

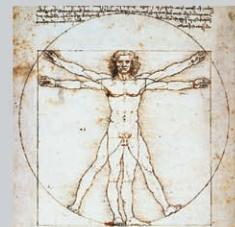
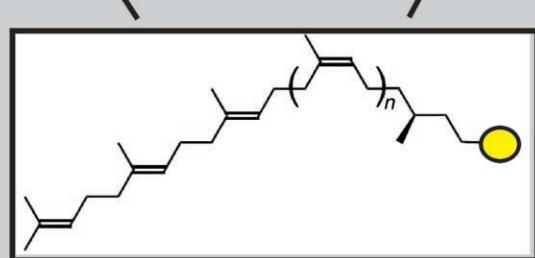
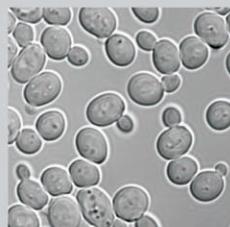
Proteinglycosylierung, konserviert von der Bäckerhefe bis zum Menschen: Ein Modellorganismus hilft bei der Aufklärung menschlicher Erbkrankheiten

Ludwig Lehle,* Sabine Strahl und Widmar Tanner*

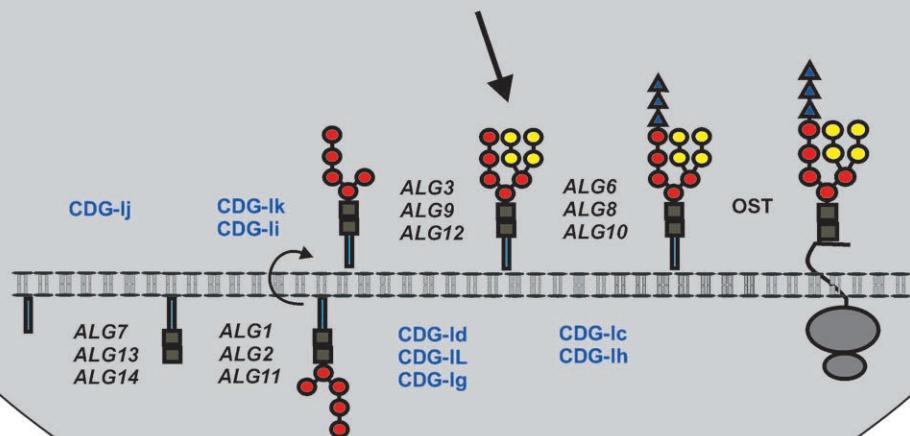
Stichwörter:

Dolichol · Glycosylierungen ·
Kongenitale Glycosylierungs-
störungen ·
Proteinmodifikationen ·
Transferasen

Professor Otto Kandler
zum 85. Geburtstag gewidmet



Dolicholphosphat-Mannose



Proteinmodifikationen durch Saccharide sind in großer Zahl bekannt. Der vorliegende Aufsatz konzentriert sich auf zwei Typen von Modifikationen, die Protein-N-Glycosylierung und die Protein-O-Mannosylierung, die mit wenigen Ausnahmen von Hefe bis Mensch im Laufe der Evolution konserviert geblieben sind. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass die Glycosylierungsprozesse im endoplasmatischen Reticulum der Zellen beginnen und im Golgi-Apparat fortgesetzt werden und dass die Anfangsschritte über dolicholaktivierte Vorstufen verlaufen. In der gentechnisch einfach handhabbaren Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sind die beiden Prozesse molekularbiologisch am besten untersucht worden. Dies ist der Hauptgrund dafür, dass zahlreiche genetisch bedingte, schwerwiegende Entwicklungsstörungen bei Kindern, wie das CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) und die kongenitalen Muskeldystrophien mit neuronalen Migrationsdefekten, mithilfe der Hefe aufgeklärt werden konnten.

1. Einleitung

Proteine aller Lebewesen sind im Regelfall auf vielerlei Weise modifiziert. Eine funktionell wichtige posttranskriptionale Modifikation ist dabei die Proteinphosphorylierung. Das Vorhandensein oder Fehlen von Phosphatgruppen an spezifischen Hydroxyaminosäuren reguliert unter anderem die Aktivität, Stabilität, Lokalisation und Oligomerisierung von Proteinen und steuert auf diese Weise den Durchsatz von Stoffwechselwegen, die Weitergabe externer und interner Signale sowie Zeitpunkt und Verlauf spezifischer Entwicklungsschritte.^[1] Die komplexeste und gleichzeitig energetisch aufwändigste Modifizierung von Proteinen ist jedoch die Proteinglycosylierung. Bereits die Vielzahl der verschiedenen Zucker, die entweder *N*- oder *O*-glykosidisch mit den Aminosäureresten Asparagin oder den Hydroxyaminosäureresten Threonin, Serin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin und Tyrosin verbunden sein können (Abbildung 1), spiegelt die Komplexität der Proteinglycosylierung eindrücklich wider.^[2] Dazu kommt die kaum überschaubare Fülle der mehr oder weniger stark verzweigten Oligo- und Polysaccharide unterschiedlichster Zusammensetzung, die sich an den jeweiligen proximalen Bindungszucker anschließen. Anders als bei der Proteinphosphorylierung blieb die funktionelle Bedeutung der Glycosylierung lange Zeit weitgehend unverstanden, sieht man einmal von der Rolle von Sacchariden für die Blutgruppenspezifität ab.^[3] Erst in den letzten Jahren wurde klar, dass das Fehlen einzelner Glycosyltransferasen, die am Aufbau der „Zuckerbäume“ bestimmter Proteine beteiligt sind, zu schwersten erblichen Entwicklungsstörungen beim Menschen führen kann. Zwar sind die molekularen Zusammenhänge und Ursachen dieser Störungen erst in Ansätzen verstanden, schon heute scheint aber klar, dass die Zuckerkomponenten von Proteinen eine herausragende Rolle in der embryonalen und frühkindlichen Entwicklung beim Menschen und bei nahezu allen anderen Lebewesen spielen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6957
2. Biosynthese von Glycoproteinen	6958
3. Funktionelle Aspekte der Proteinglycosylierung	6964
4. Hefe hilft bei der Aufklärung genetisch bedingter Glycosylierungsdefekte	6967
5. Ausblick	6969

N-Glycan

Asn — GlcNAc

O-Glycan

Ser/Thr —	Man
—	GlcNAc
—	GlcNAc
—	Gal
—	Fuc
—	Glc
Hyp —	Ara
—	Gal
—	GlcNAc
Ser —	Xyl
Hyl —	Gal
Tyr —	Glc

Abbildung 1. Typen von eukaryotischen Zucker-Peptid-Bindungen. Verwendete Abkürzungen: Asn: Asparagin, Ser: Serin, Thr: Threonin, Hyp: Hydroxylysin, Hyp: Hydroxyprolin, Tyr: Tyrosin, GlcNAc: *N*-Acetylglucosamin, GalNAc: *N*-Acetylgalactosamin, Glc: Glucose, Gal: Galactose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Man: Mannose, Fuc: Fucose. Die anomeren Konfigurationen können Lit. [2] entnommen werden.

[*] Prof. Dr. L. Lehle, Prof. Dr. W. Tanner
Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie
Universität Regensburg
Universitätstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-3352
E-Mail: luwig.lehle@biologie.uni-regensburg.de
widmar.tanner@biologie.uni-regensburg.de
Prof. Dr. S. Strahl
Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften
Abteilung V, Zellchemie
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg (Deutschland)

Die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, ein vielgenutzter eukaryotischer Modellorganismus, verfügt ausschließlich über zwei Wege der Proteinglycosylierung: die *N*-Glycosylierung von Asparaginresten und die *O*-Mannosylierung von Threonin- oder Serinresten. Zur Bildung der Glykanketten sind dabei über 100 Genprodukte notwendig. *N*-Glycosylierung und *O*-Mannosylierung sind von der Hefe bis hin zum Menschen hoch konserviert und unterscheiden sich von allen übrigen, in Abbildung 1 aufgezeigten Typen der Proteinglycosylierung in zwei wichtigen Details: Erstens werden beide Glycosylierungstypen bereits im endoplasmatischen Reticulum (ER) eingeleitet, und zweitens wirken lipidaktivierte Zucker und keine Zuckernucleotide als unmittelbare Vorstufen für die Verknüpfung mit dem Protein.^[4,5]

Die meisten der oben erwähnten, genetisch bedingten Störungen beim Menschen gehen auf Defekte in genau diesen beiden Glycosylierungswegen zurück. Der vorliegende Auf-

satz konzentriert sich daher auf die von der Bäckerhefe bis zum Menschen konservierten Proteinmodifikationen und stellt ihre Besonderheiten und funktionelle Bedeutung vor. Zudem soll gezeigt werden, in welcher Weise die Bäckerhefe als Modell bei der Aufklärung biochemischer Leistungen in komplexeren Systemen helfen kann. Andere Glycosylierungstypen werden nur kurz besprochen, da diese bereits in zahlreichen Übersichtsartikeln behandelt wurden.^[2,6-11]

2. Biosynthese von Glycoproteinen

Unter Glycoproteinen versteht man Proteine, die kovalent mit meist verzweigten, aus unterschiedlichen Monomeren bestehenden Oligosacchariden verknüpft sind.^[12] Der Kohlenhydratanteil der Glycoproteine liegt in der Regel bei unter 20 % des Molekulargewichts, kann in manchen Fällen aber bis zu 90 % betragen. Bei tierischen Zellen werden Glycoproteine von den stets extrazellulären Proteoglycanen abgegrenzt, die meist sehr viel längere, unverzweigte, aus sich seriell wiederholenden Einheiten bestehende Polysaccharidketten enthalten.^[12] Bei den so genannten *N*-glycosylierten Proteinen sind die Oligosaccharide *N*-glycosidisch mit der γ -Amidogruppe eines Asparaginrestes verbunden. Diese Gruppe der Glycoproteine ist hinsichtlich ihrer Struktur, Biosynthese und Funktion am besten untersucht; sie kommt in allen eukaryotischen Organismen, aber auch bei Archäen und in Ausnahmen bei Bakterien vor.^[13] In der Regel sind *N*-glycosylierte Proteine sekretorische Proteine, d.h., sie werden entweder aus den Zellen sezerniert oder sie gelangen auf dem gleichen intrazellulären Sekretionsweg an die Zelloberfläche, wo sie in der Plasmamembran, der extrazellulären Matrix oder der Zellwand verankert werden. Dabei ist der Kohlenhydratanteil des Proteins nach außen orientiert und bildet einen Teil der Glycocalyx.

Von den *O*-glycosylierten Proteinen wurde der Mucin-Typ intensiv studiert, dessen über GalNAc an Serin oder Threonin gebundene, wenig verzweigte und meist langkettige Saccharide Bestandteile der extrazellulären Schleime bei Tieren sind. Die Proteine des GlcNAc-Typs tragen an Serin und Threonin nur diesen einen Aminozucker und bilden nicht zuletzt wegen ihres intrazellulären Vorkommens die Ausnahme unter den Glycoproteinen. Schließlich gibt es den bei Hefen entdeckten *O*-Man-Typ, der in neuerer Zeit auch in Säugern nachgewiesen wurde und wegen seiner funktionellen Bedeutung Aufmerksamkeit erlangt hat. Beim *O*-Man-Typ ist ein Mannoserest mit Serin oder Threonin verknüpft; bei der Hefe kann er zu einer Oligomannosekette verlängert sein, während sich bei höheren Eukaryoten ein lineares Heterosaccharid aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), Galactose (Gal) und Neuraminsäure anschließt.

2.1. *N*-glycosylierte Proteine

2.1.1. Frühe Versuche

Der mit der γ -Amidogruppe des Asparaginrestes verbundene Zucker ist bei allen Eukaryoten ein *N*-Acetylglucosamin, was bereits in den 1960er Jahren aufgeklärt



Ludwig Lehle studierte Biologie und Chemie an der LMU München und promovierte 1972 bei Prof. O. Kandler und Prof. W. Tanner. Nach einem Forschungsaufenthalt bei Prof. C. E. Ballou (1978–1979) an der University of California, Berkeley, habilitierte er 1980 an der Universität Regensburg; seit 1990 ist er Professor am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Biochemie und Molekularbiologie der Proteinglycosylierung und die Untersuchung der molekularen Defekte der Glycoproteinbiosynthese beim Menschen. 2004 erhielt er den Körber-Preis für die Europäische Wissenschaft.



Sabine Strahl studierte Biologie an der Universität Regensburg und promovierte 1991 bei Prof. W. Tanner. Nach einem Postdoktorandenlaufenthalt bei Prof. M. Grunstein an der University of California, Los Angeles, wurde sie Gruppenleiterin an der Universität Regensburg und habilitierte 2000 in Botanik und Zellbiologie. Ihre Arbeiten zur Protein-*O*-Mannosylierung wurden 2003 mit dem Arnold Sommerfeld Preis der Bayerischen Akademie der Wissenschaften ausgezeichnet. 2004 wurde sie zur C3-Professorin des Heidelberg Instituts für Pflanzenwissenschaften an die Universität Heidelberg berufen.



