

# **Congenital Disorder of Glycosylation (CDG)-IIc:**

Eine retrovirale Expressionsklonierung identifiziert das  
CDG-IIc Syndrom (Leukozyten Adhäsionsdefekt II)  
als eine  
GDP-Fukose Transporter Defizienz

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Torben Lübke**  
aus Northeim

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. K. von Figura

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2001

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>N-Glycosylierung</b>                         | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Bedeutung der N-Glykosylierung                  | 1         |
| 1.1.2      | Ablauf der N-Glykosylierung                     | 1         |
| <b>1.2</b> | <b>Defekte der Glykoprotein-Biosynthese</b>     | <b>5</b>  |
| 1.2.1      | CDG-Ia  | 6         |
| 1.2.2      | CDG-Ib  | 8         |
| 1.2.3      | CDG-Ic  | 9         |
| 1.2.4      | CDG-Id  | 10        |
| 1.2.5      | CDG-Ie  | 11        |
| 1.2.6      | CDG-IIa   | 11        |
| 1.2.7      | CDG-IIb   | 12        |
| <b>1.3</b> | <b>LAD II/ CDG-IIc</b>                          | <b>12</b> |
| 1.3.1      | Klinik und klinische Chemie von LAD II/ CDG-IIc | 12        |
| 1.3.2      | Biochemie von LAD II/ CDG-IIc                   | 14        |
| 1.3.2.1    | GDP-Fukose Synthese                             | 16        |
| 1.3.2.2    | Korrektur der Hypofukosylierung                 | 17        |
| <b>2</b>   | <b>Problemstellung</b>                          | <b>18</b> |
| <b>3</b>   | <b>Material und Methoden</b>                    | <b>19</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material</b>                                 | <b>19</b> |
| 3.1.1      | Geräte  | 19        |
| 3.1.2      | Verbrauchsmaterialien                           | 21        |
| 3.1.3      | Chemikalien                                     | 22        |
| 3.1.4      | Detergenzien                                    | 24        |
| 3.1.5      | Enzyme, Standards und Antibiotika               | 24        |
| 3.1.6      | Kits zur Bearbeitung von DNA                    | 25        |
| 3.1.7      | Sekundärantikörper/ Tertiärantikörper           | 25        |
| 3.1.8      | Lektine und Streptavidin-AP-Konjugat            | 25        |
| 3.1.9      | Radioaktive Substanzen                          | 26        |
| 3.1.10     | Vektoren  | 26        |
| 3.1.11     | Bakterienstämme                                 | 26        |
| 3.1.12     | Zelllinien                                      | 27        |
| 3.1.13     | Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen      | 27        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.1.14     | Medien zur Anzucht von prokaryontischen Zellen  | 29        |
| 3.1.15     | Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen   | 29        |
| 3.1.16     | EDV   | 30        |
| <b>3.2</b> | <b>Molekularbiologische Methoden</b>  | <b>31</b> |
| 3.2.1      | Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA  | 31        |
| 3.2.1.1    | DNA-Präzipitation mit Ethanol   | 31        |
| 3.2.1.2    | Extraktion von DNA mit Phenol, Chloroform oder Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol                           | 31        |
| 3.2.1.3    | Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA  | 31        |
| 3.2.1.4    | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen  | 32        |
| 3.2.1.5    | Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA  | 33        |
| 3.2.1.5.1  | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien   | 33        |
| 3.2.1.5.2  | Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung              | 33        |
| 3.2.2      | Isolierung von DNA  | 34        |
| 3.2.2.1    | Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)   | 34        |
| 3.2.2.2    | Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)   | 34        |
| 3.2.2.3    | Isolierung genomischer DNA  | 35        |
| 3.2.2.4    | Auftrennung von DNA in Agarosegelen   | 36        |
| 3.2.2.5    | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Qiagen)   | 37        |
| 3.2.2.6    | Ligation  | 37        |
| 3.2.2.7    | DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion   | 38        |
| 3.2.2.8    | Herstellung einer cDNA über die Reverse Transkription und anschließender Amplifikation mittels PCR (RT-PCR) | 38        |
| 3.2.2.8.1  | Reverse Transkription   | 39        |
| 3.2.2.8.2  | PCR mittels der Hot-StarTaq-Polymerase (Qiagen)   | 39        |
| 3.2.2.9    | <i>in-vitro</i> Mutagenese  | 40        |
| 3.2.3      | Isolierung von RNA  | 41        |
| 3.2.4      | Northern Blot   | 41        |
| 3.2.5      | Markierung einer DNA-Sonde mit $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP  | 43        |
| 3.2.6      | Sequenzierung von DNA   | 44        |
| <b>3.3</b> | <b>Zellbiologische Methoden</b>   | <b>44</b> |
| 3.3.1      | Kultivierung von eukaryontischen Zellen   | 44        |
| 3.3.1.1    | Trypsinieren von Zellen   | 45        |
| 3.3.1.2    | Kryokonservierung von Zellen  | 45        |
| 3.3.1.3    | Auftauen und Revitalisieren von Zellen  | 46        |
| 3.3.2      | Transfektion mit dem FuGENE™6 Transfektionsreagenz  | 46        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.3.3      | Histochemische Methoden  | 46        |
| 3.3.3.1    | Gelatinisieren von Deckgläschen und Zellkulturgefäßen  | 46        |
| 3.3.3.2    | Histochemische Anfärbung von primären, humanen Fibroblasten mit dem Fukose-spezifischen <i>Aleuria aurantia</i> Lektin   | 47        |
| 3.3.3.3    | Histochemische Färbung von primären, humanen Fibroblasten nach einer Infektion mit dem EGFP-Reportergen im pLIB-Vektor   | 48        |
| <b>3.4</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden</b>  | <b>49</b> |
| 3.4.1      | Proteinbestimmung nach Lowry   | 49        |
| 3.4.2      | Ernten und Aufschluß von primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten   | 50        |
| 3.4.3      | Präparation Golgi-angereicherter Fraktionen aus primären, humanen Fibroblasten und immortalisierten Lymphoblasten  | 50        |
| 3.4.4      | Bestimmung der GDP-[ <sup>14</sup> C]Fukose und UDP-[ <sup>3</sup> H]Galaktose Import Aktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln von primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten | 51        |
| 3.4.5      | Bestimmung der GDPase Aktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln der primären, humanen Fibroblasten und Lymphoblasten  | 52        |
| 3.4.6      | Bestimmung der Galaktosyl-Transferase Aktivität in Zellhomogenaten, Post-nukleären Überständen (PNS) und Golgi-angereicherten Vesikeln   | 53        |
| <b>3.5</b> | <b>Methoden zur Arbeit mit Retroviren</b>  | <b>55</b> |
| 3.5.1      | Taxonomie der Retroviren   | 55        |
| 3.5.2      | Struktur der Retroviren  | 55        |
| 3.5.3      | Infektionsweg von Retroviren   | 57        |
| 3.5.4      | Vorstellung des retroviralen Gentransfersystems  | 58        |
| 3.5.5      | Vorstellung der retroviralen Leber-cDNA Bank im pLIB-Vektor  | 62        |
| 3.5.6      | Retroviraler Vektor pLNCX2 zur Herstellung stabil exprimierender Zelllinien nach einer Infektion und Selektion   | 62        |
| 3.5.7      | Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten   | 63        |
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse</b>  | <b>65</b> |
| <b>4.1</b> | <b>GDPase Aktivität in LAD II/ CDG-IIc Fibroblasten des Patienten A.C.</b>   | <b>65</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Zuckernukleotid Transport in LAD II/ CDG-IIc-Fibroblasten des Patienten A.C.</b>  | <b>66</b> |
| 4.2.1      | Verminderter Import von GDP-Fukose in Fibroblasten (A.C.)  | 66        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.2.2      | Import von UDP-Galaktose in Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.)   | 69        |
| 4.2.3      | Dosiswirkung von GDP-Fukose auf den Import in Golgiangereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten                                       | 70        |
| 4.2.4      | Zeit-abhängige Aufnahme von GDP-Fukose in Golgiangereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten   | 71        |
| <b>4.3</b> | <b>Zuckernukleotid Transport in Fibroblasten der Eltern des Patienten A.C.</b>   | <b>72</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Zuckernukleotid Transport in EBV-transformierte Lymphoblasten von LAD II/ CDG-IIc Patienten und Kontrollen</b>                                      | <b>73</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Expressionsklonierungs-Strategie zur Isolierung des für den LAD II/ CDG-IIc Defekt verantwortlichen Gens</b>  | <b>75</b> |
| 4.5.1      | Lektin-vermittelte Differenzierung zwischen LAD II/ CDG-IIc Patienten- und Kontrollfibroblasten (Lektin-Färbung)                                       | 75        |
| 4.5.2      | Retroviraler Gentransfer zur Expressionsklonierung einer humanen cDNA-Bank in Fibroblasten von Patient A.C.  | 77        |
| <b>4.6</b> | <b>Expression der humanen Leber cDNA-Bank nach retroviralem Gentransfer in Patientenzellen (A.C.)</b>  | <b>79</b> |
| 4.6.1      | Strategie zur retroviralen Komplementationsklonierung  | 79        |
| 4.6.2      | Retrovirale Komplementationsklonierung:<br>Runde A (~ 2500 Klone/ Pool)  | 81        |
| 4.6.3      | Retrovirale Komplementationsklonierung:<br>Runde B (~ 200 Klone/ Pool)   | 82        |
| 4.6.4      | Retrovirale Komplementationsklonierung:<br>Runde C (20 Klone/ Pool)  | 83        |
| 4.6.5      | Retrovirale Komplementationsklonierung Runde D:<br>Analyse der verbleibenden 20 Einzelklone des Pools C23  | 84        |
| <b>4.7</b> | <b>Analyse der D5-cDNA</b>   | <b>87</b> |
| 4.7.1      | Analyse der DNA-Sequenz des Klons D5   | 87        |
| 4.7.2      | Analyse der 5'-UTR von D5 und NM_018389 auf genomischer und transkriptioneller Ebene   | 89        |
| 4.7.3      | Analyse der aus D5 abgeleiteten Aminosäure-Sequenz   | 91        |
| 4.7.4      | Orthologe und Homologe der D5-Sequenz  | 94        |
| 4.7.5      | Korrektur des GDP-Fukose Imports in A.C.-Fibroblasten  | 95        |
| 4.7.5.1    | Klonierung der D5-cDNA in den selektierbaren, retroviralen Expressionsvektor pLNCX2  | 96        |
| 4.7.5.2    | Infektion von A.C.-Patientenfibroblasten mit pLNCX2-D5' retroviralen Partikeln und D5'-Expression zur partiellen Rekonstitution des GDP-Fukose Imports | 97        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 4.7.5.3     | Infektion von primären Fibroblasten des Patienten A.C. mit pLNCX2-D5' retroviralen Partikeln zur Herstellung stabil exprimierender Zellen | 101        |
| 4.7.5.4     | Histochemische Analyse stabil D5'-exprimierender Fibroblasten des Patienten A.C. durch <i>Aleuria</i> -Lektin Markierung                  | 101        |
| 4.7.7.5     | GDP-Fukose Import Aktivität stabil D5'-exprimierender Patientenfibroblasten   | 102        |
| <b>4.8</b>  | <b>Analyse der D5-spezifischen RNA-Transkription</b>  | <b>104</b> |
| 4.8.1       | Analyse der D5-RNA in Fibroblasten des Patienten A.C., in Kontrollfibroblasten und in Lymphoblasten des Patienten M.                      | 104        |
| 4.8.2       | Analyse der D5-Transkripte in verschiedenen humanen Geweben   | 105        |
| <b>4.9</b>  | <b>Mutationsanalyse des GDP-Fukose Transporters (D5) des CDG-IIc Patienten A.C. und der Eltern</b>  | <b>106</b> |
| 4.9.1       | Analyse der GDP-Fukose Transporter Transkripte mittels „nested“ RT-PCR  | 106        |
| 4.9.2       | Genomische Analyse der GDP-Fukose Transporter Allele bei dem Patienten A.C., den Eltern sowie diversen Kontrollen                         | 107        |
| 4.9.3       | Expression des pLNCX2-D5' Konstrukts nach C>T Mutagenese in Fibroblasten des Patienten A.C.   | 110        |
| 4.9.4       | Charakterisierung des R147C Aminosäureaustauschs in der D5-Sequenz im Vergleich zum Wildtyp und den Orthologen                            | 111        |
| <b>4.10</b> | <b>Mutationsanalyse des GDP-Fukose Transporters (D5) der Patienten M. und Y.W.</b>  | <b>112</b> |
| 4.10.1      | Analyse der GDP-Fukose Transporter Transkripte mittels „nested“ RT-PCR des Patienten M. und des Patienten Y.W.                            | 112        |
| 4.10.2      | Genomische Analyse der GDP-Fukose Transporter Allele bei den Patienten M. und Y.W. sowie diversen Kontrollen                              | 113        |
| <b>5</b>    | <b>Diskussion</b>   | <b>116</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Die Hypofukosylierung von Glykanen bei CDG-IIc Patienten basiert auf einer GDP-Fukose Transport Defizienz</b>                          | <b>116</b> |
| <b>5.2</b>  | <b>Retrovirale Expressionsklonierung einer humanen cDNA-Bank in den GDP-Fukose Import-defizienten Patientenfibroblasten</b>               | <b>119</b> |
| <b>5.3</b>  | <b>Die phänotypisch komplementierende D5-cDNA kodiert den humanen GDP-Fukose Transporter</b>  | <b>123</b> |



