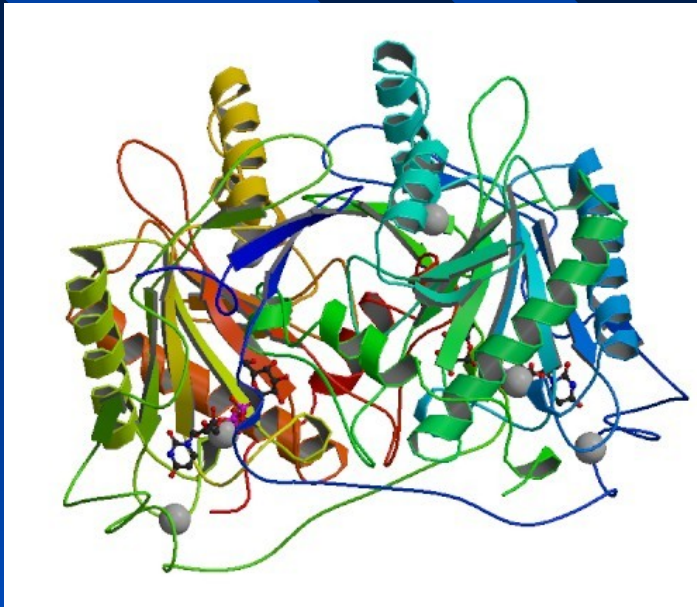


Pathomechanismen der chronischen Zellschädigung bei Galaktosämie

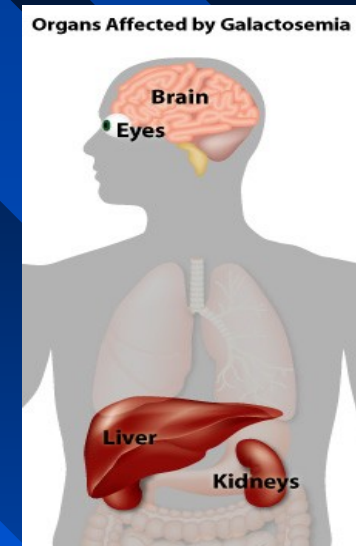
Simon Staubach

Promotionsbeginn Februar 2009

GALT (Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase)

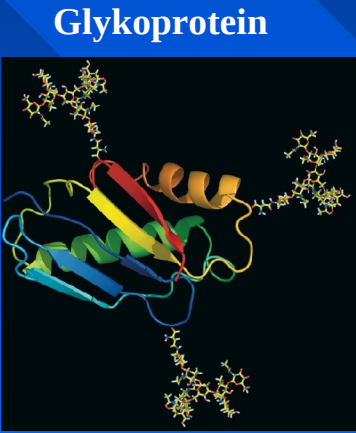
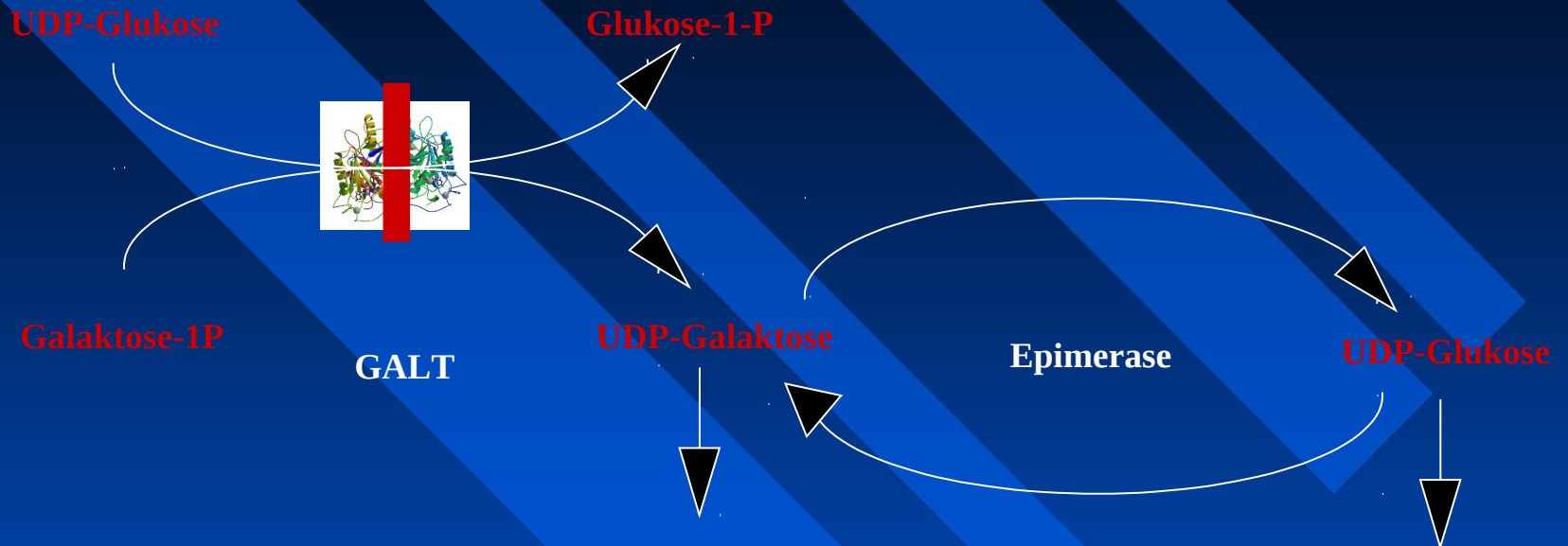


Mutation GALT (Q188R) verursacht Galaktosemie



- Akute Symptome: beeinträchtigte Nierenfunktion, gehemmte motorische Funktionen, eingeschränktes Wachstum und verzögerte mentale Entwicklung
- Chronische Langzeitsymptome: Hypogonadismus, verringerte Funktionalität der Geschlechtorgane in Bezug auf Hormonproduktion, organische Langzeitschäden, eingeschränkte geistige Entwicklung

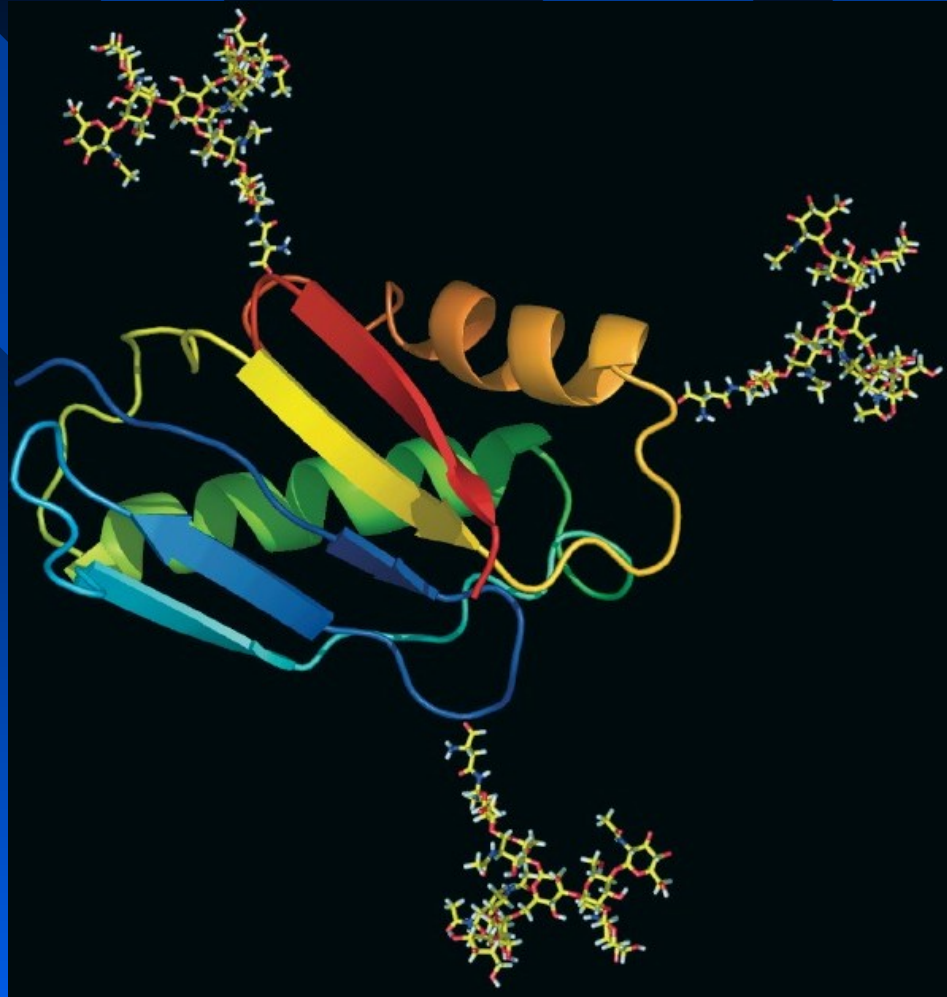
Gestörte Zuckeraanhaftung an Proteine und Lipide