Widmar Tanner studierte Biologie, Chemie und Geographie an der LMU München. Die Promotionsarbeit fertigte er bei Prof. H. Beevers an (Purdue University, Indiana) und reichte sie 1964 in München ein. Anschließend arbeitete er bei Prof. O. Kandler an der Oligosaccharid-Biosynthese (Entdeckung einer Cofaktor-Rolle des myo-Inosits) und der Photophosphorylierung. 1969 habilitierte er in Botanik und wurde 1970 auf einen Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie an der Universität Regensburg berufen. Seine Hauptarbeitsgebiete sind Proteinglycosylierung und Membrantransport.

wurde.^[14] Das Studium der Biosynthese gestaltete sich insfern schwierig, als die damals gerade entdeckten aktivierten Zucker, die Zuckernucleotide,^[15] sich nicht als geeignete Vorstufen für bestimmte Glycosyltransferasen erwiesen. Erst ein neues Prinzip der Synthese glycosidischer Bindungen wies den richtigen Weg: die Nutzung von polyprenolphosphatkaktivierten Sacchariden, den so genannten Lipid-Intermediaten, die bei der Bildung bakterieller Polysaccharide und Peptidoglycane (Mureine) entdeckt worden waren.^[16] Die eukaryotischen Polyprenole haben einen gesättigten α -ständigen Isoprenrest und werden Dolichole genannt. Die Hauptkomponenten bei der Hefe bestehen aus 14 bis 18 Isoprenresten, bei Säugern ist die Kette um drei Isopreneinheiten länger. Es wurden sowohl Dol-P-Monosaccharide (Dol-P-Man, Dol-P-Glc)^[17] als auch Dol-PP-Oligosaccharide^[18] aus *S. cerevisiae* und aus Säugern isoliert und charakterisiert (P = Monophosphat, PP = Diphosphat). Die Struktur des Oligosaccharids wurde von Kornfeld und Mitarbeitern aufgeklärt (Abbildung 2). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die unterschiedlichsten *N*-gebundenen Oligosaccharide der verschiedenen Proteine allesamt als GlcNAc₂Man₉Glc₃ vom Dol-PP-aktivierten Zustand auf das Protein übertragen werden. Im Anschluss wird das proteingebundene Oligosaccharid durch Abspaltung bestimmter Zuckerreste und durch Hinzufügen anderer Zuckerreste protein- und gewebsspezifisch in seine endgültige Struktur umgewandelt.^[4,19]

In den folgenden Abschnitten werden die Biosynthese der lipidgebundenen Vorstufen und die Übertragung der Sac-

charide auf Proteine im Detail besprochen. Dies geschieht anhand von Daten, die für *S. cerevisiae* und für Säuger erhalten wurden, da von diesen Organismen die eingehendsten Untersuchungen vorliegen. Soweit bekannt, verlaufen die entsprechenden Reaktionen bei anderen Eukaryoten, z.B. den Pflanzen, weitgehend analog.^[20]

2.1.2. Die Biosynthese des Dolichol-PP-Oligosaccharids: der Dolicholzyklus

In Abbildung 2 ist die Abfolge der Reaktionen wiedergegeben, die zur Bildung des in der Evolution konservierten Lipid-Kern-Oligosaccharids Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ führt. Dieses wird dann *en bloc* auf die naszierende Polypeptidkette transferiert. Das Protein wird dabei mittels ER-assozierter Ribosomen synthetisiert und durch einen Proteinkanal – den Sec61-Komplex – in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums transloziert. Auf der luminalen Seite der ER-Membran befindet sich das aktive Zentrum der für den Transfer auf das Protein verantwortlichen Oligosaccharyltransferase (OST), ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Membranproteinkomplex.

Der Aufbau des Kern-Oligosaccharids beginnt mit dem Transfer eines α -gebundenen *N*-Acetylglucosaminphosphats von UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat unter Bildung von GlcNAc-PP-Dol. Diese Reaktion wird sehr spezifisch durch Tunicamycin gehemmt, eine Substanz, die ursprünglich gegen Viren entwickelt wurde.^[21,22] Im Anschluss werden zunächst

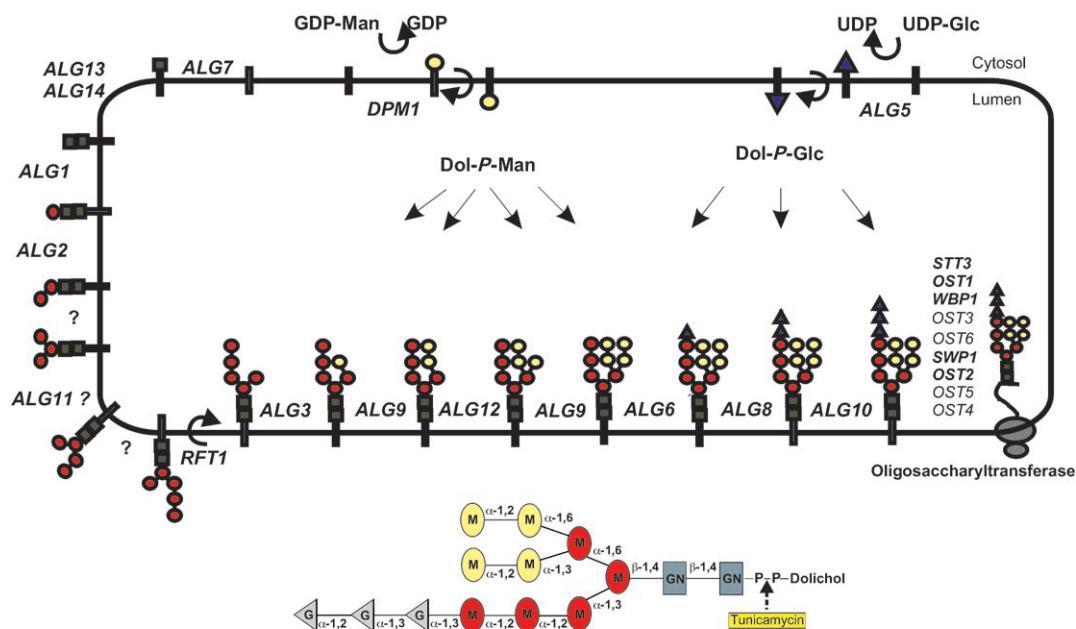


Abbildung 2. Biosynthese des lipidgebundenen Oligosaccharids und Übertragung auf die naszierende Polypeptidkette im endoplasmatischen Retikulum in *Saccharomyces cerevisiae*. Die identifizierten ALG-Gene für die jeweiligen Glycosylierungsschritte sind angegeben (für die entsprechenden Humangene siehe Tabelle 1). Die Synthese beginnt auf der cytosolischen Seite mit UDP-GlcNAc oder GDP-Man als Glycosyldonoren (UDP = Uridindiphosphat, GDP = Guanosindiphosphat). Das Dol-PP-GlcNAc₂Man₉ wird auf die luminalen Seite des ER unter Beteiligung des Rft1-Proteins transloziert und mit Dol-P-Man und Dol-P-Glc zum Vollängen-Saccharid Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ verlängert. Dieses wird durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex OST, bestehend aus neun Untereinheiten (essentielle Gene sind fett gedruckt), auf Asparaginreste der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen. Der Hemmstoff Tunicamycin hemmt spezifisch den ersten Schritt der Biosynthese, die Übertragung eines GlcNAc-Phosphatrestes von UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat. Die rot markierten Mannosereste stammen von GDP-Man, während die gelb markierten Mannosereste von Dol-P-Man übertragen werden. Die drei Glucosereste stammen von Dol-P-Glc. GN: *N*-Acetylglucosamin, M: Mannose, G: Glucose, Dolichol-P oder Dolichol-PP.

ein zweiter GlcNAc-Rest sowie fünf Mannosen auf der cytosolischen Seite des ER übertragen, wobei in allen Fällen die Zuckernucleotide UDP-GlcNAc oder GDP-Man als Zuckerdonoren wirken. Danach wird das dolicholdiphosphatgebundene Heptasaccharid auf die luminaire Seite verlagert^[23] und dort um die restlichen vier Mannosen und drei Glucosen ergänzt; dies geschieht in einer definiert ablaufenden Reaktionssequenz, die durch die Spezifität der einzelnen Glycosyltransferasen sichergestellt wird. An dem biochemisch noch wenig verstandenen Translokationsschritt durch die Membran ist in der Hefe das Produkt des *RFT1*-Gens beteiligt.^[24] Als Glycosyldonoren im Lumen des ER fungieren die lipidaktivierten Zucker Dol-*P*-Man und Dol-*P*-Glc. Anhand eines künstlichen Vesikelsystems konnte gezeigt werden, dass es nach der Synthese von Dol-*P*-Man auf der Vesikelaußenseite zu einer Verlagerung des Mannoserestes in das Vesikellumen kommt.^[25] Unklar ist allerdings, ob die Dol-*P*-Man-Synthase, deren aktives Zentrum zum Cytosol orientiert ist, zusätzlich auch die Translokation katalysiert, oder ob dafür ein eigenes, bisher nicht identifiziertes Protein verantwortlich ist.

In der Hefe sind die Gene und Genprodukte für die Synthese des Dol-*PP*-Oligosaccharids weitgehend bekannt. Bereits 1982 hatten Huffaker und Robbins mithilfe der [³H]Mannose-Suizidmethode über ein Dutzend Mutanten selektiert, die im Kohlenhydratanteil *N*-glycosylierter Proteine defekt waren.^[26] Diese Selektionsmethode beruht darauf, dass die gesuchten Mutanten weniger [³H]Mannose enthalten und damit in ihnen eine geringere letale Strahlendosis als im Wildtyp wirksam wird. Die Mutanten wurden als *alg*-Mutanten, die entsprechenden Gene mit *ALG*, für „asparagine-linked glycosylation“, bezeichnet. Sie sind in Abbildung 2 der jeweiligen Reaktion zugeordnet. Mithilfe des 1996 abgeschlossenen Hefe-Genomprojekts wurden mittlerweile über den Weg der Komplementation der entsprechenden *alg*-Mutanten für die meisten Reaktionsschritte die betroffenen Gene identifiziert. Sie sind in Tabelle 1 aufgeführt und, soweit bekannt, den orthologen Genen in Säugern gegenübergestellt. Besonders aufwändig war die Analyse der aus neun Proteinuntereinheiten bestehenden Oligosaccharyltransferase, deren Gene nicht bei dem Suizidmutantenscreen angefallen waren.

2.1.3. Die Oligosaccharyltransferase

Zwei Proteine aus Extrakten von Hundepankreas, Ribophorin I und II, denen irrtümlich Name und Funktion „Ribosomenträger“, die Ribosomen am rauen ER fixieren sollen – bereits zugewiesen waren, wurden nachfolgend als Komponenten eines Proteinkomplexes mit Oligosaccharyltransferase-Aktivität identifiziert.^[27] Ähnlich zufällig entpuppte sich ein mit Kernporen in Verbindung gebrachtes Protein, Wbp1 (wheat germ agglutinin binding protein), als essenzielle Komponente der OST in Hefen.^[28] Im Laufe von biochemischen und genetischen Untersuchungen an Hefe wurden neun Proteinuntereinheiten identifiziert, von denen fünf für das Zellwachstum unabdingbar sind.^[29] Auch bei Säugern wurden mittlerweile sieben Proteine als Bestandteile der OST identifiziert; sie sind in Tabelle 1 jenen aus Hefe gegenübergestellt. Die genaue Funktion der einzelnen Unter-

Tabelle 1: Homologien von Genen der *N*-Glycosylierung zwischen Hefe und Mensch.^[a]

Hefe	Mensch	
	Annotierung	Gen
Gene für Enzyme der LLO-Synthese		
<i>ALG1</i>	AA67521	<i>MAT-1</i> *
<i>ALG2</i>	AAH31095	h <i>ALG2</i> *
<i>ALG3</i>	AAH02839	<i>NOT56</i> *
<i>ALG5</i>	AAH12531	h <i>ALG5</i> *
<i>ALG6</i>	Q9Y672	h <i>ALG6</i> *
<i>ALG7</i>	AAH00325	<i>DPAGT1</i>
<i>ALG8</i>	NP_076984	h <i>ALG8</i> *
<i>ALG9</i>	AF395532	h <i>ALG9</i> */ <i>DIBD1</i>
<i>ALG10</i>	AAH0347	h <i>ALG10</i> *
<i>ALG11</i>	CAI12890	
<i>ALG12</i>	Q9BV10	h <i>ALG12</i> *
<i>ALG13</i>	NP_060936	h <i>ALG13</i> *
<i>ALG14</i>	NP_659425	h <i>ALG14</i> *
Gene für Untereinheiten der OST		
<i>STT3</i>	NP_689926	<i>STT3A</i> *
	NP_849193	<i>STT3-B</i> *
<i>OST1</i>	NP_002941	<i>RPN1</i> (Ribophorin I)
<i>WBP1</i>	P39656	<i>OST48/DDOST</i>
<i>SWP1</i>	P04844	<i>RPN2</i> (Ribophorin II)
<i>OST2</i>	NP_001335	<i>DAD1</i> *
<i>OST3</i> und <i>OST6</i>	NP_006756	<i>N33</i> (Isoform a)*
	NP_839952	<i>N33</i> (Isoform b)*
	NP_115497	<i>IAP</i> *
<i>OST4</i>	XP_376043	
<i>OST5</i>		

[a] Die mit Stern bezeichneten Humansequenzen konnten mithilfe der Hefequenzen identifiziert werden, oder es konnte ihre spezifische Funktion ermittelt werden. LLO: lipid-linked oligosaccharide; *ALG*: asparagine-linked glycosylation; *STT*: staurosporine temperature sensitive; *OST*: oligosaccharyltransferase; *WBP*: wheat germ binding protein; *SWP*: suppressor of *WBP*; *MAT*: mannosyltransferase; *NOT*: Not56-like protein; *DPAGT*: dolicholphosphate *N*-acetyl glucosaminephosphate-transferase; *DIBD*: disrupted in bipolar disorder; *DAD*: defender against apoptotic death; *N33*: tumor suppressor candidate 3; *IAP*: implantation associated protein.

tereinheiten ist noch kaum verstanden. Vernetzungsexperimente von Stt3 mit der naszierenden Polypeptidkette^[30,31] und die Tatsache, dass ein Stt3-Homologes in dem Prokaryoten *Campylobacter* eine *N*-Glycosylierung katalysiert,^[32] sprechen stark dafür, dass es sich hierbei um die katalytische Untereinheit handelt. Ost3 und Ost6 kommen als Alternativkomponenten in der Hefe-OST vor; sie können die Spezifität gegenüber den zu glycosylierenden Proteinen verändern und sind an der Wechselwirkung mit unterschiedlichen Transferasekomplexen beteiligt.^[33] Im Falle der Säuger-OST wurden zwei OST-Komplexe mit jeweils einer der beiden Isoformen von Stt3 nachgewiesen, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert sind.^[34]

Die OST erkennt die zu glycosylierenden Proteine an der Konsensus-Sequenz Asparagin-X-Serin/Threonin (N-X-S/T), auch als Sequon bezeichnet, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann.^[35,36] Lediglich 66% der Sequons sind glycosyliert,^[37] weshalb noch weitere Strukturbedingungen für eine *N*-Glycosylierung erfüllt sein müssen. So beeinflussen

unter anderem die Aminosäuren innerhalb und in unmittelbarer Nähe des Sequons die Lage des Sequons innerhalb der Peptidkette, die Proteinfaltungsrate und auch die Verfügbarkeit des Dolichol-Vorstufensaccharids die Glycosylierungseffizienz.^[38] Der bevorzugte Glycosyldonor der OST ist das Vollängen-Substrat Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, obwohl kürzere dolicholgebundene Saccharide übertragen werden können.^[39]