|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>5.4</b> | <b>Die Expression des GDP-Fukose Transporters (D5) in hypofukosylierten CDG-IIc Patientenfibroblasten führt zur Rekonstitution des GDP-Fukose Imports</b> | <b>125</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Parallele Identifizierung des GDP-Fukose Transporters aus <i>C.elegans</i> durch Expressionsklonierung (Lühn et al., 2001)</b>                         | <b>127</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Ausblick</b>   | <b>128</b> |
| <b>6</b>   | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>130</b> |
| <b>7</b>   | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>131</b> |
| <b>8</b>   | <b>Anhang</b>   | <b>140</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Partielle Nukleotidsequenz der humanen D5-cDNA (GDP-Fukose Transporter, ohne 3'-Ende der cDNA)</b>   | <b>141</b> |
| <b>8.2</b> | <b>Aus der humanen D5-cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz (GDP-Fukose Transporter)</b>   | <b>142</b> |
| <b>8.3</b> | <b>Sequenzen der verwendeten Primer (5' → 3')</b>   | <b>142</b> |

## Verzeichnis der Abkürzungen

|                    |   |
|--------------------|---|
| Abb.               | Abbildung   |
| Acc.No.            | Accession Number                                  |
| Amp                | Ampicillin  |
| AP                 | Alkalische Phosphatase                            |
| ATP                | Adenosintriphospat                                |
| bp                 | Basenpaare  |
| BSA                | Rinderserumalbumin                                |
| bzw.               | beziehungsweise                                   |
| <sup>14</sup> C    | Kohlenstoff 14                                    |
| °C                 | Grad Celsius                                      |
| CDG                | Congenital Disorders of Glycosylation             |
| cDNA               | komplementäre DNA                                 |
| Ci                 | Curie ( $2,22 \times 10^6$ counts pro minute)     |
| cfu                | colonie forming units                             |
| cpm                | counts per minute                                 |
| CTP                | Cytidintriphospat                                 |
| Da                 | Dalton  |
| ddH <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes Wasser                      |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                  |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                            |
| dNTPs              | Desoxyribonukleotide                              |
| EGFP               | Enhanced Grün-fluoreszierendes Protein            |
| Fuk                | Fukose  |
| Gal                | Galaktose   |
| GDP                | Guanosindiphospat                                 |
| GlcNAc             | N-Acetylglukosamin                                |
| GMP                | Guanosinmonophospat                               |
| <sup>3</sup> H     | Tritium   |
| <i>E.coli</i>      | Escherichia coli                                  |
| ER                 | Endoplasmatisches Retikulum                       |
| et al.             | et alii (lat. und andere)                         |
| FKS                | fötales Kälberserum                               |
| G418               | Geneticin <sup>®</sup> 418                        |
| h                  | Stunde(n)   |
| HEPES              | N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure |
| IgG                | Immunglobulin der Subklasse G                     |
| IPTG               | Isopropylthio-β-D-Galaktopyranosid                |
| kb                 | Kilobasenpaare                                    |
| kDa                | Kilo Dalton                                       |
| LB                 | Luria Broth                                       |
| m                  | milli   |
| M                  | Molar   |
| Man                | Mannose   |
| mA                 | Milli Ampere                                      |
| MCS                | Multi Cloning Site                                |
| min                | Minute(n)   |
| MOPS               | Morpholinopropansulfonsäure                       |

|                 |   |
|-----------------|---|
| μ               | mikro   |
| n               | nano  |
| NANA            | Sialinsäure   |
| neo             | Neomycin  |
| OD              | Optische Dichte   |
| <sup>32</sup> P | Phosphor 32   |
| p               | pico  |
| P               | Phosphat  |
| p.a.            | pro analysis (zur Analyse)                                  |
| PBS             | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung                          |
| PCR             | Polymerase Ketten Reaktion                                  |
| Pen/ Strep      | Penicillin/ Streptomycin                                    |
| pH              | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PNS             | post-nukleärer Überstand                                    |
| RT              | Raumtemperatur  |
| RNA             | Ribonukleinsäure  |
| rpm             | Umdrehungen pro Minute                                      |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat  |
| SSC             | Standard Saline Citrate                                     |
| <i>Taq</i>      | <i>Thermophilus aquaticus</i>                               |
| TBS             | Tris-gepufferte Kochsalzlösung                              |
| TCA             | Trichloressigsäure  |
| Tab.            | Tabelle   |
| TE              | Tris-EDTA   |
| tk              | Thymidin-Kinase   |
| Tris            | Tris(hydroxymethyl)-aminoacetat                             |
| U               | Unit  |
| ü.N.            | über Nacht  |
| UDP             | Uridindiphosphat  |
| UTR             | untranslated region (nicht-kodierender Bereich)             |
| UV              | ultraviolett  |
| UZ              | Ultrazentrifuge   |
| V               | Volt  |
| Vol.            | Volumen   |
| v/ v            | Volumenverhältnis   |
| WT              | Wildtyp   |
| w/ v            | Gewicht zu Volumen  |
| ×g              | ×-fache Erdbeschleunigung                                   |
| z.B.            | zum Beispiel  |

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder Ein-Buchstabencode angegeben.