Defekte Transferase (GALT)

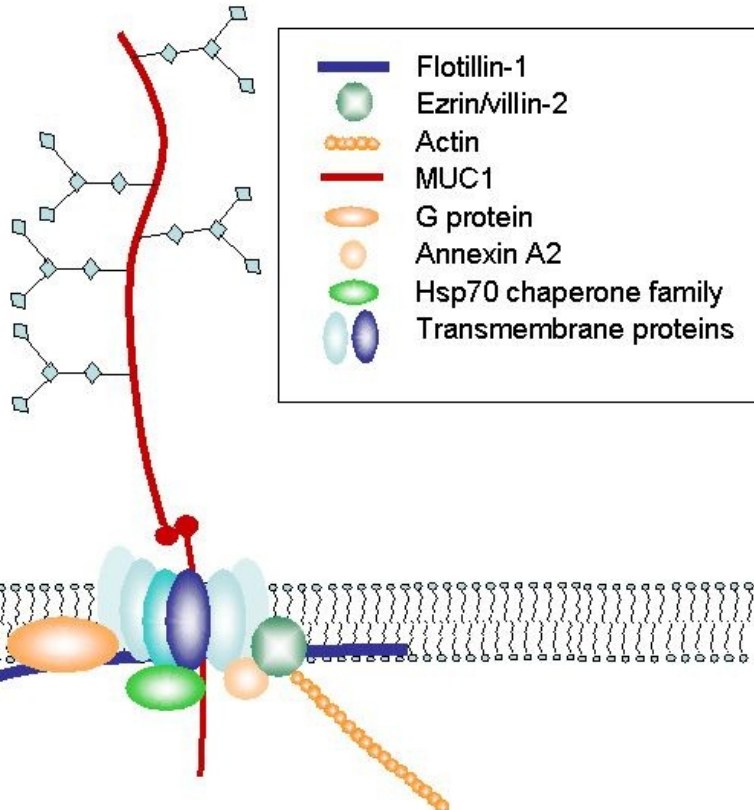
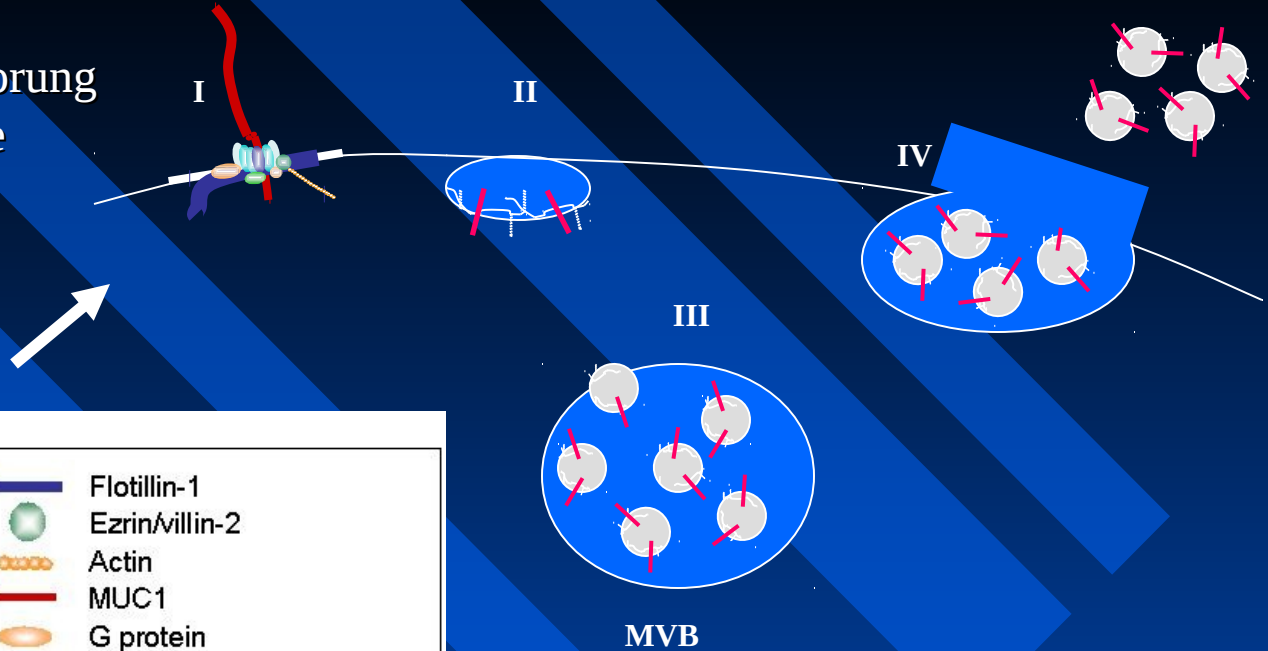
Quelle: Glykostrukturfabrik

Glykoprotein: Proteinkette mit Zuckerantennen



Glykoproteine: Auf der Oberfläche der Zelle und auf Exosomen_v

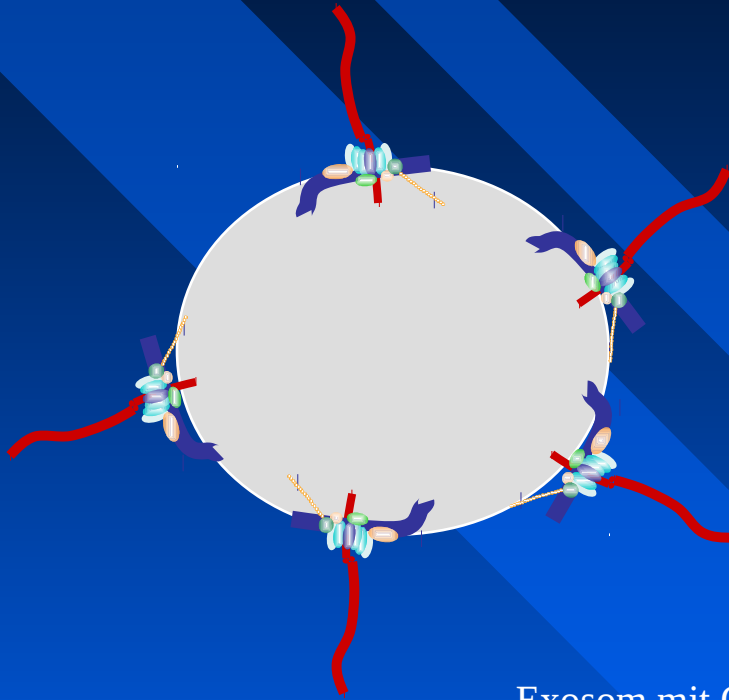
Exosome haben ihren Ursprung auf der Zelloberfläche