Der Reaktionsmechanismus für die OST ist intensiv diskutiert worden.^[36, 40] So schlugen Bause und Legler vor, dass sich eine Wasserstoffbrücke zwischen einem Carboxamid-Proton des Asparagins und dem Hydroxy-Sauerstoffatom der Hydroxyaminosäure bildet, wodurch sich die Nucleophilie des Carboxamid-Stickstoffatoms erhöht (Abbildung 3). Der

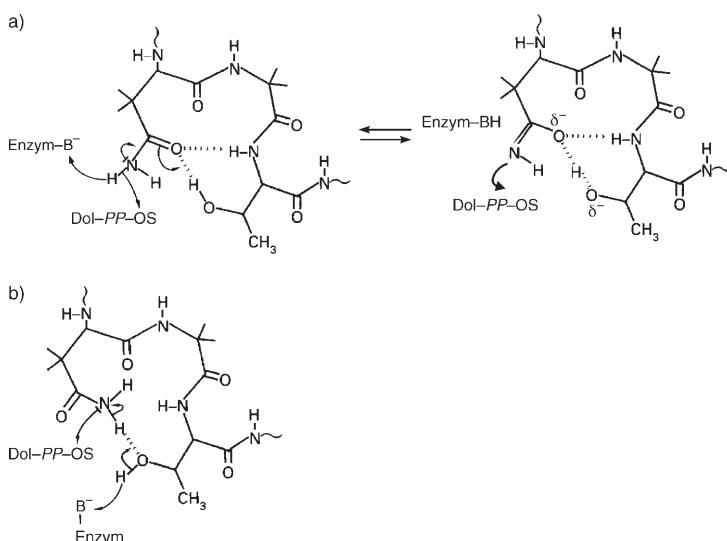


Abbildung 3. Vorgeschlagene Reaktionsmechanismen für die Oligosaccharyltransferase. a) Nach dem Modell von Imperiali und Hendrickson befinden sich Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylgruppe von Asparagin und dem Rückgrat-Amid sowie der Hydroxygruppe von Threonin und Serin. Die enzymvermittelte Deprotonierung des Asparagin-Stickstoffatoms durch einen basischen Rest im aktiven Zentrum bewirkt eine Tautomerisierung des Carboxamids zum Imidol. Die so entstandene nucleophile Gruppe könnte dann mit dem elektrophilen Lipid-Oligosaccharid reagieren. Das Modell stützt sich auf Acceptorpeptid-Untersuchungen mit einer Asx-Turn-Konformation. b) Das Modell von Bause und Legler favorisiert das Auftreten von β-Turn- oder anderen Schleifenstrukturen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen dem β-Amid-Stickstoffatom und der Hydroxygruppe der Hydroxyaminosäure zu einer Deprotonierung des Amids führen.

von Imperiali und Hendrickson postulierte Reaktionsmechanismus basiert auf Peptidacceptor-Untersuchungen, die auf einen Asx-Turn als Erkennungsmotiv der OST hindeuten. Es werden Wasserstoffbrücken zwischen der Asparagin-β-Carbonylgruppe einerseits und der peptidischen α-NH-Gruppe und der β-OH-Gruppe von Serin/Threonin andererseits angenommen (Abbildung 3). Die enzymvermittelte Deprotonierung des Stickstoffatoms induziert eine Tautomerisierung des Carboxamids zum Imidol und erleichtert einen nucleophilen Angriff am elektrophilen Lipid-Oligosaccharid. Das aktive Zentrum der OST befindet sich auf der luminalen Seite des ER. Die mögliche Glycosylierungsstelle ist etwa 65 Aminosäuren von der ribosomalen Peptidyl-

tRNA-Bindungsstelle entfernt und trifft somit auf die Peptidkette, kurz nachdem sie im Lumen des ER erscheint.^[31, 41] Die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin ist für die Reaktion essenziell, was die Möglichkeit bietet, durch Modifizierung dieser Gruppe die *N*-Glycosylierung zu regulieren. Die *O*-Mannosylierung eines *N*-Glycosylierungssequons im Zellwandprotein Ccw5p der Hefe ist z. B. die Ursache für das Ausbleiben einer entsprechenden *N*-Glycosylierung.^[42]

2.1.4. Variationen des Saccharidanteils im Golgi-Apparat

Während es im Reaktionsverlauf der *N*-Glycosylierung im ER, soweit entschlüsselt, kaum Unterschiede zwischen Hefen und Säugern gibt, zeigen die Folgereaktionen, die vor allem in den Zisternen des Golgi-Apparates ablaufen, erhebliche Unterschiede. Diese sind darauf zurückzuführen, dass in Säugerzellen Zucker und deren Transferasen zur Verfügung stehen, die in Hefe nicht vorkommen. Wie in Abbildung 4 dargestellt, wird das Oligosaccharid, bevor es gebunden an ein Protein das ER verlässt, durch die Abspaltung einer spezifischen Mannose und aller drei Glucosen verkleinert, was in beiden Organismengruppen gleichermaßen passiert. Daran kann sich im Säuger eine komplizierte Folge von Prozessierungs- oder Trimming-Reaktionen anschließen, die weitere hydrolytische Abspaltungen von insgesamt fünf Mannosen und die Anheftung einer unterschiedlichen Zahl von GlcNAc-, Gal- und Sialinsäure- sowie Fucose-Resten (bei Pflanzen auch Xylose) umfasst, was zu der enormen Vielfalt der Glycanstrukturen vom „Komplex-Typ“ führt. Dies geschieht in einer strikten Reihenfolge auf Basis der Spezifität der beteiligten Glycosyltransferasen.^[7] Wird die Zahl der Mannosen nicht verringert, ergibt sich der „Oligomannose-Typ“, der in Hefe ausschließlich vorkommt, aber abhängig vom Protein im Golgi-Apparat um weitere (bis zu über einhundert) Mannosen unter Bildung der so genannten *outer chain* verlängert werden kann.^[43]

2.2. O-glycosyierte Proteine

2.2.1. Die *O*-Mannosylierung

Mannosyierte Threonin- und Serin-Reste in Proteinen wurden lange Zeit als pilzspezifische Proteinmodifikation angesehen. 1969 von Sentandreu und Northcote^[44] ursprünglich für die Bäckerhefe beschrieben, wurden die entsprechenden Proteinmodifikationen erst knapp 30 Jahre später auch bei Säugern entdeckt. Aus Muskel- und Nervenzellen ließ sich ein dominantes Protein, das α-Dystroglycan, isolieren, das *O*-glycosidisch gebundene Tetrasaccharide des Typs NeuAc₂→3Gal→4GlcNAc→2Man trägt.^[45, 46] Die heterotypische *O*-Mannosylierung kommt mit größter Wahrscheinlichkeit bei allen tierischen Organismen, mit Ausnahme der Nematoden (z. B. *Caenorhabditis elegans*) vor; bei Pflanzen (z. B. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) ist sie ebenfalls nicht zu finden. Außer bei Eukaryoten wurde die *O*-

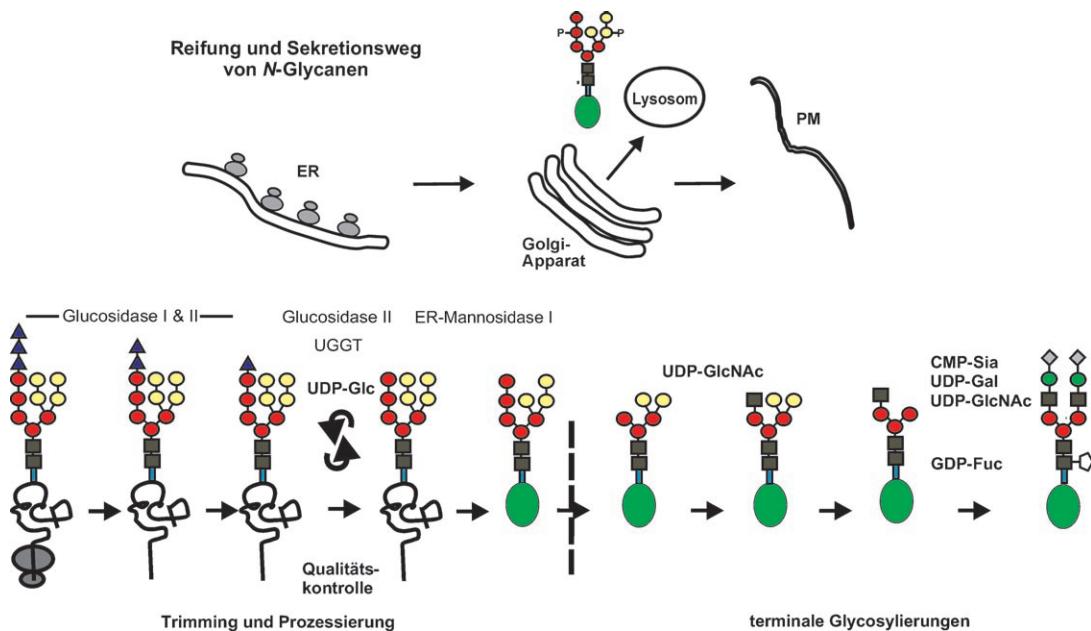


Abbildung 4. Prozessierung und Reifung von N-Glycanketten. Nach den ersten Trimming-Reaktionen im ER erfolgt der Übertritt des korrekt gefalteten Proteins (symbolisiert durch eine grüne Ellipse) aus dem ER in den Golgi-Apparat, wo in sehr geordneter Weise weitere Demannosylierungen, die Übertragung eines GlcNAc-Restes und schließlich die Abspaltung von zwei weiteren endständigen Mannosen folgen. Durch terminale Glycosylierungen entsteht die fertige Glycanstruktur (PM = Plasmamembran). Sie ist abhängig vom betreffenden Protein, der Enzymausstattung des Organs und dem jeweiligen Organismus. Die entstandenen Glycanstrukturen werden als Oligomannose-Typ, Komplex-Typ oder Hybrid-Typ zusammengefasst. In der Abbildung ist nur ein möglicher terminaler Reaktionsweg eines biantennären Glycans vom Komplex-Typ dargestellt; die Zahl der Antennen kann bis zu sechs betragen. Im Falle löslicher lysosomaler Glycoproteine kommt es zur Bildung eines Mannose-6-phosphates, der als Sortiersignal für die Zielfindung in das Lysosom dient (siehe Abschnitt 3.2).

Mannosylierung auch bei Mycobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) entdeckt.^[47]

Die Biosynthese O-mannosidisch gebundener Zuckerketten in *S. cerevisiae* wurde aufgeklärt: Anders als bei den übrigen Protein-O-Glycosylierungen (Abbildung 1) wird der Mannoserest während der Translokation der Peptidkette auf das Protein im ER-Lumen übertragen, wobei der aktivierte Zucker von Dol-P-Man und nicht von der entsprechenden Zuckernucleotid-Vorstufe stammt.^[48] Für die Anheftung der folgenden Mannosen im Golgi-Apparat wird GDP-Man als Glycosyldonor genutzt (Abbildung 5). Die Biosynthese der O-mannosidisch gebundenen Zuckerketten im Säuerling verläuft analog zu jener in der Hefe.^[49,50]

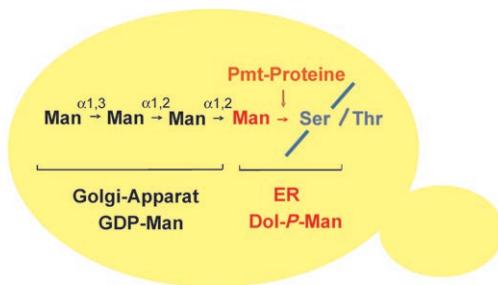
Die Familie der *PMT*(Protein:Mannosyltransferase)-Gene wurde in Bäckerhefe entdeckt. Die Reinigung der ersten Protein-Mannosyltransferase war durch die sehr geringe verfügbare Menge und die große Labilität des Enzyms beeinträchtigt. Mithilfe eines die In-vitro-Reaktion hemmenden Antikörpers konnte dann aber genügend immunpositives, wenn auch enzymatisch inaktives Material für eine Proteinsequenzierung gewonnen werden, was die Klonierung des *PMT1*-Gens ermöglichte.^[51] Die Ausschaltung dieses Gens zeigte, dass weitere Transferasen mit der gleichen Enzymaktivität vorhanden sind. Die schließlich aufgedeckte Genfamilie besteht bei der Bäckerhefe aus sieben Genen, die trotz relativ geringer Homologie auf Proteinsequenzebene eine große Ähnlichkeit im Hydropathieprofil aufweisen. Sie lassen sich mit den bei weiteren Pilzen identifizierten *PMT*-Genen in drei Subfamilien gliedern (Abbildung 5).^[5,52]

Anders als bei der Bäckerhefe und der nahen Verwandten *Candida albicans* findet sich bei der Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*) und bei filamentösen Pilzen (z. B. *Neurospora crassa*) nur je ein Vertreter jeder Subfamilie. Die in den Genomen höherer Eukaryoten gefundenen sowie die mithilfe von *Drosophila*-Mutanten aufgespürten *PMT*-Genfamilien bestehen jeweils nur aus zwei Genen, von denen je eines der *PMT2*- und eines der *PMT4*-Subfamilie zuzuordnen ist (Abbildung 5).^[49,53,54]

Die Frage, warum die *PMT*-Gene stets in mehreren Kopien vorhanden sind, kann zumindest teilweise beantwortet werden. So zeigte sich zum einen bei der Hefe, dass das aktive Enzym ein Heterodimer aus Pmt1 und Pmt2 ist. Inzwischen sind bei Hefen sowohl heteromere als auch homomere Kombinationen nachgewiesen worden. Auch beim Säugerenzym stellte sich heraus, dass es nur als Heterodimer aktiv ist.^[50,55,56] Zum anderen hat sich gezeigt, dass in Hefen verschiedene *PMT*-Komplexe deutlich unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. Zwar nutzen sie allesamt Dol-P-Man als Mannosyldonor, aber die Zielproteine sind unterschiedlich.^[57] Selbst innerhalb eines Proteins werden die Domänen durch unterschiedliche Pmt-Proteine mannosyliert.^[42]

Die Topologie des Pmt1-Proteins in der ER-Membran ist aufgeklärt: Das Protein durchdringt mit sieben Domänen die Membran (7-Transmembranprotein), wobei es mit seinem N-terminalen Ende im Cytosol und mit seinem C-terminalen Ende im Lumen des ER liegt (Abbildung 6). Die zwei größten Proteinschleifen, die Schleifen 1 und 5, liegen im Lumen

a)



b)

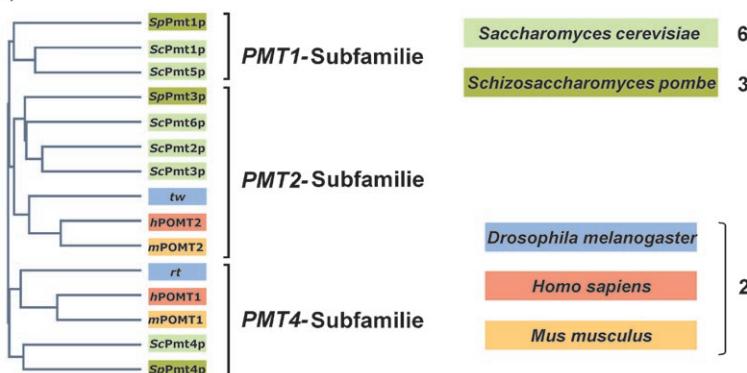


Abbildung 5. a) Verlauf der Protein-O-Mannosylierung in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die erste Mannose wird im Lumen des ER durch die Protein:O-Mannosyltransferasen (Produkt der PMT-Gene, rot) von Dol-P-Man auf das zu glycosylierende, sekretorische Protein (blau) übertragen. Die Verlängerung des Saccharids erfolgt im Golgi-Apparat, wobei GDP-Man als Zuckerdonor fungiert. b) Evolutive Verwandtschaft der Protein:O-Mannosyltransferasen. In Hefen finden sich jeweils drei PMT-Familien, in allen höheren Eukaryoten nur zwei, wobei je ein Mitglied der Subfamilie 2 und eines der Subfamilie 4 vorkommt. Die PMT-Gene der höheren Eukaryoten werden POMT genannt. Die Zahlen geben an, wie viele unterschiedliche Transferasen im Genom der Organismen insgesamt vorhanden sind. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es noch ein siebtes, aber deutlich kürzeres Homolog (nicht gezeigt).