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

# 1 Einleitung

## 1.1 N-Glykosylierung

### 1.1.1 Bedeutung der N-Glykosylierung

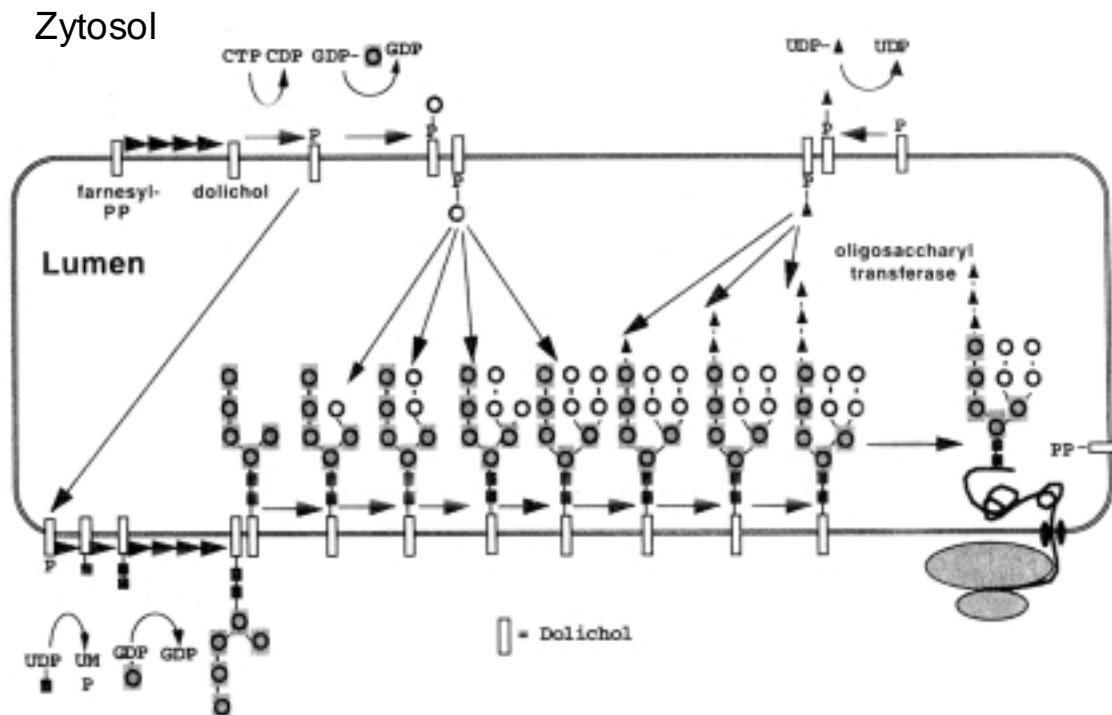
Bei der N-Glykosylierung handelt es sich um die häufigste Modifikation sezernierter und Membran-gebundener Proteine in eukaryontischen Zellen. Die Aufklärung der N-Glykan Biosynthese begann in den Sechziger und Siebziger Jahren; die essentielle Bedeutung, die heute dieser Modifikation zugesprochen wird, wurde jedoch erst in den letzten zwei Jahrzehnten erkannt. So weiß man heute, dass die kovalente Anheftung von Kohlenhydratseitenketten an Proteine bei einer großen Zahl biochemischer und zellbiologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielt. Die Kohlenhydratseitenketten gewährleisten die biologische Aktivität von Proteinen, indem sie die korrekte Faltung, die Löslichkeit und Proteaseresistenz sicherstellen. Außerdem sind sie für den rezeptorvermittelten Transport von Proteinen sowohl innerhalb der Zelle (intrazellulär) als auch zu spezifischen Zielzellen (interzellulär) mitverantwortlich (Varki et al., 1993). Als Beispiele für die Bedeutung von Kohlenhydratseitenketten bei interzellulären Prozessen sollen hier die Fertilisation (Gabijs et al., 1987), die Embryogenese (Lennarz et al., 1993) und die neuronale Zelladhäsion angeführt werden. Biomedizinische Relevanz erlangte die N-Glykosylierung in den letzten Jahren auch dadurch in erhöhtem Maße, dass einige angeborene Erkrankungen beim Menschen charakterisiert werden konnten, bei denen die genetischen Defekte zu Veränderungen in der Bildung der N-Glykane (siehe 1.2.) führen und durch die Beobachtung, dass sich die Glykan-Expression auf Krebszellen während des Vorgangs der Transformation verändert (Fukuda et al., 1996).

### 1.1.2 Ablauf der N-Glykosylierung

Die Biosynthese N-verknüpfter Kohlenhydratseitenketten ist ein komplexer Vorgang, der mit der Bereitstellung von Nukleotid-aktivierten Zuckern beginnt. Mit Ausnahme der CMP-Sialinsäure (Münster et al., 1998), die im Zellkern synthetisiert wird, werden alle anderen Nukleotid-aktivierten Zucker im Zytoplasma gebildet und sind in ihren

Synthesewegen stark miteinander verknüpft (Kean et al., 1991). Da ein großer Teil der N-Glykan Synthese im Lumen des ER und des Golgi stattfindet, befinden sich die aktivierten Zuckernukleotide für diese Reaktion topologisch im falschen Bereich der Zelle. Aufgrund ihrer negativen Ladung können die Zuckernukleotide nicht mittels einfacher Diffusion die Membranen des ER und Golgi durchdringen. Eukaryontische Zellen haben aus diesem Grund eine Reihe von Transportern entwickelt, die für den Energie-freien Import der Zuckernukleotide im Austausch mit dem entsprechenden Nucleosidmonophosphat, dem Antiporterprinzip folgend, in das entsprechende Kompartiment sorgen (siehe unten, Hirschberg et al., 1998). Im Fall der UDP-Glukose stellt das Zuckernukleotid nicht den unmittelbaren Monosaccharid Donor bei der N-Glykan Synthese im ER dar. Vielmehr wird die Glucose in einer Glucosyltransferase-katalysierten Reaktion im Zytoplasma auf ein membranständiges Dolichol-Phosphat (Dol-P) übertragen, flippt an diesem Lipidanker hängend in das Lumen des ER, ehe es durch eine Glucosyltransferase auf einen Akzeptor übertragen werden kann. Mannose, die im Lumen des ER an ein N-verknüpftes Oligosaccharid übertragen wird, wird analog der Glucose im Zytoplasma von GDP-Mannose auf Dolichol-Phosphat übertragen, flippt in dieser Verknüpfung in das Lumen des ER und wird dort als Substrat von Mannosyltransferasen erkannt.

Die Biosynthese der Oligosaccharide erfolgt durch eine Sequenz von Glycosyltransferase Reaktionen, die z.T. auf zytosolischer und z.T. auf der luminalen Seite der ER-Membran ablaufen. Die ersten sieben Glykosyltransferase Reaktionen finden an der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran statt. Dabei dient Dol-P als Akzeptor, UDP-GlcNAc sowie GDP-Man als Monosaccharid Donor. Im ersten Syntheseschritt wird durch die GlcNAc-1-phosphotransferase ein GlcNAc-P-Rest auf den Lipid-Anker übertragen, so dass ein GlcNAc-Pyrophosphoryl-dolichol (GlcNAc-P-P-Dol) entsteht. Dieses erste Intermediat wird dann von einer GlcNAc-Transferase um einen GlcNAc-Rest verlängert (GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol). Anschließend werden ausgehend von GDP-Man sequentiell fünf Man-Reste auf das GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol-Gerüst übertragen, wobei eine biantennärer Man<sub>5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol Komplex entsteht. Jede dieser Elongationsreaktionen wird von einer eigenen Transferase katalysiert. Ein bislang nicht bekannter Mechanismus sorgt anschließend dafür, dass der Man<sub>5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol-Vorläufer von der zytosomatischen Seite auf die luminalen Seite der ER-Membran transferiert wird. Im Anschluß an diese „Flip“-



**Abb. 1:** Biosynthese der Lipid-verknüpften Oligosaccharide und deren Transfer auf Proteine im ER durch die Oligosaccharyltransferase: ® = N-Acetylglukosamin; ● = Mannose; ▲ = Glukose

Reaktion werden vier weitere Mannose-Reste, diesmal ausgehend von Dol-P-Man als Donor, auf den Vorläufer übertragen, ehe abschließend die Übertragung dreier Glucose-Reste, von Dol-P-Gluc als Donor ausgehend, die Synthese des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids ( $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ ) komplettiert (Abb. 1; Kornfeld et al., 1985, Review). Das vollständige Dol-P-P-verknüpfte Oligosaccharid  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  wird en bloc unter Freisetzung des Dol-P-P von dem Oligosaccharyltransferase Komplex im rauhen ER auf naszierende Proteine kotranslational übertragen. Dabei dienen Asparaginreste, die in der Konsensussequenz N-X-[S/T] vorliegen, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann, als Akzeptoren. Der kovalenten Verknüpfung des Oligosaccharids an den Asparaginrest des Glykoproteins folgen eine Reihe von Prozessierungsreaktionen, durch die einzelne Zuckerreste abgespalten werden. Noch im Lumen des ER werden die drei terminalen Glukosereste von dem Oligosaccharid durch die Aktivität der  $\alpha$ -Glukosidase I und der  $\alpha$ -Glukosidase II entfernt und die korrekte Faltung der Glykoproteine durch ein Wechselspiel zwischen der UDP-Glukose:Glykoprotein-Transferase und dem ER-ständigen Chaperon Calnexin sowie der  $\alpha$ II-Glukosyltransferase kontrolliert (Tatu et al., 1997). Eine ER-lokalisierte  $\alpha$ -

Mannosidase entfernt einen ersten Man-Rest, ehe anschließend der vesikuläre Transport der Glykoproteine zum Golgi erfolgt. Im Golgi laufen weitere Prozessierungsreaktionen ab, bei denen zunächst in einer Abfolge weiterer  $\alpha$ -Mannosidase-Reaktionen das Oligosaccharid bis auf einen  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ -Kern verkürzt wird („trimming“). Die enzymatischen Reaktionen im medialen Golgi-Kompartiment entscheiden darüber, ob die spätere Struktur der N-Glykane dem komplexen, hybriden oder mannosereichen Typ zuzusprechen ist. Auf Oligosaccharide des komplexen Typs, dem bei Vertebraten am häufigsten auftretende extrazelluläre N-Glykan, wird durch die Aktivität der N-Acetylglukosaminyl-Transferase I zunächst ein GlcNAc-Rest übertragen, ehe in nachfolgenden Reaktionen zwei Man-Reste von der Golgi  $\alpha$ -Mannosidase II abgespalten und ein weiterer GlcNAc-Rest von der N-Acetylglukosaminyl-Transferase II auf den terminale Mannosylrest übertragen werden. In den verschiedenen Golgi Kompartimenten werden letztlich, katalysiert durch eine Anzahl von zell- und entwicklungspezifisch aktiven Glykosyltransferasen, von Zuckernukleotiden, Man-, GlcNAc-, Galaktose (Gal)-, Fukose (Fuk)- und/oder Sialinsäure (NANA)-Reste auf die Protein-verknüpften Oligosaccharide übertragen, so dass sich in bezug auf die Oligosaccharidstruktur an Glykoproteinen eine große Diversität erreichen lässt. Dem Import der Nukleotid-aktivierten Zucker, die für die Elongation der Dolichol- bzw. Protein-verknüpften Oligosaccharide im ER und Golgi benötigt werden, kommt eine wichtige Rolle zu. Die Zuckernukleotid Transporter sind Organellen-spezifisch und ihre Lokalisation im ER und Golgi korrespondiert mit der Lokalisation der entsprechenden Transferasen. Jedes Zuckernukleotid wird von seinem spezifischen Transporter transportiert (Tab. 1). Mit Ausnahme der Übertragung von NANA von seinem CMP-NANA Donor wird nach dem Transfer des Zuckerrests das Nukleosid Diphosphat (UDP oder GDP) frei. Dieses wird durch eine Nukleosid Diphosphatase im Lumen des Golgi in das entsprechende Nukleosidmonophosphat, das dem Transporter als Antiport-Substrat dient, hydrolysiert (Hirschberg et al., 1998, Review). Der Zuckernukleotid/Nukleosidmonophosphat Antiport ist Temperatur-abhängig, sättigbar und kann kompetitiv durch die korrespondierenden Nukleosid Mono-, Di- und Triphosphate, jedoch nicht durch das entsprechende Monosaccharid inhibiert werden (Capasso et al., 1984a). Des weiteren wird der Transport einzelner Zuckernukleotide durch erhöhte Konzentrationen anderer Zuckernukleotide beeinflusst. So reduzieren

erhöhte GDP-Mannose Konzentrationen die Aufnahme von GDP-Fukose. Die Inhibition ist besonders effizient, wenn die Zuckernukleotide die gleiche Base enthalten (Capasso et al., 1984a).

