, der fluoreszenzmarkierte Oberflächenmoleküle differenziert und analysiert. Fluoreszenzmarker sind z. B. Cy5 oder auch der Vitalfarbstoff Zombie-Violet. Der im Versuchsaufbau integrierte Vibrator unterbricht den kontinuierlichen Fluss der Substanz und ermöglicht eine tröpfchenweise Auswertung der Zellen (McKinnon, 2018).

C2C12-Zelllinien wurden in 6-Well-Platten in der Regel im Triplett, ausgesät, metabolisch markiert, ggf. weiteren Zusatzbehandlungen wie unten angegeben unterzogen und mit Hilfe von Accutase (A6964, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) von der Kulturschale abgelöst. Accutase ist ein Gemisch proteolytischer und kollagenolytischer Enzyme, die weder von Säugetieren noch von Bakterien stammen und schonender als Trypsin-EDTA-Lösung auf Zelloberflächenmoleküle

wirken, so dass deren Markereigenschaften und Oberflächenepitope weitgehend erhalten bleiben (Brevig et al., 2006).

3.6.1 Der Vitalitätsfarbstoff Zombie-Violet

Das als Vitalitätsfarbstoff bezeichnete Zombie-Violet (BioLegend, San Diego, USA) ist eine amin-reaktive Zellmarkierung mit einem Farbstoff, für den vitale Zellen nicht permeabel sind, der jedoch bei beschädigten Membranen eine Lilafärbung verursacht. Somit lassen sich vitale Zellen von toten Zellen unterscheiden und aussortieren.

3.6.2 Lectinfärbungen

Lectine sind komplexe, in der Natur weit verbreitete Proteine, die an Zuckerreste binden und somit in Zellen oder an Membranen bestimmte Signal-Reaktionen auslösen können. Sie werden auch verwendet, um markierte Strukturen bzw. Prozesse zu untersuchen (Iskratsch et al., 2009).

Verschiedene Lectine sind geeignet, um Sialinsäure-Reste auf Glycokonjugaten an der Zelloberfläche spezifisch zu binden. Hierzu gehören das *Sambucus nigra*-Agglutinin (SNA) und das *Maackia amurensis*-Agglutinin (MAA). SNA interagiert bevorzugt mit α 2,6- und MAA mit α 2,3- an terminale Galactose bzw. Galactosamin gebundenen Sialinsäuren (Sauer et al., 2014). *Helix pomatia*-Agglutinin (HPA) bindet an eine Reihe von Strukturen mit terminal α - oder β -gebundenem GalNAc nach biochemischen Studien. Die kristallographischen Daten erklären die offensichtliche Präferenz für α -gebundenes GalNAc, bei dem es sich um die Verknüpfung des Kernpeptid-gebundenen Zuckers von O-Glycanen vom Mucin-Typ handelt (Lescar et al., 2007; Sanchez et al., 2006).

Lectin GS-II aus *Griffonia simplicifolia* ist das einzige bekannte Lectin, das hochselektiv an terminale, nicht reduzierende α - und β -N-Acetyl-D-glucosaminy (GlcNAc)-Reste von Glycoproteinen bindet (Lyer et al., 1976). Aufgrund der Affinität des GS-II-Lectins für GlcNAc sind Konjugate dieses Lectins gut geeignet für die Färbung der Intermediär-bis-Trans-Golgi-Zisternen, in denen sich die N-Acetylglucosaminytransferase-Aktivität befindet.

3.6.3 Inhibition der Glycosylierung

Glycosylierungsinhibitoren sind hilfreich zur Identifizierung von nicht-natürlichen Analoga in verschiedenen Glykokonjugaten. Tunicamycin und Deoxymannojirimycin können zur Untersuchung der N-Glycosylierung verwendet werden. Tunicamycin hemmt die GlcNAc-Phosphotransferase (Takatsuki and Tamura, 1971), welche die Übertragung von GlcNAc auf Dolichol-1-phosphat vermittelt, um die Substratsynthese für die Oligosaccharyltransferase im Golgikomplex einzuleiten. Deoxymannojirimycin blockiert die Herstellung von N-gebundenen Glycanen durch Hemmung der alpha-Mannosidase I, einem Trimming-Enzym, das nach der Glycoproteinfaltung wirkt und weniger eingreifende Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel zu haben scheint als Tunicamycin (Bischoff and Kornfeld, 1984).

3.6.4 Neuraminidase-Behandlung

Zur Entfernung der terminalen Neuraminsäure-Reste und der SiaNAz-Reste wurden die Zellen vor der Click-Reaktion 1 µg/20 µl *C. perfringens* Neuraminidase im Medium bei 37°C für 10 Minuten vorbehandelt.

3.6.5 Auswahl von Untergruppen („Gating“-Strategie) in der FACS-Analyse

Eine Untergruppe der Zellen kann mit Hilfe eines sogenannten „Gates“ für weitere Analysen in der graphischen Darstellung von zwei Parametern gezielt ausgewählt werden. Durch eine systematische Abfolge festgelegter Gates können spezifische Zellpopulationen betrachtet werden, die exemplarisch in Abb. 11 dargestellt ist.

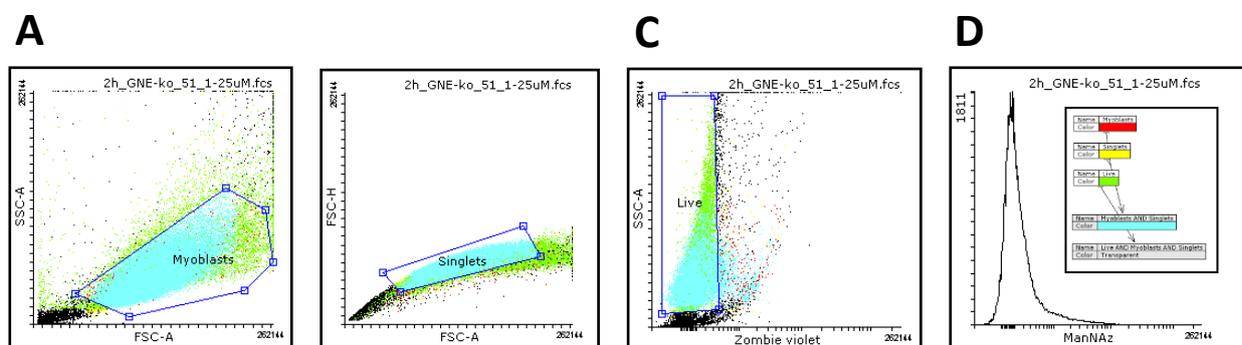


Abb. 11 Gating-Strategie in der FACS-Analyse. A Ausschluss von Zelltrümmern und Debris. B Ausschluss von Doubletten und Zellaggregaten. C Ausschluss toter Zellen: Nur tote Zellen sind für den fixierbaren Vitalitätsfarbstoff Zombie Violet permeabel. Lebende Zellen werden im Wesentlichen nicht angefärbt. D Selektierte, metabolisch markierte Zellpopulation.

Es wurden zunächst folgende Spezies ausgeschlossen: 1. Zelltrümmer und Debris, 2. Doubletten und Zellaggregate, so dass nur einzelne Zellen betrachtet werden konnten und 3. tote Zellen (Zombie Violet-positiv). Das Fluoreszenz-Signal der verbleibenden Zellen wurde mit Hilfe eines BD FACSCanto II oder eines BD LSRFortessa Durchflusszytometers (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) quantifiziert (10 000 Ereignisse pro Probe). Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo V10 (Tree Star, USA) oder mit Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku Bioscience Centre, University of Turku/Åbo Akademi University, Finland; <https://bioscience.fi/services/cell-imaging/flowing-software/>, Zugriffsdatum 15.10.2020).

3.6.6 Reduktion des unspezifischen Hintergrunds

Die DBCO-Cy5-Färbung ergab ohne metabolische Markierung mit ManNAz eine unerwartet starke unspezifische Hintergrundfärbung. Unter der Hypothese einer Nebenreaktion von DBCO mit freien Sulfhydryl-Gruppen in Abwesenheit von Azido-Zuckern, wurden systematisch verschiedene Bedingungen getestet, um unspezifische Detektion zu minimieren. Gleichzeitig wurde DBCO-Cy5 gemäß dem folgenden Schema heruntertitriert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fixierung	keine, nativ	4% PFA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA	FA-GA
Blocking	-	-	FACS Puffer	PBS-T/ 2% HS	-	-	-	-	-	-	-	-
Ellmann's Reagenz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DBCO-Cy5	2.5 μ M	0.5 μ M	2.5 μ M	2.5 μ M	2.5 μ M	0.5 μ M	0.1 μ M	0.02 μ M	0.004 μ M	0.0008 μ M	0.5 μ M	0.1 μ M
WT - 50												
KO - 51												
KO - 52												



Abb. 12 Schema der Färbebedingungen zur gezielten Reduktion der unspezifischen DBCO-Cy5 Färbung ohne metabolische Markierung mit ManNAz.

Die Zelllinien (WT-50, KO-51 und KO-52) wurden entweder nativ gefärbt oder mit 4% PFA (Paraformaldehyd) für 10 min. bzw. mit 4% Formaldehyd / 0,2% Glutaraldehyd für 30 min. wie für die Click-Chemie und dSTORM-Analyse fixiert. Eine Blockierung unspezifischer Epitope erfolgte mit FACS-Puffer (10% FCS, 2 mM EDTA) oder PBS-T

(PBS mit 0,05% Tween-20) mit 2% HS (horse serum/Pferdeserum) wie angegeben. Die Titration von DBCO-Cy5 erfolgte im Bereich von 2,5 μM bis 0,0008 μM . Ellmann's Reagenz (DTNB) zur Blockade freier SH-Gruppen wurde jeweils frisch hergestellt (5 mM Stammlösung). Die Zellen wurden in 150 μM DTNB in PBS für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal in PBS gewaschen und mit DBCO-Cy5 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert.

3.6.7 Statistische Analyse der FACS-Daten

Mit Hilfe der Statistik-Anwendung GraphPad Prism (Version 8.4.3, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt mit den folgenden Einstellungen in der englischen Version: Experimental design: No matching or pairing. Gaussian distribution and equal standard deviations (SDs) assumed Multiple comparisons: Compare the mean of each column with the mean of a control column (hier WT 50). Options: Correct for multiple comparisons using statistical hypothesis testing (Dunnett's *post hoc* test); Each P value was adjusted for multiple comparisons; Significance level: 0.05 (95% confidence interval). Residuals: Brown-Forsythe and Bartlett's tests if residuals are clustered or heteroscedastic.

Im Fall von verbundenen Stichproben wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse angewandt mit folgenden Einstellungen: Multiple comparisons. Compare each cell mean with the control cell mean on that row. Dunnett's test for multiple comparisons. Report multiplicity adjusted p value for each comparison.

Die gleichzeitig durchgeführten Tests nach Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson omnibus, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov bestätigten die Normalverteilung der Daten, die eine Voraussetzung für die Anwendung des ANOVA-Tests sind. Der Spearman's Test der gemessenen Stichproben ergab keine Hinweise für eine ungleiche Varianz.

Zusammengefasst wurden die Ergebnisse aus repräsentativen Experimenten in der Regel als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) angegeben. Die Datenanalyse erfolgte durch eine ein- oder zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von paarweisen Vergleichen unter Verwendung des Tukey-Post-Hoc-Tests (Signifikanz-Niveau, $P < 0,05$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Datenerhebung der dSTORM-Analyse

4.1.1 Auswahl geeigneter Markierungsbedingungen

Die besten Aufnahmen ergaben sich im Rahmen der Analyse nach dem entwickelten Standardprotokoll bei den Objektträgerkammern 2A und 4A. Die Zellen präsentierten sich wesentlich gesünder und stabiler als in den Kammern mit höherer Zelldichte und zeigten sich zudem signalintensiver, wenn sie mit ManNAz markiert waren.

Aufgrund der Tatsache, dass die Zellen nicht zu sensibel für die serumfreie metabolische Markierung waren und dadurch die quantitative Analyse ohne das Serum als mögliche undefinierte Sialinsäurequelle durchführbar war, wurden die Bildaufnahmen und Auswertungen anhand der Zellen in den 4A-Kammern gemacht.

4.1.2 Messungen

Zur Messung der Signalintensitäten wurde in den dSTORM-Aufnahmen der Myoblasten größere Quadrate von 15 – 30 μm^2 (M 1-3) ausgewählt, die eine möglichst geringe Anzahl an sogenannten Clustern aufwiesen. Diese Cluster sind Zellbereiche, in denen eine höhere Fluorophor-Dichte herrscht und die Bestrahlung zu schwach ist, um die Fluorophore effektiv in einen AUS-Zustand zu transferieren. Die Emissionsdichte erscheint demnach zu hoch und resultiert in falschen multiplen Fluorophor-Lokalisationen. Ein Beispiel für die Häufung solcher Artefakte sind mikrotubuläre Filamente (Burgert et al., 2015).

Die ausgewerteten Membranareale sollten sich möglichst auch nicht am Rand der Zelle befinden, um eventuelle Doppelmembranlokalisationen auszuschließen. Pro Kammer wurden dSTORM-Aufnahmen von mindestens vier verschiedenen Zellen gemacht und von jeder Aufnahme Lokalisationsmessungen in drei verschiedenen Bereichen der Membran angefertigt.

Um eine Nettolokalisation zu erhalten, wurden zusätzlich je drei Messungen an der Objektträgeroberfläche zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrunds

vorgenommen (BG 1-3). Die Messungen wurden in Lokalisationen pro Quadratmikrometer angegeben.

Die Lokalisationszahl ist wesentlich höher als die Molekülzahl selbst, da jedes Molekül während der Aufnahme mehrmals blinkt und die Gesamtanzahl der Signale am Ende summiert wird.

4.2 Hochauflösende Mikroskopie und Analyse von Zelloberflächen-Glycokonjugaten

Die *d*STORM-Aufnahmen der Ac₄ManNAz-derivatisierten basalen Plasmamembran-Proteine zeigte eine wesentlich höhere Auflösung gegenüber der konventionellen Weitwinkel-Fluoreszenzmikroskopie (Bilder siehe Anhang) und lassen die Lokalisation einzelner Glycane erkennen, die homogen über die basale Plasmamembran der primären Myoblasten verteilt sind (Abb. 13 - Abb. 16).

Es zeigte sich in Kontrollexperimenten, dass die Oberflächenbehandlung mit absättigenden, blockierenden Substanzen wie z. B. bovinem Serumalbumin, um eine unspezifische Oberflächenbindung der Fluorophore zu verhindern, nicht erforderlich war. In bereits publizierten Studien mit adhärenenten Kulturzellen auf Lab-Tek Objektträgern hatte sich gezeigt, dass die unspezifische Lokalisation unter 1% lag (Letschert et al., 2014).

4.2.1 Kontrolle 1

Weiblich, M. tibialis anterior, Kontrolle

4.2.1.1 Detaillierte Lokalisationen

Cf	M 1	M 2	M 3	BG 1	BG 2	BG 3
Zelle 1	0562	0625	0629	0103	0116	0102
Zelle 2	0602	0696	0642	0064	0093	0061
Zelle 3	0738	0667	0749	0076	0083	0094
Zelle 4	0981	1014	0999	0168	0141	0160
Zelle 5	0854	0877	0935	0082	0074	0077
Zelle 6	1085	1088	1043	0073	0073	0072

4.2.1.2 Mittelwerte und Nettolokalisationen

Cf	Membranlokalisationen	Hintergrundlokalisationen	Netto-Lokalisationen
Zelle 1	0605	0107	0498
Zelle 2	0647	0072	0575
Zelle 3	0718	0084	0634
Zelle 4	0998	0156	0842
Zelle 5	0889	0078	0811
Zelle 6	1072	0073	0999

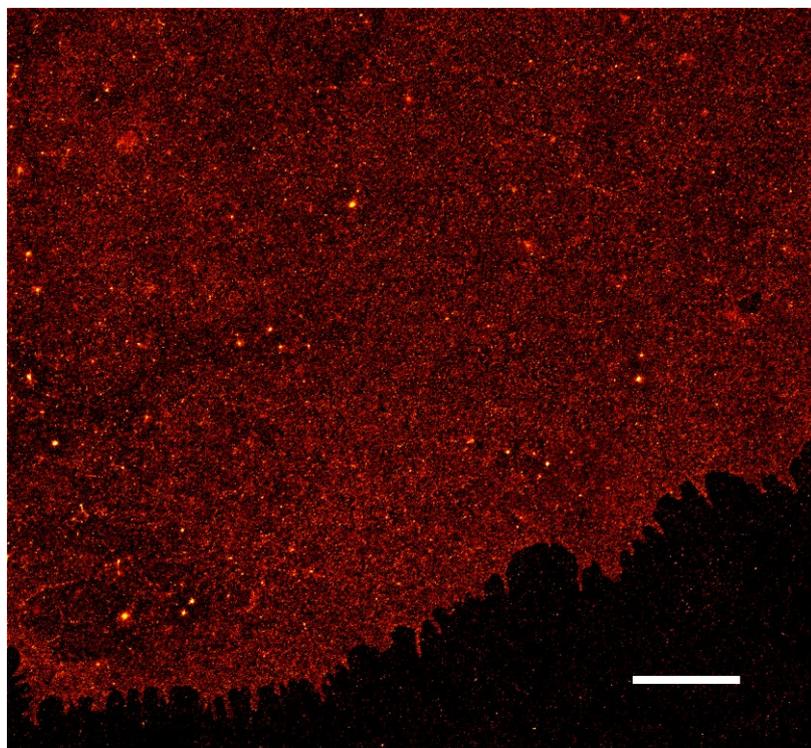


Abb. 13

dSTORM-Aufnahme einer weiblichen Kontrollzelle (repräsentativer Ausschnitt). Es wurden drei Quadrate zur Lokalisationsauswertung (M 1-3) und Hintergrundbestimmung (BG 1-3) ausgewählt.

Maßstabsbalken 1 μ m.

4.2.2 Patient 1

Weiblich, M. tibialis anterior, heterozygote Mutation R42W/F568I

4.2.2.1 Detaillierte Lokalisationen

Pf	M 1	M 2	M 3	BG 1	BG 2	BG 3
Zelle 1	0876	0815	0827	0041	0031	0032
Zelle 2	1329	1352	1346	0117	0066	0069
Zelle 3	1462	1496	1495	0258	0218	0267
Zelle 4	1946	2047	1878	0071	0069	0077

4.2.2.2 Mittelwerte und Netto-Lokalisationen

Pf	Membranlokalisationen	Hintergrundlokalisationen	Netto-Lokalisationen
Zelle 1	0839	0035	0804
Zelle 2	1342	0084	1258
Zelle 3	1484	0248	1236
Zelle 4	1957	0072	1885

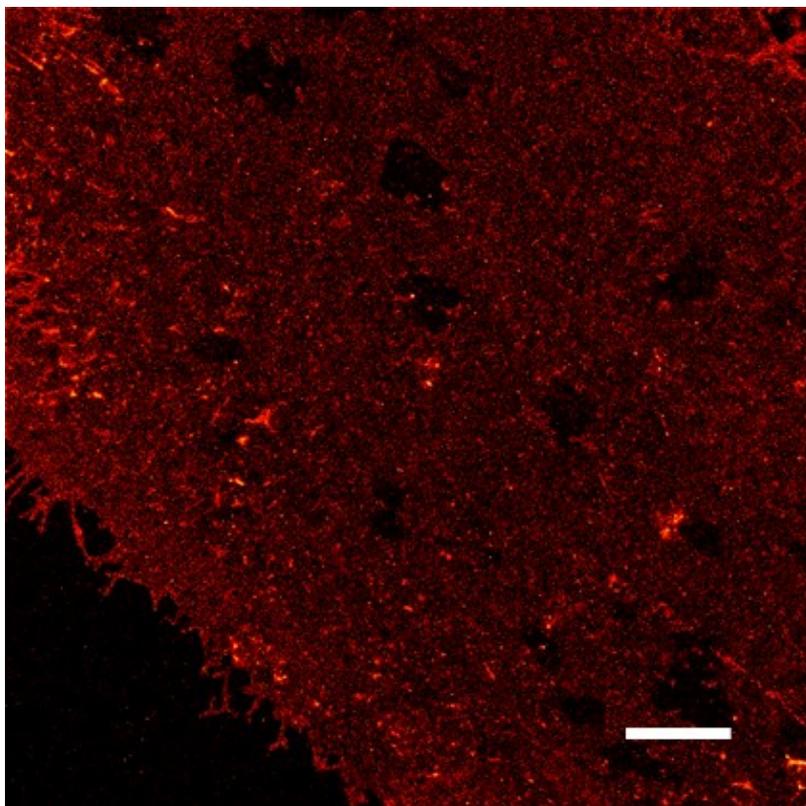


Abb. 14

dSTORM-Aufnahme einer weiblichen GNE-Myopathie Patientenzelle. Es wurden jeweils drei Quadrate zur Lokalisationsauswertung (M 1-3) und Hintergrundbestimmung (BG 1-3) ausgewählt. Maßstabsbalken 1 μ m.