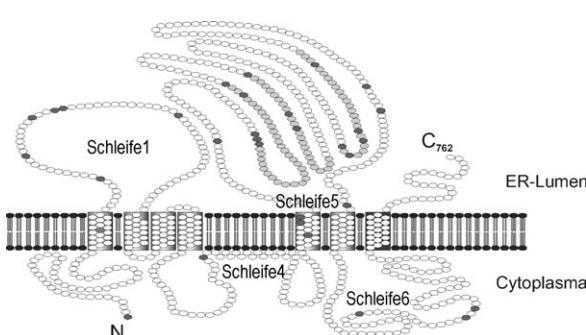


Abbildung 6. Die Membrantopologie der Protein:O-Mannosyltransferase 1 von *Saccharomyces cerevisiae*. Jeder Kreis entspricht einer Aminosäure; die schwarz gefüllten Kreise sind Aminosäuren, die in allen Mitgliedern der PMT-Familie identisch sind, die grauen entsprechen hochkonservierten Resten. Die Beweisführung für die Topologie und die Methodik sind in Lit. [58] nachzulesen.

des ER.^[58] Schleife 1 bindet das Peptidsubstrat und ist somit zumindest an der Bildung des Reaktionszentrums beteiligt. Die Bildung der jeweiligen Pmt-Pmt-Komplexe verläuft über Wechselwirkungen von Transmembranspannen.^[55]

Die schrittweise Verlängerung der O-mannosidisch gebundenen Zuckerketten im Golgi-Apparat wird in Hefe von

α-1,2-Mannosyl- (KTR-Familie; KTR: killer toxin resistant) und α-1,3-Mannosyltransferasen (MNN1-Familie, MNN: mannan) katalysiert.^[59] Anders als bei den Pmts handelt es sich hierbei um Typ-II-Membranproteine mit nur einer Transmembranspanne, einem kurzen, cytoplasmatischen N-Terminus sowie einer luminalen, katalytisch aktiven C-terminalen Domäne. Bei Säugern überträgt die POMGnT1 (Protein-O-Mannose:β-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase 1) im Golgi-Apparat GlcNAc, ausgehend von UDP-GlcNAc, unter Bildung einer α-1,2-Bindung mit der proteingebundenen Mannose.^[60,61] Die an der weiteren Verlängerung beteiligten Galactosyl- und Sialyltransferasen sind bislang unbekannt; mögliche Kandidaten sind Fukutin und FKRP (Fukutin related protein).

2.2.2. Weitere Protein-O-Glycosylierungen

In Tieren sind weitere O-gebundene Saccharidketten als Proteinmodifikationen bekannt. Am gründlichsten untersucht sind O-Glycane, die über GalNAc verknüpft sind. Sie wurden ursprünglich an extrazellulären Schleimen (Mucinen) entdeckt, was Anlass zum Namen Mucose-Typ-Glycosylierung für diese Proteinmodifikation gab. Es sind acht GalNAc-Transferasen in Säugern bekannt (in der Literatur gibt es aber Hinweise auf mehr), die an der initialen Glycosylierung beteiligt sind und im cis-Golgi GalNAc von UDP-GalNAc spezifisch auf unterschiedliche Mucine übertragen.^[8] Für die Übertragung von GalNAc auf die entsprechenden sekretorischen Proteine ist keine Erkennungssequenz bekannt. Eine Zuckersequenz der GalNAc gebundenen Glycane ist unter anderem das Sialyl-Lewis^X-Tetrasaccharid NeuNAc-α-2,3-Gal-β-1,4-(Fuc-α-1,3)-GlcNAc-β-1,3-Gal, das in unterschiedlich modifizierter Form wichtige Funktionen wahrnimmt (siehe Abschnitt 3.3). Mit Vorkommen, Biosynthese, Molekularbiologie und Funktion der Glycoproteine vom Mucin-Typ befassen sich bereits etliche Übersichtsartikel,^[6,7,8,62] weshalb hier auf eine weitergehende Besprechung dieser Proteinmodifikation verzichtet wird.

Eine ebenfalls bei höheren Eukaryoten einschließlich Pflanzen und filamentösen Pilzen (nicht jedoch *S. cerevisiae*) vorkommende, intensiv erforschte Proteinglycosylierung ist die posttranskriptionale Verknüpfung eines solitären, β-O-glycosidisch gebundenen GlcNAc-Restes mit Serin oder Threonin.^[63] Es handelt sich hierbei um cytosolische und nucleäre Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, Kernporenproteine und nucleäre Onkoproteine. Die Modifizierung mit GlcNAc-Resten erwies sich dabei – anders als die permanente „extrazelluläre“ Glycosylierung – als eine reversible Verknüpfung: Eine spezifische, bei neutralem pH-Wert aktive nucleocytoplasmatische β-N-Acetylglucosaminidase vermag den Zuckerrest wieder abzuspalten. Dieser dynamische Prozess von Synthese und Abbau ist an einer Reihe von zellulären Funktionen wie Transkription und proteasomalem Proteinabbau beteiligt und kompetiert in einigen Fällen (z. B.

SV40-T-Antigen, c-Myc-Onkogen) mit der Proteinphosphorylierung/-dephosphorylierung an identischen Hydroxygruppen.^[9] Auch zu dieser Proteinmodifikation gibt es zahlreiche Übersichtsartikel.^[10,63]

3. Funktionelle Aspekte der Proteinglycosylierung

3.1. Allgemeines

Eine Proteinmodifikation, die sich in Struktur und Biogenese im Laufe der Evolution von der einzelligen Hefe bis zum Menschen erhalten hat, muss geradezu zwingend von großer funktioneller Bedeutung sein. Umso irritierender war es daher über viele Jahrzehnte, dass für diese aufwändigen Proteinveränderungen keine grundsätzlich wichtige und allgemein gültige Rolle gefunden wurde.^[64] Hakomori sprach von einem „*Enigma*“.^[65] Überlegt man, worin sich Oligo- und Polysaccharide gegenüber anderen biologischen Polymeren auszeichnen, so ist dies vor allem die Fülle von isomeren Verbindungen, die aus nur wenigen Monomeren gebildet werden kann.^[66] So lassen sich z. B. aus zwei Molekülen Glucose elf verschiedene Disaccharide (allein aus der Pyranose-Form), aus zwei Molekülen Glycin jedoch nur ein Di-peptid bilden; aus drei verschiedenen Monosacchariden können 1056 isomere Trisaccharide, aber aus der entsprechenden Zahl Aminosäuren lediglich sechs Tripeptide hervorgehen. Da jedes Isomer als eine Informationseinheit aufgefasst werden kann, sind Kohlenhydrate Moleküle mit der potenziell höchsten Informationsdichte. Wenngleich diese Eigenschaft in Zellen nur zu einem kleinen Teil genutzt wird, müsste sie mit der biologischen Funktion der Stoffklasse in enger Beziehung stehen.

Mit der Methode der Genzerstörung (gene disruption) wurde nachgewiesen, dass das Fehlen vieler der Glycosylierungen für niedere Eukaryoten wie auch für Tiere und Pflanzen letal ist.^[26,67] Aber was wissen wir heute konkret über Funktionen der Oligosaccharidseitenketten *N*-glycosylierter Proteine? Prinzipiell müssen wir zwei Arten von Funktionen unterscheiden: Zum einen solche, die für einen simplen Einzeller wie die Hefe genauso bedeutend sind wie für Säuger und deshalb evolutiv konserviert wurden. Zum anderen jene, die mit den komplexen, in Hefe nicht vorkommenden Saccharidtypen einhergehen und die daher nur in höheren, vielzelligen Organismen eine Rolle spielen. Beim ersten Typus handelt es sich vorwiegend um intrazelluläre Funktionen, beim zweiten um extrazelluläre Funktionen (d. h. im Wesentlichen Leistungen, die auf Zell-Zell-Erkennung beruhen und davon abhängig sind und die z. B. Entwicklungsvorgänge steuern). Für die sexuelle Paarung zwischen α - und α -Zellen, die einzige Zell-Zell-Wechselwirkung, die für die Hefe relevant ist, spielen zwar zwei hochspezifische, stark glycosylierte Verklebeproteine (die Agglutinine), eine wichtige Rolle, doch beruht deren Aktivität auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung und nicht auf einer Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung.^[68]

3.2. Intrazelluläre Funktionen

Gut belegt sind derzeit zwei intrazelluläre Prozesse, an denen *N*-gebundene Saccharidketten entscheidend als Signalgeber beteiligt sind: 1) die Sortierung von Proteinen in das Lysosom und 2) die Qualitätskontrolle bei der Faltung sekretorischer Proteine, die sicherstellt, dass nur richtig gefaltete Proteine im ER-Lumen auf den Sekretionsweg zur Zelloberfläche geschickt werden; andernfalls greift ein ER-spezifischer, Saccharid-abhängiger Proteinabbau, ERAD (ER-associated degradation).

Bereits seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass lösliche lysosomale Proteine Mannose-6-phosphatreste an ihren mannosereichen Oligosacchariden tragen. Diese sind das Sortersignal für den Transport in das Lysosom, das Verdauungsorganell tierischer Zellen.^[69] Entsprechend modifizierte Zuckerketten wurden auch bei Proteinen nachgewiesen, die im Verdauungsorganell der Hefe, der Vakuole, vorkommen. Allerdings stellte sich in diesem Fall heraus, dass Mannose-6-phosphatreste nicht für die korrekte zelluläre Lokalisierung der Proteine verantwortlich sind.^[70]

Die abschließenden Reaktionen in der Biosynthese des Dol-*PP*-Oligosaccharids sind die Verknüpfungen mit drei Glucoseresten (siehe Abschnitt 2.1.2). Sofort nach dem Transfer des Saccharids auf das Protein werden diese bereits wieder durch zwei spezifische Glucosidasen (siehe Abbildungen 4 und 7) abgespalten. Lange Zeit wurde nicht verstanden, warum Glucosen am lipidgebundenen Kern-Saccharid vorhanden sind, da in keiner der Kohlenhydratstrukturen von Glycoproteinen Glucose als Baustein vorkommt. Noch rätselhafter wurde die Rolle der Glucose, als Parodi ein Enzym entdeckte, welches das deglycosylierte Glycoprotein wieder reglycosyliert.^[71]

Heute wissen wir, dass die Glycosylierung zum einen ein Signal für eine effiziente Übertragung des Oligosaccharids auf das Protein ist^[39] und zum zweiten etwas mit der korrekten Faltung des sekretorischen Glycoproteins zu tun hat.^[72] Solange Glucosereste am neu synthetisierten Protein vorhanden sind, wird dessen Verlagerung in das nächste sekretorische Kompartiment, die Golgi-Zisternen, nicht freigegeben, und es bleibt an Komponenten des ER – dem membrangebundenen Calnexin und/oder dem löslichen, homologen Calreticulin – gebunden (Abbildung 7). Ist das Protein nach der Abspaltung der drei Glucosen immer noch nicht korrekt gefaltet, erkennt dies der Faltungssensor UDP-Glc:Glycoprotein-Glycosyltransferase („Parodi“-Enzym) an der Exposition hydrophober Subdomänen und reglycosyliert das $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharid mit einem Glucoserest. Das Protein erhält dadurch eine erneute Chance, seine native dreidimensionale Struktur zu erlangen. Proteine, die im ER-Lumen ihren nativen Zustand nicht erreichen, müssen entfernt und abgebaut werden. Dies ist erstaunlicherweise bei einem erheblichen Anteil mancher sekretorischer Proteine erforderlich. So wird beim CFTR-Genprodukt (CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), einem Chlorid-Kanal, der im mutierten Zustand cystische Fibrose verursacht, selbst bei Gesunden über 50 % des neu synthetisierten Proteins rasch wieder abgebaut und unterliegt somit einem steten Umsatz. Bei Patienten mit mutiertem Protein