| Zuckernukleotid          | ER      | Golgi   |
|--------------------------|---------|---------|
| CMP-NANA                 | —       | + + +   |
| GDP-Fukose               | —       | + + + + |
| GDP-Mannose              | —       | + + + + |
| UDP-Galaktose            | —       | + + + + |
| UDP-N-Acetylglukosamin   | + +     | + + + + |
| UDP-N-Acetylgalaktosamin | + +     | + + + + |
| UDP-Glukose              | + + + + | +       |
| UDP-Xylose               | + +     | + + + + |

**Tab. 1:** Zuckernukleotid Transporter in ER und Golgi. Die relative Verteilung der Zuckernukleotid Transporter in ER und Golgi wird durch die Anzahl der (+) angezeigt. Ein (-) deutet auf das Fehlen des entsprechenden Transporters in dem Kompartiment hin.

Zusammenfassend kann man drei distinkte Schritte im Prozess der N-Glykosylierung voneinander unterscheiden: Erstens, die Synthese des  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ -Oligosaccharids am Lipid-Carrier Dolichol-Pyrophosphat an der ER Membran. Zweitens, die kotranslationale Übertragung des Oligosaccharids auf bestimmte Asparagin-Reste eines Glykoproteins und drittens, der Modifikation der Oligosaccharidstruktur durch eine Serie von „Trimming“- und „Elongation“-Reaktionen, beginnend im ER und in den späten Golgi-Kompartimenten endend.

## 1.2 Defekte der Glykoprotein-Biosynthese

Der gesamte Vorgang der N-Glykan Synthese umfasst etwa 100 Enzyme und Transportproteine. Diese Komplexität lässt vermuten, dass eine Vielzahl genetischer Defekte zu Störungen der Glykoprotein-Synthese führen können. In diesem Zusammenhang erscheint es erstaunlich, dass erst 1980 die ersten Patienten mit



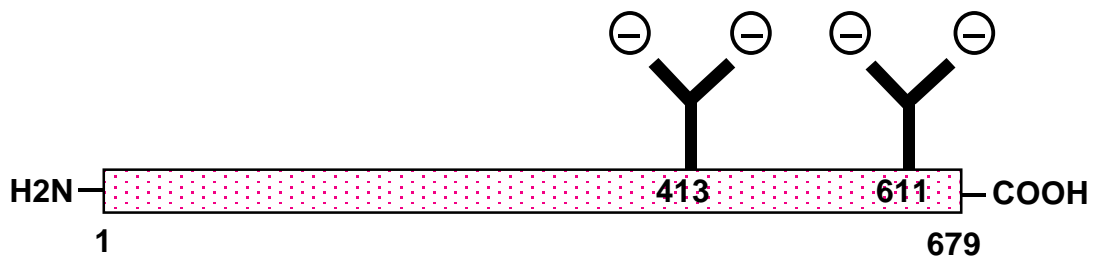
einem genetischen Defekt der N-Glykan Synthese von dem belgischen Kinderarzt Jaeken beschrieben wurden und erst 1995 die biochemische Ursache dieser ursprünglich als „Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrome (CDGS)“ bezeichneten Erkrankung identifiziert wurde (Jaeken et al., 1980; van Schaftingen et al., 1995). Seit der Identifizierung des ersten Defekts, wurden eine Reihe anderer Defekte in der N-Glykan Synthese charakterisiert. Die zunehmende Zahl der Defekte in der Glykoproteinbiosynthese, die in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnten, lässt vermuten, dass in naher Zukunft auch Defekte gefunden werden, die die Synthese anderer Glykokonjugate (z.B. Glykolipide und Proteoglykane) betreffen. Daher wurde auf dem "First international Workshop on CDGS" (Leuven, Belgium, 12.-13. November, 1999) eine Umbenennung der Krankheitsgruppe in die allgemeinere Bezeichnung „Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)“ beschlossen. Durch römische Ziffern wird die Lokalisation der Defekte innerhalb der Glykoproteinbiosynthese gekennzeichnet. Unter römisch I werden dabei alle Defekte zusammengefasst, die im Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum die Biosynthese des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids und dessen Transfer auf die neusynthetisierten Glykoproteine betreffen. Die römische II kennzeichnet Defekte der nachfolgenden Reaktionen, die im ER und Golgi lokalisiert sind.

### 1.2.1 CDG-Ia

Der klinische Phänotyp, der mit ca. 300 Patienten weltweit häufigsten Form der CDG, CDG-Ia, ist geprägt durch neurologische Abnormalitäten wie Hypotonie, verminderte Nervenleitgeschwindigkeit, cerebellare Hypoplasie und Stammhirn-Atrophie. Die Neugeborenen zeigen Gedeih- und Entwicklungsstörungen. Charakteristische dysmorphe Veränderungen sind invertierte Brustwarzen sowie Fettansammlungen im Oberarm- und Gesäßbereich, die im Alter verschwinden. Häufig kommt es auch zu Störungen des Leberstoffwechsels, der Blutgerinnung und der Herzfunktion. Die Mortalität der Erkrankten liegt bei etwa 20%. Diese Sterblichkeitsrate ist jedoch fast ausschließlich auf die ersten sechs Lebensjahre beschränkt und findet seine Ursache zumeist in schweren Infektionen, Herz- und Leberfunktionsstörungen (Jaeken & Carchon, 1993).

Bei den biochemischen Untersuchungen der Seren der ersten CDG-Ia Patienten fiel eine Veränderung der Glykosylierung des Transferrins auf (Jaeken et al., 1984).

Dieses Glykoprotein trägt im Normalfall zwei biantennäre, sialylierte Oligosaccharide vom Komplex-Typ (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Serumtransferrins. Serumtransferrin (MG 80 kDa) ist an den Asparaginresten 413 und 611 jeweils mit einem biantennären N-Glykan vom Komplex-Typ verknüpft und trägt daher in der tetrasialo-Form vier negative Ladungen.

Fehlen, wie beim CDG-Ia, eine oder beide Ketten, kommt es durch die verminderte Anzahl negativer Ladungen zur Veränderung des isoelektrischen Punktes des Transferrins. Dies kann mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) einfach nachgewiesen werden. Die Bestimmung des Musters der Transferrinbanden nach isoelektrischer Fokussierung ist daher zu dem verbreitetsten Suchtest für CDG geworden.

Die biochemische Ursache für CDG-Ia liegt in einer verminderten Aktivität der Phosphomannomutase II (PMM II) (van Schaftingen et al., 1995), die im Cytosol die Umsetzung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat katalysiert (Abb. 3). Der verminderte Mannose-1-Phosphat Spiegel führt zu einer Erniedrigung der nachfolgenden Metabolite GDP-Mannose, GDP-Fukose, Dolichol-P-Mannose. Dadurch kommt es sowohl zu einer Verminderung, als auch zu einer Verkürzung von Dolichol-verknüpften Oligosacchariden (Powell et al., 1994; Körner et al., 1998a). Als Folge nimmt die Zahl der Kohlenhydratseitenketten pro Glykoprotein ab, da keine ausreichende Anzahl vollständiger Lipid-verknüpfter Oligosaccharide zur Verfügung steht und folglich nicht alle möglichen N-Glykosylierungsstellen genutzt werden können.

