

Diss. ETH Nr. 15541

Molecular and Biochemical Characterization of Four Novel Types of Congenital Disorders of Glycosylation

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
CLAUDIA ELISABETH GRUBENMANN
Eidg. dipl. Apothekerin, ETH Zürich
born on January 31, 1973
citizen of Appenzell AI

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. med M. Müntener, examiner
Prof. Dr. med. E.G. Berger, co-examiner
Prof. Dr. T. Hennet, co-examiner

Zürich 2004

Zusammenfassung

Die Glykosylierung von Proteinen stellt eine der häufigsten Formen der posttranslationalen Proteinmodifikationen dar und spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Im Rahmen der N-Glykoproteinbiosynthese werden Monosaccharide schrittweise durch eine Reihe von Glykosyltransferase-Reaktionen an das Lipid Dolichol gebunden, das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert ist. Der vollständige Vorläufer $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ wird dann auf Asparaginreste eines Glykoproteins übertragen. Nachfolgend werden die Zuckerketten im ER und im Golgi-Apparat modifiziert. Angeborene Defekte, die die Synthese oder die Modifizierung der Glykanstrukturen von Glykoproteinen betreffen, führen beim Menschen zumeist zu multisystemischen Defekten, die mit schweren psychomotorischen und neurologischen Retardierungen einhergehen. Sie werden als Kongenitale Glykosylierungsstörungen (CDG) bezeichnet. CDG kann in zwei Typen unterteilt werden. CDG-I beinhaltet alle Defekte im ER und den Transfer der Zuckerketten auf das Protein, wo hingegen CDG-II die mit der Modifizierung des Glykans verbundenen Defekte beinhaltet. Bis heute sind zwölf CDG-I und vier CDG-II Subtypen bekannt. Die häufigste angewandte diagnostische Methode ist die isoelektrische Fokussierung von Serum Transferrin mit der man zwischen CDG Typ I und II aber nicht zwischen einzelnen Subtypen unterscheiden kann. Um weitere Informationen über den möglichen Defekt eines Gens in CDG-I zu erhalten, muss man eine Analyse der lipid-gebundenen Oligosaccharide, gewonnen aus Fibroblasten des Patienten, per HPLC vornehmen. Hefe dient für die N-Glykosylierung im ER als Modell und ist essentiell, um von einem Phänotyp auf das defekte Gen zu schließen.

In dieser Arbeit werden vier neue CDG-I Subtypen beschrieben, die als CDG-If, CDG-Ig, CDG-Ik und CDG-IL klassifiziert wurden. **CDG-If** wird auf Grund eines Defektes im *Lec35/MPDU1* verursacht. Es wurden drei Patienten mit diesem Defekt diagnostiziert, alle zeigten unterglykosyliertes Serum Transferrin und akkumulierten $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ Vorläufer-Oligosaccharide im ER. In primären Fibroblastenkulturen von CDG-If Patienten konnte durch retrovirale Expression der intakten *MPDU1* cDNA die lipid-gebundene Oligosaccharidsynthese wieder normalisiert werden, was beweist, dass der *MPDU1* Gendefekt die krankmachende Ursache in diesen Patienten ist.

CDG-Ig wird durch einen Defekt im ALG12 Gen verursacht, welches für die α 1,6 Mannosyltransferase kodiert. Die Fibroblasten dieser Patienten akkumulieren den Oligosaccharid-Vorläufer GlcNAc₂Man₇, der dann auch auf Proteine übertragen wird. Die Auswirkungen dieses Gendefektes auf die Funktionalität des ALG12 Proteins wurde in der Hefe mittels eines Komplementierungs-Assays getestet. Die Funktion des ALG12 Proteins wurde durch Expression von gesunder menschlicher ALG12 cDNA in *alg12* Hefemutanten wieder hergestellt, während die cDNA des Patienten die Funktion des Proteins nicht wieder herstellen konnte.

CDG-Ik Patienten weisen einen Defekt im ALG1 Gen auf, das für die β 1,4 Mannosyltransferase kodiert. Mittels 2-Aminobenzimid Oligosaccharidmarkierung konnte eine Akkumulierung des unvollständigen Oligosaccharid-Vorläufers GlcNAc₂ festgestellt werden. Es wurden ebenfalls Komplementierungs-Assays in der Hefe durchgeführt, um sicherzustellen, dass die gefundenen Mutationen keine Polymorphismen sind und die Funktion des ALG1 Proteins beeinträchtigen.