4.2.3 Kontrolle 2

Männlich, M. gastrocnemius, Kontrolle

4.2.3.1 Detaillierte Lokalisierungen

Cm	M 1	M 2	M 3	BG 1	BG 2	BG 3
Zelle 1	0386	0516	0410	0049	0046	0046
Zelle 2	1221	1013	1116	0098	0068	0061
Zelle 3	0801	0781	0774	0045	0030	0046
Zelle 4	0820	0790	0764	0059	0056	0052

4.2.3.2 Mittelwerte und Netto-Lokalisierungen

Cm	Membranlokalisationen	Hintergrundlokalisationen	Netto-Lokalisierungen
Zelle 1	0437	0047	0390
Zelle 2	1117	0076	1041
Zelle 3	0785	0040	0745
Zelle 4	0791	0056	0735

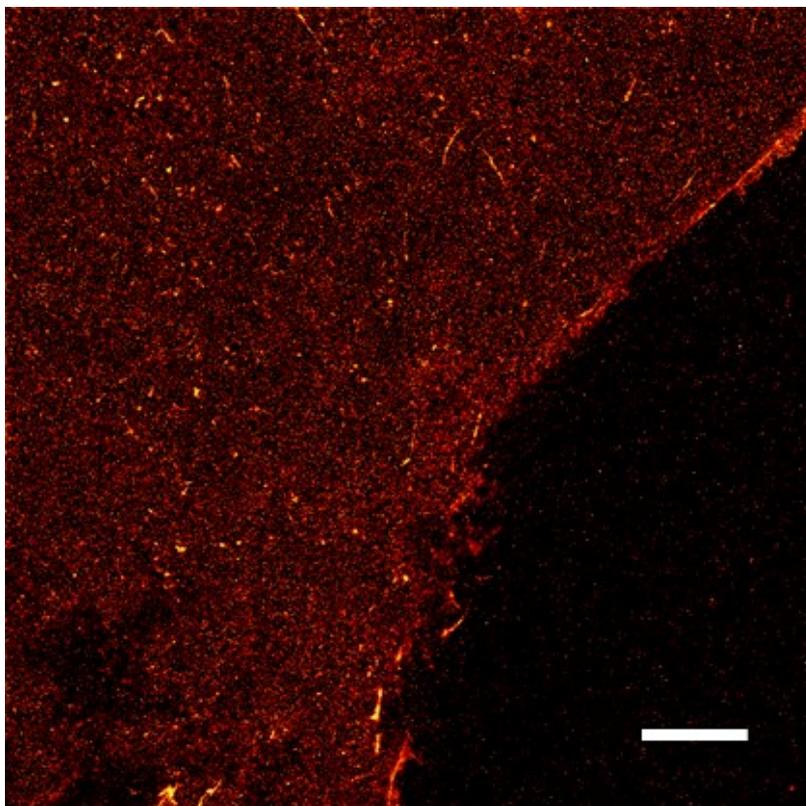


Abb. 15

dSTORM-Aufnahme einer männlichen Kontrollzelle. Es wurden drei Quadrate zur Lokalisationsauswertung (M 1-3) und Hintergrundbestimmung (BG 1-3) ausgewählt. Maßstabsbalken 1 μ m.

4.2.4 Patient 2

Männlich, M. gastrocnemius, homozygote Mutation M743T

4.2.4.1 Detaillierte Lokalisationen

Pm	M 1	M 2	M 3	BG 1	BG 2	BG 3
Zelle 1	2642	2324	2429	0102	0067	0066
Zelle 2	2062	2150	2201	0137	0138	0142
Zelle 3	1756	1652	1681	0161	0129	0157
Zelle 4	2326	2170	2489	0251	0303	0256

4.2.4.2 Mittelwerte und Netto-Lokalisationen

Pm	Membranlokalisationen	Hintergrundlokalisationen	Netto-Lokalisationen
Zelle 1	2465	0078	2387
Zelle 2	2138	0139	1999
Zelle 3	1696	0149	1547
Zelle 4	2328	0270	2058

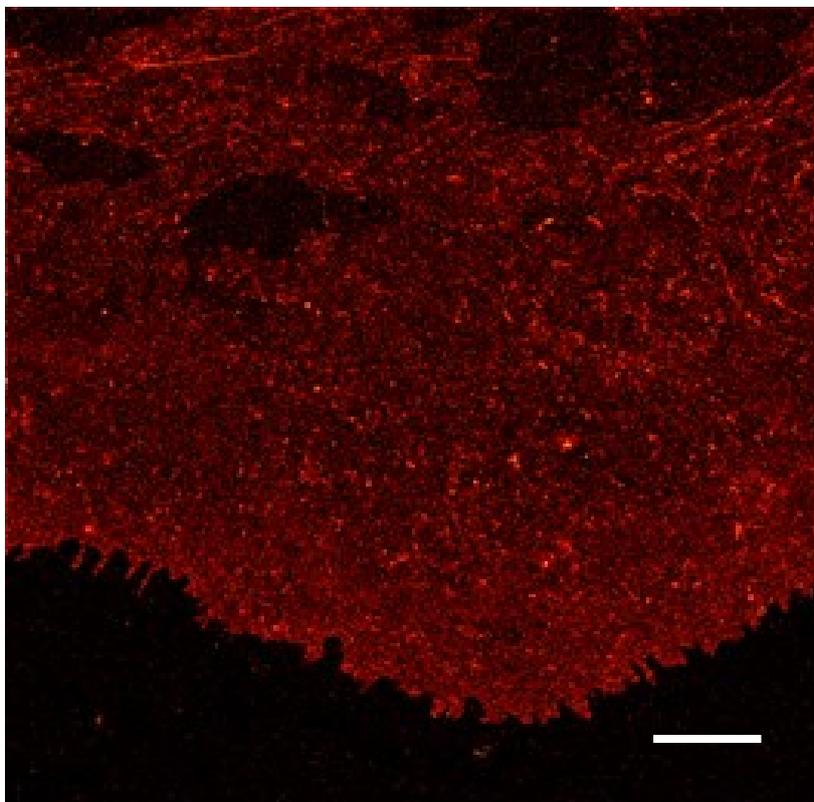


Abb. 16

*d*STORM-Aufnahme einer männlichen GNE-Myopathie Patientenzelle. Es wurden drei Quadrate zur Lokalisationsauswertung (M 1-3) und Hintergrundbestimmung (BG 1-3) ausgewählt. Maßstabsbalken 1 μ m

4.3 Explorative Datenanalyse der dSTORM-Experimente

4.3.1 Deskriptive Statistik

Mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism wurde eine deskriptive Statistik der gemessenen Lokalisationswerte erstellt.

Deskriptive Statistik	B_Cf	Cf	B_Pf	Pf	B_Cm	Cm	B_Pm	Pm
Zahl der Messwerte	15	15	12	12	12	12	12	12
Minimum	61	562	31	815	30	386	66	1652
Maximum	168	1014	267	2047	98	1221	303	2642
Bereich	107	452	236	1232	68	835	237	990
Mittelwert	105,9	771,3	109,7	1406	54,67	782,7	159,1	2157
Std.-Abweichung	31,83	157,8	87	418	16,74	256,9	74,52	320,4
Std.-Fehler der Mittelwerts	8,218	40,74	25,11	120,7	4,833	74,15	21,51	92,5
Unteres 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	88,31	684	54,39	1140	44,03	619,5	111,7	1953
Oberes 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	123,6	858,7	164,9	1671	65,3	945,9	206,4	2360
Variationskoeffizient	30,05%	20,46%	79,33%	29,74%	30,62%	32,82%	46,85%	14,86%
Schiefe (Skewness)	0,6195	0,3696	1,133	-0,03165	1,535	0,002547	0,7491	-0,4013
Kurtosis	-0,1918	-1,461	-0,3366	-0,85	3,905	-0,3716	-0,2146	-0,7933

Tab. 2 Deskriptive Statistik der gemessenen Lokalisierungsdichte von Zelloberflächen-Glycanen nach metabolischer Markierung mit Ac₄ManNAz und Visualisierung durch Click-Chemie und dSTORM.

4.3.2 Test auf Normalverteilung

Zunächst wurde die Normalverteilung der Daten mit Hilfe des Anderson-Darling (A2^{*})-, des D'Agostino-Pearson omnibus (K2)-, des Shapiro-Wilk (W)- und des Kolmogorov-Smirnov (distance)-Tests überprüft. Der Shapiro-Wilk-Test hat eine bessere statistische „Power“ als der Kolmogorov-Smirnov-Test, um eine mögliche Abweichung von der Normalverteilung korrekt zu bestimmen (Razali and Wah, 2011). Die Annahme der Normalverteilung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit weiterer statistischer Testverfahren wie z. B. der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).

Tests auf Normalverteilung

Name des Tests	Statistik	P-Wert	Test auf Normalverteilung positiv (alpha=0,05)?	Zusammenfassung P-Wert
Anderson-Darling (A2*)	5,004	<0,0001	No	****
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	9,644	0,0081	No	**
Shapiro-Wilk (W)	0,8885	<0,0001	No	****
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1756	<0,0001	No	****
Datenzusammenfassung				
Zahl der Zelltypen (in Spalten)	8			
Zahl der Messwerte (gesamt)	102			

Tab. 3 Ergebnisse der Tests auf Normalverteilung

4.3.3 Lokalisationsbefunde

Die Auswertung der Lokalisationen ergab deutlich erhöhte Messwerte bei den von GNE-Mutationen betroffenen Zellen. Während sich die Zellen der Kontrollgruppe mit jeweils mittleren Netto-Lokalisationswerten von 726,5 bei Cf und 727,5 bei Cm befanden, hoben sich die Messungen der erkrankten Zellen im Mittel bei 1295,75 Pf und 1997,75 bei Pm deutlich von ihnen ab.

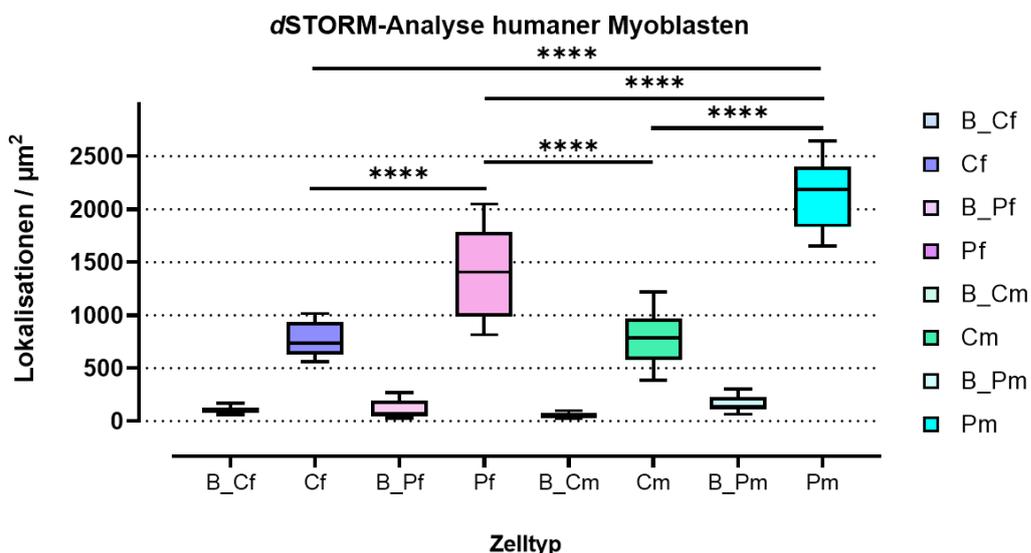


Abb. 17 Box-Plot Darstellung der Rohdaten der Lokalisationssignale in der dSTORM-Analyse: Die Lokalisierungsdichte von Membran-assoziierten Glycanen wurde über DBCO-Cy5 visualisiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts von 4-6 verschiedenen Zellen pro Kontroll- bzw. Patientenzellprobe dar, deren basale Plasmamembranabschnitte jeweils dreimal aufgenommen und ausgewertet wurden.

4.3.4 ANOVA

Es wurde in GraphPad Prism eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) der Lokalisationsdaten der *d*STORM-Analyse durchgeführt.

Bei signifikantem Ergebnis erfolgten Mehrfachvergleiche mit Hilfe des Tukey's *post-hoc* Tests mit einer gemeinsamen Varianz, wobei der Mittelwert eines Datensatzes mit dem Mittelwert jedes weiteren Datensatzes verglichen wurde.

ANOVA Zusammenfassung					
F	155,2				
P-Wert	<0,0001				
P-Wert Zusammenfassung	****				
Signif. Unterschied zwischen Mittelwerten (P < 0.05)?	Ja				
R squared	0,9203				

ANOVA Tabelle	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P-Wert
Zelltypen (in Spalten)	49539703	7	7077100	F (7, 94) = 155,2	P<0,0001
Messwerte (in Spalten)	4287745	94	45614		
Gesamt	53827448	101			

Tukeys multipler Mittelwertvergleich					
Zahl der Gruppen	1				
Zahl der Vergleiche pro Gruppe	28				
Alpha	0,05				

	Mittelwert Differenz	95,00% KI der Differenz	Signifikant?	Zusammenfassung	Korrigierter P-Wert	
B_Cf vs. Cf	-665,4	-907,2 to -423,6	Ja	****	<0,0001	A-B
B_Cf vs. B_Pf	-3,733	-260,2 to 252,7	Nein	ns	>0,9999	A-C
B_Cf vs. Pf	-1300	-1556 to -1043	Ja	****	<0,0001	A-D
B_Cf vs. B_Cm	51,27	-205,2 to 307,7	Nein	ns	0,9985	A-E
B_Cf vs. Cm	-676,7	-933,2 to -420,3	Ja	****	<0,0001	A-F
B_Cf vs. B_Pm	-53,15	-309,6 to 203,3	Nein	ns	0,9981	A-G
B_Cf vs. Pm	-2051	-2307 to -1794	Ja	****	<0,0001	A-H
Cf vs. B_Pf	661,7	405,2 to 918,1	Ja	****	<0,0001	B-C
Cf vs. Pf	-634,4	-890,9 to -378,0	Ja	****	<0,0001	B-D
Cf vs. B_Cm	716,7	460,2 to 973,1	Ja	****	<0,0001	B-E
Cf vs. Cm	-11,33	-267,8 to 245,1	Nein	ns	>0,9999	B-F
Cf vs. B_Pm	612,3	355,8 to 868,7	Ja	****	<0,0001	B-G
Cf vs. Pm	-1386	-1642 to -1129	Ja	****	<0,0001	B-H
B_Pf vs. Pf	-1296	-1566 to -1026	Ja	****	<0,0001	C-D
B_Pf vs. B_Cm	55	-215,3 to 325,3	Nein	ns	0,9984	C-E
B_Pf vs. Cm	-673	-943,3 to -402,7	Ja	****	<0,0001	C-F
B_Pf vs. B_Pm	-49,42	-319,7 to 220,9	Nein	ns	0,9992	C-G
B_Pf vs. Pm	-2047	-2317 to -1777	Ja	****	<0,0001	C-H
Pf vs. B_Cm	1351	1081 to 1621	Ja	****	<0,0001	D-E
Pf vs. Cm	623,1	352,8 to 893,4	Ja	****	<0,0001	D-F
Pf vs. B_Pm	1247	976,3 to 1517	Ja	****	<0,0001	D-G
Pf vs. Pm	-751,1	-1021 to -480,8	Ja	****	<0,0001	D-H
B_Cm vs. Cm	-728	-998,3 to -457,7	Ja	****	<0,0001	E-F
B_Cm vs. B_Pm	-104,4	-374,7 to 165,9	Nein	ns	0,9307	E-G
B_Cm vs. Pm	-2102	-2372 to -1832	Ja	****	<0,0001	E-H
Cm vs. B_Pm	623,6	353,3 to 893,9	Ja	****	<0,0001	F-G
Cm vs. Pm	-1374	-1644 to -1104	Ja	****	<0,0001	F-H
B_Pm vs. Pm	-1998	-2268 to -1727	Ja	****	<0,0001	G-H

Tab. 4 ANOVA-Daten und Tukey *post-hoc*-Test

Der Tukey *post-hoc* Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen zugehörigen Hintergrundlokalisationen im Vergleich zu den gefärbten Zellen ($p < 0,0001$). Des Weiteren fand sich eine signifikant erhöhte Signalstärke zwischen gefärbter Kontrolle und gefärbten Patientenzellen (alle P-Werte $> 0,0001$).

Verglichen wurden hierbei folgenden Gruppen:

- a) Männliche Patientenzellen mit männlichen Kontrollzellen
- b) Weibliche Patientenzellen mit weiblichen Kontrollzellen
- c) Sämtliche Patientenzellen mit Kontrollzellen
- d) Männliche mit weiblichen Patientenzellen

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei männlichen und weiblichen Kontrollzellen.

Es ist möglich, dass der signifikante Unterschied des SiaNAz-Signals bei männlichen und weiblichen GNE-Myopathie-Zellen auf die zugrundeliegenden Mutationen zurückzuführen ist.

4.4 FACS-Analyse: ManNAz-Markierung mit Inhibition und Competition

Das SiaNAz-Signal zeigt sich nur bei den beiden Knockout-Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne ManNAz signifikant erhöht, da der unspezifische Hintergrund der WT-C2C12-Linie relativ hoch erschien.

Tunicamycin ist ein Gemisch aus einem homologen Nukleosid-Antibiotikum, das die N-Glycosylierung hemmt und die GlcNAc-Phosphotransferase (GPT) blockiert. Tunicamycin induziert ER-Stress und verursacht die Akkumulation ungefalteter Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER).

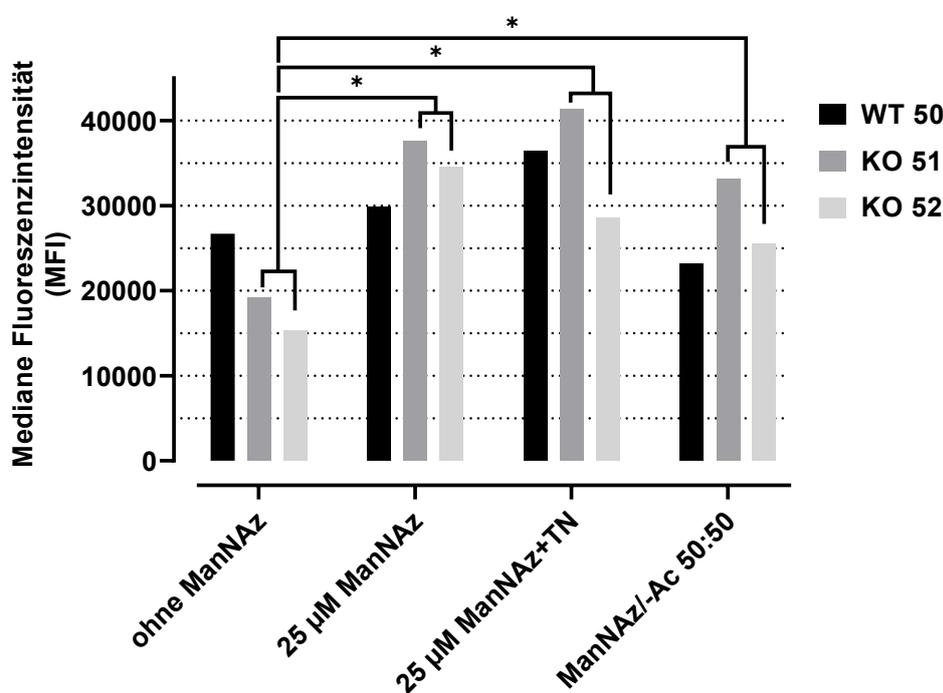


Abb. 18 FACS-Analyse von metabolisch markierten C2C12-Zellen mit 25 µM ManNAz. Die Inhibition der N-Glycosylierung durch Tunicamycin (TU) ergab keine signifikante Reduktion des SiaNAz-Signals. Im Competitionsexperiment mit der Kombination von 12,5 µM Ac₄ManNAz und 12,5 µM ManNAc zeigte sich eine leicht reduzierte MFI im Vergleich zu den jeweiligen Zelllinien, die nur mit 25 µM ManNAz supplementiert wurden.

Allerdings fand sich nach Tunicamycin-Behandlung über Nacht keine wesentliche Reduktion des SiaNAz-Signals, obwohl sich die Zellen unter der relativ geringen Tunicamycin-Konzentration von 5 µM teilweise bereits von der Kulturschale ablösten. Daher wurde kein erneuter Versuch mit einer höheren Tunicamycin-Konzentration durchgeführt.

ManNAz kann durch ManNAc während der metabolischen Markierung auskompetiert werden. Allerdings zeigte sich der kompetitive Effekt nicht in dem Maße, wie der Anteil von 50% ManNAc im Medium nahelegen würde. Das SiaNAz-Signal war nur um 22% beim WT, um 12% bei der Knockout-Linie 51 und um 26% bei der Knockout-Linie 52 im Vergleich mit den bei 25 μ M ManNAz markierten Zellen vermindert.

Eine mögliche Erklärung liegt in Unterschieden der zellulären Aufnahme der Substrate. Die Zellmembran ist besser permeabel für das tetra-acetylierte ManNAz (Ac_4 ManNAz) und könnte von den Zellen leichter aufgenommen werden als das unmodifizierte ManNAc.

4.5 FACS-Analyse: Lectinfärbung metabolisch markierter C2C12 Zelllinien

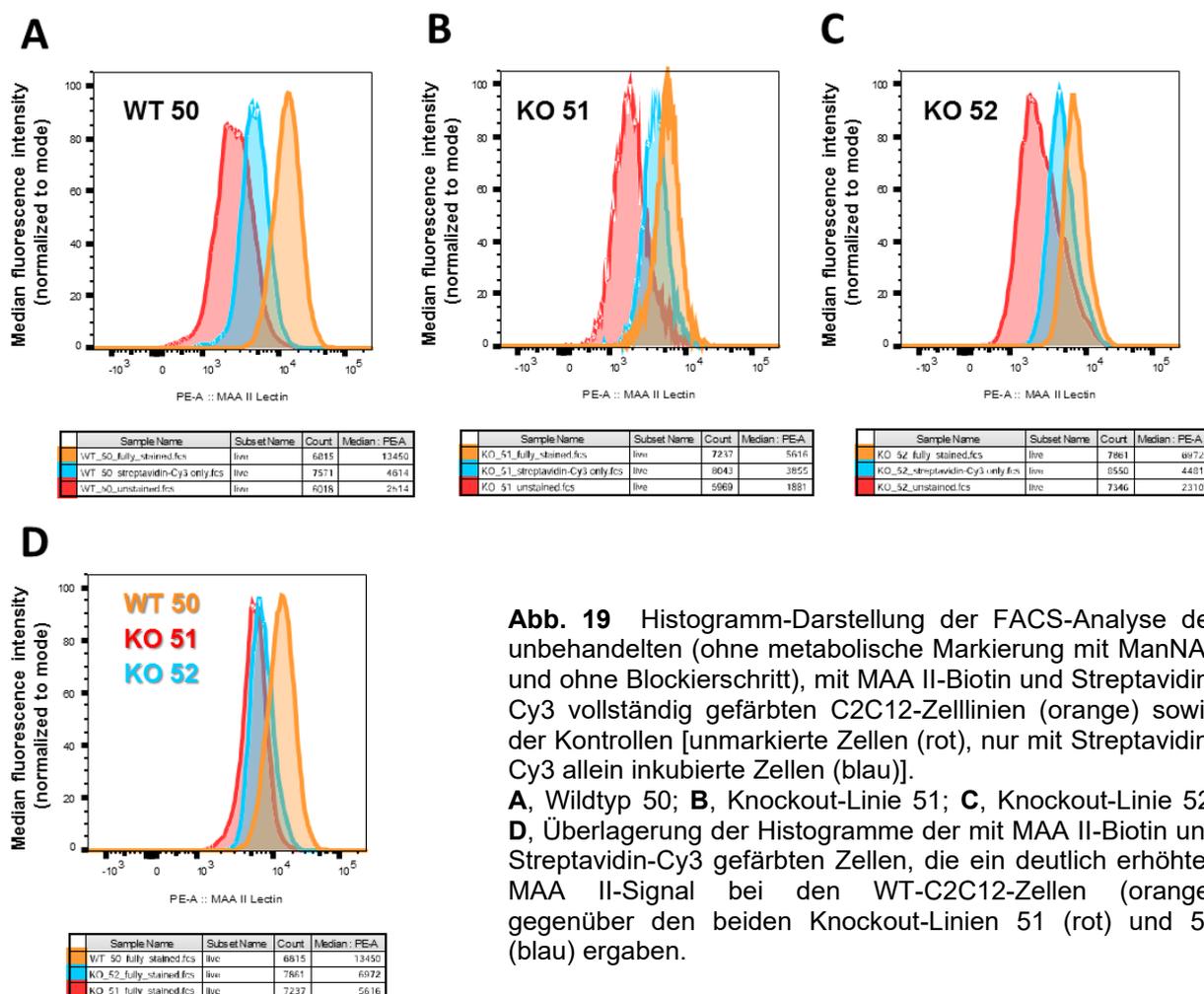


Abb. 19 Histogramm-Darstellung der FACS-Analyse der unbehandelten (ohne metabolische Markierung mit ManNAz und ohne Blockierschritt), mit MAA II-Biotin und Streptavidin-Cy3 vollständig gefärbten C2C12-Zelllinien (orange) sowie der Kontrollen [unmarkierte Zellen (rot), nur mit Streptavidin-Cy3 allein inkubierte Zellen (blau)].