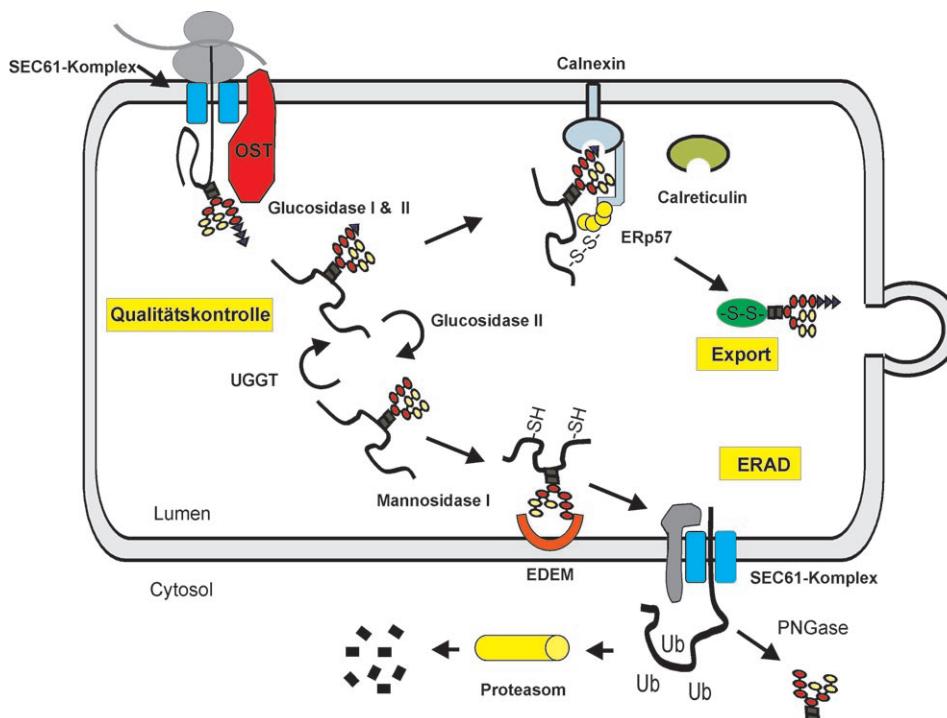


Abbildung 7. Der Calnexin-Calreticulin-Zyklus bei der Faltungs kontrolle im ER. Während der Translokation der naszierenden Polypeptidkette durch den Sec61-Komplex (Translokon) werden Asparaginreste der Sequenz Asn-X-Ser/Thr durch die OST erkannt und mit dem $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharid glycosyliert. Die beiden distalen Glucosereste werden sodann durch die Glucosidase I und II entfernt, und das erzeugte $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ bindet an das membranständige Calnexin oder das lösliche Calreticulin, zwei homologe ER-Lektine für monoglycosylierte Oligosaccharide. Dabei wird das Protein dem ERp57, einer Thiodisulfid-Oxidoreduktase präsentiert, die sowohl mit Calnexin als auch mit Calreticulin wechselwirkt und an der Disulfidbildung über die Bildung gemischter Disulfide mitwirkt. Nachdem die verbleibende dritte Glucosidase durch die Glucosidase II entfernt wurde, dissoziieren die Komplexe. Ist das Protein richtig gefaltet, verlässt es auf dem Sekretionsweg das ER. Bei unvollständiger Faltung jedoch wird das $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ -Oligosaccharid durch UGGT reglucosyliert. Dadurch kommt es zu einer erneuten Bindung an das Calnexin/Calreticulin. Eine dritte Möglichkeit, falls das Protein zu lange im ungefalteten Zustand im ER verbleibt, ist der Abbau des Proteins. Dabei wird das fehlgefaltete Protein ins Cytosol retransloziert und nach Abspaltung der Glykankette durch eine membrangebundene PNGase und nach Ubiquitinierung (Ub) schließlich durch das Proteasom abgebaut (ERAD-Weg). Hierbei wird die durch die ER-Mannosidase I generierte $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Struktur vom ER-Lektin EDEM/Htm1p erkannt und die Retranslokation eingeleitet.

erreicht aufgrund eines erhöhten Umsatzes nur ein sehr geringer Prozentsatz des Proteins die Plasmamembran, wo dieser Kanal normalerweise seine Funktion ausübt.^[73] Die irreversibel fehlgefalteten Proteine werden in Proteasomen abgebaut. Dazu müssen die Proteine das ER-Lumen verlassen, was durch den Sec61-Kanal geschieht (Abbildung 7) – es wird also der gleiche Kanal genutzt, durch den naszierende Proteinketten während ihrer Biosynthese in das Innere des ER gelangen.^[74] Im Cytosol wird das abzubauende Protein polyubiquitiniert. Für die Einleitung des Abbaus scheint bei Glycoproteinen eine modifizierte Zuckerkette des Proteins verantwortlich zu sein.^[75]

Mithilfe von *PMT*-Mutanten konnte zunächst bei der Bäckerhefe, später auch bei der Spalthefe, gezeigt werden, dass die Protein-*O*-Mannosylierung eine für Pilze wesentliche Proteinmodifikation ist. In *S. cerevisiae* führt erst das gleichzeitige Ausschalten von mindestens einem Mitglied jeder *PMT*-Subfamilie zum Zelltod, wohingegen in *S. pombe* be-

reits die Deletion des zur Bäckerhefe homologen *PMT2*-Gens letal ist.^[76,77] Die Charakterisierung lebensfähiger Hefe-*pmt*-Mutanten ergab, dass die *O*-Mannosylierung eine entscheidende Rolle bei zahlreichen physiologisch wichtigen Prozessen spielt, z.B. beim polaren Wachstum und der Bildung einer intakten Zellwand.^[77,78] Für den humanpathogenen Pilz *Candida albicans* wurde ein Zusammenhang zwischen Virulenz und *O*-Mannosylierung nachgewiesen.^[79]

Einige dieser Mechanismen konnten auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. So zeigte sich, dass viele Zelloberflächenproteine mit Schlüsselfunktionen, z.B. Rezeptoren der Plasmamembran, stark *O*-mannosyliert sind und diese Modifikation für ihre Stabilität, Sekretion, Lokalisierung und/oder Funktion entscheidend ist.^[80] Des Weiteren wird eine Rolle der *O*-Mannosylierung bei der Prozessierung falsch gefalteter Proteine im ER^[81] und eine Beteiligung an der Regulation der *N*-Glycosylierung diskutiert.^[42] Kommt bei Pilzen die *O*-Mannosylierung zum Erliegen, laufen einige zelluläre Prozesse nicht mehr richtig ab, was letztlich zum Zelltod führt.

Fällt die *O*-Mannosylierung

bei Mäusen aus, sterben diese bereits während der frühen Embryonalentwicklung,^[82] beim Menschen manifestiert sich eine rezessive Erbkrankheit, das Walker-Warburg-Syndrom, worauf im Abschnitt 3.4 näher eingegangen wird.

3.3. Extrazelluläre Funktionen

Zwar gab es immer wieder Hinweise, dass die Zuckerkomponenten der Glycoproteine für spezifische Zell-Zell-Erkenntnisse und -Wechselwirkungen von Bedeutung sind, fundierte Belege dafür gibt es allerdings erst seit Ende der 1980er Jahre. Leukozyten, so zeigte sich, wechselwirken mit Endothelzellen über spezifische Kohlenhydratbindende Zelladhäsionsmoleküle, die Selektine. Es handelt sich hierbei um eine Familie von Membranproteinen, die sowohl auf der Leukozytenoberfläche als auch auf Endothelzellen vorhanden sind. Die Wechselwirkung von Glycanstrukturen be-

stimmter Glycoproteine der Zelloberfläche mit Selektinen bewirkt letztlich, dass die mit hoher Geschwindigkeit im Blutstrom mitgeführten Leukozyten abgebremst werden. Während sie stark verlangsamt am Endothel entlangrollen, kommt es über aktivierte Integrine auf der Leukozytenoberfläche zu weiteren, stärkeren Wechselwirkungen, was die Voraussetzung für den Austritt der Leukozyten aus dem Endothel und das Erreichen des Entzündungs-/Infektionsherdes ist. Der durch Selektine vermittelte Prozess lässt sich durch eine Reihe von zugesetzten Oligosacchariden hemmen, wobei vor allem die in Abschnitt 2.2.2 angesprochenen Lewis^X-Saccharide wirksam sind. Die große medizinische Bedeutung dieser Prozesse, besonders im Hinblick auf die mögliche Linderung chronischer Entzündungen, hat vielzählige Übersichtsartikel zur Funktion proteingebundener Oligosaccharide im Zusammenhang mit Selektinen hervorgebracht.^[62]

Die in den letzten Jahren als Ursachen für erblich bedingte Krankheiten zunehmend bekannt gewordenen Störungen der Proteinglycosylierung werden im folgenden Abschnitt behandelt. Soweit aufgeklärt, gilt auch für sie, dass extrazelluläre Funktionen der Saccharidketten betroffen sind.

3.4. Genetisch bedingte Glycosylierungsdefekte beim Menschen

Die bis heute bekannten, genetisch bedingten Unterglycosylierungen lösen beim Menschen im Kindesalter gravierende Störungen aus, die durch ein multisystemisches Krankheitsbild gekennzeichnet sind, bei dem vor allem die Hirnentwicklung sowie Funktionen des Nerven-, Leber-, Magen- und Darmsystems betroffen sind. Sie werden, soweit Protein-*N*-Glycosylierungen betroffen sind, als CDG-Syndrom zusammengefasst (Congenital Disorders of Glycosylation), und sie belegen wohl am eindrücklichsten die große biologische Bedeutung der Proteinglycosylierung.

Die Entdeckungsgeschichte von CDG begann Anfang der 1980er Jahre mit Befunden des belgischen Kinderarztes Jaak Jaeken (Abbildung 8). Jaeken beobachtete an einem Zwillingsspärchen eine Reihe schwerwiegender, motorischer Störungen sowie eine stark verzögerte geistige Entwicklung.^[83] Die eindeutig genetische Ursache der Krankheit resultierte in einer Reihe veränderter, funktionell völlig verschiedener Proteine, was der gängigen Vorstellung widersprach, *ein* Gendefekt entspreche *einem* defekten Protein. Jaeken fiel auf, dass die betroffenen Proteine Glycoproteine waren. Bei einem genetischen Defekt in *einem* der vielen, für die Proteinglycosylierung erforderlichen Enzyme (siehe Abschnitt 2) muss eine große Zahl von Glycoproteinen betroffen sein, die dann in geringerer Menge, Aktivität oder Stabilität vorliegen könnten. Jaeken entwickelte einen einfachen Test für die rasche Feststellung von Unterglycosylierung in Serumproben von Patienten.^[84] Abbildung 8 zeigt, wie das Serumglycoprotein Transferrin, ein Eisentransportprotein, bei unterschiedlicher Glycosylierung sein elektrophoretisches Laufverhalten ändert. Dieses Protein hat zwei *N*-Glycosylierungsstellen, die beim Gesunden im Normalfall von zwei biantennären (teilweise triantennären) Sacchariden des Komplex-Typs besetzt sind. Aufgrund der endständigen Sialinsäuren trägt das Mo-

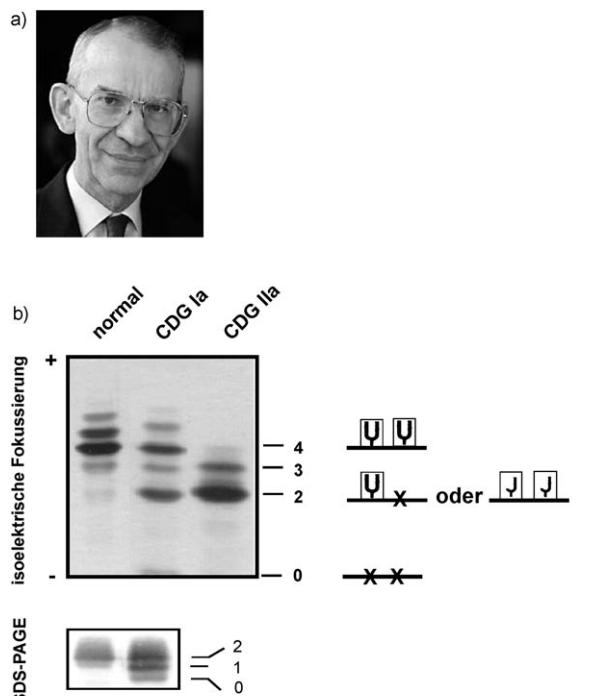


Abbildung 8. Serum-Transferrin, ein diagnostischer Marker für CDG. a) Jaak Jaeken entdeckte und beschrieb den ersten CDG-Fall. Transferrin hat im Normalfall zwei biantennäre Glykanketten vom Komplextyp (c), die gelegentlich auch zu einer triantennären Struktur verzweigt sein können (nicht gezeigt). Bei der isoelektrischen Fokussierung (b) ist daher beim gesunden Menschen das Tetrasialo-Transferrin die Hauptform. In CDG-I-Patienten, hier als Beispiel CDG-Ia, kommen zusätzliche Bänder vor, die Disialo- und Asiato-Transferrinformen repräsentieren. Mögliche strukturelle Veränderungen sind rechts angedeutet. Darüber hinaus lässt sich mithilfe der SDS-PAGE (b) der komplette oder partielle Verlust von *N*-Glycanen sichtbar machen.

lekül mindestens vier negative Ladungen, die sein Laufverhalten in der isoelektrischen Fokussierung bestimmen. Bei CDG-Patienten zeigt sich wegen der Unterglycosylierung oder gar dem völligen Fehlen von Oligosacchariden am Transferrin ein deutlich anderes Bandenmuster. Darüber hinaus lässt sich mithilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der komplette oder partielle Verlust von *N*-Glykanen sichtbar machen.

Mit diesen einfachen Tests sind heute an die tausend Patienten mit genetisch bedingten *N*-Glycosylierungsdefekten identifiziert worden. In welchem Einzelschritt des komplexen Biosynthesegeschehens die Mutationen vorliegen – als Defekte in den einzelnen Glycosyltransferasen des Dolicholzyklus (Abbildung 2), der nachfolgenden Prozessierungsreaktionen oder bei der Bereitstellung der Ausgangssubstrate – ist im Einzelfall mit aufwändigeren Methoden zu klären (siehe nächster Abschnitt). Bisher sind 19 Subtypen von CDG bekannt, in denen jeweils eine unterschiedliche Reaktion (oder besser: das dafür verantwortliche Gen) nicht funktioniert. Eine detaillierte Analyse der Mutationen hat gezeigt, dass in

den jeweiligen CDG-Typen immer noch enzymatische Restaktivitäten vorhanden sind. Ein vollständiger Verlust der Lipid-Oligosaccharid-Synthese wirkt sich im Embryonalstadium fatal aus.^[85] Allerdings ist auf molekularer Ebene noch kaum verstanden, inwieweit der Glycosylierungsdefekt bestimmter Proteine oder Proteingruppen für die außerordentlich vielfältigen Krankheitssymptome verantwortlich ist, ganz zu schweigen von den Kausalketten, die das defekte Genprodukt mit dem biologischen Phänomen verbinden.