- I. Lipid raft mit Glykoprotein
- II. Glykoprotein wird in die Zelle aufgenommen
- III. Ansammlung der späteren Exosomen
- IV. Transport der Exosome zur Zelloberfläche
- V. Abgabe der Exosomen zB.: (in den Urin/ ins Blut)

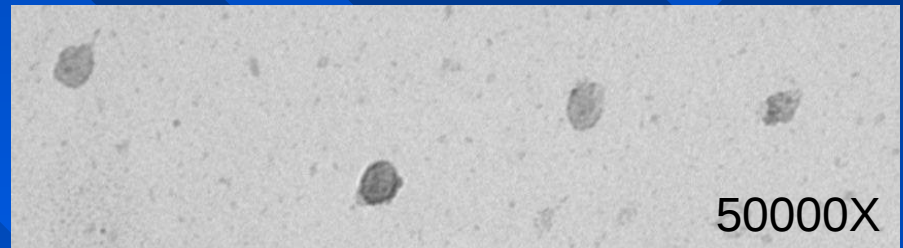
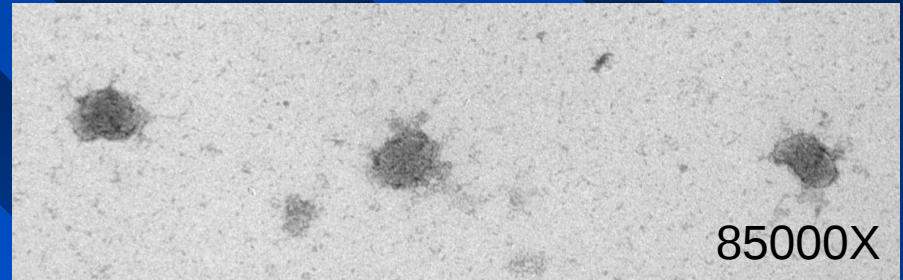
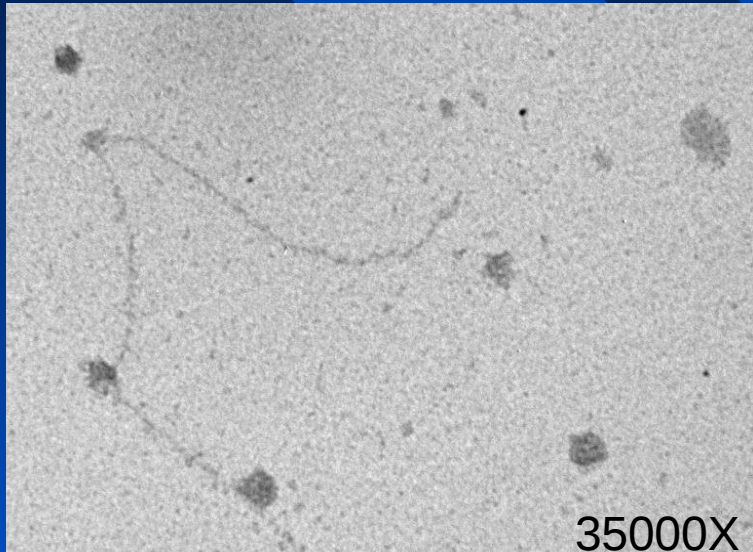
Strategie: Zuckerketten der Glykoproteine auf urinären Exosomen vergleichen

- Frisches Material
- Menge unbegrenzt
- Technisch leichte Aufreinigung

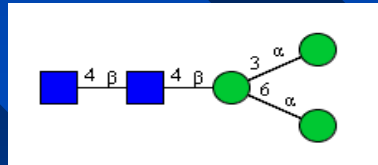
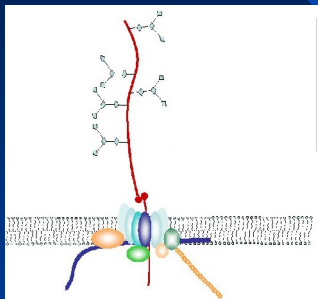


Exosom mit Glykoproteinen auf der
Oberfläche

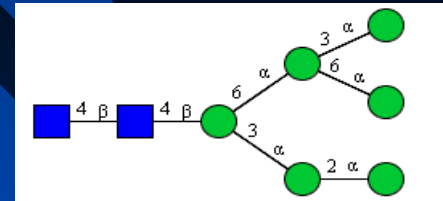
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Exosomen