A, Wildtyp 50; **B**, Knockout-Linie 51; **C**, Knockout-Linie 52; **D**, Überlagerung der Histogramme der mit MAA II-Biotin und Streptavidin-Cy3 gefärbten Zellen, die ein deutlich erhöhtes MAA II-Signal bei den WT-C2C12-Zellen (orange) gegenüber den beiden Knockout-Linien 51 (rot) und 52 (blau) ergaben.

Zunächst wurde zur Kontrolle die Färbung von unmarkierten Zellen mit MAA II-Lectin durchgeführt, das an Biotin gekoppelt war und in einem zweiten Schritt über Streptavidin-gekoppeltes Cy3 detektiert wurde.

Die FACS-Analyse wurde im PE-Kanal gemessen, da die Anregungs- und Emissions-Spektren von PE und Cy3 vergleichbar sind.

Die Histogramm-Darstellung zeigt die Werte für die Kontrollen (ungefärbte Zellen und mit Streptavidin-Cy3 allein inkubierte Zellen) sowie die mit MAA II-Biotin und Streptavidin-Cy3 vollständig gefärbten C2C12-Zellen. Es wurden jeweils der Median der Fluoreszenzintensitäten von 10.000 Ereignissen bestimmt (Abb. 19).

Die Wildtyp-Zellen zeigten ein starkes MAA II-Signal, das auf α 2,3-verknüpfte terminale Sialinsäure auf der Zelloberfläche hinweist, wohingegen die beiden KO-Linien ein deutlich geringeres Signal aufwiesen. Die Signalstärke für die Kontrollen war für die ungefärbten Zellen und die mit Streptavidin-Cy3 inkubierten Zellen jeweils für alle drei Zelllinien vergleichbar (s. Abb. 20 A).

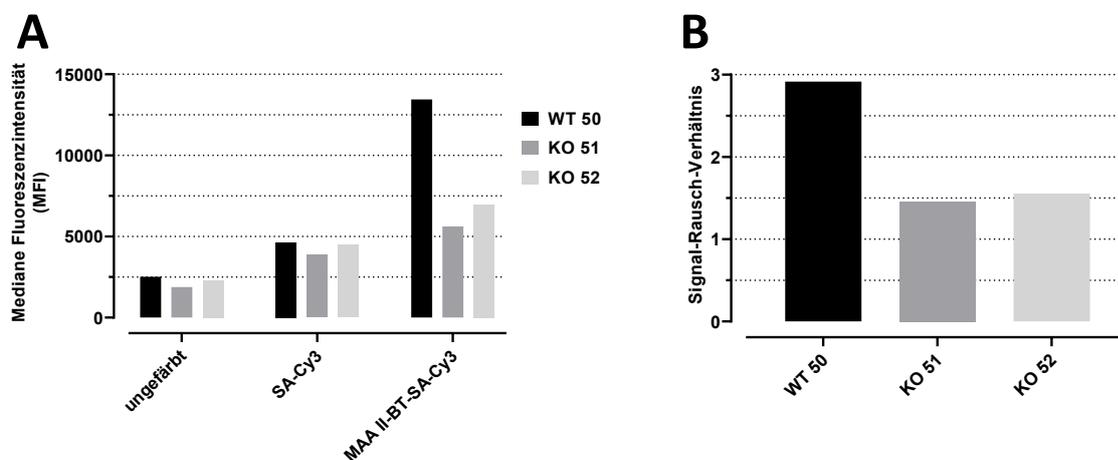


Abb. 20 Quantifizierung der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) der mit MAA II-Biotin (MAA II-BT) und Streptavidin-Cy3 (SA-Cy3) gefärbten Zelllinien im Vergleich zu Kontrollen ohne metabolische Markierung mit ManNAz und ohne Blockierschritt nach FA-GA Fixierung (s. **Abb. 19**). Die WT 50-Zellen zeigen ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis [Signal-to-Noise-Ratio (S/N)] im Vergleich zu den KO-Linien unter Verwendung der jeweiligen SA-Cy3-Werte.

Allerdings hatten die WT 50-Zellen ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis [Signal-to-Noise-Ratio (S/N)] im Vergleich zu den KO-Linien unter Verwendung der jeweiligen SA-Cy3-Werte (s. Abb. 20 B).

In weiteren Experimenten wurden C2C12-Wildtyp- und GNE-Knockout-Myoblasten metabolisch mit 2,5 und 12,5 mM ManNAz über 12 h markiert. SiaNAz- und SiaNAc-Reste an der Zelloberfläche wurden nach Fixierung mit Fluorochrom-basierter Lectinfärbung dargestellt. Es erfolgte die simultane Färbung mit HPA, das direkt mit FITC gekoppelt war und mit MAA II-Biotin, das in einem weiteren Schritt mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin detektiert wurde.

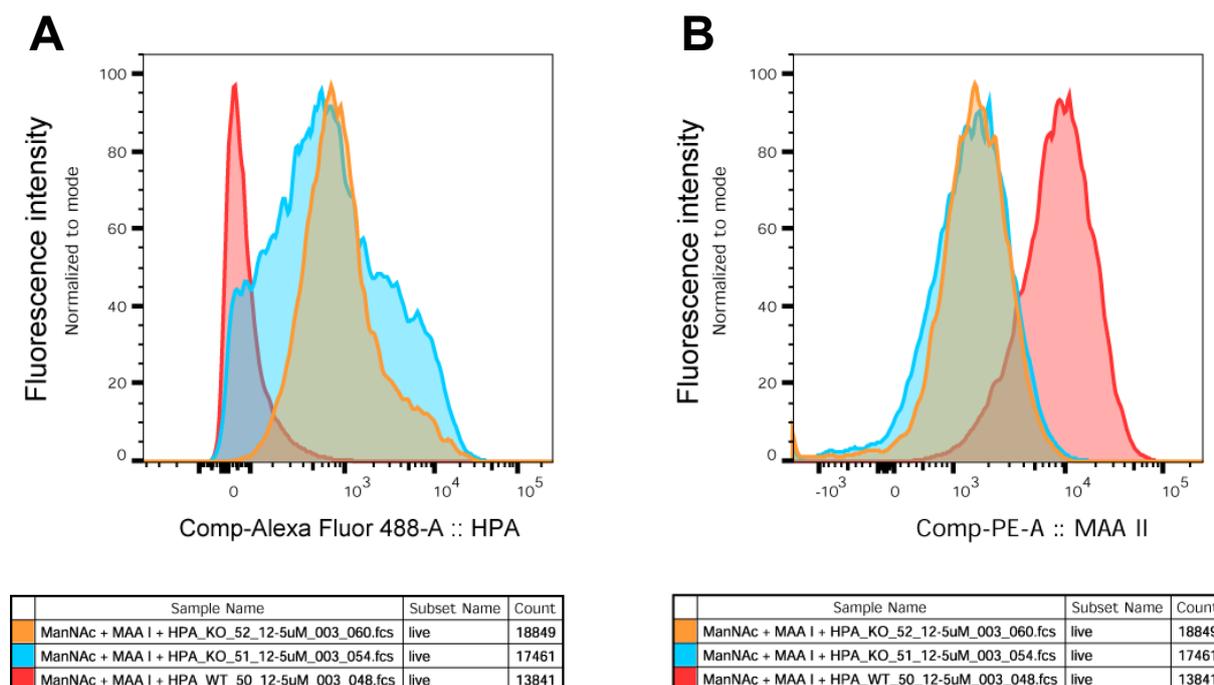


Abb. 21 **A** HPA und **B** MAA II Färbung: Durchflusszytometrie von C2C12 Zellen nach metabolischer Markierung mit 12,5 μ M ManNAz. Jeweils 10.000 Ereignisse in Einzelzellen wurden pro Probe dokumentiert. Repräsentative Histogramme aus jeweils drei unabhängigen Messungen sind gezeigt.

Die Fluoreszenzintensität des HPA-Signals beider Mutanten war im Mittel um den Faktor 1000 erhöht. Die Wildtyp-Zellen wurden kaum mit HPA gefärbt. Dagegen zeigte die MAA II-Färbung bei Wildtyp-Zellen um eine Größenordnung (Faktor 10) höhere Werte, während die mittlere Fluoreszenzintensität der KO-Zellen mit dem MAA II Lectin im Bereich der HPA-Färbung lag.

Die erhöhte HPA-Färbung kann indirekt auf fehlende terminale Sialinsäure-Reste hinweisen, wenn die darunter gelegenen Galactosamin-Resten freiliegen und verstärkt an HPA gebunden werden können.

Das starke MAA II-Signal der Wildtyp-C2C12-Zellen deutet auf einen großen Anteil endständiger Sialylreste in α 2,3-Verknüpfung hin. Bei den KO-Zellen waren die durch MAA II detektierbaren Sialylreste im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 10 geringer.

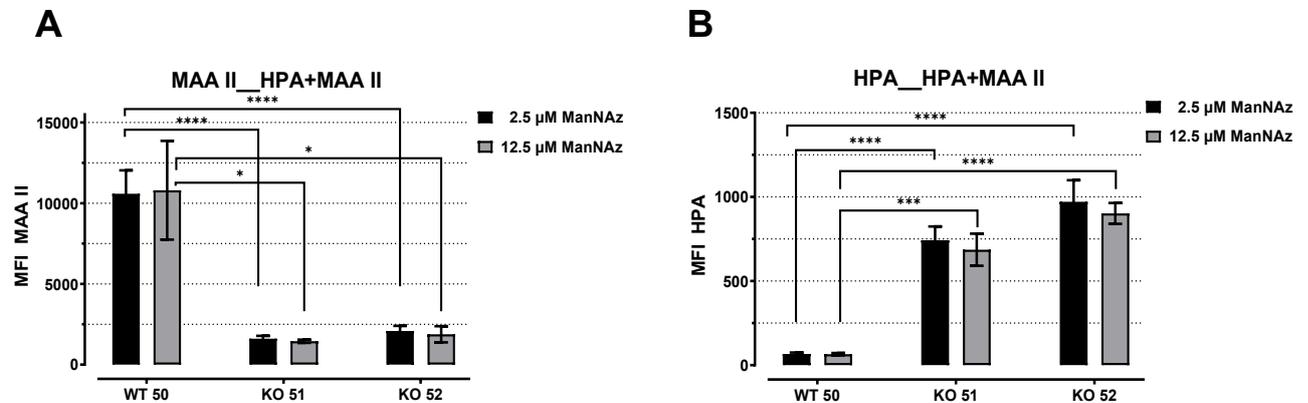


Abb. 22 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der simultanen MAA II- und HPA-Lectinfärbung von C2C12-Zelllinien, die nativ (ohne Fixierung und ohne Blockierschritt) mit zwei verschiedenen Konzentrationen an ManNAz (2,5 μ M und 12,5 μ M) metabolisch-markiert wurden. Die ManNAz-Substitution zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf das MAA II- oder HPA-Signal beim Vergleich der beiden Konzentrationen.

Es zeigten sich vergleichbare Resultate der MAA II- und HPA-Färbung in nativen Zellen, die erst nach Lectin-Bindung auf Eis fixiert wurden, um Membran-Internalisierung zu vermeiden. Erst nach erfolgter Färbung bei 4°C mit dem jeweiligen Fluorochrom-markierten Lectin wurden die Zellen mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd fixiert, um eine Veränderung oder Verfälschung der Lectin-Bindung durch die Fixierung zu umgehen.

Auch in dieser Versuchsanordnung zeigten sich Hinweise auf eine Verminderung der endständigen Sialylreste in α 2,3-Verknüpfung bei den C2C12-KO Linien. Ein DTNB-Blockierschritt wurde bei diesen Versuchen nicht durchgeführt.

Um den unklaren Einfluss der Fixierungsmethode auf die Lectinbindung im Detail zu untersuchen, wurden in weiteren Bestätigungsexperimenten Färbungen mit jeweils einzelnen Lectinen nach metabolischer Markierung mit 12,5 μ M ManNAz über 24 h durchgeführt, um die Stoffwechselsituation der über Click-Chemie gefärbten Zellen zu simulieren.

Hierbei blieb die MAA-II-Färbung bei den WT-Zellen hochsignifikant höher als bei den KO-Zelllinien (Abb. 23 A).

In der Einzelfärbung mit HPA in fixierten Zellen (Abb. 23 B) zeigte sich ein vergleichsweise sehr starkes HPA-Signal möglicherweise durch die einfache direkte Färbung mit FITC-gekoppeltem HPA oder durch fehlende sterische Behinderung durch ein zweites Lectin (MAA II-Biotin in Abb. 22) während der Inkubation. Ähnlich wie bei der simultanen Lectin-Färbung mit HPA (Abb. 22) bestätigte sich eine signifikant höhere Färbung der KO-Zelllinien.

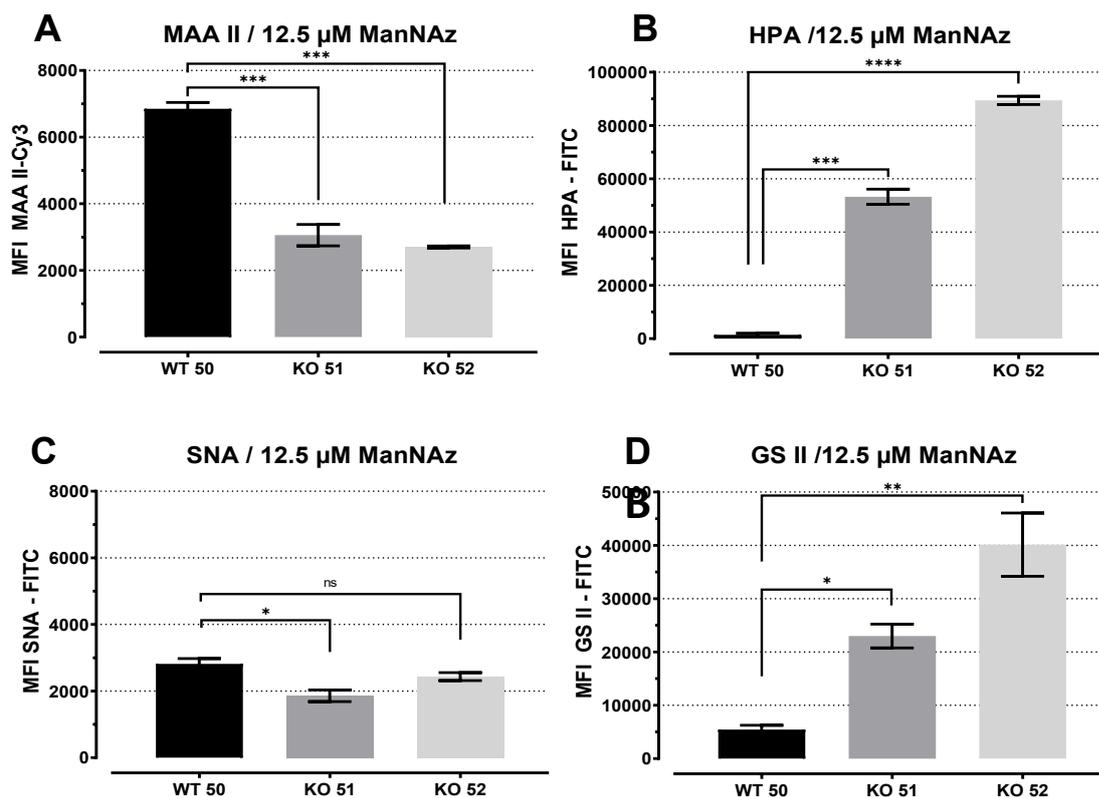


Abb. 23 A - D Lectinfärbungen nativer, mit 12,5 µM ManNAz metabolisch markierter C2C12-Zelllinien und nachfolgender Paraformaldehyd / Glutaraldehyd (PFA-GA)-Fixierung (keine DTNB-Behandlung).

SNA bindet bevorzugt an Sialinsäure, die an terminale Galaktose in α -2,6 und in geringerem Maße in α -2,3-Bindung an N-Acetylgalactosamin oder Galactose gebunden ist. Die Intensität des SNA-FITC-Signals ist im Vergleich zum MAA II-Signal geringer und zeigt nur zwischen C2C12 WT und der KO 51-Linie einen gering signifikanten Unterschied (Abb. 23 C).

GS-II bindet terminales *N*-Acetyl-D-Glucosamin, eine Glycanstruktur, von der zu erwarten wäre, dass sie in korrekt modifizierten Oberflächenproteinen mit terminalen Sialinsäureanteilen selten ist. Daher würde eine verringerte Sialylierung zu einer

erhöhten GS-II-Markierung führen. Dies bestätigt sich in den beiden C2C12-KO-Linien die auch unter ManNAz-Substitution ein im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich erhöhtes GS-II-Signal zeigen (Abb. 23 D).

4.6 FACS der DBCO-Cy5-Färbung metabolisch markierter C2C12 Zelllinien

Um die Ergebnisse der dSTORM-Analyse von primären GNE-Myopathie-Patientenzellen mit einer unabhängigen Methode zu untersuchen, wurde die metabolische Markierung im Zellkulturmodell mit myogenen WT und GNE-Knockout-C2C12-Zellen durchgeführt. Die Zucker-Derivate wurden mit Hilfe der DBCO-Cy5-vermittelten Click-Reaktion auf der Zelloberfläche sichtbar gemacht.

Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung durch DBCO-Cy5 wurde nach den erfolglosen FACS-Versuchen mit Maleimide und Iodoacetamid stattdessen Ellmann's Reagenz (DTNB) verwendet, das in der versuchsweisen Fluoreszenzmikroskopie von C2C12-Zellen eine Reduktion der vermuteten Hintergrundfärbung ergeben hatte.

Im Gegensatz zu metabolisch mit ManNAz markierten, unbehandelten Zellen zeigte sich mikroskopisch ein abgeschwächtes Fluoreszenzsignal in den mit DTNB behandelten Zellen bei identischer Belichtungszeit, nicht jedoch in den mit Iodoacetamid oder Maleimid inkubierten Ansätzen. Daher lag die Annahme nahe, dass DTNB ein effizientes Blockier-Agens für die FACS-Analyse sein könnte.

Um den unspezifischen Hintergrund der DBCO-Cy5-Färbung in der FACS-Analyse zu verringern, wurde zusätzlich der Versuch unternommen, das Farbstoffkonjugat DBCO-Cy5 herunterzutitrieren.

Die Konzentration von DBCO-Cy5 war bei 2,5 μM möglicherweise etwas zu gering, um das Signal der metabolischen Markierung mit 5 μM ManNAz adäquat darzustellen. Die identisch markierten Zellen zeigten bei 12,5 μM ein erhöhtes SiaNAz-Signal (s. Abb. 19), was für eine unzureichende Effizienz der Färbung bei der sehr geringen Konzentration von 2,5 μM DBCO-Cy5 spricht.

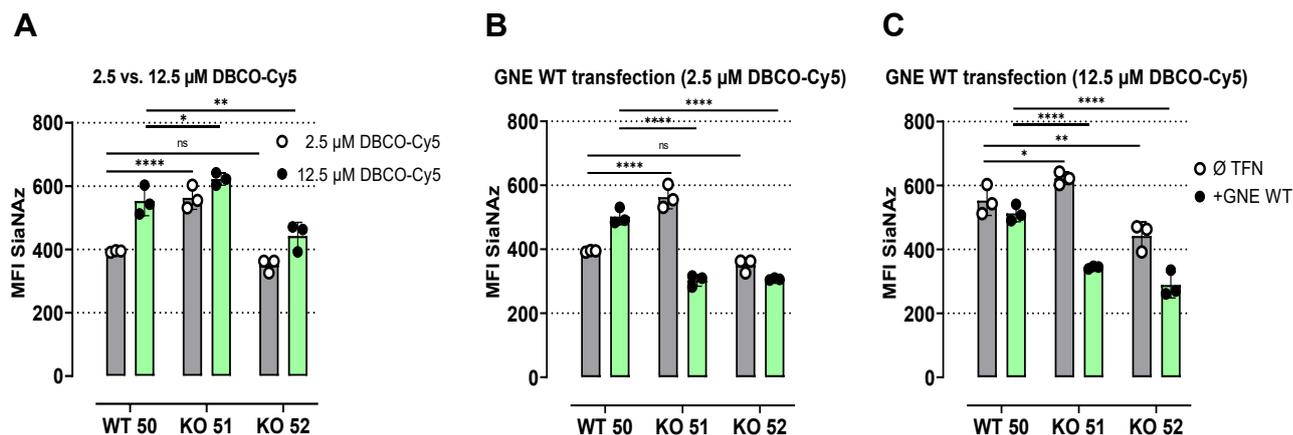


Abb. 24 **A** Glykokonjugat-Detektion mit DBCO-Cy5 in absteigender Konzentration nach ManNAz-Markierung. **B** und **C** Rescue (Wiederherstellungs)-Experiment mit Transfektion eines GNE WT Expressions-Konstrukts in WT und GNE-defiziente Zellen KO 51 und KO 52 (Blockierschritt mit DTNB).