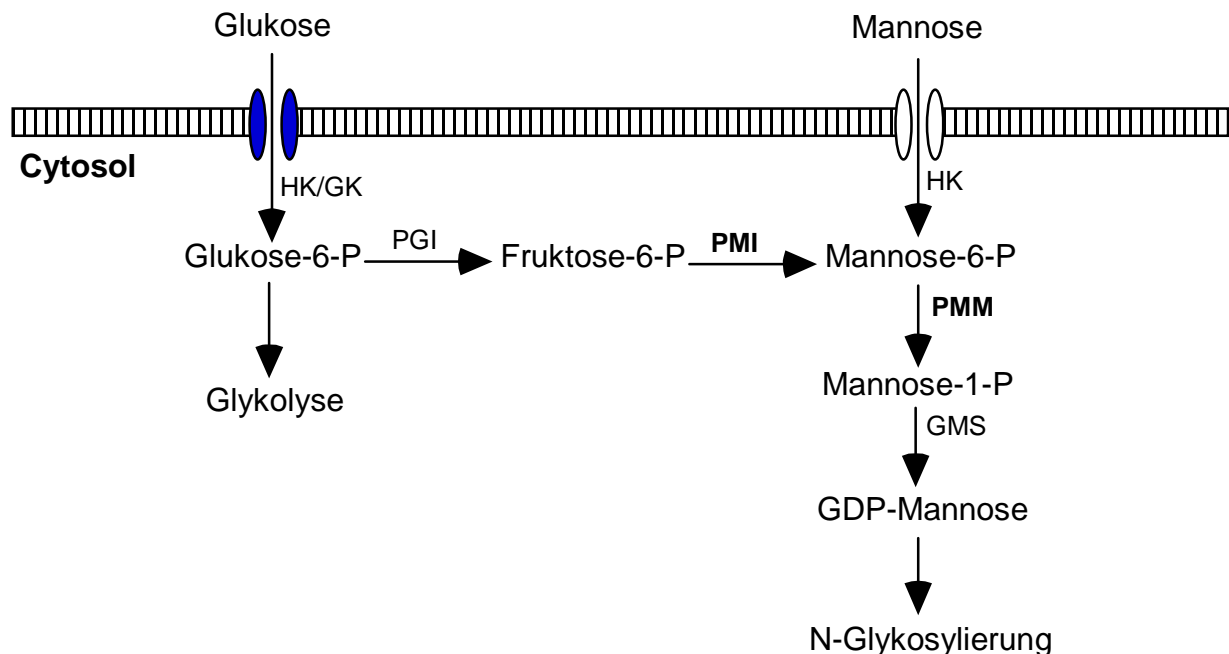
Das PMM II-Gen konnte auf dem Chromosom 16p13 lokalisiert werden. Die Sequenzanalyse zeigte bei CDG-Ia Patienten eine Vielzahl von Punktmutationen, die zum Austausch von Aminosäureresten führten, jedoch keine Deletionen oder

Stopmutationen (Matthijs et al., 1997). Auch die häufigste Mutation, die zu einem R141H Austausch auf Aminosäureebene führt, konnte bisher nicht in homozygoter Form nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass eine PMM II-Restaktivität für eine Entwicklung in utero bis zum Zeitpunkt der Geburt notwendig ist und ein völliger Aktivitätsverlust, wie er bei der R141H Mutation zu sehen ist, nicht konform mit der Embryonalentwicklung ist (Matthijs et al., 1998). Sowohl die Zugabe von Mannose in das Zellkulturmedium von CDG-Ia Fibroblasten (Panneerselvam et al., 1996), als auch die Reduktion der Glukosekonzentration auf ein Zehntel des physiologischen Wertes (Körner et al., 1998b), führte zu einer Normalisierung der Struktur von Dolichol- und Protein-verknüpften Oligosacchariden. Allerdings konnte man nach oraler Gabe von Mannose bei CDG-Ia Patienten in Langzeitstudien bisher keine Verbesserung des Gesundheitszustandes beobachten (Marquardt, persönliche Mitteilung). Eine Glukose-arme Diät als Therapieansatz für CDG-Ia ist in der Kinderklinik Münster in Planung.

### **1.2.2 CDG-Ib**

Das CDG-Ib wurde 1998 erstmals von Niehues et al. beschrieben. Diese Erkrankung unterscheidet sich klinisch grundlegend von den anderen bekannten Formen des CDG und ist bislang erst bei wenigen Patienten beschrieben worden. Die mentale und motorische Entwicklung bei den Patienten ist nicht gestört, dafür tritt vor allem chronische Diarrhoe mit enteropathischem Proteinverlust auf. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kann es zu lebensbedrohlichen Darmblutungen kommen. Das Transferrin-Muster entspricht dem bei CDG-Ia (Niehues et al., 1998). Der Primärdefekt dieser Erkrankung liegt in der Phosphomannose Isomerase (PMI) und vermindert die Mannose-6-Phosphat Produktion aus Fruktose-6-Phosphat im Cytosol (Abb. 3). CDG-Ib kann durch eine orale Mannose-Behandlung therapiert werden, da zwar durch die PMI-Defizienz die Synthese von Mannose-6-Phosphat aus Glukose inhibiert ist, aber Mannose-6-Phosphat auch durch direkte Phosphorylierung von Mannose durch die Hexokinase im Zytosol der Zellen gebildet werden kann (Abb. 3). Die so phosphorylierte Mannose kann zum einen aus dem Glykokonjugat Katabolismus stammen; zum anderen wird exogene Mannose durch einen Mannose-spezifischen Transportvorgang aus dem Serum in die Zellen transportiert (Etchinson et al., 1997; Paneerselvam et al., 1997). Erhöht man die Mannose-Konzentration im Blut durch die orale Mannosetherapie, so kann auch mehr exogene Mannose in die

Zellen transportiert und durch die Hexokinase in die limitierende Mannose-6-Phosphat Form überführt werden (Niehues et al., 1998).



**Abb. 3. Bereitstellung von Nukleotid-aktivierten Zuckern am Beispiel der GDP-Mannose.** Glukose oder Mannose werden über Transportproteine in das Zytosol der Zelle befördert, phosphoryliert und werden in einer Reihe Enzym-katalysierter Reaktionen zu GDP-Mannose umgesetzt, um als Zuckerdonor für die N-Glykosylierung zu fungieren. Die beteiligten Enzyme sind: HK=Hexokinase, GK=Glukokinase, PGI=Phosphoglucose Isomerase, PMI=Phosphomannose Isomerase, PMM=Phosphomannomutase, GMS=GDP-Mannose Synthase

### 1.2.3 CDG-Ic

Klinisch ist bei CDG-Ic (ehemals CDGS type V) Patienten der neurologische Defekt milder ausgeprägt als bei CDG-Ia Patienten, und einige körperliche Abnormalitäten der CDG-Ia Patienten fehlen gänzlich. Dafür neigen die Betroffenen während Infektionsintervallen zu Krampfanfällen (Körner et al., 1998c). CDG-Ic wird durch einen Defekt in der Dol-P-Glc:Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-dolichyl Glukosyltransferase ausgelöst, so dass die N-Glykan Synthese in der Akkumulation des Lipid-verknüpften

Vorläufers  $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  endet (Körner et al., 1998c). Das für diese Transferase kodierende humane Gen wurde, dem zuvor bekannten orthologen Gen ALG6 aus *Saccharomyces cerevisiae* entsprechend, als hALG6 benannt (Imbach et al., 1999). Während die Lipid-verknüpften Oligosaccharide in Kontrollfibroblasten zu über 90% der vollständigen  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  Struktur aufweisen, sind es bei Patienten nur 10-20%, was auf einen partiellen Defekt der Glucosyltransferase hinweist (Körner et al., 1998c). Der nicht glukosylierte  $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  Vorläufer stellt jedoch ein schlechtes Substrat für die Oligosaccharyltransferase dar, so dass bei Patienten nur die wenigen, vollständig synthetisierten Lipid-verknüpften Oligosaccharide auf neu gebildete Glykoproteine übertragen werden, und es wie bei Typ Ia zu einer stark verminderten Nutzung der N-Glykosylierungsstellen kommt (Turco et al., 1977). Das Serum-Transferrinmuster in der isoelektrischen Fokussierung ähnelt dem der CDG-Ia Patienten (Körner et al., 1998c).

#### 1.2.4 CDG-Id

Das Krankheitsbild des CDG-Id (ehemals CDGS type IV) ist durch schwere Krampfanfälle, die direkt nach der Geburt einsetzen, geprägt. Der einzig bisher beschriebene Patient zeigt zudem eine extrem eingeschränkte psychomotorische Entwicklung, Skelettdeformationen, Sehstörungen und Mikrozephalie. Das Serum-Transferrin des Patienten weist einen partiellen Verlust kompletter N-Glykanketten auf (Körner et al., 1999a). Wie Körner et al. (1999a) feststellen konnten, wird CDG-Id durch einen Defekt in der Dolichyl-P-Man:Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-dolichyl Mannosyltransferase hervorgerufen. Diese ER-ständige Mannosyltransferase überträgt Mannose-Reste von dem Donor Dol-P-Man auf den Lipid-verknüpften Akzeptor  $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ . Bei der Defizienz dieser Mannosyltransferase akkumulieren Dolichol-verknüpfte Oligosaccharide der  $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  Form. Da auch dieser Defekt nach den bisherigen Ergebnissen nur unvollständig ist, wird ein geringer Anteil vollständiger Lipid-verknüpften Oligosacchariden ( $\leq 20\%$  gegenüber 90% bei Kontrollen) auf Glykoproteine übertragen. Zusätzlich findet man in neusynthetisierten Glykoproteinen bei CDG-Id Fibroblasten verkürzte Oligosaccharide der  $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-}$  und wahrscheinlich der  $\text{G}_1\text{-Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-}$ Form, die beide als Substrate der Oligosaccharyltransferase fungieren können (Körner et al., 1999a; Rearick et al., 1981).

### 1.2.5 CDG-Ie

CDG-Ie wird durch einen Defekt in dem Dolichol-phosphat-mannose Synthase 1 Gen (DPM 1) ausgelöst. Dieses Gen codiert für die zytosolische Untereinheit des Dol-P-Man Synthase Heterodimers. Auch bei diesem Defekt weisen die bisher untersuchten Patienten eine Restaktivität des Enzyms auf ( $\leq 10\%$ ). Betrachtet man die Schwere des klinischen Phänotyps, der durch starke Entwicklungsstörungen, Hirnatrophie, Muskelhypotonie und Krampfanfällen geprägt ist, so ist es vorstellbar, dass Mutationen, die zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität führen, lethal sind. Die Analyse der Lipid-verknüpften Oligosaccharide der Patienten zeigt eine Akkumulation der  $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$  Struktur, da die Elongation des Oligosaccharids aufgrund fehlender Dol-P-Man Donoren nicht fortschreiten kann. In der IEF des Serum-Transferrins ist eine sehr prominente Disialo-, jedoch fast keine Asialo-Bande zu erkennen (Imbach et al., 2000; Kim et al., 2000).