Wie seit vier Jahren bekannt ist, werden ähnlich schwerwiegende Entwicklungsstörungen auch durch genetisch bedingte Glycosylierungsdefekte im Zusammenhang mit der Protein-*O*-Mannosylierung bewirkt. Es handelt sich dabei um neuromuskuläre Erkrankungen, z. B. bestimmte Muskeldystrophien in Verbindung mit neuronalen Zellwanderungsdefekten, wie sie beim Walker-Warburg-Syndrom (WWS) oder der MEB-Krankheit (*muscle-eye-brain disease*) auftreten.^[52,86,87] Die Protein-Fehlglycosylierungen dieses Typs müssten eigentlich als eine Unterkategorie des CDG-Syndroms geführt werden, da es sich zweifelsfrei um eine „Congenital Disorder of Glycosylation“ handelt. Die derzeitige CDG-Nomenklatur gilt aber bisher nur für Störungen der Protein-*N*-Glycosylierung.

Die Entdeckungsgeschichte besagter Erbkrankheiten begann mit einer Beobachtung an bestimmten *Drosophila*-Mutanten. Eine der Mutanten aus der klassischen Mutantensammlung der 1920er und 1930er Jahre weist einen gekrümmten Hinterleib auf. Martín-Blanco und García-Bellida zeigten, dass die Ursache dieser Mutation, die mit der Bezeichnung „rt“ für „rotated abdomen“ geführt wird, ein Defekt in einem dem Hefe-*PMT4* homologen Gen war.^[53] Der mikroskopische Phänotyp wies eine gestörte embryonale Muskelentwicklung auf, bei der eine anomale Muskelfaser-Verankerung vorlag. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Protein-*O*-Mannosylierung und erblich bedingten Muskeldystrophien postuliert. Bald danach wurde bei Säugern ein Protein, das α/β -Dystroglycan, identifiziert,^[87,88] das als Verankerungsmolekül unter Vermittlung des Dystrophins das Cytoskelett der Muskelzellen mit der extrazellulären Matrix der Zelle verbindet (Abbildung 9). Endo und Mitarbeiter^[46] wiesen schließlich nach, dass das extrazellulär exponierte α -Dystroglycan Glykanketten vom *O*-Mannose-Typ trägt und dass über diese (siehe Abschnitt 2.2.1) die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix erfolgt. Inzwischen wurde bei sieben WWS-Patienten ein Defekt im *POMT1*-Gen und bei vier Patienten ein Defekt im *POMT2*-Gen nachgewiesen.^[89,90] Die Patienten, die in der Regel das dritte Lebensjahr nicht erreichen, zeigen außer schweren motorischen Ausfällen vor allem auch neuronale Defekte, was in Einklang mit der Beobachtung ist, dass im Gehirn 30 % der *O*-glycosierten Proteine die hefetypische *O*-Mannose-Modifikation tragen.^[45] Die Gehirnstrukturen der Patienten sind zum Teil stark verändert,^[91] woraus auf eine Rolle des α -Dystroglycans und seiner Zuckerstruktur bei der Migration der neuronalen Zellen geschlossen werden muss. In einer *POMT1*-Knockout-Maus ist die Mutation sogar embryonal fatal, was auf die fehlerhafte Prozessierung des α -Dystroglycans zurückzuführen ist und zur fehlerhaften Bildung einer für Nager typischen Basalmembran, der Reicherts-Membran, führt.^[82]

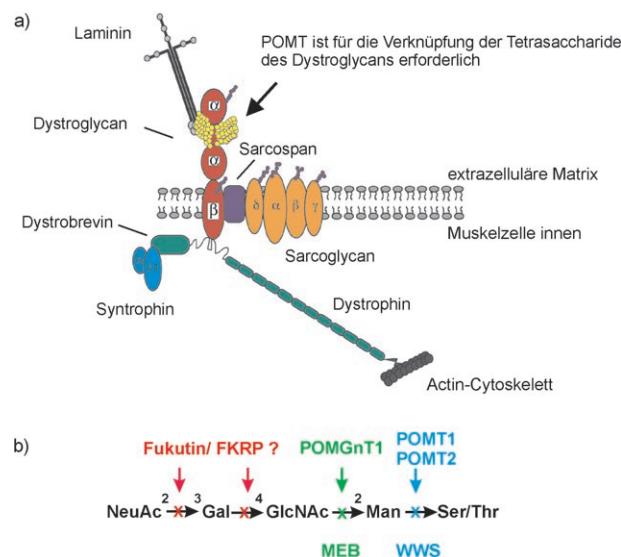


Abbildung 9. a) Der Dystrophin-Glycoprotein-Komplex. Er besteht aus einer Reihe von Transmembranproteinen, von denen das aus zwei Untereinheiten bestehende Dystroglycan die Verbindung des intrazellulären Cytoskeletts mit extrazellulärem Laminin herstellt. Das hantelförmige extrazelluläre α -Dystroglycan ist in seinem zentralen Abschnitt hoch *O*-mannosyliert. Die entsprechenden Tetrasaccharide sind für die Wechselwirkung mit dem Laminin essenziell. b) *O*-Mannosylglykankette und zugrunde liegende genetische Defekte kongenitaler Muskel-Dystrophie mit neuronalen Zellwanderungsdefekten.

In der Zwischenzeit ist klar geworden, dass die an α -Dystroglycan gebundenen Tetrasaccharide von erheblicher Bedeutung sind und dass nicht nur das völlige Fehlen des Saccharids, sondern bereits seine Verkürzung, z. B. durch das Fehlen der POMGnT1-Transferase,^[60] Ursache für die schwerwiegende MEB-Krankheit ist (Abbildung 9). Anders als bei den multisystemischen CDG-Erkrankungen mit *N*-Glycosylierungsdefekten sind somit die molekularen Details der fehlerhaften Protein-*O*-Mannosylierung in ihrer Auswirkung zumindest teilweise verstanden. Erstaunlicherweise ist mit dem α -Dystroglycan bisher nur ein einziges definiertes Protein mit dieser Modifikation im Säuger bekannt.

4. Hefe hilft bei der Aufklärung genetisch bedingter Glycosylierungsdefekte

Die Aufklärung der hier besprochenen neuromuskulären Erbkrankheiten, die auf einer Unterglycosylierung von α -Dystroglycan beruhen, hat stark von den an Hefe erhaltenen Befunden profitiert; aber auch für die Charakterisierung der CDG-Typen war die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* außerordentlich nützlich. Die Vorgehensweise soll abschließend an zwei Beispielen erläutert werden. Die bisher bekannten CDG-Typen resultieren aus unterschiedlichen defekten Genen, die für den komplexen Biosyntheseweg der Protein-*N*-Glycosylierung erforderlich sind. In Tabelle 2 ist der gegenwärtige Kenntnisstand der biochemisch und molekular identifizierten CDG-Typen zusammengefasst.

Wie identifiziert man die betroffenen Gene, besonders wenn deren Identitäten beim Menschen noch weitgehend

Tabelle 2: CDG-Typen und kongenitale Störungen der O-Glycosylierung.^[a]

Typ	Gen	Aktivität	Lit.
CDG I			
CDG-1a	<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase	[98]
CDG-1b	<i>MPI</i>	Phosphomannoseisomerase	[99]
CDG-1c	<i>ALG6</i>	Dol-P-Glc:Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Glucosyltransferase	[100]
CDG-1d	<i>ALG3</i>	Dol-P-Man:Man ₅ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	[101]
CDG-1e	<i>DPM1</i>	Dol-P-Man-Synthase I GDP-Man:Dol-P-Mannosyltransferase	[102]
CDG-1f	<i>MPDU1</i>	Mannose-P-dolichol utilization defect MPDU1/Lec35	[103]
CDG-1g	<i>ALG12</i>	Dol-P-Man:Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	[93, 94]
CDG-1h	<i>ALG8</i>	Dol-P-Glc:Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Glucosyltransferase	[104]
CDG-1i	<i>ALG2</i>	GDP-Man:Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	[92]
CDG-1j	<i>DPAGT1</i>	UDP-GlcNAc:Dolicholphosphat N-Acetylglucosamin-1-phosphattransferase	[105]
CDG-1k	<i>ALG1</i>	GDP-Man:GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	[106]
CDG-1l	<i>ALG9</i>	Dol-P-Man:Man ₆ - und Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	[107]
CDG II			
CDG-IIa	<i>MGAT2</i>	GlcNAc-Transferase II	[108]
CDG-IIb	<i>GLS1</i>	Glucosidase I	[109]
CDG-IIc	<i>SLC35C1</i>	GDP-Fucose-Transporter (LAD II)	[110]
CDG-IId	<i>B4GALT1</i>	β-1,4-Galactosyltransferase	[111]
CDG-IIf	<i>SLC35A1</i>	CMP-Sialinsäure-Transporter	[112]
CDG-IIx	<i>COG7</i>	COG-Komplex, Untereinheit 7	[113]
CDG-IIx	<i>COG1</i>	COG-Komplex, Untereinheit 1	[114]
Name	Gen	Aktivität	Lit.
Defekte in der O-Mannosylglycan-Synthese			
Walker-Warburg-Syndrom	<i>POMT1/ POMT2</i>	O-Mannosyltransferase	[89]
MEB-Krankheit	<i>POMGnT1</i>	O-Mannosyl-β-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase 1	[60]
Defekte in der O-Xylosylglycan-Synthese			
Ehlers-Danlos-Syndrom (progeroid Form)	<i>β4GALT7</i>	β-1,4-Galactosyltransferase 7	[115]
Multiple-Exostose-Syndrom	<i>EXT1/EXT2</i>	Glucuronyltransferase/N-Acetylhexosaminyltransferase	[116]

[a] Defekte in der Synthese des Lipid-Oligosaccharides einschließlich dessen Übertragung auf das Protein durch die Oligosaccharyltransferase werden als CDG-I bezeichnet, während Defekte in der Prozessierung der N-Glykankette unter die CDG-II-Gruppe fallen. Dem Transferrin von CDG-I-Patienten fehlen Sialinsäurereste, da nicht jede Glycosylierungsstelle eine Glykankette trägt. Störungen in der LLO-Synthese (nicht optimales Substrat für die OST) oder im Transfer bewirken eine Unterglycosylierung. Die Strukturen der übertragenen Glykanketten sind jedoch normal oder nur geringfügig geändert. Bei CDG-II-Patienten hingegen sind die beiden Glycosylierungsstellen des Transferrins besetzt, jedoch sind die Oligosaccharidstrukturen verändert.

ungeklärt sind? Im Fall der Hefe sind mittlerweile fast alle Gene der N-Glycosylierung bekannt, ebenso sind die entsprechenden Knockouts für alle nicht essenziellen Gene verfügbar. Soweit die entsprechenden Mutanten einen Phänotyp zeigen, zum Teil erst mit einer zusätzlich eingeführten Mutation, kann untersucht werden, ob mit der potenziell orthologen menschlichen DNA der Phänotyp behoben werden kann. Transformiert man sodann die entsprechende Hefemutante mit der Patienten-DNA, lässt sich aus der Nichtkomplementierung schließen, dass im Patienten eben dieses Gen defekt ist. So ergab sich für CDG-II, dass es sich um einen Defekt im *Alg2*-Protein handelt (Abbildung 10).^[92] Unter bestimmten Bedingungen zeigt die *alg2*-Hefemutante nur ein spärliches Wachstum. Sowohl mit dem *ALG2*-Gen der Hefe als auch mit der orthologen, humanen DNA, nicht aber mit der DNA des Patienten lässt sich das Wildtypwachstum wiederherstellen. Vorausgegangen war hier die für die Eingrenzung des Defekts wichtige Beobachtung, dass es in kultivierten Hautfibroblasten des Patienten, analog zu einer *alg2*-Hefemutante, zu einer Akkumulation von Dol-PP-GlcNAc₂Man₉ kommt, während in Kontrollfibroblasten über-

wiegend das Vollängensubstrat Dol-PP-GlcNAc₂Man₉Glc₃ vorliegt.

Die Expression des orthologen humanen *ALG2* kann auch die Unterglycosylierung des Modellglycoproteins Carboxypeptidase Y, die Synthese der dolicholverknüpften Oligosaccharide in vivo sowie den Mannosyltransferasedefekt in vitro in der Hefe komplementieren (Abbildung 10).^[92] Wie erstaunlich genau sich die jeweiligen Genprodukte von Mensch und Hefe entsprechen können, zeigen Versuche, in denen die bei CDG-Ig-Patienten identifizierten Mutationen L158P^[93] oder T61M^[94] in das entsprechende *ALG12*-Gen der Hefe eingeführt wurden. So lässt sich eine *alg12*-Mutante der Hefe erwartungsgemäß mit dem *ALG12*-Wildtypgen komplementieren, nicht jedoch mit dem Hefegen, das an entsprechender Stelle die jeweiligen Mutationen enthält.