In einem Rescue (Wiederherstellungs)-Experiment mit transienter Transfektion eines WT-GNE-Expressionskonstrukts (Abb. 24 C) zeigte sich überraschenderweise in der FACS-Analyse eine hochsignifikante Verringerung des SiaNAz-Signals, wohingegen die Transfektion in WT-Zellen keine wesentliche Änderung ergab.

Dieses Färbeverhalten unter DTNB-Blockade steht im Widerspruch zu den weiteren Transfektions-Experimenten ohne DTNB. Sowohl bei Detektion mit DBCO-Cy5 als auch über DBCO-Biotin/Streptavidin-Cy3 fand sich ein Anstieg des Fluoreszenzsignals sowohl im WT als auch hochsignifikant bei KO 51. Dies spricht für eine unerwartete Artefaktbildung unter DTNB-Blockade, so dass DTNB kein geeignetes Agens ist, um unspezifische DBCO-Bindung bei Abwesenheit von Azido-Zuckeranaloga in der Click-Reaktion zu vermindern.

Ohne Transfektion fand sich zwischen WT- und KO 51-Zellen eine signifikante Signalerhöhung, die an die beobachtete Signalerhöhung in der *d*STORM-Analyse in GNE-Myopathie-Patientenzellen erinnert.

Im Konkurrenzexperiment mit einem doppelten Überschuss an ManNAc gegenüber dem tetraacetylierten Zuckeranalogon Ac₄ManNAz zeigten sich nicht für alle Vergleiche zwischen WT und Mutanten signifikante Ergebnisse (Abb. 25 A).

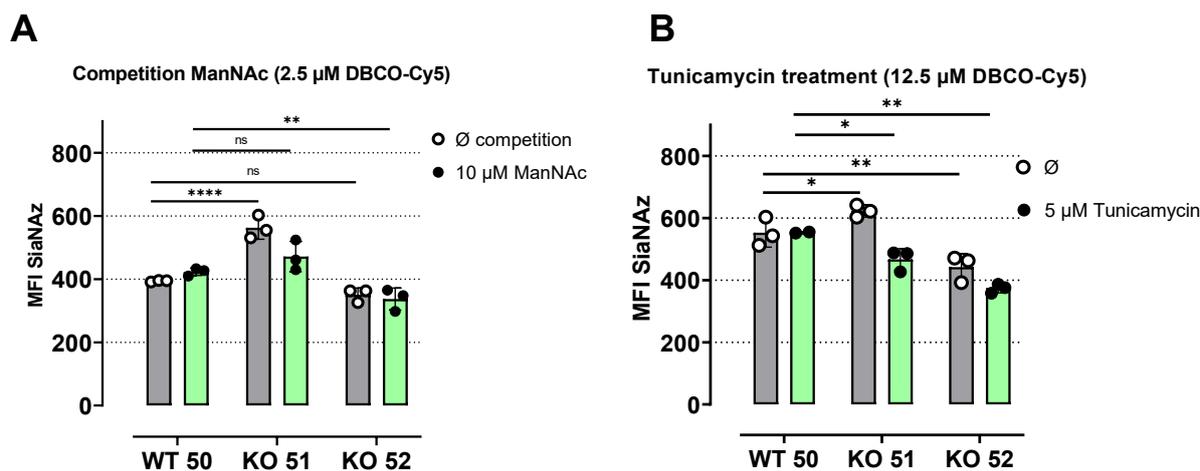


Abb. 25 **A** Konkurrenz (Competition) und Inhibition der Glycosylierung. Konkurrenz mit 10 μ M ManNAc: Die mit 5 μ M ManNAz über 24 h metabolisch markierten Zellen wurden mit 2,5 μ M DBCO-Cy5 detektiert. **B** Bei Tunicamycin-Behandlung und metabolischer Markierung mit 5 μ M ManNAz fanden sich in der Detektion mit 12,5 μ M DTNB-Cy5 signifikante Unterschiede zu den WT Zellen (Blockierschritt mit DTNB).

Eine Validierung der Ergebnisse mit höheren absoluten Konzentrationen an Ac₄ManNAz / ManNAc und anschließender Detektion mit 12,5 μ M DBCO wäre sinnvoll bei vertretbarer Hintergrundfärbung.

Die Tunicamycin-Behandlung (s. Abb. 25 B) ergab eine signifikante SiaNAz-Signalreduktion der KO-Linien im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, bei denen sich durch die Inhibition der N-Glycosylierung kein wesentlicher Unterschied zeigte.

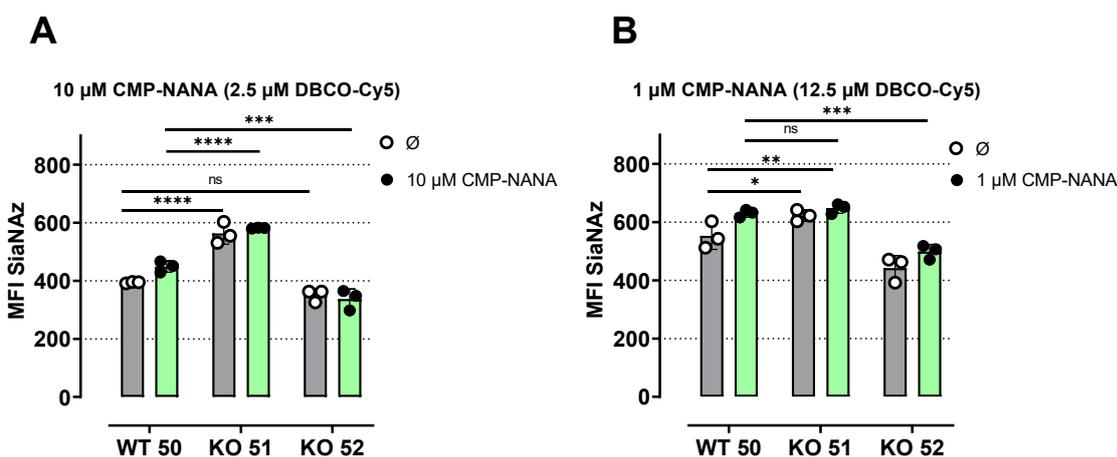


Abb. 26 Feedback-Inhibition (Rückkopplungshemmung der Neuraminsäuresynthese) mit CMP-N-Acetylneuraminsäure (CMP-NANA). Die Detektion mit DBCO-Cy5 erfolgte nach einem Blockierschritt mit DTNB.

Die Endprodukthemmung zeigte keine wesentlichen Veränderungen des SiaNAz-Signals (Abb. 26). Es fanden sich nur die vorbekannten signifikanten Unterschiede

zwischen WT und KO-Zellen. Mögliche Gründe hierfür sind eine zu geringe CMP-NANA Konzentration im Kulturmedium und eine unzureichende Aufnahme der aktivierten Sialinsäure in die behandelten Zellen.

Die unterschiedliche Konzentration von DBCO-Cy5 (2,5 und 12,5 μM) zur SiaNAz-Detektion ergab nur eine Änderung des absoluten SiaNAz-Signals bei allen Zelllinien (Vergleich von Abb. 26 A und B).

Zusammenfassend ließ die DTNB-Behandlung allerdings keine Verminderung des Hintergrund-Signals in der statistischen Auswertung der FACS-Resultate erkennen. Vielmehr zeigte sich eine so hohe unspezifische Färbung, dass der Unterschied zwischen WT und KO-Zellen nicht mehr zu erkennen war. Darüber hinaus standen die Resultate des GNE WT-Transfektions-Experiments (Rescue-Experiments) im Widerspruch zu den Wiederholungsexperimenten mit Click-Reaktion über DBCO-Cy5 oder DBCO-Biotin.

In allen nachfolgenden Experimenten wurde kein Blockierschritt mehr zur Absättigung freier Sulfhydryl-Gruppen eingesetzt, da alle Maßnahmen zur Reduktion einer unspezifischen Hintergrundfärbung von DBCO mit Ausnahme der direkten nativen Färbung zu einem teils sehr starken unspezifischen Signal führten (Details s. Abb. 29).

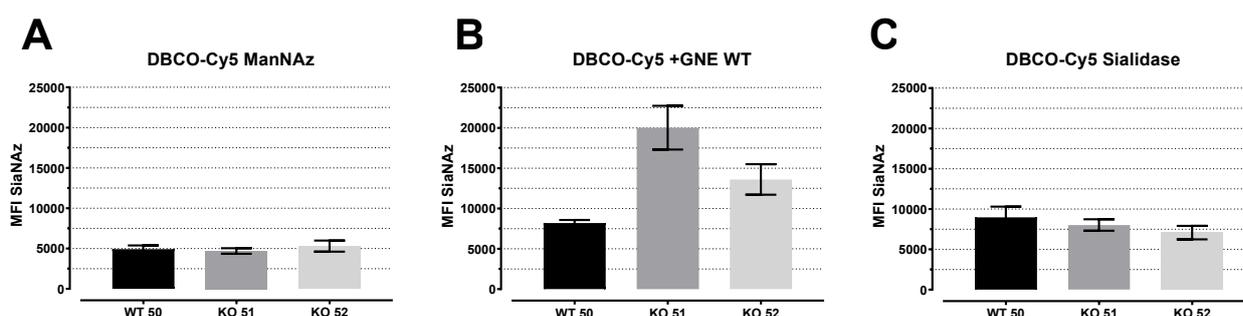


Abb. 27 DBCO-Cy5-Detektion von Oberflächenglycokonjugaten nach metabolischer Markierung mit 12,5 μM ManNAz über 24 h (FA-GA-Fixierung, kein DTNB-Blockierschritt) und quantitativer FACS-Analyse. A, ohne weitere Behandlung, B, mit transienter Transfektion eines GNE WT Expressions-Konstrukts über 24 h, C, mit Sialidase-Behandlung zur Entfernung endständiger Neuraminsäurereste. Darstellung der Daten als Median mit 95%igem Konfidenzintervall.

Eine ANOVA-Auswertung zeigte, dass sich kein signifikanter Unterschied im Cy5-Signal zwischen WT und der jeweiligen KO-Linie finden ließ (Abb. 27 A), $F(2,6) = 1,040$; $p = 0,410$ (A). Bei Transfektion eines GNE WT-Expressionskonstrukts, ließen sich interessanterweise signifikante Unterschiede belegen [$F(2,6) = 28,42$; $p = 0,0009$], und zwar zwischen WT 50 und KO 51 ($p = 0,0005$) sowie zwischen WT und KO 52 ($p = 0,0244$). Nach Sialidase-Behandlung ließen sich in nicht-transfizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede nachweisen [$F(2,6) = 2,687$; $p = 0,1468$].

Neben der metabolischen Markierung mit ManNAz wurden als Zuckeranaloga auch GlcNAz und GalNAz verwendet, um Stoffwechselunterschiede bei WT und KO-Zellen zu überprüfen.

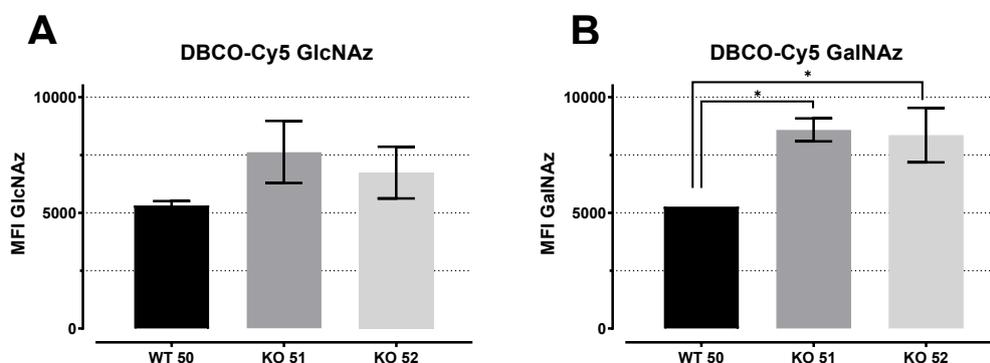


Abb. 28 DBCO-Cy5-Detektion von Oberflächenglycokonjugaten nach metabolischer Markierung mit A 12,5 μM GlcNAz sowie B 12,5 μM GalNAz über 24 h und quantitativer FACS-Analyse. Median mit 95%igem Konfidenzintervall.

Mit GlcNAz fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Zelloberflächenfärbung nach Detektion mit DBCO-Cy5 [$F(2,6) = 3,979$; $p = 0,0794$] (Abb. 28 A).

Allerdings zeigte eine ANOVA-Auswertung bei der Markierung mit GalNAz [$F(2,5) = 11,86$; $p = 0,0127$], dass ein signifikanter Unterschied zwischen WT C2C12-Zellen und den KO 51 ($p = 0,0109$) und KO 52-Zellen ($p = 0,0145$) besteht (s. Abb. 28 B).

4.7 FACS-Analyse: Unspezifischer Hintergrund der DBCO-Cy5-Detektion

Unbehandelte C2C12-Wildtyp-Zellen (WT) und die beiden Knock-out (KO)-Linien wurden ohne metabolische Markierung mit einem Azido-Zucker mit verschiedenen Methoden fixiert und mit DBCO-Konjugaten inkubiert, um systematisch die unspezifische Hintergrundmarkierung zu überprüfen. Die Inkubation mit DBCO-Cy5 oder DBCO-PEG4-Biotin, erfolgte stets bei 4°C, um Membran-Internalisierung zu minimieren, damit nur das Oberflächensignal an der Zellmembran detektiert wurde.

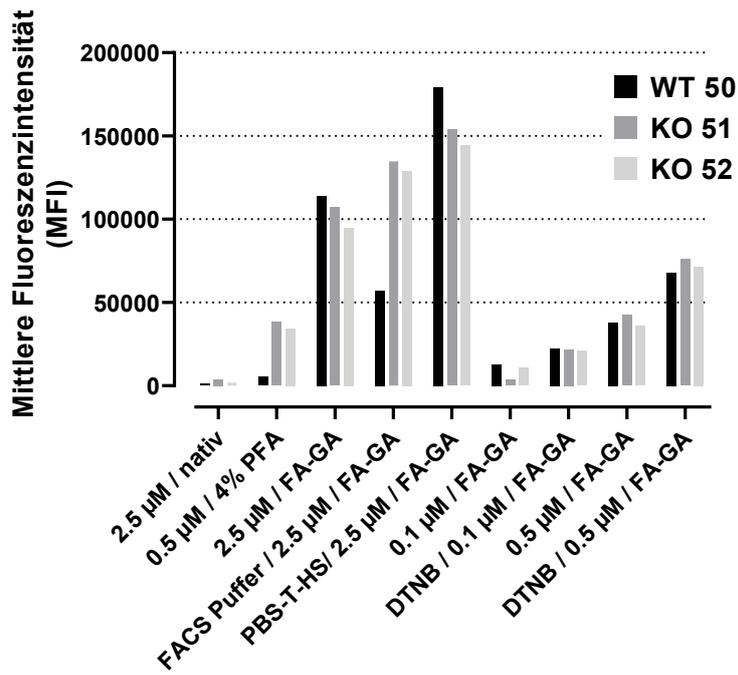


Abb. 29 Durchflusszytometrie-Analyse unmarkierter Zellen zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrund-Färbung durch DBCO-Cy5. Die mediane Fluoreszenzintensität lebender Einzelzellen wurde aufgenommen (jeweils 10.000 Ereignisse). Die verwendete DBCO-Cy5-Konzentration ist in μM angegeben. Die Zellen waren unfixiert (nativ) oder wurden mit 4% Paraformaldehyd/PBS oder 4% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd/ PBS fixiert. Ellmann's Reagenz [DTNB, 5,5-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)] erhöhte sogar noch das unspezifische Fluoreszenzsignal, selbst mit sehr geringen Konzentrationen von DBCO-Cy5 (0,1 und 0,5 μM), die nicht mehr zur ausreichenden Detektion von SiaNAz-Konjugaten geeignet waren.

Zwei Blockierpuffer (FACS-Puffer und PBS-Tween mit 2% Pferdeserum) und verschiedene DBCO-Konzentrationen wurden getestet, die fünffach oder mehr als zehnfach unter den Konzentrationen lagen, die in den vorherigen Experimenten zur ManNAz-Markierung verwendet wurden (12,5 μM).

Es zeigte sich, dass die unspezifische Hintergrundfärbung sogar noch zunahm, wenn die fixierten Zellen mit Blockier-Puffer vorbehandelt wurden. Es ist möglich, dass freie Sulfhydryl-Gruppen zur unspezifischen Hintergrundfärbung mit DBCO beitragen können. Eine Reihe von Agenzien sind in der Literatur zur Absättigung mit Sulfhydryl-Gruppen beschrieben worden.

Ellmann's Reagenz [DTNB, 5,5-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)] (Bard and Martin, 2018), das auch zur quantitativen Bestimmung freier Sulfhydryl-Gruppen eingesetzt wird, führte allerdings sogar zu einer Erhöhung des Hintergrunds in der FACS-Analyse.

Weitere Versuche, das Hintergrundsignal durch Vorinkubation mit Iodoacetamid (IAM) (Amgarten et al., 2015; van Geel et al., 2012) oder Maleimide (Chen et al., 2013; Tian et al., 2016) zu minimieren, waren - anders als vorbeschrieben - erfolglos und führten eher noch zu einem massiven Anstieg des unspezifischen Hintergrundsignals, wenn die Zellen nicht zuvor mit ManNAz metabolisch markiert waren (Abb. 29).

Den geringsten Hintergrund zeigten überraschenderweise native, unfixierte Zellen (Abb. 29).

Um jedoch Membran-Internalisierungsvorgänge während der Detektions-Reaktion mit DBCO-Cy5 zuverlässig zu verhindern, wurde zunächst eine Fixierung der Zellen in den nachfolgenden Experimenten durchgeführt.

Ein Titrationsexperiment mit Formaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Zellen zeigte auch, dass das unspezifische Hintergrundsignal mit abnehmender DBCO-Cy5 Konzentration verschwand (

Abb. 30). Auf fixierten Zellen zeigte sich also eine konzentrationsabhängige Hintergrundfärbung durch DBCO-Cy5, so dass in nachfolgenden Experimenten die geringstmögliche Konzentration (2,5 - 12,5 μM) zur Detektion von SiaNAz in Glycokonjugaten verwendet wurde.

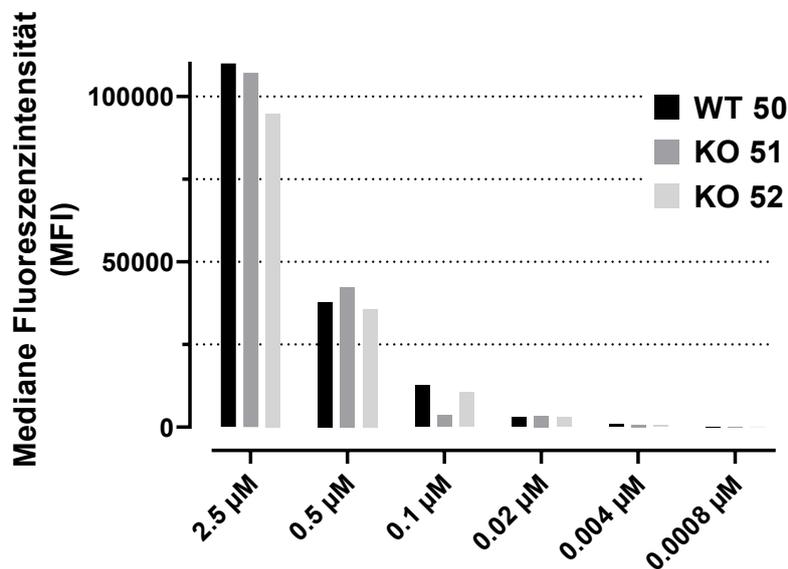


Abb. 30 Durchflusszytometrie-Analyse unmarkierter, fixierter C2C12-Zellen zur Titration des unspezifischen Hintergrundsignals von DBCO-Cy5 im Bereich von 2,5 μM bis 0,0008 μM .

Nach den Versuchen mit Iodoacetamid, Maleimide und DTNB (Ellmann's Reagenz), den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde diese Strategie nicht weiterverfolgt. Im Gegensatz zu den FACS-Untersuchungen hatte sich in der *d*STORM-Analyse keine relevante unspezifische Färbung gezeigt. Für die Mikroskopie wurden die Zellen im Monolayer allerdings erst mit DBCO-Cy5 inkubiert und anschließend fixiert.

Bei einer detaillierten FACS-Untersuchung der DBCO-Cy5-Färbung von unmarkierten Zellen ohne ManNAz-Supplementation hatte sich auch das geringste unspezifische Signal bei nativen, unfixierten Zellen gezeigt (Abb. 29).

Aufgrund der höheren Zahl der Zell-Proben für die FACS-Analyse (Messung in Triplets, zeitaufwändigere Handhabung der Zellen in Suspension während der Inkubations- und Waschschriffe) wurde der Verzicht auf die Fixierung zunächst nicht durchgeführt, insbesondere auch um eine Internalisierung der Membran sicher zu verhindern und gleiche Bedingungen für alle Replikate zu gewährleisten.

Um auch ohne Blockierschritt ein möglichst spezifisches Signal zu erhalten, wurde die Konzentration von ManNAz zur metabolischen Markierung möglichst geringgehalten (5 μM). Zusätzlich wurde die DBCO-Cy5-Konzentration nach unten titriert.

4.8 FACS-Analyse: SiaNAz-Detektion über DBCO-Biotin / Streptavidin-Cy3

Alternativ zur Detektion mit DBCO-Cy5 wurde DBCO-PEG4-Biotin mit Streptavidin-Cy3 verwendet, um zu überprüfen, ob die unspezifische Hintergrundfärbung von DBCO-Cy5 substratspezifisch war oder eher durch den DBCO-Rest verursacht wurde.

In einem ersten Experiment wurde noch der Blockierschritt mit DTNB durchgeführt (Abb. 31).