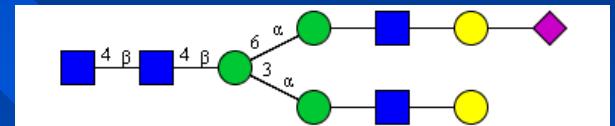
N-Glykosylierung auf Exosomen



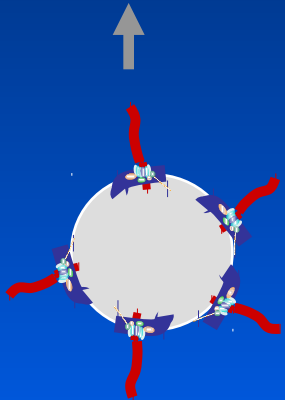
Kernstruktur



High-Mannose-Typ



Komplex-Typ



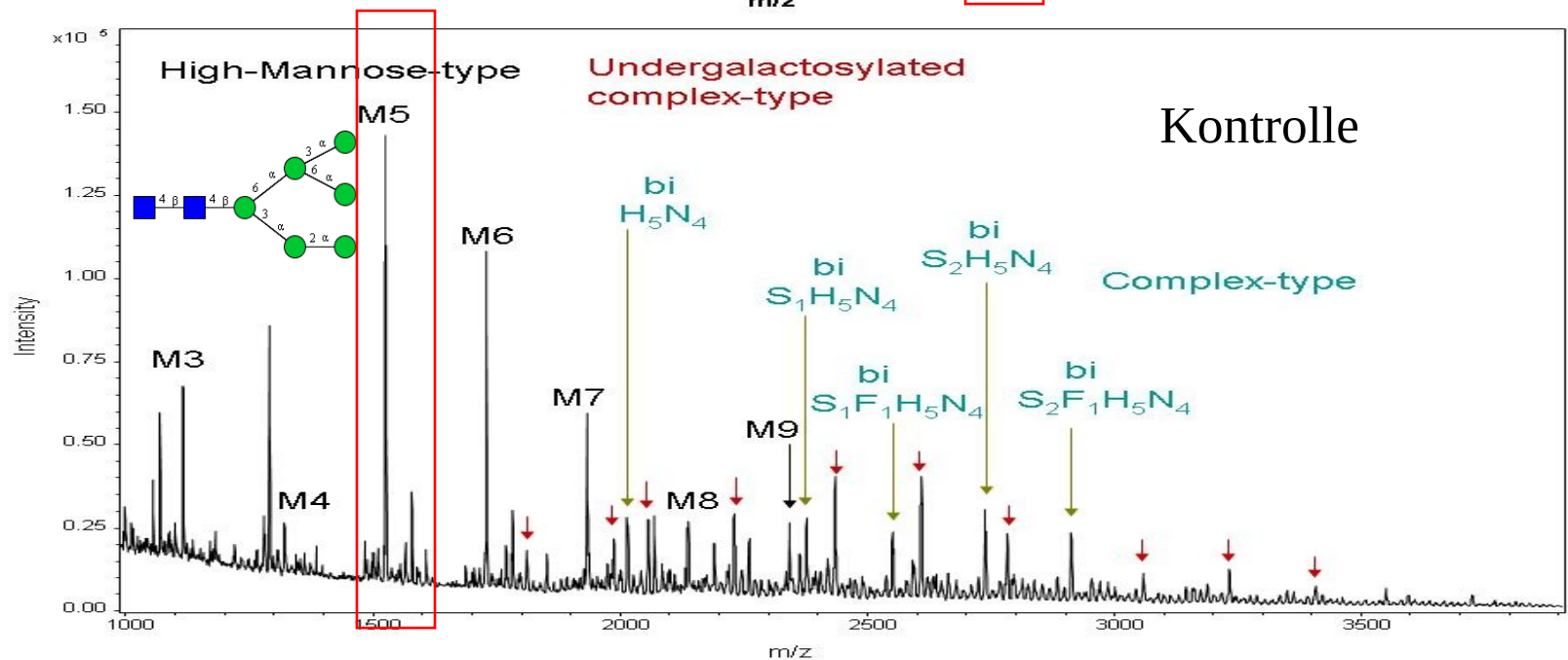
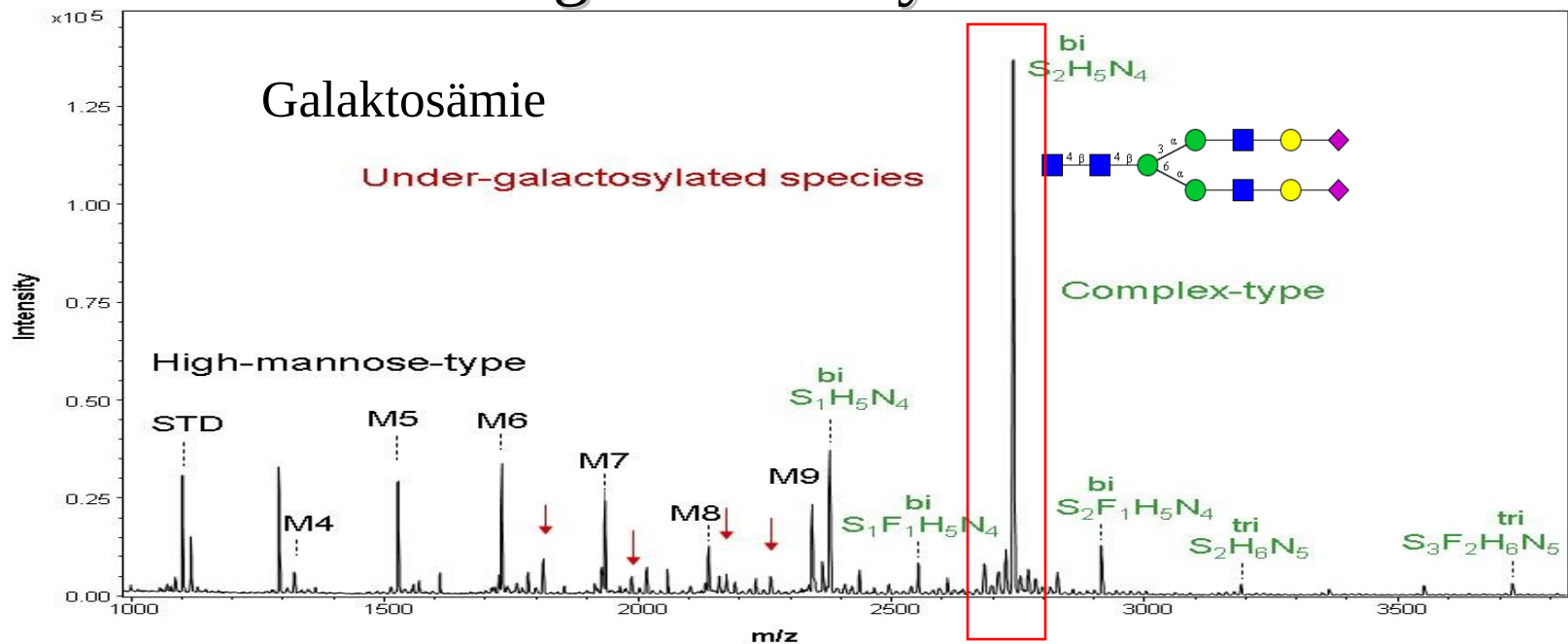
□ GlcNAc