Wie hier gezeigt, war die Hefe überaus hilfreich bei der Aufklärung der Biosynthese-Maschinerie der Protein-N-Glycosylierung in Säugerzellen. Der derzeitige Kenntnisstand zu den meisten an diesem Stoffwechselweg beteiligten Säugergenen basiert auf Informationen, die ursprünglich bei der Untersuchung der Hefe erhalten wurden (Tabelle 1). Gle-

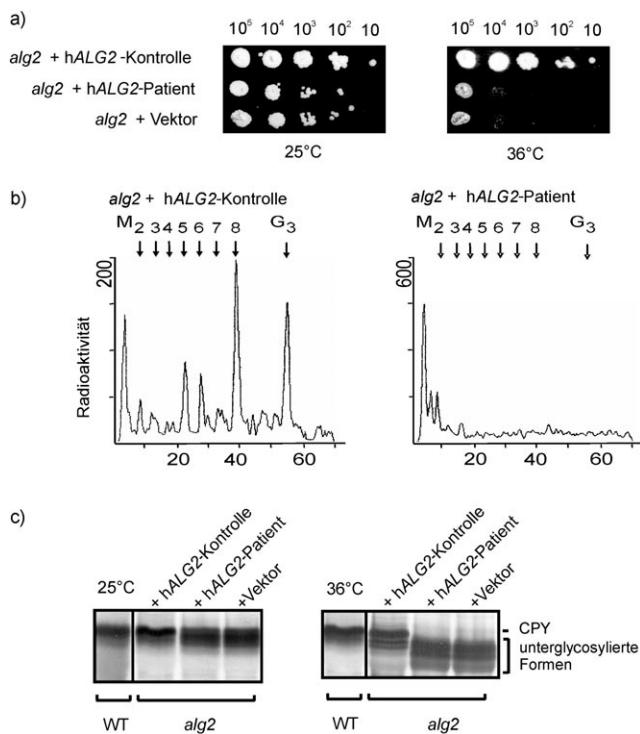


Abbildung 10. Hefe als Modell für die Identifizierung von CDG: Komplementierung des Wachstumsdefekts (a), des Defekts in der Lipid-Oligosaccharid-Biosynthese (b) und der Unterglycosylierung von CPY (c) durch das humane ALG2. Eine *alg2*-Hefemutante zeigt einen temperaturempfindlichen Wachstumsdefekt bei 36 °C. Dieser kann durch hALG2 eines Gesunden, nicht jedoch eines CDG-II-Patienten mit der Δ1040G-Mutation komplementiert werden (a). Serielle 1:10-Verdünnung von *alg2*-Zellen und Wachstum unter permissiver Temperatur (25 °C) oder bei restriktiver Temperatur (36 °C). In (b) wurden Hefezellen metabolisch mit [²-³H]Mannose markiert, und die Oligosaccharide wurden nach Abspaltung mit milder Säure durch HPLC analysiert. Die *alg2*-Mutante, transformiert mit dem hALG2 des Patienten, akkumuliert Man₂GlcNAc₂, während hALG2 eines Kontrollexperimentes zur Synthese von Glc₃Man₉GlcNAc₂ führt. In (c) ist die Analyse des Glycosylierungsstatus von Carboxypeptidase Y (CPY) der Hefe dargestellt. CPY von Wildtypzellen hat vier *N*-Glykanketten und wandert in der SDS-PAGE als eine distinkte Bande. In einer *alg2*-Mutante bei restriktiver Temperatur von 36 °C sind die Ketten verkürzt und werden weniger effizient auf das Protein übertragen. Sie sind ein nicht optimales Substrat für die OST, was zu unterglycosylierten CPY-Formen führt. Durch ein intaktes hALG2 kann der Defekt weitgehend behoben werden.

ches gilt für die Aufklärung der CDG-Fälle. Die Bäckerhefe dürfte auch zukünftig eine wichtige Rolle bei der biochemischen und molekulargenetischen Identifizierung von CDG spielen – und nicht zuletzt eignet sich Hefe natürlich auch als Modellorganismus für andere Biosyntheseprozesse als die Proteinglycosylierung.

5. Ausblick

In den vergangenen 50 Jahren hat die Erforschung von Proteinen und Nucleinsäuren die Molekularbiologie dominiert. Kohlenhydrate fanden – abgesehen von ihrer Rolle im Energiestoffwechsel – weit weniger Beachtung. Zunehmend

wird aber klar, dass sie als Informationsmoleküle *par excellence* wichtige biologische Funktionen vor allem für die Steuerung der Entwicklung höherer Organismen wahrnehmen. Ein besseres Verständnis der Rolle von Oligo- und Polysacchariden als Protein- und Lipid-Modifikationen wird auch für die Bewältigung zukünftiger medizinisch-pharmazeutischer Herausforderungen von Vorteil sein.^[95] Die letzten Jahre brachten enorme Fortschritte bei der organischen Synthese von Glykanen und komplexen Glycopeptiden bis hin zu distinkten Glycoproteinvarianten^[96] sowie bei der Analytik, wo neue Methoden der Massenspektrometrie, der NMR-Spektroskopie und hochauflösender Trennverfahren entwickelt wurden.^[97] Die Beschäftigung mit der Chemie und Biologie von Kohlenhydraten verspricht daher faszinierende Wissenschaft, die Lösung grundlegender biologischer Fragen und schließlich auch nutzbringende Anwendungen.

Die Arbeiten aus dem Labor der Autoren wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), vom Fonds der Chemischen Industrie und der Körber-Stiftung unterstützt. Wir bedauern, dass aus Platzgründen nicht alle relevanten Originalarbeiten zitiert oder diskutiert werden konnten und häufig auf Übersichtsartikel ausgewichen werden musste.

Eingegangen am 26. April 2006

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raft, K. Roberts, P. Walter, *The Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl., Garland Science, New York, **2002**; S. K. Hanks, T. Hunter, *FASEB J.* **1995**, 9, 576–596.
- [2] R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, 12, 43R–56R; H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1–27.
- [3] K. Landsteiner, *Wien. Klin. Wochenschr.* **1901**, 14, 1132–1134; W. M. Watkins, *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 561–568.
- [4] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631–664; L. Lehle, W. Tanner in *Glycoproteins, New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 29a (Hrsg.: J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam, **1995**, S. 475–509.
- [5] S. Strahl-Bolsinger, M. Gentzsch, W. Tanner, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1426, 297–307.
- [6] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 67–95; F. G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 143–149; K. G. Ten Hagen, T. A. Fritz, L. A. Tabak, *Glycobiology* **2003**, 13, 1R–16R.
- [7] H. Schachter, *Glycobiology* **1991**, 1, 453–461.
- [8] M. Amado, R. Almeida, T. Schwientek, H. Clausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 35–53; J. Marth, in *Essentials of Glycobiology* (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, G. W. Hart, J. Marth), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**, S. 101–113.
- [9] X. Cheng, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10570–10575; K. Kamemura, B. K. Hayes, F. I. Comer, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19229–19235.
- [10] G. W. Hart in *Essentials of Glycobiology* (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, G. W. Hart, J. Marth), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**, S. 171–194.
- [11] R. Schauer, *Glycoconj. J.* **2000**, 17, 485–499; O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, 11, 11R–18R.
- [12] A. Gottschalk, in *Glycoproteins, their composition, structure and function*, Vol. 5 (Hrsg.: A. Gottschalk), B.B.A. Library, **1972**, S. 24–30.

- [13] J. Lechner, F. Wieland, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 173–194; P. Messner, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 3–11; P. Messner, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 2517–2519.
- [14] P. G. Johansen, R. D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.* **1961**, *78*, 518–527; R. H. Nuenke, L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2452–2460.
- [15] L. F. Leloir, *Science* **1971**, *172*, 1299–1303.
- [16] Y. Higashi, J. L. Strominger, C. C. Sweeley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 1878–1884; M. Scher, W. J. Lennarz, C. C. Sweeley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 1313–1320; A. Wright, M. Dankert, P. Fennessey, P. W. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 1798–1803.
- [17] N. H. Behrens, L. F. Leloir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 153–159; P. Jung, W. Tanner, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *37*, 1–6; W. Tanner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *35*, 144–150.
- [18] N. H. Behrens, A. J. Parodi, L. F. Leloir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 2857–2860; L. Lehle, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *109*, 589–601; L. Lehle, W. Tanner, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *399*, 364–374.
- [19] P. W. Robbins, S. C. Hubbard, S. J. Turco, D. F. Wirth, *Cell* **1977**, *12*, 893–900; E. Li, I. Tabas, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 7762–7770; S. Kornfeld, E. Li, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 7771–7778.
- [20] G. P. Kaushal, A. D. Elbein, *Methods Enzymol.* **1989**, *179*, 452–475; L. Lehle, W. Tanner, *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, *11*, 568–574; L. Faye, A. Boulaflous, M. Benchabane, V. Gomord, D. Michaud, *Vaccine* **2005**, *23*, 1770–1778; I. B. Wilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 569–577.
- [21] A. Takatsuki, K. Arima, G. Tamura, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 215–223.
- [22] L. Lehle, W. Tanner, *FEBS Lett.* **1976**, *71*, 167–170; J. S. Tkacz, O. Lampen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *65*, 248–257.
- [23] M. D. Snider, L. A. Sultzman, P. W. Robbins, *Cell* **1980**, *21*, 385–392.
- [24] J. Helenius, D. T. Ng, C. L. Marolda, P. Walter, M. A. Valvano, M. Aeby, *Nature* **2002**, *415*, 447–450.
- [25] A. Haselbeck, W. Tanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 1520–1524; A. Haselbeck, W. Tanner, *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, *21*, 305–308.
- [26] T. C. Huffaker, P. W. Robbins, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3203–3210; T. C. Huffaker, P. W. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 7466–7470.
- [27] D. J. Kelleher, G. Kreibich, R. Gilmore, *Cell* **1992**, *69*, 55–65.
- [28] R. Knauer, L. Lehle, *FEBS Lett.* **1994**, *344*, 83–86; S. te Hessen, B. Janetzky, L. Lehle, M. Aeby, *EMBO J.* **1992**, *11*, 2071–2075.
- [29] R. Knauer, L. Lehle, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 259–273; S. Silberstein, R. Gilmore, *FASEB J.* **1996**, *10*, 849–858; A. Yan, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3121–3124.
- [30] I. Nilsson, D. J. Kelleher, Y. Miao, Y. Shao, G. Kreibich, R. Gilmore, G. von Heijne, A. E. Johnson, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 715–725.
- [31] A. L. Karamyshev, D. J. Kelleher, R. Gilmore, A. E. Johnson, G. von Heijne, I. Nilsson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40489–40493.
- [32] M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, M. Aeby, *Science* **2002**, *298*, 1790–1793; D. Linton, N. Dorrell, P. G. Hitchen, S. Amber, A. V. Karlyshev, H. R. Morris, A. Dell, M. A. Valvano, M. Aeby, B. W. Wren, *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1695–1703.
- [33] M. Schwarz, R. Knauer, L. Lehle, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6564–6568; A. Yan, W. J. Lennarz, *Glycobiology* **2005**, *15*, 1407–1415; U. Spirig, D. Bodmer, M. Wacker, P. Burda, M. Aeby, *Glycobiology* **2005**, *15*, 1396–1406.
- [34] D. J. Kelleher, D. Karaoglu, E. C. Mandon, R. Gilmore, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 101–111.
- [35] C. Ronin, S. Bouchilloux, C. Granier, J. van Rietschoten, *FEBS Lett.* **1978**, *96*, 179–182; E. Bause, L. Lehle, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*, 531–540; G. W. Hart, K. Brew, G. A. Grant, R. A. Bradshaw, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9747–9753.
- [36] E. Bause, *Biochem. J.* **1983**, *209*, 331–336; E. Bause, G. Legler, *Biochem. J.* **1981**, *195*, 639–644.
- [37] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4–8; A. J. Petrescu, A. L. Milac, S. M. Petrescu, R. A. Dwek, M. R. Wormald, *Glycobiology* **2004**, *14*, 103–114.
- [38] L. Kasturi, H. Chen, S. H. Shakin-Eshleman, *Biochem. J.* **1997**, *323*, 415–419; J. L. Mellquist, L. Kasturi, S. L. Spitalnik, S. H. Shakin-Eshleman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6833–6837; R. S. Senger, M. N. Karim, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1653–1662; T. Roitsch, L. Lehle, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 525–529.
- [39] C. B. Sharma, L. Lehle, W. Tanner, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *116*, 101–108; D. Karaoglu, D. J. Kelleher, R. Gilmore, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12193–12206.
- [40] B. Imperiali, T. L. Hendrickson, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1565–1578; E. Bause, G. Legler, *Biochem. J.* **1981**, *195*, 639–644.
- [41] P. Whitley, I. M. Nilsson, G. von Heijne, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6241–6244.
- [42] M. Ecker, V. Mrsa, I. Hagen, R. Deutzmann, S. Strahl, W. Tanner, *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 628–632.
- [43] C. E. Ballou, *Methods Enzymol.* **1990**, *185*, 440–470.
- [44] R. Sentandreu, D. H. Northcote, *Carbohydr. Res.* **1969**, *10*, 584–585.
- [45] W. Chai, C. T. Yuen, H. Kogelberg, R. A. Carruthers, R. U. Margolis, T. Feizi, A. M. Lawson, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *263*, 879–888; C. T. Yuen, W. Chai, R. W. Loveless, A. M. Lawson, R. U. Margolis, T. Feizi, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8924–8931.
- [46] A. Chiba, K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata, T. Endo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2156–2162.
- [47] B. C. VanderVen, J. D. Harder, D. C. Crick, J. T. Belisle, *Science* **2005**, *309*, 941–943.
- [48] P. Babczynski, W. Tanner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *54*, 1119–1124; G. Larriba, M. V. Elorza, J. R. Villanueva, R. Sentandreu, *FEBS Lett.* **1976**, *71*, 316–320; A. Haselbeck, W. Tanner, *FEBS Lett.* **1983**, *158*, 335–338.
- [49] T. Willer, W. Amselgruber, R. Deutzmann, S. Strahl, *Glycobiology* **2002**, *12*, 771–783.
- [50] H. Manya, A. Chiba, A. Yoshida, X. Wang, Y. Chiba, Y. Jigami, R. U. Margolis, T. Endo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 500–505.
- [51] S. Strahl-Bolsinger, T. Immervoll, R. Deutzmann, W. Tanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8164–8168; S. Strahl-Bolsinger, W. Tanner, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *196*, 185–190.
- [52] T. Willer, M. C. Valero, W. Tanner, J. Cruces, S. Strahl, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 621–630.
- [53] E. Martín-Blanco, A. García-Bellido, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6048–6052; L. A. Jurado, A. Coloma, J. Cruces, *Genomics* **1999**, *58*, 171–180.
- [54] D. Lyalin, K. Koles, S. D. Roosendaal, E. Repnikova, L. Van Wechel, V. M. Panin, *Genetics* **2006**, *172*, 343–353.
- [55] V. Girrbach, S. Strahl, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12554–12562; V. Girrbach, T. Zeller, M. Priesmeier, S. Strahl-Bolsinger, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19288–19296.
- [56] M. Gentzsch, T. Immervoll, W. Tanner, *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 128–130.
- [57] M. Gentzsch, W. Tanner, *Glycobiology* **1997**, *7*, 481–486.
- [58] S. Strahl-Bolsinger, A. Scheinost, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9068–9075.
- [59] M. Lussier, A. M. Sdicu, H. Bussey, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 323–334.