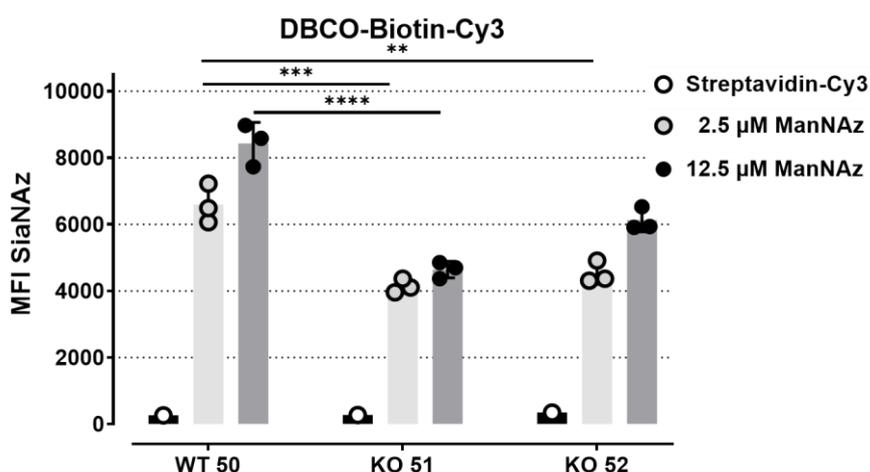


Abb. 31 DBCO-PEG4-Biotin-Cy3-Detektion metabolisch-markierter C2C12-Zelllinien, die sowohl mit 2,5 μM als auch mit 12,5 μM ManNAz über 40 h in WT-Zellen ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal ergab. Unspezifische DBCO-Bindung wurde versuchsweise mit DTNB (Ellmann's Reagenz) blockiert. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (One-way ANOVA) zusammen mit dem Brown-Forsythe-Test auf Varianzhomogenität und dem Bartlett-Test, der die Nullhypothese überprüft, dass alle beobachteten Variablen unkorreliert sind und gleiche Varianzen aufweisen sowie dem Dunnett's *post-hoc*-Test zum Vergleich aller Werte zum WT (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

Insgesamt zeigte sich bei C2C12-Zellen mit der Kontrollfärbung über Streptavidin-Cy3 eine wesentlich geringere unspezifische Hintergrundfärbung als mit DBCO-Cy5.

Überraschenderweise fand sich in Wildtyp-Zellen eine hochsignifikant erhöhte mediane SiaNAz-Fluoreszenzintensität, die vergleichbar mit der MAA II-Lectinfärbung war (vgl. Abb. 22 A).

Im Vergleich mit späteren Experimenten ohne DTNB-Vorbehandlung war ein signifikant stärkeres Signal bei den KO-Zellen als beim Wildtyp nachweisbar. Es lässt sich spekulieren, dass DTNB bestimmte SiaNAz-Epitope bei den KO-Zellen maskieren könnte. Diese SiaNAz-Reste stehen dann nicht mehr für die Click-Reaktion mit DBCO-Cy3 zur Verfügung. Von der DTNB-Behandlung wurde in nachfolgenden Experimenten aufgrund wahrscheinlicher Artefaktbildung Abstand genommen.

4.8.1 Sialidase-Experiment mit nativen C2C12-Zellen

Im Wiederholungsexperiment der DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3-Detektion mit nativen unfixierten Zellen (ohne DTNB-Vorbehandlung) zeigte sich das Fluoreszenzsignal bei den WT-Zellen im Vergleich zu Abb. 31 etwas schwächer, möglicherweise weil eine kürzere Inkubationszeit mit 12,5 μM ManNAz vorlag (24 h vs. 40 h). Es ist auch denkbar, dass im Vorexperiment eine Signalanhebung bei den WT-Zellen durch die DTNB-Vorbehandlung stattfand, die bei den KO-Zellen weniger relevant war.

In der nativen Färbung mit DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3 zeigten WT und KO-Zellen nach 24 h metabolischer Markierung mit 12,5 μM ManNAz vergleichbare Fluoreszenz-Intensitäten.

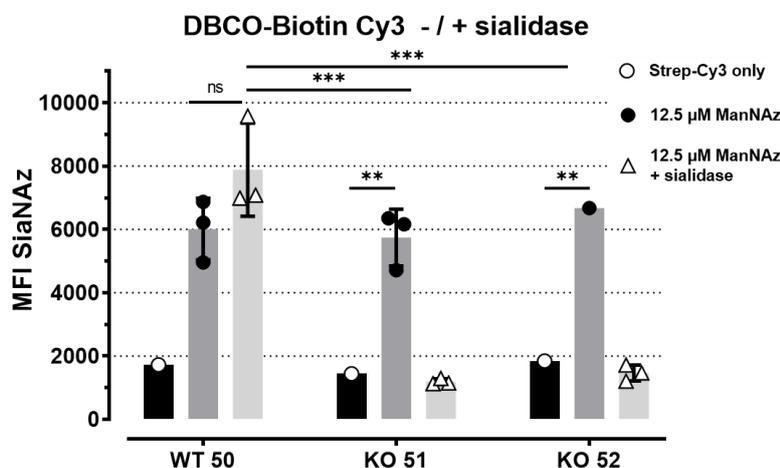


Abb. 32 DBCO-PEG4-Biotin-Cy3-Detektion mit 12,5 μM ManNAz über 24 h in metabolisch-markierten C2C12-Zelllinien. Die Click-Reaktion erfolgte in nativen Zellen ohne und mit vorangehender Sialidase-Behandlung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einfacher Varianz-Analyse (One-way ANOVA) und dem Dunnett's post-hoc-Test zum Vergleich aller Werte zum WT (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns nicht signifikant).

Zusätzlich wurden die C2C12-Zellen nativ mit Sialidase behandelt (vgl. Pilotversuch mit DBCO-Cy5-Markierung unter DTNB-Blockade in Abb. 27 C). In den KO-Zellen ergab sich ein signifikant erniedrigtes Fluoreszenzsignal nach Sialidase-Behandlung.

4.8.2 Transfektion mit GNE-Expressions-Konstrukten als Rescue-Experiment

C2C12-Zellen wurden mit einem GNE-Expressions-Konstrukt mittels JetPEI transient transfiziert und am folgenden Tag mit ManNAz über Nacht metabolisch markiert. Ein Pilotversuch wurde zu Beginn der FACS-Analyseserie unternommen, bei dem mit DTNB unspezifische Färbung reduziert werden sollte (s. Abb. 27 B).

Um einen Einfluss der Fixierung und DTNB-Blockade auf die DBCO-C5-Färbung zu umgehen wurden C2C12-Zelllinien für 24 h metabolisch markiert und 2 h nach Beginn der ManNAz-Inkubation mit verschiedenen GNE-Expressionskonstrukten für 22 h transient transfiziert.

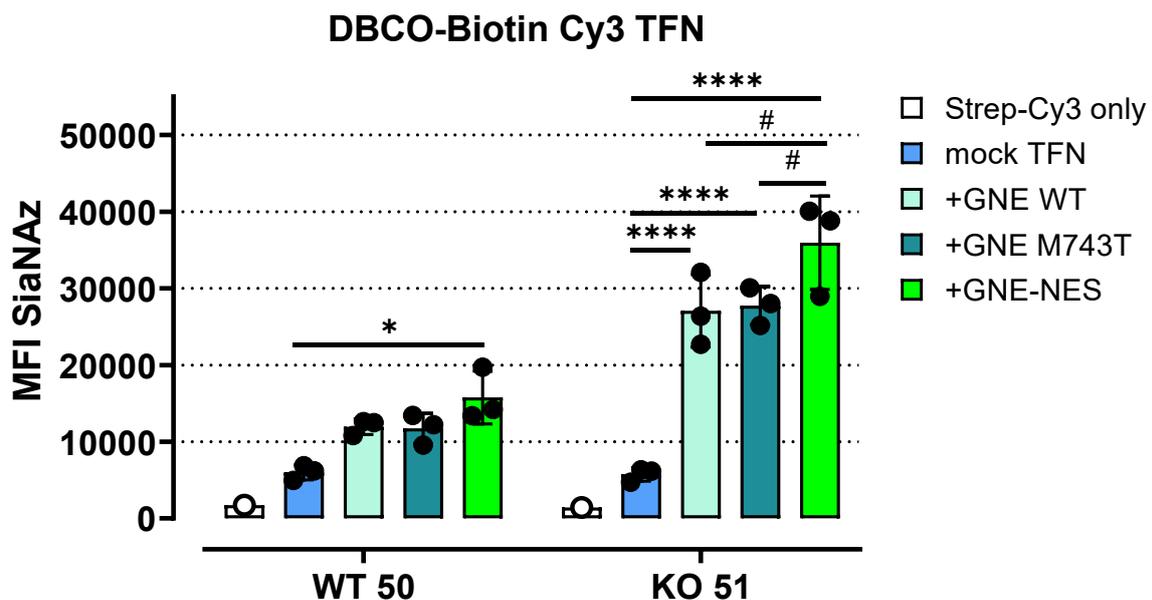


Abb. 33 Transiente Transfektion von GNE-Expressionskonstrukten bei metabolischer Markierung mit 12,5 μM ManNAz über 24 h. Färbung mit DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3 als alternative Detektions-Methode bei 4°C mit anschließender Fixierung. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet (**** $p < 0,0001$, #/* $p < 0,05$). Alle Daten wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Datenanalyse erfolgte durch eine zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit Sidak'scher Korrektur, da mehrere Gruppen mit anderen Gruppen verglichen wurden (bei bestätigter Gaußscher Verteilung der Messwerte).

4.8.3 Kinetik des SiaNAz-Signals im Zeitverlauf

Titrationsexperimente im Zeitverlauf mit metabolischer Markierung im Bereich von 1,25 μM – 125 μM ManNAz wiesen interessanterweise auf eine komplexe Regulation des SiaNAz-Signals nach DBCO-Cy5-Detektion im Zeitverlauf hin.

Insgesamt zeigte sich, dass das SiaNAz-Signal je nach Zeitpunkt der Messung bei den KO-Zellen stärker als das Oberflächen-Signal der WT-Zellen sein kann (Abb. 34).

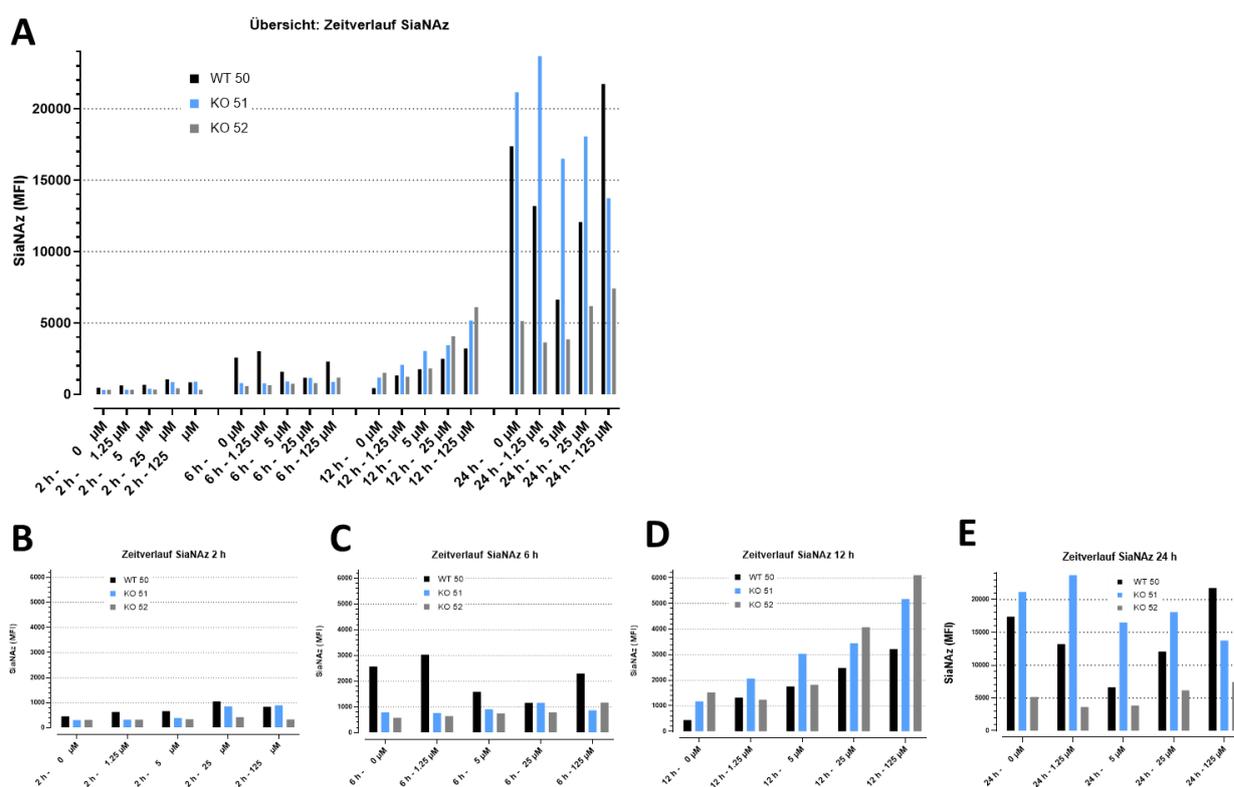


Abb. 34 Titrationsexperiment: metabolische Markierung im Zeitverlauf. A Übersicht über alle Zeitpunkte. B-E Darstellung der einzelnen Zeitintervalle von 2 h – 24 h. Es ist zu beachten, dass die y-Achse bei B-D zur besseren Vergleichbarkeit der Daten identisch skaliert ist.

5 DISKUSSION

5.1 Etablierung der dSTORM-Mikroskopie zur Evaluation von Sialinsäure-Biosynthese-Defekten

Die dSTORM-Mikroskopie wurde erstmals erfolgreich zur Untersuchung der Zelloberflächen von myogenen Zelllinien einschließlich primären Myoblasten der GNE-Myopathie eingesetzt. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist diese innovative Methodik bisher noch nicht zur Charakterisierung von hereditären Myopathien eingesetzt worden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bestätigten die Annahme, dass es möglich ist, Zellen myogenen Ursprungs mit Zucker-Analoga metabolisch zu markieren und die Fluoreszenz-Farbstoff-Kopplung *in vivo* mittels Click-Chemie erfolgreich durchzuführen sowie mittels des dSTORM-Setups Mikroskop-Aufnahmen zu erstellen und sowohl qualitativ als auch quantitativ auszuwerten.

Die folgenden theoretischen Überlegungen zur optimalen Durchführung der metabolischen Markierungsversuche ließen sich erfolgreich umsetzen:

1. Wachstumsfaktorzusatz: Auch empfindliche primäre Zelllinien ließen sich unter definierten Zellkultur-Bedingungen mit synthetischem Wachstumsfaktorzusatz kultivieren, so dass die Verwendung von FCS nicht erforderlich war. FCS ist eine mögliche Quelle für Hexosamin-(Vorläufer-)Substrate und hätte die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Versuche beeinträchtigen können.
2. Optimale Signalstärke: Es zeigte sich, dass die Zugabe der Substrate in physiologischen Konzentrationen möglich war. Die verwendeten Konzentrationen leiteten sich aus der etablierten Enzymkinetik von GNE ab und lagen sowohl mit 5 μM als auch mit 12,5 und 25 μM im dynamischen Bereich der GNE-Kinetik (Hinderlich et al., 1997; Nieto-Garcia et al., 2016).
3. Zeitverlauf der pathologischen Veränderungen: Die GNE-Myopathie ist eine Erkrankung, die sich erst im frühen bis mittleren Erwachsenenalter manifestiert. Es wäre denkbar, dass sich ein physiologischer Defekt auch im Zellkultursystem erst zeitverzögert in seneszenten Zellen oder nach einem Reifungsschritt zu multinukleären Myotuben manifestiert. Da sich deutliche Unterschiede in der Oberflächenexpression in proliferierenden Patientenmyoblasten im Vergleich zu

Normalkontrollen ergaben, wurden keine weiterführenden Auswertungen an Myotuben oder seneszenten Zellen vorgenommen. Es zeigte sich, dass Zellen, die mit dem Ziel der terminalen Differenzierung mehrere Tage in Kultur gehalten wurden, Membranfragmente oder Extrazellulärmatrixbestandteile auf dem Objektträger hinterließen, die durch ein erhöhtes Hintergrundsignal die Analysen erschwerten und keine zusätzlichen Schlussfolgerungen auf einen veränderten Sialinsäuremetabolismus zuließen.

5.2 Differenzielle Reporter-Expression von Myoblasten bei GNE-Myopathie

Betrachtet man die Zahlenwerte der ManNAz-Signalstärke, so lassen sich die GNE-Myopathie-Zellen anhand der Lokalisationsbefunde in der hochauflösenden Mikroskopie eindeutig von den Kontrollzellen abgrenzen. Die pathologischen Zellen weisen eine wesentlich höhere Signalintensität auf, was für eine verstärkte Expression von Oberflächen-Glycokonjugaten mit endständiger Sialinsäure sprechen kann. Biochemisch könnte die exogene Zugabe von Sialinsäure-Vorläufern bzw. Reportersubstrat-Vorläufern die Proteinbiosynthese in den Zellen anregen, sialylierte Proteine stabilisieren oder deren Katabolismus verlangsamen und so zu einer erhöhten Expression und Stabilisierung der Membranmoleküle führen.

Ein zusätzlicher Erklärungsansatz für ein verstärktes Oberflächen-Signal des ManNAz-Reporters könnte in einer Beeinträchtigung von Trimming-Vorgängen der Kohlenhydratseitenketten von Glycokonjugaten im endoplasmatischen Reticulum liegen. Durch Trimming der endständigen Reste der Kohlenhydrat-Seitenketten werden Sialinsäuren wieder entfernt. Falls in den GNE-Myopathie-Myoblasten ein verringertes Trimming stattfinden sollte, würde daraus eine verstärkte Oberflächen-Expression des ManNAz-Reporters resultieren.

Schließlich ist auch die Maskierung von endständigen Sialinsäureresten durch z. B. endogene Lectine denkbar, die die Click-Chemie mit einem Fluorochrom-gekoppelten Substrat erlauben könnten, sofern es relativ klein ist (z. B. DBCO-Cy5). Im Gegensatz dazu könnte ein größeres, nur bedingt für die Zellfärbung geeignetes Reportersystem (z. B. DBCO-PEG4-Biotin /Streptavidin-Cy3) durch sterische Einschränkung nicht binden und die unerwartete differentielle Detektion von SiaNAz in WT- und KO-Zellen verursachen. Dieses Erklärungsmodell könnte zwar nicht quantitative Veränderungen

von Glycokonjugaten präzisieren, jedoch interessante Hypothesen über qualitativ und funktionell veränderte Eigenschaften der Glycocalyx bei GNE-Defiziten liefern.

Es ist zu betonen, dass mit der etablierten Methode nur die Oberflächen-Expression der Hexosamin-Analoga betrachtet werden kann, intrazelluläre Reporter nicht markiert werden und somit ausschließlich die Oberflächen-Expression dargestellt wird.

Im Hinblick auf die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der GNE-Myopathie, mit der sich u. a. von der Hetero- bzw. Homozygotie bestimmter pathogener Genveränderungen auf die Ausprägung und Schwere der Erkrankung schließen lässt, zeigten sich interessanterweise im Vergleich zwischen der zusammengesetzt-heterozygoten Mutation R42W/F568I und der homozygoten Mutation M743T deutliche Unterschiede in den mikroskopischen Lokalisationsbefunden.

Es ist denkbar, dass ein Rückschluss vom Genotyp auf den Phänotyp und die klinische Präsentation der Erkrankung über die pathologische Signalintensitätszunahme bzw. -verstärkung der Patientenmyoblasten in den *d*STORM-Aufnahmen möglich ist.

Erstmals wäre nach der in dieser Arbeit etablierten Methodik auch eine quantitative Charakterisierung des biochemischen Defekts mit Hilfe des Sialinsäure-Signals über DBCO-Cy5 möglich, ohne dass die Veränderungen in einzelnen Biosynthesewege im Detail bekannt sind. Dies ist von großer Bedeutung, da die pathophysiologische Relevanz der bisherigen Methoden zur Quantifizierung des Stoffwechsel-Defekts bei der GNE-Myopathie sehr kontrovers diskutiert werden (Gagiannis et al., 2007; Malicdan et al., 2007b; Noguchi et al., 2004; Salama et al., 2005). Weiterhin spricht für die metabolische Charakterisierung mittels Reportersubstraten die Tatsache, dass die Protein- und Lipidglycosylierung sehr komplexe Stoffwechselwege umfasst, deren Regulation im Detail nicht ausreichend verstanden ist.

Interessanterweise steht mit der *d*STORM-Mikroskopie erstmals eine simultan qualitative und quantitative Evaluationsmethode zur Verfügung, die im Gegensatz zu konventionellen Quantifizierungsverfahren funktionelle pathologische Aspekte bei Myoblasten berücksichtigen kann.

Es bleibt zu klären, ob sich die beobachteten quantitativen Oberflächenveränderungen in Myoblasten auch in anderen primären Patienten-Zellen bestätigen lassen, die aus extramuskulären Geweben abgeleitet sind, jedoch für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Die qualitative mikroskopische Analyse subzellulärer Strukturen ist bei Myopathien mit pathologischer Aggregatbildung von besonderem Interesse. Die GNE-Myopathie wird auch zur Gruppe der Aggregatmyopathien gezählt. Histopathologisch weist der Skelettmuskel autophagische Vakuolen mit einer Reihe von degenerativ aggregierten Proteinen auf, deren Ursache unklar bleibt. Es kann spekuliert werden, dass Glycosylierungsdefekte zu vermehrter pathologischer intrazellulärer Proteinaggregation führen können oder auch zu einem veränderten Muster der Oberflächenexpression von Glycokonjugaten. Überraschenderweise zeigten sich jedoch auch mittels hochauflösender Mikroskopie über Grenzflächenreflexion an der Myoblastenunterseite keine wegweisenden Unterschiede in der weitgehend homogenen Signalverteilung zwischen Patientenzellen und Kontrollen. Eine wesentliche Glycoproteinakkumulation war an der Zelloberfläche nicht zu verzeichnen und konnte als möglicher *in vitro* Zielparameter, auch im Hinblick auf die präklinische Therapie-Entwicklung, ausgeschlossen werden.