● Man

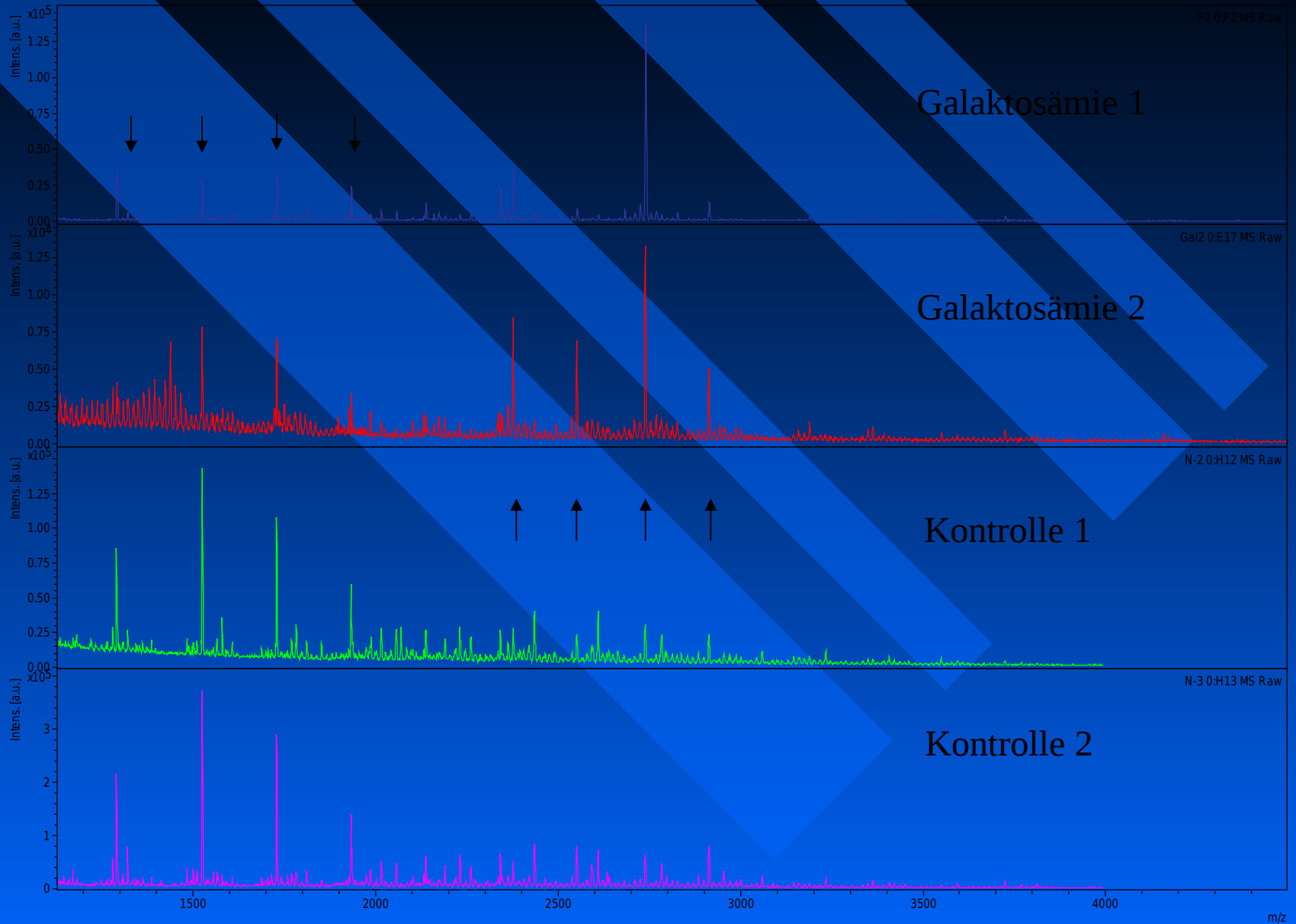
● Gal

◆ NeuAc

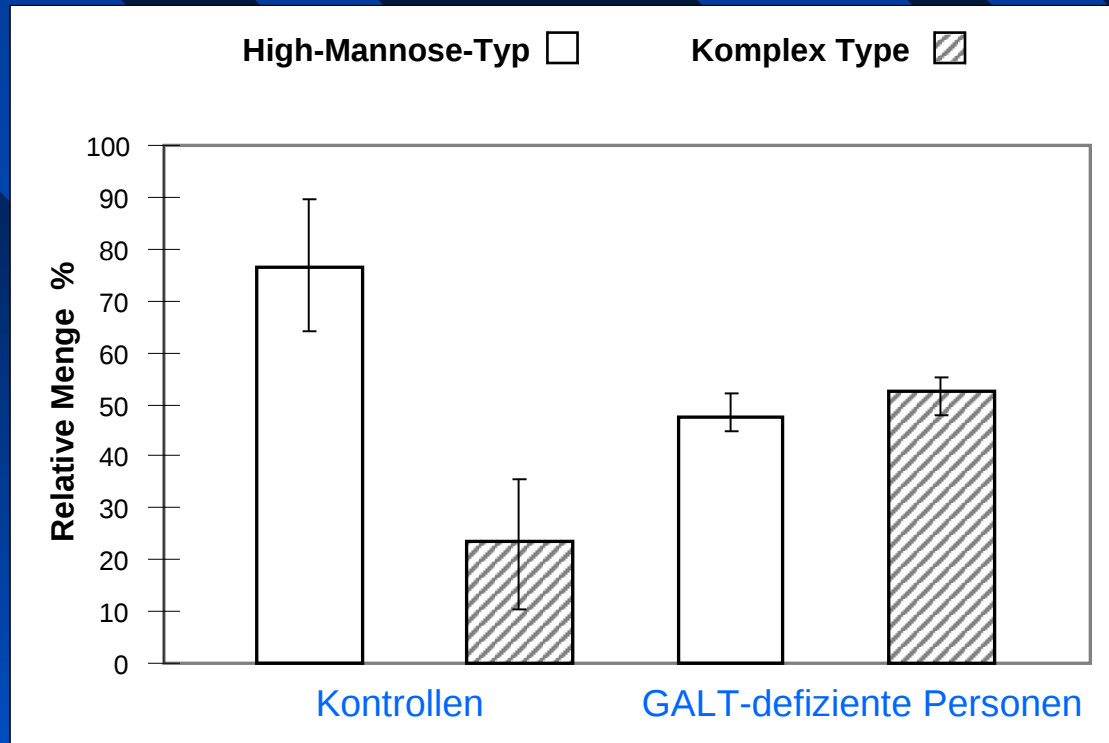
Vergleich N-Glycan Profile



Differential N-glycosylation of urinary exosomes



Verhältnis High-Mannose / Komplex Typ



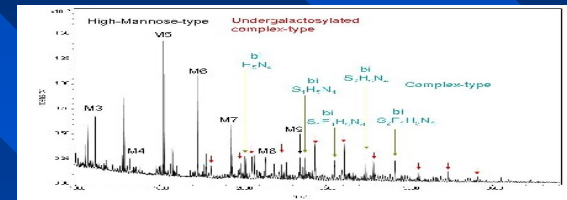
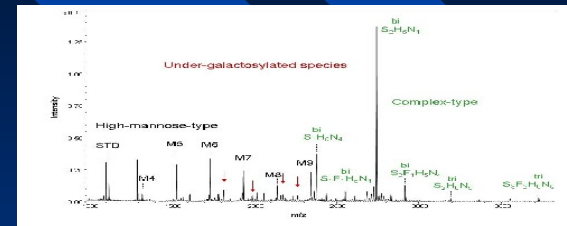
Wilcoxon-Rangsummen-Test

p-value = 0.001850 → sehr signifikant →**

Menge der analysierten Proben

12 Galaktosämie

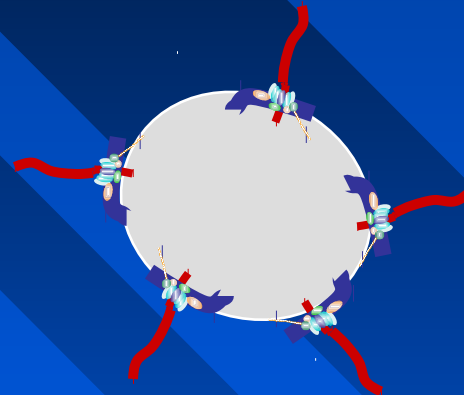
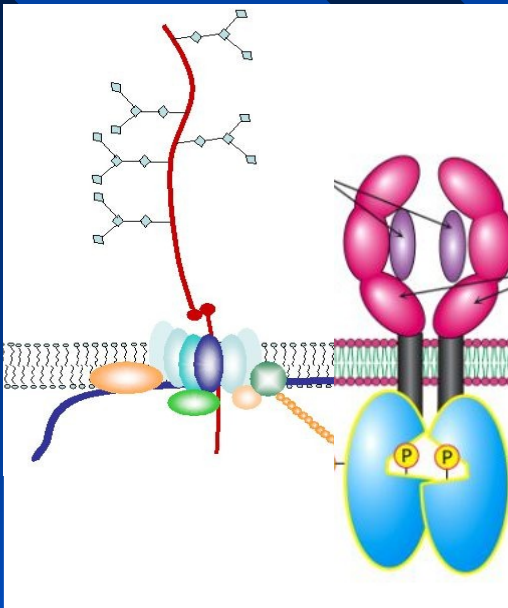
5 Kontrollen



Wo sind die restlichen Proben?