### 1.2.6 CDG-IIa

Im Jahr 1991 wurde eine weitere Form von CDG beschrieben, die heute als CDG-IIa bezeichnet wird. Klinisch ist dieser autosomal rezessiv vererbte Defekt durch schwerste Entwicklungsstörungen, eine generelle Hypotonie und eine Gliederschwäche gekennzeichnet. Im Gegensatz zu CDG-Ia wird keine periphere Neuropathie beobachtet, und das Kleinhirn ist normal angelegt (Ramaekers et al., 1991). Die isoelektrische Fokussierung des Transferrins zeigt eine Akkumulation des Disialotransferrins bei gleichzeitiger Abwesenheit von Tetrasialo- und Asialotransferrin. Der biochemische Defekt liegt im Gen der im medial-Golgi lokalisierten N-Acetylglukosaminyltransferase II (GnTII) (Jaeken et al., 1994). Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von GlcNAc mit dem  $\text{Man}\alpha 1\text{-6}$ -Arm der N-Glykan Core-Struktur. Die Synthese von biantennären Oligosacchariden ist ohne die GnTII nicht möglich (vergl. Abb.X). Allerdings wird der Seitenarm, der von der N-Acetylglukosamin Transferase I (GnTI) verlängert wird, normal prozessiert. Es werden daher Transferrinmoleküle gebildet, deren Oligosaccharide monoantennär sind und denen damit die Hälfte der negativen Ladungen fehlen.

### **1.2.7 CDG-IIb**

CDG-IIb ist als Glukosidase I Defizienz charakterisiert - dem ersten Enzym der Prozessierung nach dem Transfer des vollständigen Oligosaccharids durch die Oligosaccharyltransferase auf das naszierende Protein. Bisher ist nur ein Patient mit diesem Defekt beschrieben (Stand: 1/2001). Das inzwischen verstorbene Kind litt unter Krampfanfällen, verminderter Nervenleitgeschwindigkeit, Muskelhypotonie, dysmorphen Veränderungen sowie Leberfunktionsstörungen. Das Serum-Transferrinmuster des Kindes war nicht auffällig, so dass der Standardsuchtest bei diesem Fall nicht zur Identifizierung als CDG beiträgt (de Praeter et al., 2000).

## **1.3 LAD II / CDG-IIc**

Das Krankheitsbild des Leukocyte Adhesion deficiency type II (LAD II) wurde erstmals 1992 beschrieben. LAD II-Patienten weisen schwere Entwicklungsverzögerungen, Mikrozephalie, kortikale Atrophie, Hypotonie, vermindertes Wachstum sowie wiederkehrende, lebensbedrohliche Infektionen bei einer persistierenden Leukozytose auf (Etzioni et al., 1992; Frydman et al., 1992; Marquardt et al., 1999).

### **1.3.1 Klinik und klinische Chemie von LAD II/ CDG-IIc**

Der Patient A.C. (Abb. 4), dessen biochemischer und molekulargenetischer Defekt in dieser Arbeit beschrieben wird, ist das erste Kind nicht konsanguiner Eltern. Bei Ultraschalluntersuchungen im Mutterleib fiel ein vermindertes Wachstum auf. Aufgrund pathologischer Veränderungen der Herzfrequenz in der 32. Woche wurde die Entbindung durch Kaiserschnitt durchgeführt. Während der ersten drei Lebensmonate kam es zu schweren Infektionen, die intravenöse Antibiotikabehandlungen erforderlich machten. Auch ansonsten zeigte A.C. die typischen physischen Stigmata (Abb. 4) und klinischen Laborbefunde anderer LAD II Patienten (Tab. 2). Die Menge der peripheren Leukozyten war bei A.C. konstant um das vier- bis fünffache gegenüber normalen Leukozytenspiegeln, während der Infektionen sogar um das zehnfache erhöht. Bei der Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sortierungsanalyse (FACS) der Leukozyten-Oberflächenantigene konnten keine Sialyl-Lewis X-Reste nachgewiesen werden. Diese O-glykosidischen,  $\alpha$ 1,3-fukosylierten Tetrasaccharidstrukturen an Glykoproteinen (Tab. 2) der neutrophilen

Granulozyten vermitteln die erste Zell-Zell-Interaktion bei dem Prozess des „Leukozyten-Rolling“ zwischen den Neutrophilen einerseits und dem aktivierten Endothelzellen andererseits. Der Verlust dieser Zuckerstrukturen und deren Notwendigkeit bei der Extravasation der Leukozyten in entzündeten Geweben erklärt den erhöhten Leukozyten Spiegel im Blut. Gleichzeitig liefert dieser Befund einen ersten Hinweis auf einen Defekt im Fukose-Stoffwechsel. Zusätzlich konnte bei FACS-Untersuchungen der Erythrozyten des Patienten weder das  $\alpha$ 1,2-fukosylierte H-Antigen, wodurch es zur Ausprägung des in Westeuropa seltenen sogenannten Bombay Phänotyps kommt, noch das  $\alpha$ 1,4-fukosylierte Lewis A-Antigen detektiert werden (Marquardt et al., 1999). Die Affinitäts-chromatographische Analyse metabolisch, [2- $^3$ H]Mannose-markierter Glykopeptide ergab eine etwa hundertfach verminderte Bindung an eine *Lens-culinaris* Lektin-Matrix. Dieses Lektin bindet spezifisch  $\alpha$ 1,6-verknüpfte Fukosereste, wie sie in komplexen N-Glykanen vorkommen können (Marquardt et al., 1999).



**Abb. 4:** Klinische Stigmata des LAD II/ CDG-IIc Patienten A.C.. Auffällig sind die langen Wimpern, die breite Nasenwurzel, die Vierfingerfurche der Hände und die übereinander stehenden Zehen. Die breite Nasenwurzel konnte bereits in der 28. Schwangerschaftswoche im Ultraschall gesehen werden (Pfeil).



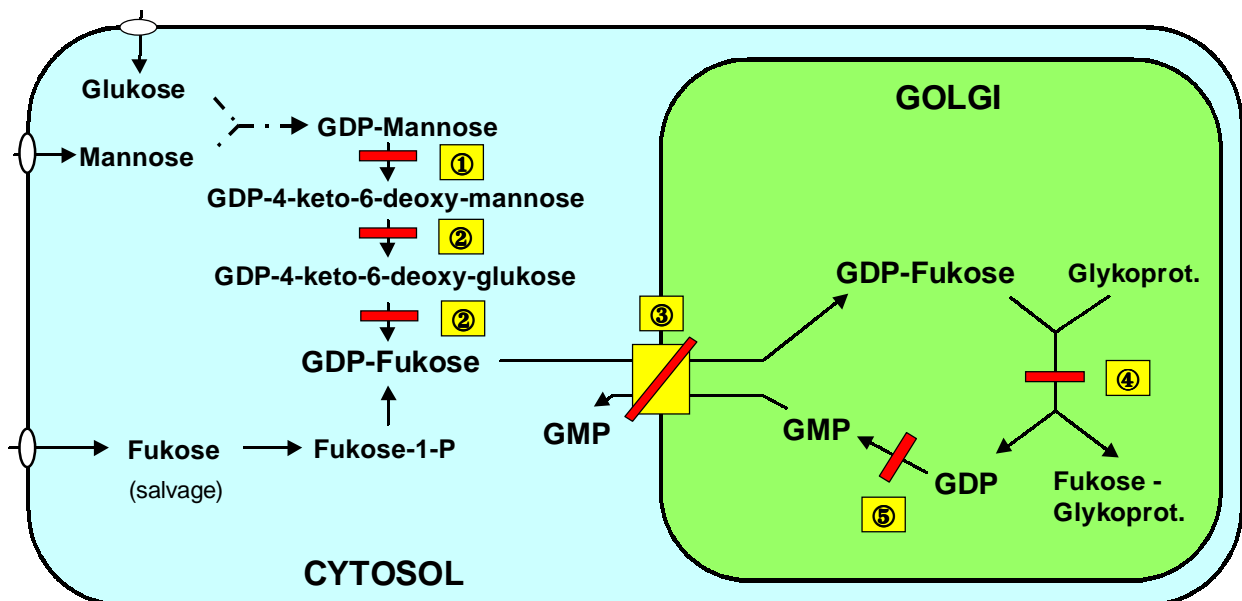
|                                     |  | Patient A.C. |
|-------------------------------------|--|--------------|
| <b>Bombay</b>                       | Gal $\beta$ 1,3 – GlcNAc $\beta$ 1 –   | <b>+</b>     |
| <b>Blutgruppe H</b>                 | Gal $\beta$ 1,3 – GlcNAc $\beta$ 1 –<br><div style="text-align: center;"> <span style="color: red;"> </span><br/> <b>Fuk <math>\alpha</math>1,2</b> </div>   | <b>–</b>     |
| <b>Lewis A</b>                      | Gal $\beta$ 1,3 – GlcNAc $\beta$ 1 –<br><div style="text-align: center;"> <span style="color: red;"> </span><br/> <b>Fuk <math>\alpha</math>1,4</b> </div>   | <b>–</b>     |
| <b>[Sialyl] Lewis X</b>             | NANA $\alpha$ 2,3<br><div style="text-align: center;"> <span style="color: red;"> </span><br/> Gal <math>\beta</math>1,4 – GlcNAc <math>\beta</math>1 –<br/> <div style="text-align: center;"> <span style="color: red;"> </span><br/> <b>Fuk <math>\alpha</math>1,3</b> </div> </div> | <b>–</b>     |
| <b><i>Lens culinaris</i> Lektin</b> | GlcNAc $\beta$ 1,4 – GlcNAc $\beta$ 1 – Asn<br><div style="text-align: center;"> <span style="color: red;"> </span><br/> <b>Fuk <math>\alpha</math>1,6</b> </div>  | <b>–</b>     |

Tab. 2: O- und N-glykosidisch verknüpfte fukosylierte Strukturen, die im Fall des CDG-IIc Patienten A.C. fehlen.