5.3 Einschränkungen der Methodik

Da es sich bei der GNE-Myopathie um eine sehr seltene Erkrankung handelt, ist aufgrund der beschränkten Probandenzahl eine statistische Auswertung der dSTORM-Bilder trotz multipler biologischer Replikate nur bedingt aussagekräftig. Es erscheint aber aufgrund der deutlichen Differenz der Ergebnisse zwischen den beiden untersuchten Gruppen durchaus möglich, dass sich bei einer größeren Anzahl untersuchter Probanden eine statistische Signifikanz der Lokalisationsunterschiede herleiten lässt. Hierfür sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Ein möglicher Grund für die intensivere Färbung von Glycokonjugaten an der Zelloberfläche mittels ManNAz und teilweise erfolgreiche Therapieansätze durch orale ManNAc-Supplementation bei GNE-Myopathie-Patienten liegt im Syntheseweg der Sialinsäure. Die Schrittmacherreaktion, also die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Sialinsäurebiosynthese, ist der Übergang von UDP-*N*-Acetyl-D-Glucosamin zu *N*-Acetyl-D-Mannosamin mit Hilfe der UDP-*N*-Acetyl-D-Glucosamin-2-Epimerase. Die weiteren Syntheseschritte mittels der *N*-Acetyl-D-Mannosamin-Kinase bis zur Sialinsäure erfolgen nach einem Kaskadenprinzip. Bevor allerdings UDP-GlcNAc den Epimerisierungsschritt zu ManNAc durchläuft, besteht noch die Möglichkeit, andere Biosynthese-Wege einzuschlagen. Sowohl bei der Verwendung von

Ac₄ManNAz bei der metabolischen Markierung mittels Click-Chemie und oral verabreichtem ManNAc als Therapieansatz, wird möglicherweise ein Bypass verwendet, die Schrittmacherreaktion teilweise umgangen und somit eine schnellere Umwandlung zu Sialinsäure erreicht, das dann den Sialinsäure-Transportern und –Transferasen im Endoplasmatischen Reticulum im Überfluss zur Verfügung steht.

Es bleibt derzeit offen, weshalb im experimentellen *in vitro*-System, die ManNAz-Substitution und -Detektion mit DBCO-Cy5 zur vergleichsweise stärksten Oberflächenmarkierung führte. Die folgenden Erklärungsansätze sind denkbar: Es könnte eine beeinträchtigte Feedback-Inhibition bei den GNE-Mutanten durch eine mögliche Konformationsänderung vorliegen. Daneben könnte das gewählte Zeitfenster für die Markierung eine Akkumulation von UDP-ManNAz zeigen, die bei UDP-GlcNAz und UDP-GalNAz möglicherweise zeitversetzt stattfindet. Hier wären weitere Titrationsexperimente mit Zugabe von UDP-ManNAz, UDP-GlcNAz oder UDP-GalNAz mit Konzentrationen im Bereich von 1 µM bis 50 µM weiterführend. Zusätzlich sollten weitere Analysen im Zeitverlauf im Bereich von einer Stunde bis zu mehreren Tagen nach Substratzugabe vorgenommen werden um die zelluläre Enzymkinetik besser zu verstehen.

Primäre Myoblasten stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die größtenteils myogene Zellen umfasst. Wachstumsunterschiede oder eine veränderte Zusammensetzung der Zellpopulation der verwendeten Zelllinien könnten die metabolische Markierung beeinflussen. Aufgrund der sehr begrenzten Verfügbarkeit der GNE-Myopathie-Myoblasten wurde keine weitere Charakterisierung proliferativer Parameter und keine Anreicherung myogener Zellen (NCAM/CD56+), z. B. mittels MACS (Magnetic activated cell sorting) vorgenommen.

Es wurde bereits ausführlich etabliert, dass primäre GNE-Myopathie-Myoblasten *in vitro* keinen Proliferations- oder Differenzierungsdefekt gegenüber Normalkontrollen aufweisen (Amsili et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen der Azido-Zuckeranaloga lagen stets im subtoxischen Bereich, um das Zellwachstum nicht zu beeinträchtigen.

Das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosynthesewegs, Glutamin-Fructose-6-phosphat Amidotransferase (GFAT), unterliegt interessanterweise der Rückkopplungs-Hemmung (feedback inhibition) durch UDP-GlcNAc. Damit besteht die Gefahr, dass ein Aufstau von UDP-Reportersubstraten *in vitro* die Biosynthese von UDP-GlcNAc blockieren und zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann.

Es zeigte sich, dass UDP-Reportersubstrate mit größeren Substitutionen an der N-Acetyl-Gruppe GFAT nicht inhibieren. Hingegen wirken Modifikationen an der 2- oder 6-Hydroxy-Position inhibitorisch (Walter et al., 2018). Somit ist zu erwarten, dass die endogene Biosynthese von UDP-GlcNAc im Hexosamin-Biosyntheseweg nicht wesentlich durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete UDP-GlcNAz beeinträchtigt wird.

Die humanen Kontroll-Myoblasten wurden bestmöglich ausgewählt, d. h. angepasst an die GNE-Myopathie-Myoblasten hinsichtlich des Geschlechts des Patienten und Alter bei Biopsie.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der primären Myoblasten und aufgrund des großen Aufwands der *d*STORM Analyse wurden in diesen Zellen keine weiteren Experimente zum Zeitverlauf der Markierung oder unter Titration der drei verwendeten Hexosamin-Analoga durchgeführt.

Per-O-acetylierte Monosaccharide (sowie ihre klickbaren Analoga) können spontan mit zahlreichen Cysteinresten in Proteinen reagieren, wie eine ausführliche Proteomanalyse gezeigt hat, ohne dass eine enzymatische Katalyse erforderlich ist (Qin et al., 2018). Für Ac₄ManNAz zeigten die Autoren S-Glykosylierungsreaktionen bei intrazellulären Proteinen in einer Konzentration bis zu 50 µM. Da in der vorliegenden Arbeit viel geringere Konzentrationen an Az₄ManNAz verwendet wurden und ausschließlich Oberflächenproteine betrachtet wurden, ist ein wesentlicher unspezifischer Hintergrund durch S-Glykosylierungsreaktionen unwahrscheinlich.

Die metabolischen Markierungsexperimente erfolgten stets in definiertem Zellkulturmedium mit Ultrosor G-Substitution ohne externe Sialinsäurequelle in Form von sialylierten Serumproteinen aus FCS, um sowohl für primäre humane Myoblasten als auch die C2C12-Zelllinien standardisierte Kulturbedingungen zu gewährleisten. Einschränkend ist anzumerken, dass Zellen im Organismus stets von glycosylierten humoralen Faktoren umgeben sind.

5.4 FACS-Analyse und statistische Auswertung

Um mit einer unabhängigen Methode und in einem homogenen Zellkulturmodell die beobachteten Oberflächenveränderungen im Zusammenhang mit GNE-Mutationen in einer größeren Zellzahl zu überprüfen, wurden zunächst murine GNE-Knockout-

Myoblastenlinien und eine verwandte Kontrollzelllinie verwendet, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dirk Lefebre, Universität Nijmegen, Niederlande, zur Verfügung gestellt wurden.

Interessanterweise bestätigte sich in der Click-Reaktion mit Cy5-DBCO-Alkyne ein erhöhtes ManNAz-Signal in den untersuchten Knockout-Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp.

Allerdings zeigte sich bei Verwendung von DBCO-PEG4-Biotin ein umgekehrtes Resultat: Die Wildtyp-Zellen waren stärker markiert als die beiden Knockout-Linien.

Die folgenden Erklärungsansätze sind denkbar: Die Größe des Biotinmoleküls mit PEG-Spacer kann zum einen aus sterischen Gründen eine Bindung an der Zelloberfläche verhindern. Zum anderen könnte der Biotin-Streptavidin-FITC-Komplex nur schwach gebunden sein und leichter in den nachfolgenden Waschschrritten entfernt werden.

Das vergleichsweise kleinere DBCO-Cy5-Molekül kann möglicherweise effizienter eine größere Zahl an SiaNAz-Resten in der Glycocalyx erreichen und binden.

Die unerwarteten Markierungsergebnisse für das DBCO-Biotin-Konjugat lassen sich durch seine im Vergleich zu DBCO-Cy5 sehr ausgedehnte Molekularstruktur erklären. In Wildtyp-C2C12-Zellen sind an die Glycokonjugate möglicherweise reife, verzweigte sialylierte Kohlenhydratketten gebunden, die an den terminalen Enden leicht zugänglich sind.

Bei den humanen GNE-Mutanten-Myoblasten oder den Knockout-Zellen könnte die Mehrzahl der SiaNAz-Reste nach metabolischer Markierung in der Glycocalyx verborgen vorliegen und für das DBCO-Biotin-Konjugat unzugänglich sein, aber durch DBCO-Cy5 gut detektierbar sein. Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte Qualität der Glycocalyx in den GNE-Knock-out-Zellen hin. Das DBCO-Biotin-Konjugat wird für die visuelle Detektion metabolisch markierter Glycokonjugate mittels Click-Chemie nicht empfohlen, da die Detektion aufgrund der sterischen Behinderung durch die Biotin- und PEG-Linker-Einheiten ineffizient ist.

Durch den prinzipiellen Nachweis der Funktionstüchtigkeit der alternativen Markierungsstrategie mit DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3 können wir auch bei den oben diskutierten Einschränkungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, dass die DBCO-Cy5-Bindung unspezifisch erfolgte. Bei kürzerer metabolischer Markierung über ca. 20 h war das Fluoreszenzsignal von SiaNAz über die DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3-Färbung bei WT- und KO-Zellen auffällig gleich. Dies zeigt, dass der unerwartet

höhere SiaNAz-Anteil in WT-Zellen erst nach mehr als 24 h nachzuweisen war, wenn die Färbung über DBCO-Biotin-Streptavidin-Cy3 erfolgte.

Um das unerwartet verstärkte SiaNAz-Signal der GNE-Myopathie-Patientenzellen in der dSTORM-Analyse und der GNE-KO-Zellen in der FACS-Analyse nach metabolischer Markierung mit ManNAz zu interpretieren, wäre auch eine Hyperstabilität der Oberflächen-Konjugate bei GNE-Defekten denkbar. Unter der Hypothese eines verminderten Katabolismus von Oberflächen-Konjugaten wäre ein SiaNAz-Signal an der Zelloberfläche länger sichtbar.

Dagegen könnte der Umsatz von Oberflächen-Glycokonjugaten in der WT-Situation rascher erfolgen, so dass zwar die MAA II-Färbung, die endogenes SiaNAc von exogenem SiaNAz nicht unterscheidet, stets ein hohes Signal zeigt, der Anteil an ManNAz durch katabole Vorgänge jedoch auf der Oberfläche geringer werden könnte.

Weitere Komplexität könnte sich ergeben, wenn relativ viele SiaNAz-Epitope bei GNE-Defekten an der Zelloberfläche in einer Weise maskiert wären, die zwar leicht eine direkte DBCO-Cy5-Färbung ermöglichen, eine indirekte Detektion über DBCO-Biotin mit anschließender Streptavidin-Cy3-Bindung oder eine Lectin-Färbung aus sterischen Gründen jedoch nur sehr ineffizient zuließen.

Zusammengefasst können die möglichen molekularen sterischen Eigenschaften beider Agenzien (DBCO-Cy5 vs. DBCO-PEG4-Biotin) und ihre unterschiedlichen Nachweismuster - auch im Zeitverlauf - auf qualitative Veränderungen in der Glycocalyx bei der metabolischen Markierung mit dem Monosaccharid-Analogon ManNAz hinweisen, die sowohl auf kinetischer als auch auf molekularer Ebene noch im Detail zu untersuchen sind.

Lectinfärbungen bieten eine weitere wichtige Vergleichsmöglichkeit zur quantitativen Charakterisierung von Oberflächenglycanen bei der GNE-Myopathie. Sie bieten darüber hinaus die Möglichkeit, Aussagen über die Art der glycosidischen Bindung zu machen mit der die detektierten endständigen Zuckerreste verknüpft sind. Die Quantifizierung der Lectin-Fluoreszenz mit Hilfe der *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)-Färbung zeigte bei Ko-Lokalisierung mit einem membranständigen Caveolin 3 (CAV-3)-Signal eine 50%ige Reduktion bei GNE-Myopathie-Biopsien im Vergleich zu Kontrollen (Leoyklang et al., 2018). Allerdings detektiert das SNA-Lectin nur α 2,6-gebundene Sialinsäure, die einen kleineren Anteil der gesamten Oberflächen-Sialinsäure ausmacht.

Der positive Nachweis eines SNA-Signals kann auch von der Fixierungsmethode abhängig sein. Es wurde berichtet, dass sich in Patientenfibroblasten ein SNA-reaktives Epitop fand, welches nur mit Paraformaldehyd-Fixierung sichtbar war. Die Autoren spekulierten, dass es sich um ein kleines Molekül (Protein oder Lipid) handelte, das mittels Methanolfixierung nicht erhalten blieb (Kane et al., 2017). Des Weiteren findet die Aktivierung von Neu5Ac zu CMP-Sialinsäure im Gegensatz zu anderen Nucleotid-Zuckern, die im Zytoplasma aktiviert werden, im Zellkern statt (Münster et al., 1998) und könnte bei Aldehydfixierung ein kleines SNA-reaktives Epitop ergeben, welches nicht auf ein maturiertes Glykokonjugat hinweist (Hoffman et al., 2015).

In Fibroblasten untersuchten Patzel et al. die Akkumulation von Glycosphingolipiden mittels Säulenchromatographie-Analyse bei Patienten- und Kontroll-Fibroblasten sowie im Plasma (Patzel et al., 2014). Die mutierten Zellen zeigten eine beeinträchtigte GNE-Epimerase-Aktivität bei Verwendung eines speziellen Iminozuckers. Dies führte zu einem Anstieg sowohl der neutralen als auch der sialylierten Glycosphingolipide. Bemerkenswert ist, dass die Behandlung von Patienten-Fibroblasten mit *N*-Acetylmannosamin die erhöhten Glycosphingolipidkonzentrationen zwar nicht normalisierte, aber leichtgradig verbesserte. *N*-Acetylmannosamin stellt eine Sialinsäure-Vorläufersubstanz in der Kaskade des Sialinsäurebiosynthesewegs dar, die nach dem GNE-Epimeraseschritt entsteht (s.

Abb. 1). Die experimentellen Daten von Patzel et al. legen die Möglichkeit nahe, dass die Konzentration von Glycosphingolipiden ein potenzieller Biomarker sein kann, der nicht nur für die GNE-Myopathie, sondern auch für andere Störungen des Sialinsäurestoffwechsels bedeutsam sein könnte. Bei der Untersuchung des Gewebes von Gne-Knock-In-Mäusen (p.M712T/p.M712T; nach der aktuellen Nomenklatur p.M743T/p.M743T) wurden ebenfalls erhöhte Glycosphingolipidwerte gemessen, die die Biomarker-Theorie einer veränderten Glycosphingolipidkonzentration bei der GNE-Myopathie unterstützen (Patzel et al., 2014).

Neben der GNE-Myopathie sind noch andere genetisch determinierte Syndrome bekannt, denen Defekte im Hexosamin- und Sialinsäure-Biosyntheseweg zugrunde liegen (Willems et al., 2016). CMP-Sialinsäure ist ebenso wie UDP-GlcNAc ein essentielles Vorläufersubstrat für verschiedene Protein-Glycosylierungsschritte und für die Konversion in andere Nucleotid-Zucker. Eine Reihe von Glycosylierungswegen kann den Phänotyp einer Erkrankung beeinflussen. Der gegenwärtige Wissensstand auf

biochemischer Ebene reicht allerdings nicht aus, um die verschiedenen gewebespezifischen Phänotypen zu erklären (Willems et al., 2016).

5.5 Effekte des Abbaus von Sialinsäure im Skelettmuskel

Drei Stoffwechselwege, die Sialinsäure-Biosynthese, der lysosomale Salvage (Wiederverwertungs)-Weg und der Sialinsäurekatabolismus bilden komplexe biochemische Netzwerke, die den Sialinsäurespiegel innerhalb der Zelle kontrollieren, wobei ihr jeweiliger Beitrag zum metabolischen Fluss und dem Spiegel der einzelnen Metaboliten unklar bleibt.

Der metabolische Fluss durch den Sialinsäure-Biosyntheseweg erhöht die Sialylierung bestimmter Glykokonjugate während andere daneben nur wenig oder gar nicht verändert werden (Almaraz et al., 2012).

Nicht nur die Synthese der Sialinsäure lässt sich mit bioorthogonaler Chemie innerhalb des Zellstoffwechsels verfolgen, sondern auch die Wiederaufnahme von ManNAI und SiaNAI als Reportersubstanzen in die Zelle als Alkyn-Derivate (Gilormini et al., 2016).

Die wesentliche Bedeutung des Sialinsäure-Synthesewegs und die vielfältigen Folgen bei metabolischen Defekten wurden bereits ausführlich erörtert. Im Hinblick auf die rätselhafte molekulare Pathologie der GNE-Myopathie, stellt sich im Rahmen einer umfassenden Betrachtung möglicher Pathomechanismen die Frage, ob auch der Abbau und Umbau von Sialinsäuren die Muskelfunktion beeinträchtigen kann.

Ein wesentliches Enzym für den Sialinsäure-Katabolismus, die Neuraminsäure-Pyruvat-Lyase (NPL), auch als Sialinsäure-Aldolase bekannt, die Neu5Ac zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) und Pyruvat spaltet, wurde u. a. auch beim Menschen identifiziert (Schauer et al., 1999). Es zeigte sich, dass die *N*-Acetylneuraminat Pyruvat-Lyase essentiell für die Muskelfunktion ist (Wen et al., 2018).

Die GlcNAc 2-Epimerase kann interessanterweise ebenfalls eine katabole Rolle im Sialinsäure-Stoffwechsel übernehmen (Luchansky et al., 2003).

Es ist bedeutsam, dass ManNAc nicht nur in den Sialinsäure-Biosyntheseweg eingehen kann, sondern auch durch RENBP [Renin binding protein, synonym: *N*-Acyl-D-glucosamin (GlcNAc) 2-Epimerase] zu GlcNAc umgewandelt werden und nach Phosphorylierung zu GlcNAc-6-Phosphat in den Hexosamin-Biosyntheseweg eintreten kann. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass der Renin-Stoffwechsel bei Sarkopenie eine Rolle spielen kann (Yoshida et al., 2019). Im Herzen zeigten humane

Myozyten eine spezifisch nach Herzversagen hochregulierte Proteinexpression der GlcNAc 2-Epimerase (Bohlmeier et al., 2003).

In C2C12-Zellen erhöhte ein experimentell induzierter zellulärer Hungerzustand die (Pro)renin-Rezeptor [(P)RR]-Expression und die Translokation des Transkriptionsfaktors TFEB in den Zellkern, was zur Expression von Genen führte, die mit Autophagie korreliert sind (Mizuguchi et al., 2018).

Das als Dimer vorliegende rekombinante Renin-bindendes Protein (RnBP), zeigte eine starke Inhibition von porcinem Renin, wohingegen das Schweine-Renin die enzymatische Aktivität der rekombinanten GlcNAc-2-Epimerase hemmte (Takahashi et al., 2001). Die Induktion profibrotischer Faktoren von Prorenin an den (Pro-) Reninrezeptor wurde zwar nicht in Muskelzellen beschrieben. Es könnte jedoch auch einen Zusammenhang mit degenerativen Veränderungen im Skelettmuskel geben (Reyes-Martinez et al., 2019).

5.6 Glycoproteine als Degenerations- und Alterungsmarker

Die GNE-Myopathie zeigt Hinweise auf fehlregulierte Autophagieprozesse (Malicdan et al., 2007a). Alterungsprozesse in Zellen können sich in den intrazellulären Glycanspiegeln ablesen lassen, die von mehreren Faktoren wie Glycan-Synthese, Glycan-Abbau, Sekretion und autophagischer Clearance beeinflusst werden (Itakura et al., 2018)

Die Hemmung des Autophagieprozesses führt zu Veränderungen intrazellulärer lysosomaler Membranproteine wie z. B. Sialin. Dieser Effekt scheint spezifisch für Sialin zu sein, da die Menge von LAMP1, einem anderen lysosomalen Membranprotein, unter den gleichen Bedingungen konstant bleibt (Seino et al., 2013). Die Stabilität des Proteins Sialin kann durch Autophagie reguliert werden und könnte zur zytosolischen Akkumulation von Sialyloligosacchariden bei einem Autophagiedefekt führen (Huang et al., 2015).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass bei der GNE-Myopathie die Muskeldegeneration und -regeneration gleichermaßen eine pathogenetische Rolle spielen. Zum einen bestimmt die Sialylierung von Glykokonjugaten die Differenzierung von Myofibroblasten *in vitro* (Sasaki et al., 2017). Darüber hinaus wird die intrazelluläre Signalübertragung durch

den gezielten Umbau extrazellulärer, membranständiger Glycane reguliert (Parker and Kohler, 2010).

Eine Reihe von Erkrankungen, denen Defekte im O-Glycosylierungs-Stoffwechsel zugrunde liegen, haben dazu beigetragen, die komplexe Regulation der Synthese von N-glycosylierten Glykokonjugaten eingehender zu verstehen (van Tol et al., 2019).

Es gibt nur wenige Informationen über die dynamischen Veränderungen der Glycoprotein-Oberflächenexpression und der subzellulären Lokalisierung während der Pathogenese der GNE-Myopathie.

Eine ganz aktuelle Studie des Glycoproteoms, insbesondere der N-Glycane bei der Muskelzellentwicklung, bestätigte eine Remodellierung des Glycoms, deren Ursache auch in der Regulation der beteiligten Glycosyltransferasen und Glycosidasen liegt. Zusätzlich zeigte sich eine bisher unbekannte Umstellung von Di-Galaktose zu Sialinsäure, die auf eine funktionelle Rolle dieser regulierten Glycoepitope in der Myogenese hinweist (Blazev et al., 2020). In dieser Glycom-Untersuchung zeigten die Autoren, dass verschiedene Integrine während der Myogenese eine verminderte Di-Galaktosylierung aufweisen, die eine verminderte Galectin-Bindung zur Folge haben kann.