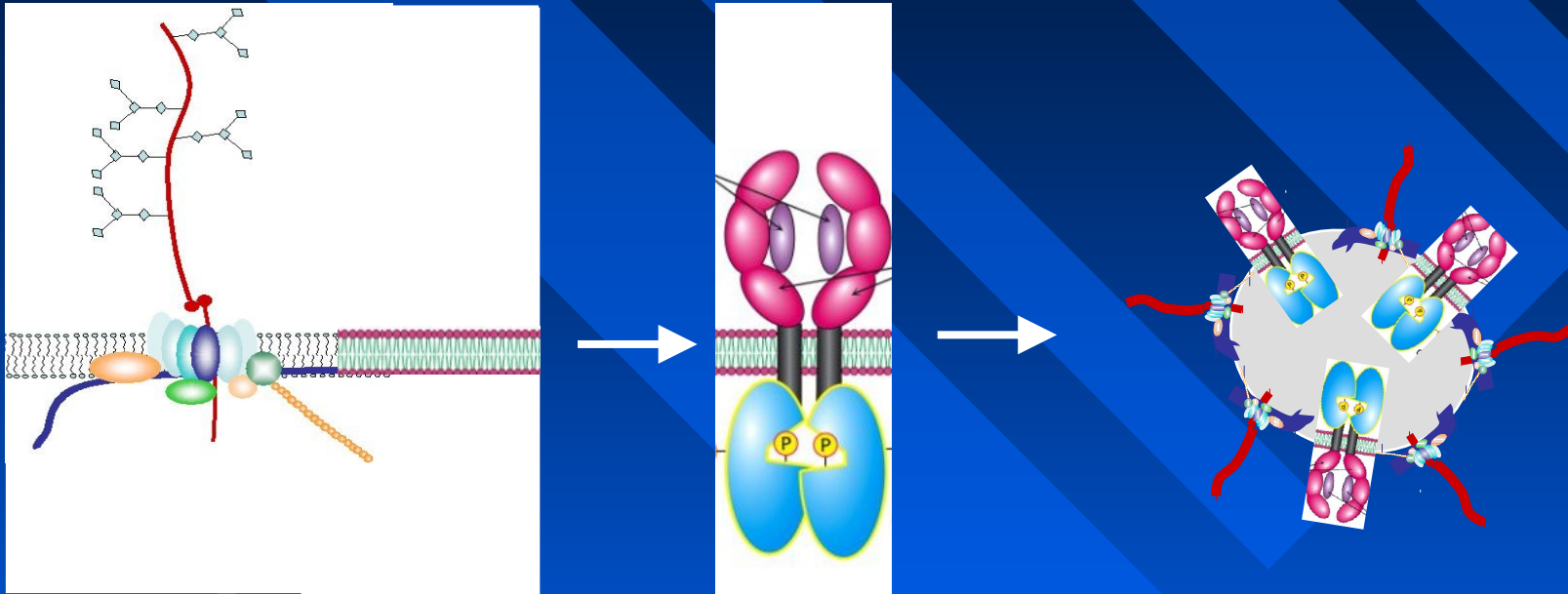
Coomassiegele, Proteinbestimmungen, Evaluierung der idealen Menge zum Einsetzen für N-Glycan-Analytik, O-Glykananalytik, Westernblots, Test Gesamtexosomen oder Rafts aus Exosomen, Tamm-Horsfall-Protein Untersuchung/Entfernung, Elektronenmikroskopie, Analyse Glykolipide und vieles mehr → kein Rest

EGF-Rezeptor Kontrollperson



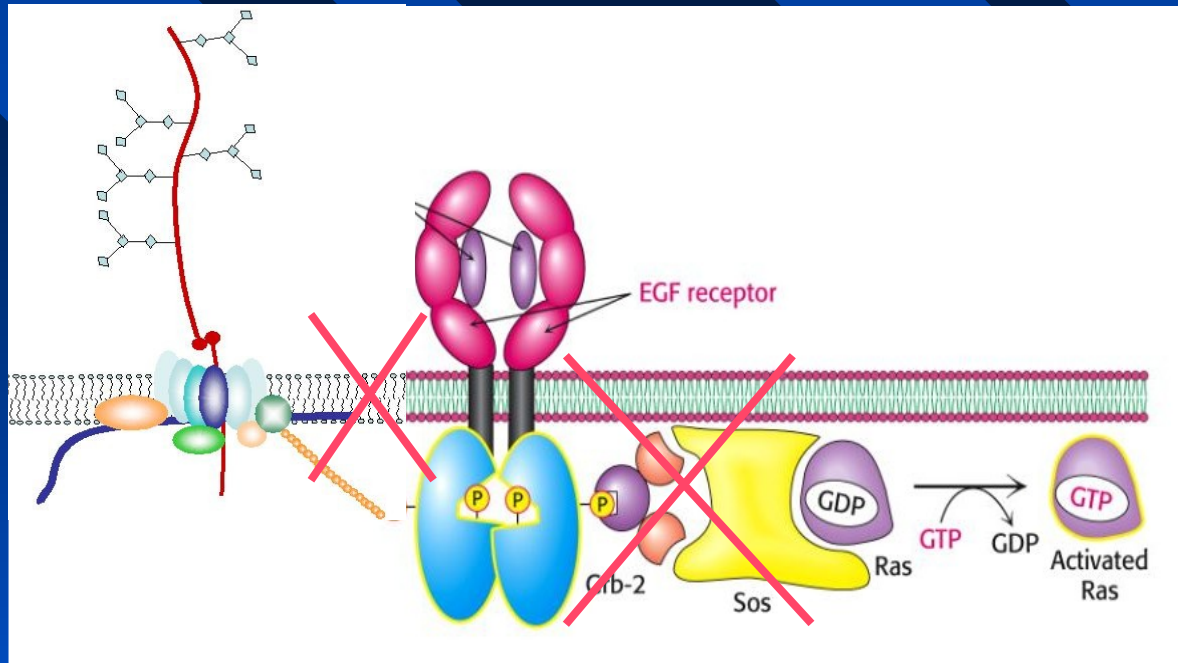
EGF-Rezeptor verbleibt im Lipid raft auf der Zelloberfläche und wird nicht in die Exosomen transportiert

EGFR Galaktosämie Patient



Der EGF-Rezeptor wird aus den Lipid rafts in die Exosomen transportiert

Ohne EGF-Rezeptor



Die Struktur der Lipid rafts wird beeinträchtigt und die Signalweiterleitung des Rezeptors wird gestört

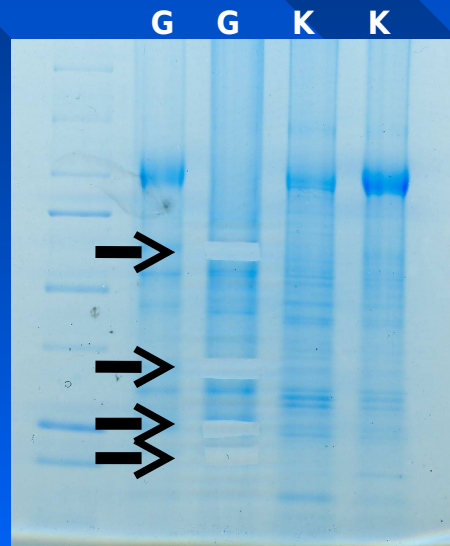
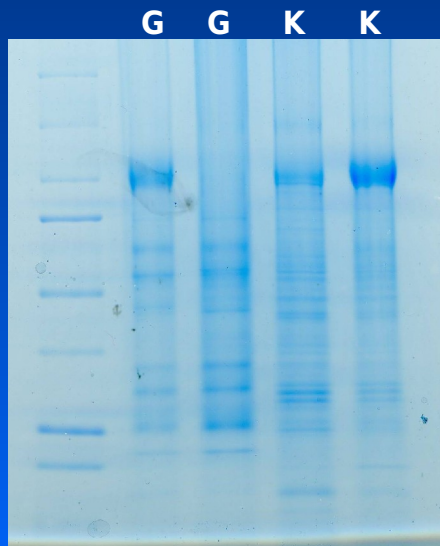
Ausblick

Identifizierung unterschiedlicher Glykosylierung von Gangliosiden auf Exosomen, im Vergleich Kontrollpersonen mit Galaktosämiepatienten

Schlussfolgerungen aus der Relevanz der Disglykosylierung für die Zelle ziehen:

- Gestörte Signalweiterleitung,
- Fehltransport von Rezeptoren (EGFR),
- gestörter Aufbau von Lipid rafts,
- gesteigerte Endozytose und exosomaler Export

Proteom Studie, Methode iTRAQ (4 parallele Proben: Exosomen, 2 gesunde Personen verglichen mit 2 Galaktosämiepatienten)



G = Galaktosämiepatient

K = Kontrollperson

Ziel der Forschung

- Die Disglykosylierung in Bezug zur veränderten Proteinsortierung setzen
- Schlussfolgerungen für die Signalweiterleitung in der Zelle ziehen
- Aspekte der Langzeitschädigung von Organen bei chronischer Galaktosämie aufklären

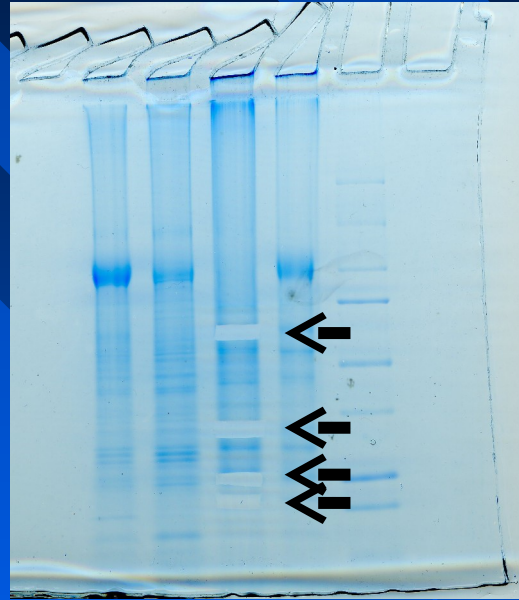
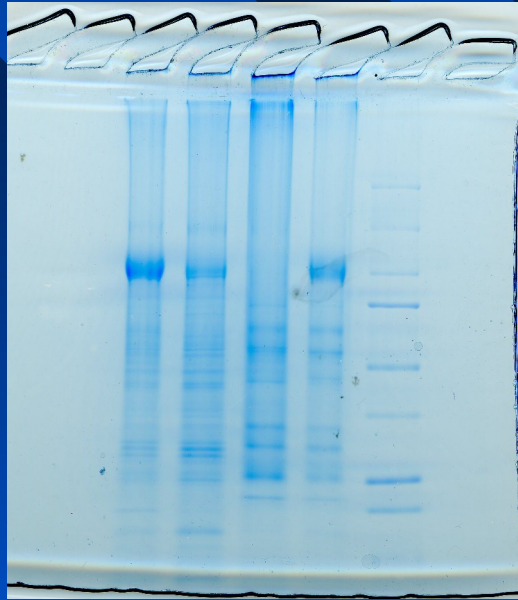
Freiwillige Probenspende (Morgenurin)

- jeder kann teilnehmen, das Geschlecht oder Alter spielen keine Rolle
 - Die Aktion ist freiwillig, bei nicht Teilnahme entstehen keinerlei Nachteile
 - Sie können einen wertvollen Beitrag zur Forschung liefern
- Durchführung:
- Sie unterschreiben die Einverständnisklärung mit einer Nummer (1-24)
- Sie nehmen sich das entsprechende verschließbare Gefäß mit der zugehörigen Nummer.
 - Nach dem Aufstehen am Sonntagmorgen oder während der Nacht befüllen Sie dieses mit Urin (große Mengen sind erwünscht)
 - Sonntagmorgen stellen Sie bitte die Probe vor dem Frühstück oben auf den Tisch

Danke für Ihre Aufmerksamkeit

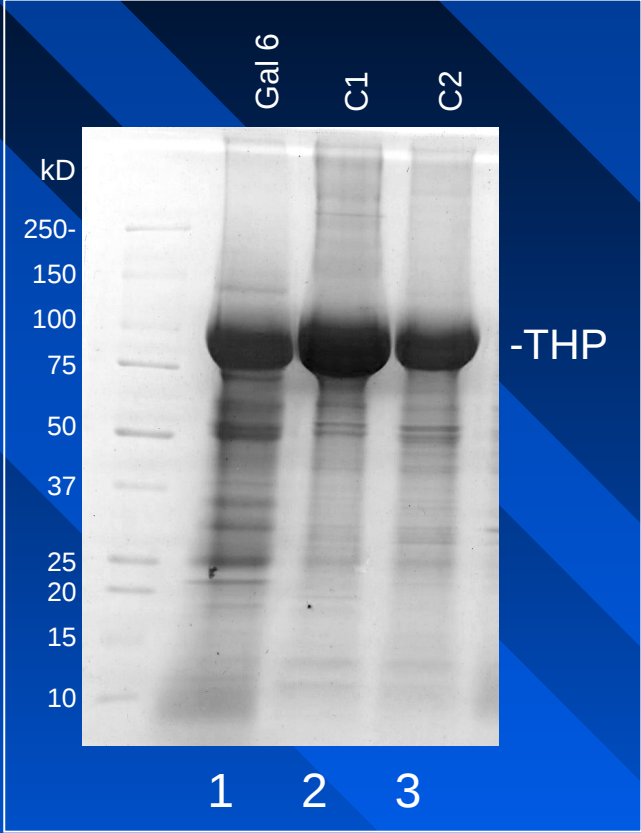


Spinnen sind toll!

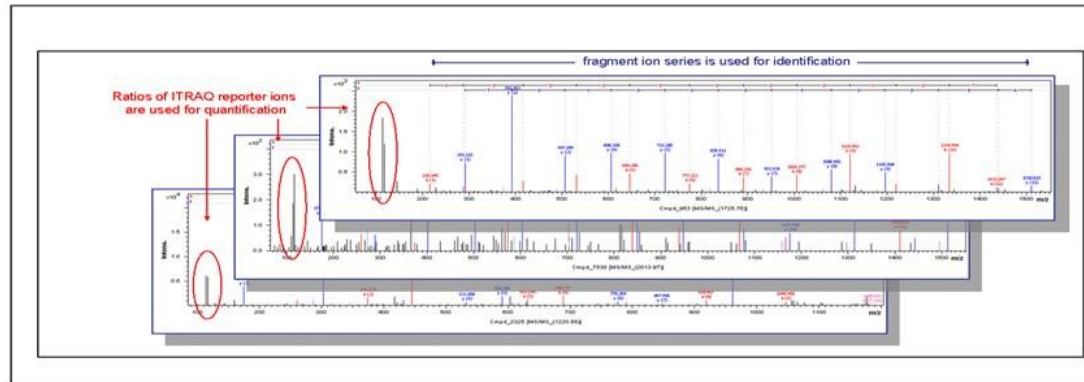
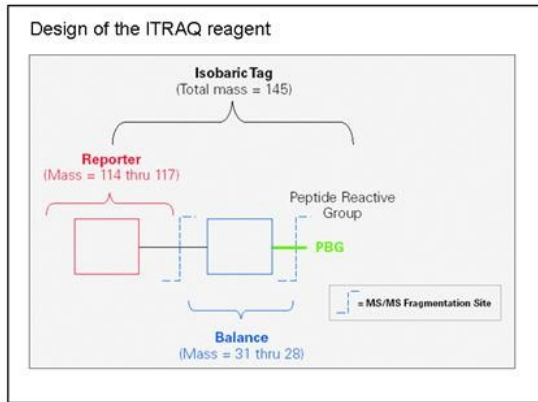
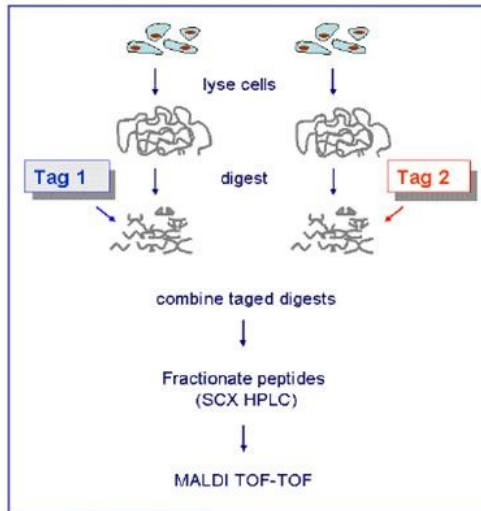