### 1.3.2 Biochemie von LAD II/ CDG-IIc

Der Verlust der  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-,  $\alpha$ 1,4- und  $\alpha$ 1,6-verknüpften Fukosereste weist auf eine generelle Hypofukosylierung von Glykokonjugaten bei dem Patienten A.C. hin und spricht gegen einen Defekt einer der Fukosyltransferasen im Golgi. Dieser Verlust spricht vielmehr für einen generellen Defekt im Fukose-Metabolismus bei der Bereitstellung von GDP-Fukose als Donor im Golgi (Etzioni et al., 1992). Dazu könnten folgende Störungen führen: Erstens, ein Defekt in der GDP-Fukose Synthese aus GDP-Mannose unter der Beteiligung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und des bifunktionellen FX-Proteins, das eine Epimerase- und eine Reduktase-Aktivität besitzt. Zweitens, ein Defekt des GDP-Fukose/GMD

Antiporters. Drittens, ein Defekt der GDPase im Golgi, die das Antiportsubstrat GMP aus GDP bildet oder viertens, der Defekt eines unbekanntes, gemeinsamen Kofaktors der Fukosyltransferasen (Abb. 5).



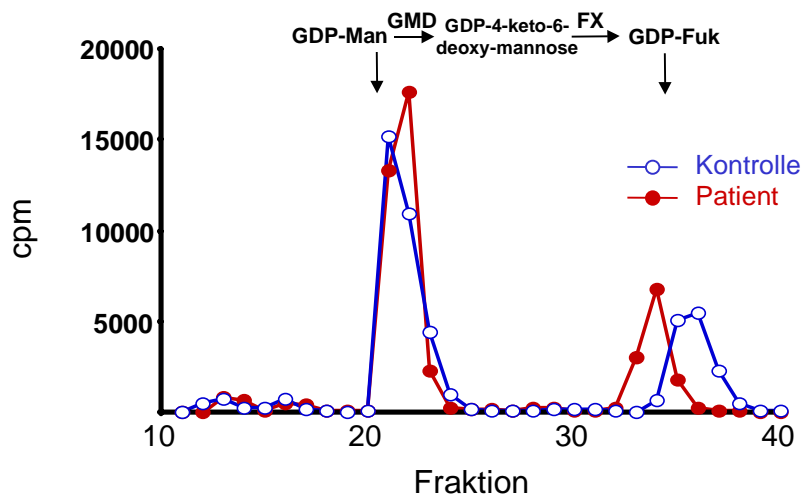
- ① GDP-mannose-4,6-dehydratase    ② FX-Protein    ③ GDP-Fukose Transporter  
 ④ Fukosyltransferases    ⑤ GDPase

Abb. 5: Schematische Darstellung der Fukosylierung von Glykoproteinen und potentieller Defekte (rote Balken), die zu einer Hypofukosylierung von Glykoproteinen führen könnten.

Der klinische Phänotyp sowie die generelle Hypofukosylierung bei dem hier beschriebenen Patienten wurden schon früher bei LAD II Patienten beschrieben (Etzioni et al., 1992). Die molekulare Ursache für LAD II wird in einem Defekt der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) vermutet, so dass die Synthese des zentralen Moleküls der Fukosylierung, GDP-Fukose, blockiert ist. Bisher konnten jedoch Mutationen in den GMD-cDNAs der Patienten nicht nachgewiesen werden. Die Autoren nehmen daher an, dass die Mutationen bislang noch nicht charakterisierte, GMD-regulierende Proteine betreffen (Sturla et al., 1998).

### 1.3.2.1 GDP-Fukose Synthese

Da die molekulare Ursache für LAD II als ein Defekt der GMD beschrieben wurde (Sturla et al., 1998), wurden an Fibroblasten des Patienten A.C. zuerst die Konversion von GDP-Mannose zu GDP-Fukose untersucht. Zytosolische Extrakte aus Leukozyten und Fibroblasten von A.C. zeigten dabei eine normale GDP-Fukose Syntheserate. Die molekularbiologische Analyse der beiden an der Konversion beteiligten Enzyme, GMD und FX-Protein, ergab eine vergleichbare Menge von Transkriptionsprodukten (Northern-Analyse) in Kontroll- und Patientenzellen. Bei der Sequenzierung mittels RT-PCR aus Patienten- und Kontroll-RNA generierter cDNA konnte zwar ein Polymorphismus, nicht aber eine Mutation nachgewiesen werden, so dass ein Defekt in der GDP-Fukose Synthese ausgeschlossen werden konnte (Körner et al., 1999b).



**Abb. 6:** In-vitro Konversion von GDP-Mannose zu GDP-Fukose in cytosolischen Extrakten aus Fibroblasten von Patient A.C. und Kontrollen nach einer metabolischen Markierung mit [ $^{14}\text{C}$ ]GDP-Mannose.

### 1.3.2.2 Korrektur der Hypofukosylierung

In weiterführenden metabolischen Markierungsstudien an Kontroll- und Patienten-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die bereits erwähnte stark verminderte Affinität von markierten Glykopeptiden an das Lektin *Lens culinaris* durch die Zugabe von 1 mM Fukose in das Markierungsmedium annähernd normalisiert wurde; nicht aber durch die Zugabe von 1 mM Mannose (Tab. 3). Aufgrund dieses Korrektoreffekts konnte ein Defekt eines gemeinsamen Kofaktors der Fukosyltransferasen ausgeschlossen werden (Marquardt et al., 1999).

|   | <b>Addition</b> | <b>Fukosylierte [<sup>3</sup>H]Glykopeptide<br/>(% der markierten Glykopeptide)</b> |
|---|-----------------|---|
| <b>Patient</b>                              | —               | 0,1   |
|   | 1 mM Mannose    | 0,2   |
|   | 1 mM Fukose     | 7,0   |
| <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> |                 |   |
| <b>Kontrolle</b>                            | —               | 14,6  |
|   | 1 mM Mannose    | 9,8   |
|   | 1 mM Fukose     | 13,0  |

**Tab. 3:** Korrektur der Hypofukosylierung von Glykopeptiden in Fibroblasten von Kontrollen und Patient A.C. in Abwesenheit bzw. Gegenwart von entweder 1 mM Mannose oder 1 mM Fukose im metabolischen Markierungsmedium.

## 2 Problemstellung

Biochemische Untersuchungen an einem kürzlich beschriebenen Patienten mit CDG-IIc/ LAD II zeigen einen Widerspruch zu dem bislang als molekulare Ursache für LAD II vorgeschlagenen Defekt. Während in den Lymphoblasten der bislang untersuchten LAD II-Fälle ein Defekt der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und damit der GDP-Fukose Synthese nachgewiesen wurde, so schließen die biochemischen Untersuchungen an Hautfibroblasten des hier untersuchten Patienten mit LAD II Symptomatik einen Defekt in der Synthese von GDP-Fukose (GMD und FX-Protein) aus. Es handelt sich jedoch auch um einen Defekt, der zu einer Hypofukosylierung führt. Da es sich bei der Fukosylierung von Glykoproteinen um einen relativ übersichtlichen Stoffwechselweg handelt, verbleiben nach den bisherigen Befunden noch drei Proteine, deren Defekt zu einer allgemeinen Hypofukosylierung von Glykoproteinen führt. So könnte der hier untersuchte Patient einen Defekt des GDP-Fukose Transporters oder der Golgi-ständigen GDPase aufweisen. Letztere ist für die Bereitstellung des Antiport-Substrats verantwortlich. Zudem ist es möglich, dass der Defekt einen noch unbekanntem, für die Fukosylierung notwendigen Faktor betrifft. Letztlich kann nur eine molekulargenetische Untersuchung Aufschluss darüber geben, welcher Defekt die Unterfukosylierung der Glykoproteine des neuen CDG-IIc/ LAD II Patienten verursacht.

Ziel dieser Arbeit ist einerseits die biochemische Charakterisierung des Defekts bei dem Patienten sowie andererseits die molekularbiologische Identifizierung des Gendefekts. Um letzteres durchzuführen, soll die cDNA, die die Hypofukosylierung in den Patientenzellen zu komplementieren vermag, isoliert und charakterisiert werden. Dazu soll ein Verfahren etabliert werden, das es erlaubt zwischen dem Patienten- und Kontroll-Phänotyp zu unterscheiden, um dann mit Hilfe der Expressionsklonierung die cDNA zu isolieren, die in den Patientenzellen den Fukosylierungsdefekt korrigiert. Nach ihrer Isolierung soll die den Defekt komplementierende cDNA näher charakterisiert und die Mutationen in dem entsprechenden Gen bei dem Patienten identifiziert werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

|   |  |
|---|--|
| Analysenwaagen Typ 1602 MP und M5P                                | Sartorius, Göttingen                     |
| Typ Tecnoclav 50  | Tecnomara, Zürich Schweiz                |
| Brutschrank Typ 2771  | Heraeus, Osterode, Köttermann, Häningsen |
| Dounce-Homogenisator  | Wheaton, USA                             |
| Drehrad für Eppendorfgefäße                                       | Eigenbau, Werkstatt des Instituts        |
| DNA-Sequencer, Typ 310  | ABI, PE Biosystems                       |
| Eismaschine   | Ziegra, Isernhagen                       |
| Elektrophoresekammern für Agarosegele                             | Eigenbau, Werkstatt des Instituts        |
| Flüssigkeitsszintillationszähler 1900TR                           | Packard, Frankfurt                       |
| Filmentwicklungsmaschine Gevomatic 60                             | Agfa-Gevaert, Leverkusen                 |
| Gefrierschrank -80 °C   | Colora Messtechnik, Lorch                |
| Heizblock 5320  | Eppendorf, Hamburg                       |
| Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO <sub>2</sub> -Atmosphäre | Forma Scientific, Marietta, USA          |
| Inkubationsschüttler Modell G25                                   | New Brunswick Scientific Edison, USA     |
| Durchlicht-Mikroskop  | Zeiss, Oberkochen                        |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100                                 | Zeiss, Oberkochen                        |

| Fluorochrom | Emissionsfilter |
|-------------|-----------------|
| GFP         | LP 515-565      |

|                                |                   |
|--------------------------------|-------------------|
| Objektive für das Axiovert 100 | Zeiss, Oberkochen |
| Plan-Neofluar 25x/ 0,81 mm     |                   |
| Plan-Neofluar 40x/ 1,3 mm      |                   |
| Plan-Neofluar 63x/ 1,4 mm      |                   |

|                               |                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Mikroskop Kamerasysteme Imago | T.I.L.L. Photonics, Martinsried |
|-------------------------------|---------------------------------|