Interessanterweise kann α 2,3-NeuAc im Vergleich zu α 2,6-NeuAc die Bindung verschiedener Galectine an Galactose-Epitope zusätzlich weiter verändern. Beispielsweise hemmt α 2,6-NeuAc die Bindung von Galectin-1 an Galactose, hat aber keinen Einfluss auf die Bindung von Galectin-3, während sowohl Galectin-1 als auch Galectin-3 an Galactose mit α -2,3-NeuAc-verknüpften Glycanen binden können (Kamili et al., 2016).

Inflammatorische Prozesse werden auch durch das N-Glycom wesentlich reguliert (Lauc et al., 2016). Eine wesentlich Rolle spielt Galectin-8 bei der Regulation sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort (Tribulatti et al., 2020), die möglicherweise auf die inflammatorische Komponente der GNE-Myopathie hinweist. Galectin-8 ist nicht nur an extrazellulären Membranen aktiv, sondern hemmt des Weiteren die mTOR-Signalübertragung am Lysosom (Jia et al., 2019). Die Glycom-Analyse von Blazev et al. zeigte eine Abnahme der Galectin-8-Expression während der Myogenese, was auf eine Verminderung der mTOR-Inhibition hindeutet, die für das Zellwachstum erforderlich ist (Blazev et al., 2020).

Störungen der Glycosylierung können allerdings bei verschiedenen (neuro)-degenerativen Erkrankungen eine mTOR-Aktivierung mit Autophagie-Hemmung zur Folge haben (Costa et al., 2015; Liu et al., 2020; Wani et al., 2017), die auch bei der GNE-Myopathie das Myozytenwachstum und die Muskelregeneration beeinträchtigen könnte.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick zur künftigen Therapie-Entwicklung für die GNE-Myopathie

Durch eine mögliche Hyposialylierung, die als Pathomechanismus der GNE-Myopathie zugrunde liegen kann, erscheinen Therapieansätze mittels ManNAc und weiteren Vorstufen des Sialinsäure-Stoffwechselwegs sinnvoll und vielversprechend, u. a. die bereits in Mauszellmodellen erfolgreich durchgeführte 6-Sialyllactose-Therapie. Ein aktueller Therapieansatz soll die Effizienz der substituierten Vorläufersubstrate mit Hilfe eines Prodrug-Konzepts verbessern (Morozzi et al., 2019).

Möglicherweise wird durch das Überangebot von ManNAc und anderen Vorläufern des Hexosamin-Stoffwechselwegs die Produktion von Sialylkonjugaten und ihre Oberflächenexpression auf Zellen angeregt. Es ist bekannt, dass ein verstärkter metabolischer Durchsatz durch den Sialinsäureweg bestimmte Sialoglycoproteine erhöht während andere jedoch unverändert bleiben (Almaraz et al., 2012).

Ein Nutzen der ManNAc-Supplementationstherapie bezüglich der Zellfunktion oder Symptomlinderung wurde bisher nur in einem kleinen Teil der GNE-Myopathie-Patienten belegt. Das Therapiekonzept, mit einer ManNAc-Stoffwechsel-Supplementation, einen Stillstand der Muskelerkrankung oder eine Verbesserung der Muskelkraft zu erreichen, hat keinen klinischen Nutzen für die überwiegende Mehrzahl der Patienten erbracht (Bedrosian, 2020; Carrillo et al., 2018).

Damit liegt nahe, dass das GNE-Mausmodell die GNE-Myopathie beim Menschen nicht hinreichend abbildet. Ebenso bleibt unklar, wie eine vermutete Glycoprotein-Hyposialylierung einen Autophagie-Defekt verursacht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Hyposialylierung allmählich zu einer Erhöhung an fehlgefalteten Proteinen innerhalb der Muskelfasern führt, die im Laufe der Zeit das Autophagiesystem im Skelettmuskel überlasten. Allerdings fanden sich histologisch im Muskel von GNE-Patienten keine Hinweise auf eine Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR)

(Nogalska et al., 2015). Des Weiteren zeigte eine umfassende Glycom-Analyse keine wesentlichen Veränderungen der Sialylierung von Glykokonjugaten in primären humanen GNE-Myopathie-Myoblasten (Sela et al., 2020).

Im GNE-Mausmodell führt Sialinsäuremangel zu oxidativem Stress, der durch eine orale antioxidative Behandlung verbessert werden kann. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob diese Behandlung auch die Autophagie-Zeichen im Muskel abmildert (Cho et al., 2017). Die zeitliche Kaskade der pathogenetischen Schritte zwischen Sialinsäuremangel und Autophagie bleibt insgesamt ungeklärt.

Ohne dass die Zusammenhänge des verstärkten Sialinsäure-Signals an der Zelloberfläche vollkommen im Detail geklärt sind, könnten die in der vorliegenden Arbeit etablierten Zellkulturmodelle als Testsystem verwendet werden, um die Effizienz innovativer Therapiestrategien bei der GNE-Myopathie in einem präklinischen Ansatz zu evaluieren.

Im Gegensatz zu den histologischen Lectin-basierten Quantifizierungsmethoden im Rahmen der erfolglosen klinischen ManNAc-Supplementations-Studie (Bedrosian, 2020; Carrillo et al., 2018), hat sich gezeigt, dass eine Verminderung des Sialinsäure-Gehalts von Zellen oder Geweben bei der GNE-Myopathie kein konsistenter therapeutischer Zielparameter ist (Salama et al., 2005). Das vorliegende Zellkultursystem kann auch dazu beitragen mittels FACS-Analyse, sogar in Hochdurchsatzverfahren, vielversprechende therapeutische Substanzen zu identifizieren, die bei GNE-Myopathie wirksam sind und die darüber hinaus auch therapeutische Effizienz bei anderen genetisch determinierten Muskelerkrankungen oder den sehr viel häufigeren degenerativen Myopathien des späteren Lebensalters zeigen könnten.

Die erstmals in der vorliegenden Arbeit durchgeführten systematischen metabolischen Markierungsversuche führen zu zwei entscheidenden Ergebnissen:

Zum einen zeigte der Sialinsäure-Biosyntheseweg *in vitro* in Abhängigkeit von der verfügbaren ManNAz-Vorläufer-Konzentration auf kinetischer Ebene eine bemerkenswerte und unerwartet komplexe Regulation.

Zum anderen ist die quantitative Bestimmung von Sialinsäure-Konjugaten durch indirekte Färbung mittels Lectinen oder Hexosamin-Analoga sehr stark abhängig von dem verwendeten Nachweisverfahren.

Diese beiden neuen Erkenntnisse liefern mögliche Erklärungen für teils widersprüchliche Sialinsäure-Messungen im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der GNE-Myopathie in der bisherigen Literatur. Wenn Sialinsäure als therapeutischer Zielparameter dienen soll, so ist eine einheitliche Standardisierung des Messverfahrens zu definieren.

Darüber hinaus sollen künftig weitere, bislang unbekannte Funktionen von GNE entschlüsselt werden, die möglicherweise die ungeklärte pathophysiologische Grundlage für den Abbau bestimmter Muskelgruppen bei der GNE-Myopathie darstellen und innovative Ansatzpunkte für kausale Therapiestrategien bieten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Biologische Membranen sind höchst komplexe, dynamische Strukturen, die das Analysieren von Zelloberflächen äußerst herausfordernd gestalten. Bei der GNE-Myopathie liegen möglicherweise Veränderungen in den Oberflächenstrukturen der Muskelfasern durch Störungen im Glycanstoffwechsel vor. Es kann folglich u. a. zu veränderten Zell-Zell-Interaktionen und vermehrten Abbau von Proteinen durch Proteasen kommen. Auch nach mehr als 15 Jahren intensiver Forschung bleibt die molekulare Pathogenese dieser äußerst seltenen Erkrankung weitgehend unbekannt. Die hochauflösende *d*STORM-Mikroskopie bietet die Möglichkeit der qualitativen und quantitativen Plasmamembran-Glycokonjugatdarstellung auf Einzelmolekül-Ebene durch angewandte Click-Chemie. Hierbei werden Glycokonjugate mit physiologisch verstoffwechselten Zuckern analoge an der Zelloberfläche präsentiert und *in vivo* in einer bioorthogonalen Reaktion kovalent mit einem Fluoreszenz-Farbstoff verbunden. Somit ist es möglich, die Zelloberflächenmoleküle nach Anregung des Farbstoffes in hochauflösenden Mikroskopaufnahmen zu analysieren.

Die vorliegende Arbeit liefert Einblicke in eine mögliche Anwendung der Aufnahmetechnik bei primären myogenen Zellen und die qualitative bzw. quantitative Auswertung des Glycokonjugatmusters auf der Oberflächenmembran. Erstmals wurde die *d*STORM-Mikroskopie erfolgreich zur Untersuchung von primären Muskelzellen eingesetzt. Nach schrittweiser Etablierung eines angepassten Färbeprotokolls wurden primäre Myoblasten von an GNE-Myopathie erkrankten Patienten mit Zellen aus Kontrollmuskelbiopsien verglichen. Die stärkste Oberflächenmarkierung wurde durch die Substitution von ManNAz *in vitro* erzielt.

Nach metabolischer Markierung zeigte sich bei den ausgewerteten Lokalisationsbefunden ein deutlicher Unterschied der GNE-Myopathie-Zellen anhand der Signalintensität der Oberflächenmoleküle. Ursächlich hierfür könnten eine verstärkte Aktivierung von Proteinbiosynthesen oder vermehrte Stabilisierung von Konjugaten bzw. ein verlangsamter Proteinabbau sein. Zudem war ein Intensitätsunterschied zwischen der homozygoten p.M743T und der zusammengesetzt heterozygoten Mutation p.R42W/p.F568I auffällig, der möglicherweise auf eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp schließen lässt. Zur Bestätigung dieser Hypothese ist die Auswertung weiterer Patientenzellen erforderlich.

Die Etablierung des Protokolls zur metabolischen Markierung von Glycokonjugaten auf primären Myoblasten, sowie die Auswertung der erhobenen Daten und mögliche Ansätze für therapeutische Strategien werden in dieser Arbeit ausführlich diskutiert.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der somit beschränkten Probandenzahl sind die Untersuchungsergebnisse nur bedingt aussagekräftig. Weitere Untersuchungen mit primären Myoblasten, sowie aus extramuskulärem Gewebe stammenden primären GNE-Myopathie-Patientenzellen sind indiziert.

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit primärer Patientenzellen wurden in einem weiteren Projekt myogene Mauszellen (C2C12-Zelllinie) mit GNE-Knockouts mittels metabolischer Markierung und FACS untersucht. Verschiedene Reportersubstrate ergaben Hinweise auf eine differentielle Regulation der Zelloberflächenglycane im Vergleich von WT- gegenüber KO-Myoblasten. Da die bisher etablierten Maus-Modelle der GNE-Myopathie die humane Erkrankung nicht hinreichend abbilden, sind die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Funktionsuntersuchungen ein wesentliches Instrument, die molekulare Pathogenese im Sialinsäure-Biosyntheseweg eingehender zu verstehen. Die in dieser Arbeit etablierten Zellkulturmodelle können als dynamisches Testsystem dienen, um die Effizienz innovativer Therapiestrategien bei der GNE-Myopathie in einem präklinischen Ansatz zu evaluieren.

LITERATUR

Almaraz, R.T., Tian, Y., Bhattacharya, R., Tan, E., Chen, S.H., Dallas, M.R., Chen, L., Zhang, Z., Zhang, H., Konstantopoulos, K., *et al.* (2012). Metabolic flux increases glycoprotein sialylation: implications for cell adhesion and cancer metastasis. *Mol Cell Proteomics* 11, M112 017558.

Amgarten, B., Rajan, R., Martínez-Sáez, N., Oliveira, B.L., Albuquerque, I.S., Brooks, R.A., Reid, D.G., Duer, M.J., and Bernardes, G.J. (2015). Collagen labelling with an azide-proline chemical reporter in live cells. *Chemical communications (Cambridge, England)* 51, 5250-5252.

Amsili, S., Shlomai, Z., Levitzki, R., Krause, S., Lochmuller, H., Ben-Bassat, H., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2007). Characterization of hereditary inclusion body myopathy myoblasts: possible primary impairment of apoptotic events. *Cell death and differentiation* 14, 1916-1924.

Argov, Z., and Yarom, R. (1984). "Rimmed vacuole myopathy" sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 64, 33-43.

Bard, J.A.M., and Martin, A. (2018). Recombinant Expression, Unnatural Amino Acid Incorporation, and Site-Specific Labeling of 26S Proteasomal Subcomplexes. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1844, 219-236.

Bedrosian, C.L. (2020). Clinical trial data available for UX001, aceneuramic acid extended-release. *J Neurol Sci* 411, 116724.

Bennmann, D., Weidemann, W., Thate, A., Kreuzmann, D., and Horstkorte, R. (2016). Aberrant O-GlcNAcylation disrupts GNE enzyme activity in GNE myopathy. *FEBS J* 283, 2285-2294.

Bischoff, J., and Kornfeld, R. (1984). The effect of 1-deoxymannojirimycin on rat liver alpha-mannosidases. *Biochem Biophys Res Commun* 125, 324-331.

Blazev, R., Ashwood, C., Abrahams, J.L., Chung, L.H., Francis, D., Yang, P., Watt, K.I., Qian, H., Quaife-Ryan, G.A., Hudson, J.E., *et al.* (2020). Integrated glycoproteomics identifies a role of N-glycosylation and galectin-1 on myogenesis and muscle development. *Mol Cell Proteomics*.

Bohlmeyer, T., Ferdensi, A., Bristow, M.R., Takahashi, S., and Zisman, L.S. (2003). Selective activation of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase expression in failing human heart ventricular myocytes. *Journal of cardiac failure* 9, 59-68.

Brevig, T., Røhrmann, J.H., and Riemann, H. (2006). Oxygen reduces accumulation of type IV collagen in endothelial cell subcellular matrix via oxidative stress. *Artificial organs* 30, 915-921.

Burgert, A., Letschert, S., Doose, S., and Sauer, M. (2015). Artifacts in single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol* 144, 123-131.

Carrillo, N., Malicdan, M.C., and Huizing, M. (2018). GNE Myopathy: Etiology, Diagnosis, and Therapeutic Challenges. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 15, 900-914.

- Celeste, F.V., Vilboux, T., Ciccone, C., de Dios, J.K., Malicdan, M.C., Leoyklang, P., McKew, J.C., Gahl, W.A., Carrillo-Carrasco, N., and Huizing, M. (2014). Mutation update for GNE gene variants associated with GNE myopathy. *Hum Mutat* **35**, 915-926.
- Chamova, T., Guergueltcheva, V., Gospodinova, M., Krause, S., Cirak, S., Kaprelyan, A., Angelova, L., Mihaylova, V., Bichev, S., Chandler, D., *et al.* (2015). GNE myopathy in Roma patients homozygous for the p.I618T founder mutation. *Neuromuscul Disord* **25**, 713-718.
- Chaouch, A., Brennan, K.M., Hudson, J., Longman, C., McConville, J., Morrison, P.J., Farrugia, M.E., Petty, R., Stewart, W., Norwood, F., *et al.* (2014). Two recurrent mutations are associated with GNE myopathy in the North of Britain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **85**, 1359-1365.
- Chen, X., Henschke, L., Wu, Q., Muthoosamy, K., Neumann, B., and Weil, T. (2013). Site-selective azide incorporation into endogenous RNase A via a "chemistry" approach. *Organic & biomolecular chemistry* **11**, 353-361.
- Cho, A., Hayashi, Y.K., Monma, K., Oya, Y., Noguchi, S., Nonaka, I., and Nishino, I. (2014). Mutation profile of the GNE gene in Japanese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles (GNE myopathy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **85**, 914-917.
- Cho, A., Malicdan, M., Miyakawa, M., Nonaka, I., Nishino, I., and Noguchi, S. (2017). Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. *Hum Mol Genet* **26**, 3081-3093.
- Costa, C., Pereira, S., Lima, L., Peixoto, A., Fernandes, E., Neves, D., Neves, M., Gaitero, C., Tavares, A., Gil da Costa, R.M., *et al.* (2015). Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS One* **10**, e0141253.
- Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T., Barash, M., Shemesh, M., Sadeh, M., Grabov-Nardini, G., *et al.* (2001). The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* **29**, 83-87.
- Eisenberg, I., Grabov-Nardini, G., Hochner, H., Korner, M., Sadeh, M., Bertorini, T., Bushby, K., Castellan, C., Felice, K., Mendell, J., *et al.* (2003). Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps. *Hum Mutat* **21**, 99.
- Gagiannis, D., Orthmann, A., Danssmann, I., Schwarzkopf, M., Weidemann, W., and Horstkorte, R. (2007). Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconjugate journal* **24**, 125-130.
- Gilormini, P.A., Lion, C., Vicogne, D., Levade, T., Potelle, S., Mariller, C., Guérardel, Y., Biot, C., and Foulquier, F. (2016). A sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAI and SiaNAI as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways. *Chemical communications (Cambridge, England)* **52**, 2318-2321.
- Goldfarb, L.G., Park, K.Y., Cervenakova, L., Gorokhova, S., Lee, H.S., Vasconcelos, O., Nagle, J.W., Semino-Mora, C., Sivakumar, K., and Dalakas, M.C. (1998). Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* **19**, 402-403.
- Greenberg, S.A. (2019). Inclusion body myositis: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* **15**, 257-272.

- Heilemann, M., Margeat, E., Kasper, R., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2005). Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J Am Chem Soc* *127*, 3801-3806.
- Hinderlich, S., Salama, I., Eisenberg, I., Potikha, T., Mantey, L.R., Yarema, K.J., Horstkorte, R., Argov, Z., Sadeh, M., Reutter, W., *et al.* (2004). The homozygous M712T mutation of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase results in reduced enzyme activities but not in altered overall cellular sialylation in hereditary inclusion body myopathy. *FEBS Lett* *566*, 105-109.
- Hinderlich, S., Stasche, R., Zeitler, R., and Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* *272*, 24313-24318.
- Hinderlich, S., Weidemann, W., Yardeni, T., Horstkorte, R., and Huizing, M. (2015). UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis. *Topics in current chemistry* *366*, 97-137.
- Hoffman, E.A., Frey, B.L., Smith, L.M., and Auble, D.T. (2015). Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem* *290*, 26404-26411.
- Huang, C., Seino, J., Wang, L., Haga, Y., and Suzuki, T. (2015). Autophagy regulates the stability of sialin, a lysosomal sialic acid transporter. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* *79*, 553-557.
- Huizing, M., Carrillo-Carrasco, N., Malicdan, M.C., Noguchi, S., Gahl, W.A., Mitrani-Rosenbaum, S., Argov, Z., and Nishino, I. (2014). GNE myopathy: new name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord* *24*, 387-389.
- Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K., and Wilson, I.B. (2009). Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal Biochem* *386*, 133-146.
- Itakura, Y., Sasaki, N., and Toyoda, M. (2018). Qualitative and quantitative alterations in intracellular and membrane glycoproteins maintain the balance between cellular senescence and human aging. *Aging (Albany NY)* *10*, 2190-2208.
- Jia, J., Abudu, Y.P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S.W., Peters, R., Mudd, M.H., Allers, L., Salemi, M., *et al.* (2019). Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy. *Autophagy* *15*, 169-171.
- Kamili, N.A., Arthur, C.M., Gerner-Smidt, C., Tafesse, E., Blenda, A., Dias-Baruffi, M., and Stowell, S.R. (2016). Key regulators of galectin-glycan interactions. *Proteomics* *16*, 3111-3125.
- Kane, M.S., Davids, M., Bond, M.R., Adams, C.J., Grout, M.E., Phelps, I.G., O'Day, D.R., Dempsey, J.C., Li, X., Golas, G., *et al.* (2017). Abnormal glycosylation in Joubert syndrome type 10. *Cilia* *6*, 2.
- Kayser, H., Zeitler, R., Kannicht, C., Grunow, D., Nuck, R., and Reutter, W. (1992). Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* *267*, 16934-16938.
- Krause, S., Schlotter-Weigel, B., Walter, M.C., Najmabadi, H., Wiendl, H., Muller-Hocker, J., Muller-Felber, W., Pongratz, D., and Lochmuller, H. (2003). A novel homozygous missense mutation in the GNE gene of a patient with quadriceps-sparing

- hereditary inclusion body myopathy associated with muscle inflammation. *Neuromuscul Disord* **13**, 830-834.
- Lauc, G., Pezer, M., Rudan, I., and Campbell, H. (2016). Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 1574-1582.
- Leoyklang, P., Class, B., Noguchi, S., Gahl, W.A., Carrillo, N., Nishino, I., Huizing, M., and Malicdan, M.C. (2018). Quantification of lectin fluorescence in GNE myopathy muscle biopsies. *Muscle & nerve* **58**, 286-292.
- Lescar, J., Sanchez, J.F., Audfray, A., Coll, J.L., Breton, C., Mitchell, E.P., and Imberty, A. (2007). Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by Helix pomatia lectin. *Glycobiology* **17**, 1077-1083.
- Letschert, S., Gohler, A., Franke, C., Bertleff-Zieschang, N., Memmel, E., Doose, S., Seibel, J., and Sauer, M. (2014). Super-resolution imaging of plasma membrane glycans. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 10921-10924.
- Liu, Y., Li, J., Han, Y., Chen, Y., Liu, L., Lang, J., Yang, C., Luo, H., and Ning, J. (2020). Advanced glycation end-products suppress autophagy by AMPK/mTOR signaling pathway to promote vascular calcification. *Molecular and cellular biochemistry* **471**, 91-100.
- Luchansky, S.J., Hang, H.C., Saxon, E., Grunwell, J.R., Yu, C., Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2003). Constructing azide-labeled cell surfaces using polysaccharide biosynthetic pathways. *Methods in enzymology* **362**, 249-272.
- Lyer, P.N., Wilkinson, K.D., and Goldstein, L.J. (1976). An -N-acetyl-D-glycosamine binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *Archives of biochemistry and biophysics* **177**, 330-333.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., and Nishino, I. (2009). Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* **15**, 690-695.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., and Nishino, I. (2007a). Autophagy in a mouse model of distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Autophagy* **3**, 396-398.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., and Nishino, I. (2007b). A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* **16**, 2669-2682.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Hayashi, Y.K., and Nishino, I. (2007c). A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* **16**, 115-128.
- Martinsson, T., Darin, N., Kyllerman, M., Oldfors, A., Hallberg, B., and Wahlstrom, J. (1999). Dominant hereditary inclusion-body myopathy gene (IBM3) maps to chromosome region 17p13.1. *Am J Hum Genet* **64**, 1420-1426.
- Mateos-Gil, P., Letschert, S., Doose, S., and Sauer, M. (2016). Super-Resolution Imaging of Plasma Membrane Proteins with Click Chemistry. *Front Cell Dev Biol* **4**, 98.
- McKinnon, K.M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* **120**, 5.1.1-5.1.11.