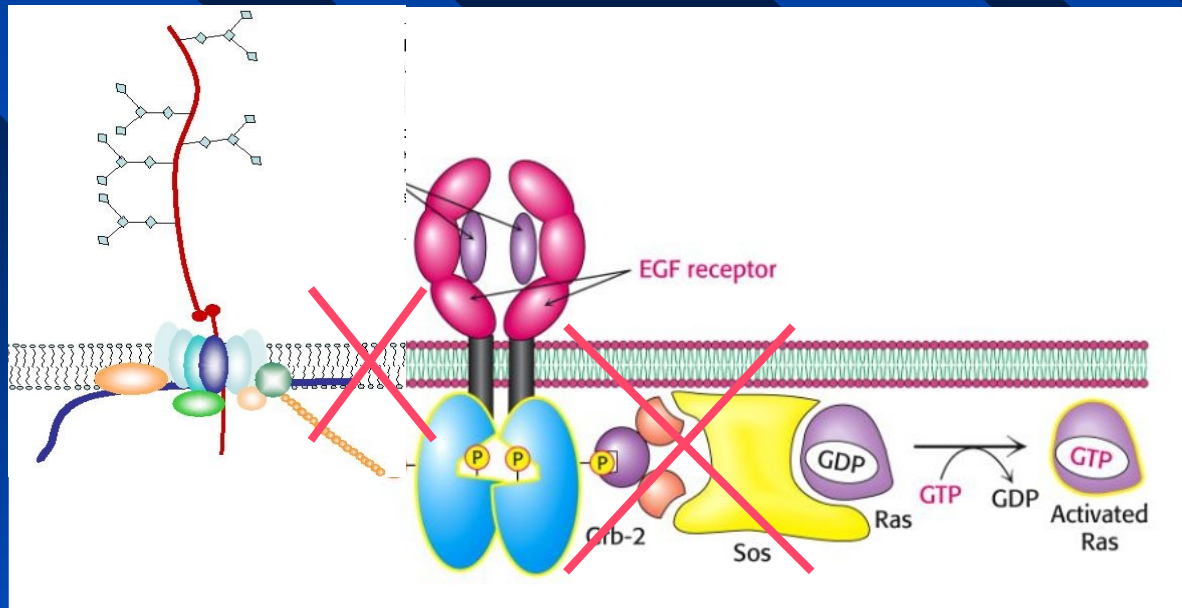




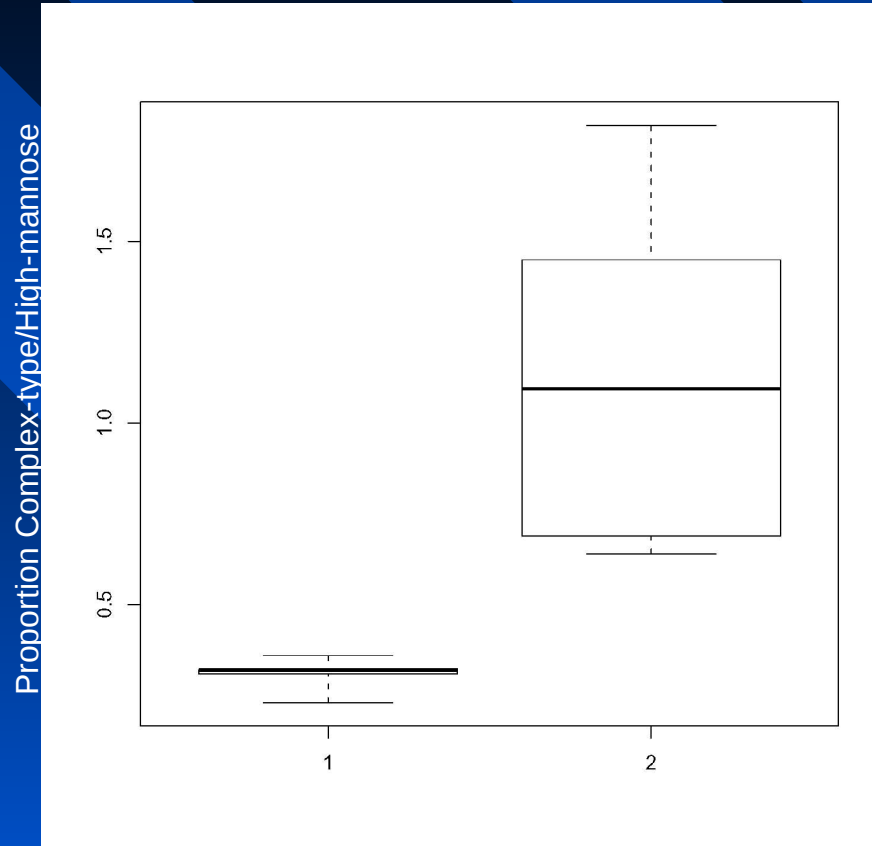


The iTRAQ-Strategy





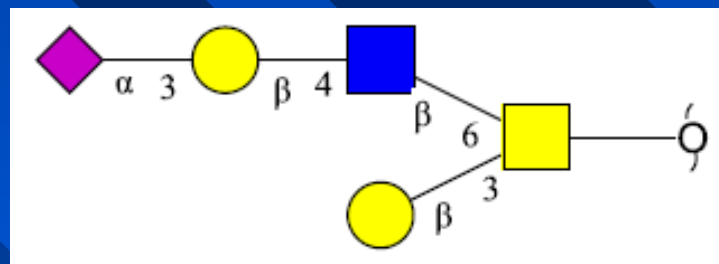
Boxplot Wilcoxon rank sum test with continuity correction
 $W = 60$, $p\text{-value} = 0.001850$

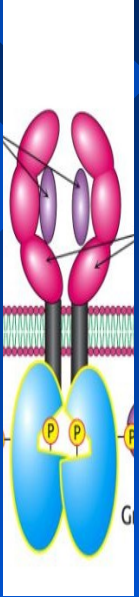


Proportion Complex-type/High-mannose:

1 healthy control

2 galactosemic patient



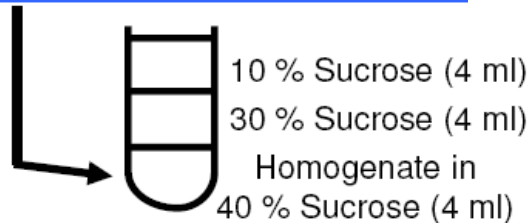


I. Sucrose gradient centrifugation



Figure 1

Homogenisation of fibroblasts and incubation for 1h with cold Triton X-100 → Homogenate dispersed in 45% Sucrose (PBS) and placed in the bottom of an discontinuous sucrose gradient



1,5 ml fractions, CHCl₃/MeOH precipitation SDS-Page; WB Flott-2

D