- [60] A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Topaloglu, T. Toda, T. Endo, *Dev. Cell* **2001**, *1*, 717–724.
- [61] W. Zhang, D. Betel, H. Schachter, *Biochem. J.* **2002**, *361*, 153–162.
- [62] K. Ebnet, D. Vestweber, *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *112*, 1–23; M. Fukuda, N. Hiraoka, J. C. Yeh, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 467–470; R. P. McEver, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 581–586; D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 181–213; R. D. Cummings, D. F. Smith, *BioEssays* **1992**, *14*, 849–856.
- [63] G. W. Hart, R. S. Haltiwanger, G. D. Holt, W. G. Kelly, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 841–874; G. W. Hart, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 315–335; F. I. Comer, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29179–29182; C. Slawson, M. P. Housley, G. W. Hart, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97*, 71–83.
- [64] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [65] S. Hakomori in *Science and scientists* (Hrsg.: M. Kageyama, K. Nakamura, T. Oshima, T. Uchida), Japan Scientific Societies Press and D. Reidel Publ. Co., Tokyo and Dordrecht, **1981**, S. 199–205.
- [66] R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759–767.
- [67] E. Ioffe, P. Stanley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 728–732; M. Metzler, A. Gertz, M. Sarkar, H. Schachter, J. W. Schrader, J. D. Marth, *EMBO J.* **1994**, *13*, 2056–2065; H. Koiba, F. Li, M. G. McCully, I. Mendoza, N. Koizumi, Y. Manabe, Y. Nakagawa, J. Zhu, A. Rus, J. M. Pardo, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, *Plant Cell* **2003**, *15*, 2273–2284; O. Lerouxel, G. Mouille, C. Andeme-Onzighi, M. P. Bruyant, M. Sevano, C. Loutelier-Bourhis, A. Driouich, H. Hofte, P. Lerouge, *Plant J.* **2005**, *42*, 455–468.
- [68] C. Cappellaro, C. Baldermann, R. Rachel, W. Tanner, *EMBO J.* **1994**, *13*, 4737–4744; C. Cappellaro, K. Hauser, V. Mrsia, M. Watzele, G. Watzele, C. Gruber, W. Tanner, *EMBO J.* **1991**, *10*, 4081–4088.
- [69] S. Hickman, L. J. Shapiro, E. F. Neufeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *57*, 55–61; K. von Figura, A. Hasilik, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 167–193; S. Kornfeld, *FASEB J.* **1987**, *1*, 462–468; W. S. Sly, *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 563–564.
- [70] C. Hashimoto, R. E. Cohen, W. J. Zhang, C. E. Ballou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2244–2248; H. Schwaiger, A. Hasilik, K. von Figura, A. Wiemken, W. Tanner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *104*, 950–956.
- [71] A. J. Parodi, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 69–93; E. S. Trombetta, A. J. Parodi, *Methods* **2005**, *35*, 328–337.
- [72] S. Dejgaard, J. Nicolay, M. Taheri, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2004**, *6*, 29–42; L. Ellgaard, A. Helenius, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 181–191; R. G. Spiro, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1025–1041; D. B. Williams, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 615–623.
- [73] C. L. Ward, R. R. Kopito, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25710–25718; J. R. Riordan, *Annu. Rev. Physiol.* **2005**, *67*, 701–718.
- [74] B. Tsai, Y. Ye, T. A. Rapoport, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 246–255.
- [75] C. A. Jakob, D. Bodmer, U. Spirig, P. Battig, A. Marcil, D. Dignard, J. J. Bergeron, D. Y. Thomas, M. Aeby, *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 423–430; N. Hosokawa, I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihizi, L. O. Tremblay, A. Herscovics, K. Nagata, *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 415–422; K. Nakatsukasa, S. Nishikawa, N. Hosokawa, K. Nagata, T. Endo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8635–8638.
- [76] M. Gentzsch, W. Tanner, *EMBO J.* **1996**, *15*, 5752–5759.
- [77] T. Willer, M. Brandl, M. Sipiczki, S. Strahl, *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 156–170.
- [78] B. D. Shaw, M. Momany, *Fungal Genet. Biol.* **2002**, *37*, 263–270.
- [79] M. Rouabha, M. Schaller, C. Corbucci, A. Vecchiarelli, S. K. Prill, L. Giasson, J. F. Ernst, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4571–4580.
- [80] C. M. Coughlan, J. L. Walker, J. C. Cochran, K. D. Wittrup, J. L. Brodsky, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15289–15297; M. Lommel, M. Bagnat, S. Strahl, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 46–57; T. J. Proszynski, K. Simons, M. Bagnat, *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 1533–1543.
- [81] C. Harty, S. Strahl, K. Romisch, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 1093–1101; K. Nakatsukasa, S. Okada, K. Umebayashi, R. Fukuda, S. Nishikawa, T. Endo, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49762–49772.
- [82] T. Willer, B. Prados, J. M. Falcon-Perez, I. Renner-Muller, G. K. Przemeck, M. Lommel, A. Coloma, M. C. Valero, M. H. de Angelis, W. Tanner, E. Wolf, S. Strahl, J. Cruces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14126–14131.
- [83] J. Jaeken, M. Vanderschueren-Lodeweyckx, P. Casaer, L. Snoeck, L. Corbeel, E. Eggermont, R. Eeckels, *Pediatr. Res.* **1980**, *14*, 179.
- [84] J. Jaeken, H. G. van Eijk, C. van der Heul, L. Corbeel, R. Eeckels, E. Eggermont, *Clin. Chim. Acta* **1984**, *144*, 245–247.
- [85] K. W. Marek, I. K. Vijay, J. D. Marth, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1263–1271.
- [86] T. Endo, T. Toda, *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1641–1647; F. Muntoni, M. Brockington, S. Torelli, S. C. Brown, *Curr. Opin. Neurol.* **2004**, *17*, 205–209; H. Schachter, J. Vajsar, W. Zhang, *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*, 291–300.
- [87] D. E. Michele, K. P. Campbell, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15457–15460.
- [88] R. Barresi, K. P. Campbell, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 199–207; M. Durbeej, K. P. Campbell, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 349–361.
- [89] D. Beltran-Valero de Bernabe, S. Currier, A. Steinbrecher, J. Celli, E. van Beusekom, B. van der Zwaag, H. Kayserili, L. Merlini, D. Chitayat, W. B. Dobyns, B. Cormand, A. E. Lehesjoki, J. Cruces, T. Voit, C. A. Walsh, H. van Bokhoven, H. G. Brunner, *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 1033–1043.
- [90] J. van Reeuwijk, M. Janssen, C. van den Elzen, D. Beltran-Valero de Bernabe, P. Sabatelli, L. Merlini, M. Boon, H. Scheffer, M. Brockington, F. Muntoni, M. A. Huynen, A. Verrips, C. A. Walsh, P. G. Barth, H. G. Brunner, H. van Bokhoven, *J. Med. Genet.* **2005**, *42*, 907–912.
- [91] J. G. Gleeson, C. A. Walsh, *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 352–359; M. Haltia, I. Leivo, H. Somer, H. Pihko, A. Paetau, T. Kivelä, A. Tarkkanen, F. Tome, E. Engvall, P. Santavuori, *Ann. Neurol.* **1997**, *41*, 173–180; C. Longman, E. Mercuri, F. Cowan, J. Allsop, M. Brockington, C. Jimenez-Mallebrera, S. Kumar, M. Rutherford, T. Toda, F. Muntoni, *Arch. Neurol.* **2004**, *61*, 1301–1306; E. Mercuri, H. Topaloglu, M. Brockington, A. Berardelli, A. Pichieccio, F. Santorelli, M. Rutherford, B. Talim, E. Ricci, T. Voit, F. Muntoni, *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 251–257.
- [92] C. Thiel, M. Schwarz, J. Peng, M. Grzmil, M. Hasilik, T. Braulke, A. Kohlschutter, K. von Figura, L. Lehle, C. Koerner, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22498–22505.
- [93] C. Thiel, M. Schwarz, M. Hasilik, U. Griebel, F. Hanefeld, L. Lehle, K. von Figura, C. Koerner, *Biochem. J.* **2002**, *367*, 195–201.
- [94] C. E. Grubenmann, C. G. Frank, S. Kjaergaard, E. G. Berger, M. Aeby, T. Hennet, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2331–2339.
- [95] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 751–763.
- [96] C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085–3112; S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677–1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654; H. Weiss, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4389–4392; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4261–4263; S. Hanashima, S. Manabe, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4290–4296; *Angew.*

- Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4218–4224; M. V. Chiesa, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3541–3554.
- [97] Y. Mechref, M. V. Novotny, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321–369.
- [98] E. Van Schaftingen, J. Jaeken, *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 318–320.
- [99] R. Niehues, M. Hasilik, G. Alton, C. Koerner, M. Schiebe-Sukumar, H. G. Koch, K. P. Zimmer, R. Wu, E. Harms, K. Reiter, K. von Figura, H. H. Freeze, H. K. Harms, T. Marquardt, *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1414–1420.
- [100] C. Koerner, R. Knauer, U. Holzbach, F. Hanefeld, L. Lehle, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13200–13205; T. Imbach, P. Burda, P. Kuhnert, R. A. Wevers, M. Aebi, E. G. Berger, T. Hennet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6982–6987.
- [101] C. Koerner, R. Knauer, U. Stephani, T. Marquardt, L. Lehle, K. von Figura, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6816–6822.
- [102] T. Imbach, B. Schenk, E. Schollen, P. Burda, A. Stutz, S. Grunewald, N. M. Bailie, M. D. King, J. Jaeken, G. Matthijs, E. G. Berger, M. Aebi, T. Hennet, *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 233–239; S. Kim, V. Westphal, G. Srikrishna, D. P. Mehta, S. Peterson, J. Filiano, P. S. Karnes, M. C. Patterson, H. H. Freeze, *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 191–198.
- [103] C. Kranz, J. Denecke, M. A. Lehrman, S. Ray, P. Kienz, G. Kreissel, D. Sagi, J. Peter-Katalinic, H. H. Freeze, T. Schmid, S. Jackowski-Dohrmann, E. Harms, T. Marquardt, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1613–1619; B. Schenk, T. Imbach, C. G. Frank, C. E. Grubenmann, G. V. Raymond, H. Hurvitz, I. Korn-Lubetzki, S. Revel-Vik, A. Raas-Rotschild, A. S. Luder, J. Jaeken, E. G. Berger, G. Matthijs, T. Hennet, M. Aebi, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1687–1695.
- [104] I. Chantret, J. Dancourt, T. Dupre, C. Delenda, S. Bucher, S. Vuillaumier-Barrot, H. Ogier de Baulny, C. Peletan, O. Danos, N. Seta, G. Durand, R. Oriol, P. Codogno, S. E. Moore, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9962–9971.
- [105] X. Wu, J. S. Rush, D. Karaoglu, D. Krasnewich, M. S. Lubinsky, C. J. Waechter, R. Gilmore, H. H. Freeze, *Hum. Mutat.* **2003**, *22*, 144–150.
- [106] M. Schwarz, C. Thiel, J. Lubbehusen, B. Dorland, T. de Koning, K. von Figura, L. Lehle, C. Korner, *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 472–481; C. Kranz, J. Denecke, L. Lehle, K. Sohlbach, S. Jeske, F. Meinhardt, R. Rossi, S. Gudowius, T. Marquardt, *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 545–551; C. E. Grubenmann, C. G. Frank, A. J. Hulsmeier, E. Schollen, G. Matthijs, E. Mayatepek, E. G. Berger, M. Aebi, T. Hennet, *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 535–542.
- [107] C. G. Frank, C. E. Grubenmann, W. Eyaid, E. G. Berger, M. Aebi, T. Hennet, *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 146–150.
- [108] J. Jaeken, H. Schachter, H. Carchon, P. De Cock, B. Coddeville, G. Spik, *Arch. Dis. Child.* **1994**, *71*, 123–127; J. Tan, J. Dunn, J. Jaeken, H. Schachter, *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *59*, 810–817.
- [109] C. M. De Praeter, G. J. Gerwig, E. Bause, L. K. Nuytinck, J. F. Vliegenthart, W. Breuer, J. P. Kamerling, M. F. Espeel, J. J. Martin, A. M. De Paepe, N. W. Chan, G. A. Dacremont, R. N. Van Coster, *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 1744–1756.
- [110] T. Luebke, T. Marquardt, K. von Figura, C. Koerner, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25986–25989; T. Luebke, T. Marquardt, A. Etzioni, E. Hartmann, K. von Figura, C. Koerner, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 73–76; K. Luhn, M. K. Wild, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, D. Vestweber, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 69–72.
- [111] B. Hansske, C. Thiel, T. Lubke, M. Hasilik, S. Honing, V. Peters, P. H. Heidemann, G. F. Hoffmann, E. G. Berger, K. von Figura, C. Korner, *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 725–733.
- [112] I. Martinez-Duncker, T. Dupre, V. Piller, F. Piller, J. J. Candelier, C. Trichet, G. Tchernia, R. Oriol, R. Mollicone, *Blood* **2005**, *105*, 2671–2676.
- [113] X. Wu, R. A. Steet, O. Bohorov, J. Bakker, J. Newell, M. Krieger, L. Spaapen, S. Kornfeld, H. H. Freeze, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 518–523.
- [114] F. Foulquier, E. Vasile, E. Schollen, N. Callewaert, T. Ramaekers, D. Quelhas, J. Jaeken, P. Mills, B. Winchester, M. Krieger, W. Annaert, G. Matthijs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3764–3769.
- [115] E. Quentin, A. Gladen, L. Roden, H. Kresse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1342–1346; T. Okajima, S. Fukumoto, K. Furukawa, T. Urano, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 28841–28844.
- [116] W. Wuyts, S. Ramlakhan, W. Van Hul, J. T. Hecht, A. M. van den Ouwehand, W. H. Raskind, F. C. Hofstede, E. Reyniers, D. E. Wells, B. de Vries, E. U. Conrad, A. Hill, D. Zalatayev, J. Weissenbach, M. J. Wagner, E. Bakker, D. J. J. Halley, P. J. Willems, *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *57*, 382–387; W. Wuyts, W. Van Hul, J. Wauters, M. Nemtsova, E. Reyniers, E. V. Van Hul, K. De Boulle, B. B. de Vries, J. Hendrickx, I. Herrygers, P. Bossuyt, W. Balemans, E. Fransen, L. Vits, P. Coucke, N. J. Nowak, T. B. Shows, L. Mallet, A. M. van den Ouwehand, J. McGaughran, D. J. Halley, P. J. Willems, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1547–1557.