- Mizuguchi, Y., Yatabe, M., Morishima, N., Morimoto, S., and Ichihara, A. (2018). Buffering roles of (pro)renin receptor in starvation-induced autophagy of skeletal muscles. *Physiological reports* 6.
- Morozzi, C., Sedlakova, J., Serpi, M., Avigliano, M., Carbajo, R., Sandoval, L., Valles-Ayoub, Y., Crutcher, P., Thomas, S., and Pertusati, F. (2019). Targeting GNE Myopathy: A Dual Prodrug Approach for the Delivery of N-Acetylmannosamine 6-Phosphate. *J Med Chem*.
- Münster, A.K., Eckhardt, M., Potvin, B., Mühlenhoff, M., Stanley, P., and Gerardy-Schahn, R. (1998). Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9140-9145.
- Nagasundaram, M., Horstkorte, R., and Gnanapragassam, V.S. (2020). Sialic Acid Metabolic Engineering of Breast Cancer Cells Interferes with Adhesion and Migration. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25.
- Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforet, P., Labelle, V., Urtizberea, J.A., Figarella-Branger, D., Romero, N., Attarian, S., *et al.* (2007). Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64, 1176-1182.
- Nieto-Garcia, O., Wratil, P.R., Nguyen, L.D., Bohrsch, V., Hinderlich, S., Reutter, W., and Hackenberger, C.P.R. (2016). Inhibition of the key enzyme of sialic acid biosynthesis by C6-Se modified N-acetylmannosamine analogs. *Chemical science* 7, 3928-3933.
- Nishino, I., Noguchi, S., Murayama, K., Driss, A., Sugie, K., Oya, Y., Nagata, T., Chida, K., Takahashi, T., Takusa, Y., *et al.* (2002). Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59, 1689-1693.
- Nogalska, A., D'Agostino, C., Engel, W.K., Cacciottolo, M., Asada, S., Mori, K., and Askanas, V. (2015). Activation of the Unfolded Protein Response in Sporadic Inclusion-Body Myositis but Not in Hereditary GNE Inclusion-Body Myopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 74, 538-546.
- Noguchi, S., Keira, Y., Murayama, K., Ogawa, M., Fujita, M., Kawahara, G., Oya, Y., Imazawa, M., Goto, Y., Hayashi, Y.K., *et al.* (2004). Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279, 11402-11407.
- Nonaka, I., Sunohara, N., Ishiura, S., and Satoyoshi, E. (1981). Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 51, 141-155.
- Parker, R.B., and Kohler, J.J. (2010). Regulation of intracellular signaling by extracellular glycan remodeling. *ACS chemical biology* 5, 35-46.
- Patzel, K.A., Yardeni, T., Le Poec-Celic, E., Leoyklang, P., Dorward, H., Alonzi, D.S., Kukushkin, N.V., Xu, B., Zhang, Y., Sollogoub, M., *et al.* (2014). Non-specific accumulation of glycosphingolipids in GNE myopathy. *J Inherit Metab Dis* 37, 297-308.
- Penner, J., Mantey, L.R., Elgavish, S., Ghaderi, D., Cirak, S., Berger, M., Krause, S., Lucka, L., Voit, T., Mitrani-Rosenbaum, S., *et al.* (2006). Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry* 45, 2968-2977.

-
- Pogoryelova, O., Gonzalez Coraspe, J.A., Nikolenko, N., Lochmuller, H., and Roos, A. (2018). GNE myopathy: from clinics and genetics to pathology and research strategies. *Orphanet J Rare Dis* 13, 70.
- Preethish-Kumar, V., Pogoryelova, O., Polavarapu, K., Gayathri, N., Seena, V., Hudson, J., Nishino, I., Prasad, C., Lochmuller, H., and Nalini, A. (2016). Beevor's sign: a potential clinical marker for GNE myopathy. *Eur J Neurol* 23, e46-48.
- Qin, W., Qin, K., Fan, X., Peng, L., Hong, W., Zhu, Y., Lv, P., Du, Y., Huang, R., Han, M., *et al.* (2018). Artificial Cysteine S-Glycosylation Induced by Per-O-Acetylated Unnatural Monosaccharides during Metabolic Glycan Labeling. *Angew Chem Int Ed Engl* 57, 1817-1820.
- Razali, N.M., and Wah, Y.B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2, 21-33.
- Reyes-Martinez, C., Nguyen, Q.M., Kassan, M., and Gonzalez, A.A. (2019). (Pro)renin Receptor-Dependent Induction of Profibrotic Factors Is Mediated by COX-2/EP4/NOX-4/Smad Pathway in Collecting Duct Cells. *Frontiers in pharmacology* 10, 803.
- Salama, I., Hinderlich, S., Shlomain, Z., Eisenberg, I., Krause, S., Yarema, K., Argov, Z., Lochmuller, H., Reutter, W., Dabby, R., *et al.* (2005). No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 221-226.
- Sanchez, J.F., Lescar, J., Chazalet, V., Audfray, A., Gagnon, J., Alvarez, R., Breton, C., Imberty, A., and Mitchell, E.P. (2006). Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J Biol Chem* 281, 20171-20180.
- Sasaki, N., Itakura, Y., and Toyoda, M. (2017). Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts. *Stem cell research & therapy* 8, 81.
- Sauer, A.K., Liang, C.H., Stech, J., Peeters, B., Quéré, P., Schwegmann-Wessels, C., Wu, C.Y., Wong, C.H., and Herrler, G. (2014). Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PLoS One* 9, e89529.
- Saxon, E., and Bertozzi, C.R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science (New York, NY)* 287, 2007-2010.
- Schauer, R., Sommer, U., Kruger, D., van Unen, H., and Traving, C. (1999). The terminal enzymes of sialic acid metabolism: acylneuraminate pyruvate-lyases. *Biosci Rep* 19, 373-383.
- Seino, J., Wang, L., Harada, Y., Huang, C., Ishii, K., Mizushima, N., and Suzuki, T. (2013). Basal autophagy is required for the efficient catabolism of sialyloligosaccharides. *J Biol Chem* 288, 26898-26907.
- Sela, I., Goss, V., Becker-Cohen, M., Dell, A., Haslam, S.M., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2020). The glycomic sialylation profile of GNE Myopathy muscle cells does not point to consistent hyposialylation of individual glycoconjugates. *Neuromuscul Disord* 30, 621-630.
- Tajima, Y., Uyama, E., Go, S., Sato, C., Tao, N., Kotani, M., Hino, H., Suzuki, A., Sanai, Y., Kitajima, K., *et al.* (2005). Distal myopathy with rimmed vacuoles: impaired O-glycan formation in muscular glycoproteins. *The American journal of pathology* 166, 1121-1130.

- Takahashi, S., Hori, K., Takahashi, K., Ogasawara, H., Tomatsu, M., and Saito, K. (2001). Effects of nucleotides on N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerases (renin-binding proteins): comparative biochemical studies. *Journal of biochemistry* *130*, 815-821.
- Takatsuki, A., and Tamura, G. (1971). Effect of tunicamycin on the synthesis of macromolecules in cultures of chick embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *The Journal of antibiotics* *24*, 785-794.
- Tian, H., Sakmar, T.P., and Huber, T. (2016). A simple method for enhancing the bioorthogonality of cyclooctyne reagent. *Chemical communications (Cambridge, England)* *52*, 5451-5454.
- Tomimitsu, H., Ishikawa, K., Shimizu, J., Ohkoshi, N., Kanazawa, I., and Mizusawa, H. (2002). Distal myopathy with rimmed vacuoles: novel mutations in the GNE gene. *Neurology* *59*, 451-454.
- Tribulatti, M.V., Carabelli, J., Prato, C.A., and Campetella, O. (2020). Galectin-8 in the onset of the immune response and inflammation. *Glycobiology* *30*, 134-142.
- van de Linde, S., Loschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* *6*, 991-1009.
- van de Linde, S., Sauer, M., and Heilemann, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J Struct Biol* *164*, 250-254.
- van Geel, R., Pruijn, G.J., van Delft, F.L., and Boelens, W.C. (2012). Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *Bioconjug Chem* *23*, 392-398.
- van Tol, W., Wessels, H., and Lefeber, D.J. (2019). O-glycosylation disorders pave the road for understanding the complex human O-glycosylation machinery. *Current opinion in structural biology* *56*, 107-118.
- Walter, L.A., Batt, A.R., Darabedian, N., Zaro, B.W., and Pratt, M.R. (2018). Azide- and Alkyne-Bearing Metabolic Chemical Reporters of Glycosylation Show Structure-Dependent Feedback Inhibition of the Hexosamine Biosynthetic Pathway. *Chembiochem* *19*, 1918-1921.
- Wang, Z., Sun, Z., Li, A.V., and Yarema, K.J. (2006). Roles for UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc 6-kinase outside of sialic acid biosynthesis: modulation of sialyltransferase and BiP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* *281*, 27016-27028.
- Wani, W.Y., Ouyang, X., Benavides, G.A., Redmann, M., Cofield, S.S., Shacka, J.J., Chatham, J.C., Darley-Usmar, V., and Zhang, J. (2017). O-GlcNAc regulation of autophagy and α -synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Molecular brain* *10*, 32.
- Wen, X.Y., Tarailo-Graovac, M., Brand-Arzamendi, K., Willems, A., Rakic, B., Huijben, K., Da Silva, A., Pan, X., El-Rass, S., Ng, R., *et al.* (2018). Sialic acid catabolism by N-acetylneuraminidase pyruvate lyase is essential for muscle function. *JCI Insight* *3*.
- Willems, A.P., van Engelen, B.G., and Lefeber, D.J. (2016). Genetic defects in the hexosamine and sialic acid biosynthesis pathway. *Biochim Biophys Acta* *1860*, 1640-1654.

Wolter, S., Loschberger, A., Holm, T., Aufmkolk, S., Dabauvalle, M.C., van de Linde, S., and Sauer, M. (2012). rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat Methods* 9, 1040-1041.

Yabe, I., Higashi, T., Kikuchi, S., Sasaki, H., Fukazawa, T., Yoshida, K., and Tashiro, K. (2003). GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation. *Neurology* 61, 384-386.

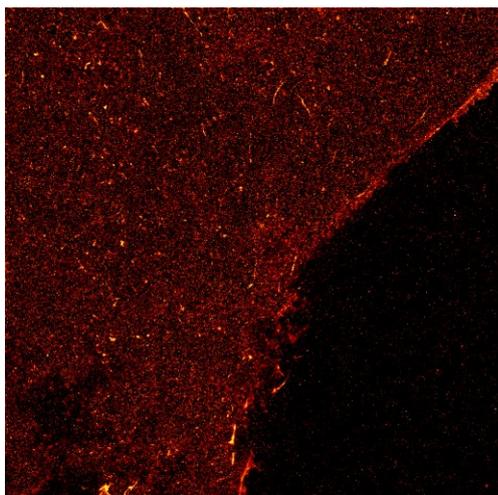
Yonekawa, T., Malicdan, M.C., Cho, A., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., Mine, T., Yamamoto, T., Nishino, I., and Noguchi, S. (2014). Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice. *Brain* 137, 2670-2679.

Yoshida, N., Endo, J., Kinouchi, K., Kitakata, H., Moriyama, H., Kataoka, M., Yamamoto, T., Shirakawa, K., Morimoto, S., Nishiyama, A., *et al.* (2019). (Pro)renin receptor accelerates development of sarcopenia via activation of Wnt/YAP signaling axis. *Aging cell* 18, e12991.

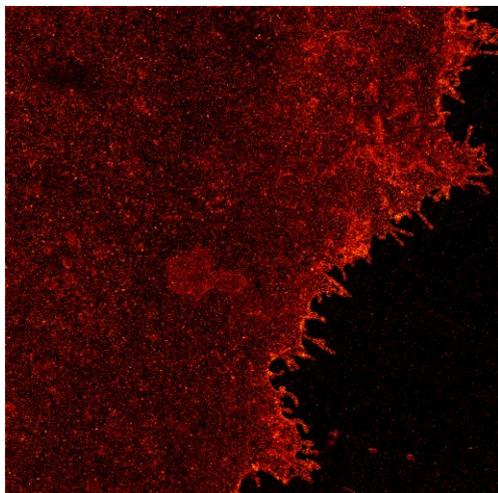
Anhang

Anhang 1: Lokalisationen pro μm^2

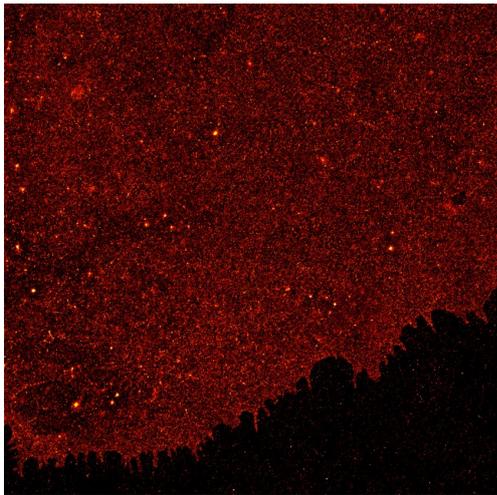
Lokalisationen	Membran 1	Membran 2	Membran 3	Hintergrund 1	Hintergrund 2	Hintergrund 3
Cf Zelle 1	1665	1735	1697	127	105	96
Cf Zelle 2	562	625	629	103	116	102
Cf Zelle 3	602	696	642	64	93	61
Cf Zelle 4	738	667	749	76	83	94
Cf Zelle 5	981	1014	999	168	141	160
Cf Zelle 6	854	877	935	82	74	77
Cf Zelle 7	1085	1088	1043	73	73	72
Cm Zelle 1	386	516	410	49	46	46
Cm Zelle 2	1221	1013	1116	98	68	61
Cm Zelle 3	801	781	774	45	30	46
Cm Zelle 4	820	790	764	59	56	52
Pm Zelle 1	2642	2324	2429	102	67	66
Pm Zelle 2	2062	2150	2201	137	138	142
Pm Zelle 3	1756	1652	1681	161	129	157
Pm Zelle 4	2326	2170	2489	251	303	256
Pf Zelle 1	876	815	827	41	31	32
Pf Zelle 2	1329	1352	1346	117	66	69
Pf Zelle 3	1462	1496	1495	258	218	267
Pf Zelle 4	1946	2047	1878	71	69	77



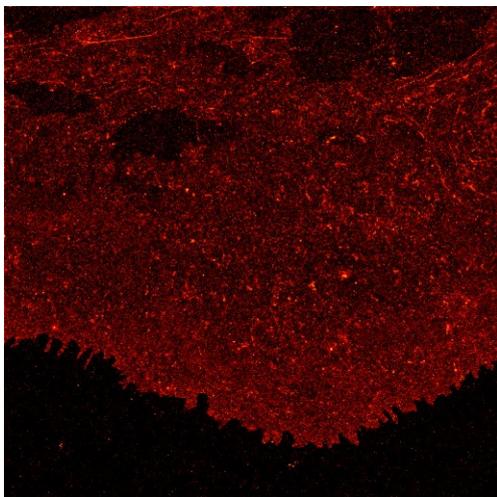
Anhang 2A: dSTORM-Aufnahme Cm



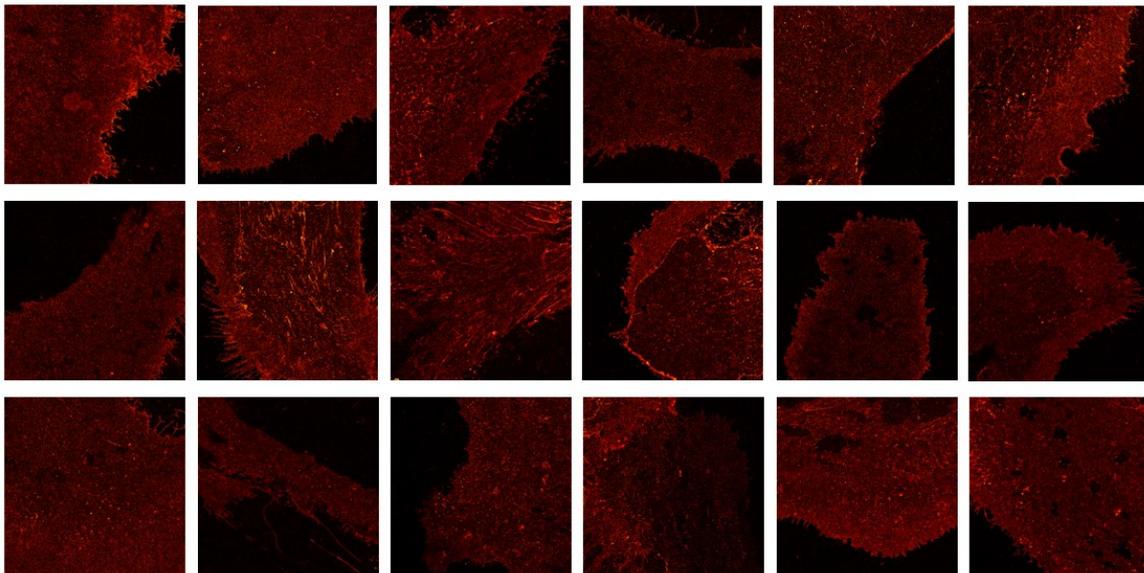
Anhang 2B: dSTORM-Aufnahme Pf



Anhang 2C: *d*STORM-Aufnahme Cf



Anhang 2D: *d*STORM-Aufnahme Pm



Anhang 3: Übersicht über die ausgewerteten *d*STORM-Aufnahmen

Anhang 4: Stoffwechselwege der verwendeten Metabolite:

UDP-GlcNAc

<https://biocyc.org/HUMAN/substring-search?type=NIL&object=UDP-GlcNAc&quickSearch=Quick+Search>

- 1 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4
- 2 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7
- 3 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8
- 4 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 9
- 5 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein 1
- 6 Acetylgalactosaminyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase
- 7 bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
- 8 Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1
- 9 Putative UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase LOC100288842
- 10 UDP-glucose 4-epimerase
- 11 UDP-N-acetylglucosamine transporter

Anhang 5: Statistische Auswertung des FACS-Experiments mit Tunicamycin-Behandlung und Konkurrenz

Tunicamycin treatment and competition: 2way ANOVA from GraphPad Prism

Within each column, compare rows (simple effects within columns)

Number of families	3
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
WT 50					
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	-3160	-12548 to 6229	No	ns	0,3057
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	-9774	-20924 to 1377	No	ns	0,0609
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	3490	-8334 to 15314	No	ns	0,2685
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	-6614	-13948 to 720,1	No	ns	0,0598
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	6650	-951,2 to 14250	No	ns	0,0624
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	13264	8196 to 18331	Yes	**	0,0079
KO 51					
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	-18466	-28200 to -8732	Yes	*	0,018
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	-22172	-33393 to -10950	Yes	*	0,0175
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	-13978	-27745 to -210,6	Yes	*	0,0489
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	-3706	-13342 to 5931	No	ns	0,2688
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	4488	-6238 to 15214	No	ns	0,2276
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	8194	-2592 to 18979	No	ns	0,0835
KO 52					
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	-19240	-28870 to -9610	Yes	*	0,0169
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	-13277	-21399 to -5154	Yes	*	0,0222
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	-10240	-18785 to -1694	Yes	*	0,0373
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	5964	-2504 to 14431	No	ns	0,096
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	9001	463,0 to 17538	Yes	*	0,0452
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	3037	-5004 to 11078	No	ns	0,2782

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
WT 50								
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	26698	29857	-3160	1252	2	2	3,568	1,87
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	26698	36471	-9774	1130	2	2	12,24	1,531
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	26698	23208	3490	1110	2	2	4,446	1,46
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	29857	36471	-6614	928,8	2	2	10,07	1,794
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	29857	23208	6650	905,1	2	2	10,39	1,712
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	36471	23208	13264	725,8	2	2	25,85	1,986
KO 51								
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	19190	37656	-18466	1086	2	2	24,05	1,634
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	19190	41362	-22172	1159	2	2	27,05	1,551
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	19190	33168	-13978	1274	2	2	15,51	1,447
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	37656	41362	-3706	1379	2	2	3,8	1,985
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	37656	33168	4488	1477	2	2	4,297	1,92
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	41362	33168	8194	1532	2	2	7,564	1,972
KO 52								
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz	15336	34576	-19240	1034	2	2	26,31	1,591
ohne ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	15336	28612	-13277	955,7	2	2	19,65	1,697
ohne ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	15336	25575	-10240	978,6	2	2	14,8	1,664
25 µM ManNAz vs. 25 µM ManNAz+TN	34576	28612	5964	1206	2	2	6,991	1,977
25 µM ManNAz vs. ManNAz/-Ac 50:50	34576	25575	9001	1224	2	2	10,39	1,989
25 µM ManNAz+TN vs. ManNAz/-Ac 50:50	28612	25575	3037	1159	2	2	3,705	1,998

DANKSAGUNG

Danken möchte ich zunächst Frau Univ.-Prof. Dr. med. Marianne Dieterich, FANA, FEAN, Direktorin der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Friedrich-Baur-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Markus Sauer, Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Biozentrum, Julius-Maximilians-Universität Würzburg für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität, München und der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause für ihre großartige Betreuung über die gesamte Entstehungszeit dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Letschert meinen Dank aussprechen für seine Expertise und kreative Unterstützung bei der Versuchsdurchführung der dSTORM-Analyse.

Herr Prof. Dirk Lefebre, Universität Nijmegen, Niederlande, stellte freundlicherweise GNE-Knockout-Myoblastenlinien und eine verwandte Kontrollzelllinie zur Verfügung.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Dr. med. Christiane Sander und Dr. med. Rainer Sander für die Ermöglichung des medizinischen Werdegangs und ihre Unterstützung in jeder Lebenslage danken.

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Hochauflösende Mikroskopie (dSTORM) von Plasmamembran-Glycanen auf primären Muskelzellen bei GNE-Myopathie“ selbständig angefertigt habe, 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. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.02.2022

Maximilian Christoph Friedrich Sander