Der **CDG-IL** Patient, der einen ALG9 Gendefekt aufweist, synthetisiert und akkumuliert unvollständige GlcNAc₂Man₆ und GlcNAc₂Man₉ Oligosaccharid-Vorläufer, die auf Proteine übertragen werden. Komplementierungs-Assays in der Hefe zeigten auch hier, dass der gefundene Gendefekt des Patienten die krankmachende Ursache von CDG-IL ist.

Summary

Glycosylation is a post-translational modification affecting properties and functions of proteins and therefore having a considerable impact on biological processes. The biosynthesis of N-glycans occurs first in the endoplasmic reticulum (ER) where an oligosaccharide precursor is assembled on the lipid carrier dolichyl pyrophosphate. This GlcNAc₂Man₉Glc₃ precursor is transferred to selected asparagine residues of nascent proteins. Once this oligosaccharide is attached to the protein its processing in the ER and in the Golgi apparatus takes place. Deficiencies along the N-glycan biosynthesis pathway lead to severe multisystemic diseases with psychomotoric and mental retardations and are known as congenital disorders of glycosylation (CDG). CDG is a group of recessive inherited metabolic diseases and can be divided into two types: CDG-I comprises defects of the assembly of the precursor oligosaccharide and its transfer onto proteins in the ER while CDG-II comprises alterations where the subsequent processing steps in the Golgi apparatus are affected. Twelve subtypes of CDG-I and four subtypes of CDG-II are known, so far. To elucidate N-glycosylation defects, isoelectric focusing of serum transferrin represents a simple diagnostic tool, although this test does not discriminate between different subtypes of CDG. To get more insights about the deficiency of a candidate gene lipid-linked and N-linked oligosaccharide analysis by HPLC have to be performed. To further elucidate the molecular basis of a subtype of CDG-I the model organism yeast is a helpful tool especially to relate a glycosylation phenotype to its underlying genetic defect.

In this work four novel types of CDG-I have been characterized on the molecular and biochemical level, namely CDG-If, CDG-Ig, CDG-Ik and CDG-IL. In the first report we describe the molecular basis of **CDG-If**, which is due to a deficiency of the Lec35/MPDU1 gene. In these patients serum transferrin was hypoglycosylated and patients fibroblasts were accumulating incomplete GlcNAc₂Man₅ lipid-linked oligosaccharide precursors and the incomplete precursors were transferred onto nascent proteins. Retroviral-based expression of the normal MPDU1 cDNA in primary fibroblasts of CDG-If patients restored normal lipid-linked oligosaccharide biosynthesis.

In the second report we describe the results of the molecular characterization of **CDG-Ig**, caused by the deficiency of ALG12, the α 1,6 mannosyltransferase. Patient's fibroblasts accumulate the truncated oligosaccharide precursor GlcNAc₂Man₇ which is transferred onto proteins. The impact of the patients mutations on ALG12 protein function was tested in the

S.cerevisiae alg12 mutant, showing that the yeast ALG12 gene bearing the homologous mutations and the human mutant Alg12 alleles failed to normalize the growth defect of the *alg12* yeast mutant.

In the third report we describe the β 1,4 mannosyltransferase (ALG1) deficiency designated as **CDG-Ik**. The 2-aminobenzimide fluorescence labeling of oligosaccharides was a helpful novel tool to demonstrate the accumulation of lipid-linked GlcNAc₂ oligosaccharide precursors in this patient's fibroblasts. A complementation assay in yeast confirmed that the mutations found in this patient were leading to loss of ALG1 activity.

In the last report we describe the characterization of the ALG9 α 1,2 mannosyltransferase deficiency which causes **CDG-IL**. Patient's fibroblasts revealed an accumulation of lipid-linked GlcNAc₂Man₆ and GlcNAc₂Man₈ structures, which was paralleled by the transfer of incomplete oligosaccharide precursors to proteins. A complementation assay was confirming that the mutation found in the patient's ALG9 cDNA was leading to loss of ALG9 function.