|  |  |
|--|--|
| Magnetrührer Ika-Combimag Ret            | Janke & Kunkel, Staufen                        |
| Mikrowellenherd                          | Bosch, Stuttgart                               |
| Multipette, Combitips                    | Eppendorf, Hamburg                             |
| Peristaltikpumpe, P1                     | Pharmacia, Uppsala Schweden                    |
| pH-Meter                                 | Beckmann, München                              |
| Photometer, UV 160 A                     | Shimadzu, Kyoto, Japan                         |
| Refraktometer                            | Schmidt, Haensch                               |
| Schüttelwasserbad                        | Köttermann, Häningsen,<br>Göttingen            |
| Semi-Dry-Blot-System                     | cti GmbH, Idstein/Taunus                       |
| Spannungsgeräte                          | Hölzel, München                                |
| Spektralphotometer Modell Uvikon 810     | Kontron, Eching                                |
| Sterilbank, Typ A/B3                     | Baker Company, Inc., USA                       |
| Thermoprinter, Typ P91E                  | INTAS, Mitsubishi, Tokio, Japan                |
| Transilluminator Modell IL-400-M         | Bachofer, Reutlingen                           |
| Typ Gene Amp PCR System 2400             | Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA               |
| Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450 | Branson Ultrasonic SA, Carouge-<br>Geneve, USA |
| Video Copy Prozessor                     | Mitsubishi, Tokio, Japan                       |
| Video-Drucker                            | Intas, Göttingen                               |
| Video-Kamera                             | Intas, Göttingen                               |
| Vortex-Genie                             | Bender & Hobein, Zürich                        |
| Waagen Typ 1264 MP und 1265              | Sartorius, Göttingen                           |
| Wärmeschrank                             | Memmert, Schwabach                             |
| Wasserbad Typ HOR 7225                   | Köttermann, Häningsen                          |
| Wipptisch                                | Eigenbau, Werkstatt des Instituts              |
| Zentrifugen:                             |  |
| Biofuge Fresco                           | Hereaus Sepatech, Osterode                     |
| Eppendorfszentrifuge 5402 und 5415C      | Eppendorf, Hamburg                             |
| Kühlzentrifuge, Modell J-21C und J2-MC   | Beckmann, München                              |
| Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B             | DuPont Instruments, Bad Homburg                |
| Labofuge GL                              | Heraeus Sepatech, Osterode                     |
| Megafuge 1.0                             | Hereaus Sepatech, Osterode                     |

## Rotoren für die Kühlzentrifuge:

|  |                   |
|--|-------------------|
| JA-10 Rotor, bis 17680 x g                                     | Beckmann, München |
| JA-20 Rotor, bis 48300 x g                                     | Beckmann, München |
| Ultrazentrifuge L-80   | Beckmann, München |
| Tisch-Ultrazentrifuge TL-100<br>mit Rotor TLA-45 und TLA-100.3 | Beckmann, München |

**3.1.2 Verbrauchsmaterialien**

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Einfrierkästen                               | National Lab, Mölln            |
| Einfrierröhrchen                             | Nunc, Wiesbaden                |
| Einmalkanülen                                | Neobject, Gelnhausen           |
| Einmalspritzen                               | Braun, Melsungen               |
| 6- bzw. 24- Napf-Zellkulturplatten           | Greiner, Nürtingen             |
| Gewebekulturschalen 35, 60, 100, 150 mm Ø    | Greiner, Nürtingen             |
| Glaskolben 100ml, 250 ml, 1000 ml            | Schott, Mainz                  |
| Immersionsöl 518C                            | Zeiss, Oberkochen              |
| Kanülen (steril), 26G und 20 G               | Braun, Melsungen               |
| Linsenpapier MN 10B                          | Machery-Nagel, Düren           |
| Nitrocellulose Blotting Membranen 0,2 um     | Sartorius AG, Göttingen        |
| Objektträger und Deckgläser                  | Menzel Gläser                  |
| Parafilm <sup>®</sup>                        | American National, Neenah, USA |
| Pasteurpipetten                              | Schütt, Göttingen              |
| Plastikröhrchen, klein (10 ml), groß (50 ml) | Greiner, Nürtingen             |
| Plastikpipetten, steril (5, 10, 25 ml)       | Greiner, Nürtingen             |
| Plasik-Petrischalen 9 cm Ø                   | Sarstedt, Nürmbrecht           |
| Qiagen-Säulen für DNA-Präparation            | Qiagen, Düsseldorf             |
| Reaktionsgefäße 0.5, 1.5, 2 ml               | Sarstedt, Nürmbrecht           |
| Röntgenfilme, XAR-5                          | Kodak, Stuttgart               |
| 1 ml-Spritze , steril                        | Sherwood, Ballymoney, Irland   |
| Skapelle, steril                             | Braun, Melsungen               |
| Sterile Plastikröhrchen 10, 50 ml            | Sarstedt, Nürmbrecht           |
| Sterilfilter 0,2 µm und 0,45 µm              | Sartorius, Göttingen           |
| Whatman 3 MM-Papier                          | Whatman Vertrieb, Göttingen    |



Zentrifugenbecher: JA-10 & JA-20 Polypropylen, SW 40 Polyallomer

Beckmann bzw. Nalgene, München

### 3.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA), Baker (Deventer, Niederlande), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Calbiochem (Frankfurt), Fluka (Buchs, Schweiz), GIBCO/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

|   |           |
|---|-----------|
| Aceton  | Merck     |
| Adenosintriphosphat   | Merck     |
| Agar  | Sigma     |
| Agarose   | Sigma     |
| Albumin aus Rinderserum (BSA)                                 | Serva     |
| Ammouniummolybdat   | Merck     |
| Ascorbinsäure   | Sigma     |
| ATP   | Sigma     |
| Bacto-Hefe-Extrakt  | Difco     |
| Bacto-Trypton   | Difco     |
| Bromphenolblau  | BioRad    |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin (BCIP)          | Sigma     |
| Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )                           | Merck     |
| Chloroform  | Merck     |
| Dextransulfat   | Pharmacia |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Merck     |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                       | Merck     |
| EDTA-Na <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O                       | Merck     |
| Essigsäure  | Merck     |
| Ethanol   | Merck     |
| Ethanolamin   | Merck     |
| Ethidiumbromid  | Serva     |

|  |            |
|--|------------|
| Flüssigszintillator Rotiszint eco plus                     | Roth       |
| Folin-Ciocalteus-Reagenz                                   | Merck      |
| Formaldehydlösung (37%)                                    | Merck      |
| Formamid   | Fluka      |
| Glukose  | Merck      |
| Glycerin   | Merck      |
| H <sub>2</sub> O HPLC-Reinheitsgrad                        | Merck      |
| HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-<br>N'-2-ethansulfonsäure | Serva      |
| Imidazol   | Merck      |
| Isoamylalkohol   | Merck      |
| Isopropanol  | Merck      |
| Kaliumacetat   | Merck      |
| Kaliumchlorid (KCl)  | Merck      |
| Kaliumhydrogenphosphat                                     | Merck      |
| Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )                          | Merck      |
| Levamisol  | Sigma      |
| Manganchlorid  | Merck      |
| Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )                       | Merck      |
| Methanol   | Roth       |
| Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)                         | Serva      |
| Mowiol   | Calbiochem |
| Natriumacetat  | Merck      |
| Natriumazid  | Sigma      |
| Natriumcarbonat  | Merck      |
| Natriumchlorid (NaCl)                                      | Merck      |
| Natriumcitrat  | Merck      |
| Natriumdihydrogenphosphat                                  | Merck      |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                                 | Sigma      |
| Natriumhydrogencarbonat                                    | Merck      |
| Natriumhydroxid (NaOH)                                     | Merck      |
| Natriumhydrogenphosphat                                    | Merck      |
| Natrium-Kalium-Tartrat                                     | Merck      |
| Nitroblau-tetrazolium (NBT)                                | Sigma      |

|   |            |
|---|------------|
| Ovalbumin                               | Sigma      |
| Paraformaldehyd (PFA)                   | Sigma      |
| Phenol                                  | Merck      |
| Phospho-Wolfram-Säure                   | Sigma      |
| Polybrene                               | Sigma      |
| Salzsäure                               | Merck      |
| Schwefelsäure                           | Merck      |
| Sucrose                                 | Merck      |
| Trichloressigsäure (TCA)                | Merck      |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Merck      |
| Trypanblau                              | Boehringer |

### 3.1.4 Detergenzien

|              |                    |
|--------------|--------------------|
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
|--------------|--------------------|

### 3.1.5 Enzyme, Standards und Antibiotika

|  |  |
|--|--|
| 1-kb-DNA-Ladder                                | Gibco BRL, Eggenstein  |
| Ampicillin                                     | Calbiochem, Frankfurt  |
| DNase I  | Boehringer, Mannheim   |
| Geneticin <sup>®</sup> (G418)                  |  |
| Hot-Start-Taq-DNAPolymerase                    | Qiagen, Hilden   |
| Oligonukleotide (Primer)                       | NAPS, Göttingen  |
| Penicillin/Streptomycin                        | Gibco BRL, Eggenstein  |
| Phosphatase, alkalische (calf intestinal), CIP | Boehringer, Mannheim   |
| Proteinase K                                   | Boehringer, Mannheim   |
| Restriktionsendonukleasen                      | Boehringer, Mannheim, Gibco BRL,<br>New England Biolabs, USA |
| Reverse Transkriptase Omniscript               | Qiagen, Hilden   |
| T4-DNA-Ligase                                  | New England Biolabs, USA                                     |
| Taq-DNA-Polymerase                             | Pharmacia Freiburg   |
| Pfu-Taq-DNA-Polymerase                         | Stratagene, Heidelberg                                       |
| Trypsin, modifiziert aus Rinderpankreas        | Boehringer, Mannheim   |
| Ultrapure dNTP Set                             | Pharmacia, Freiburg  |

### 3.1.6 Kits zur Bearbeitung von DNA

|                                     |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| FuGENE6 Transfektionsreagenz        | Roche, Mannheim                  |
| RediPrimell DNA Labeling Kit        | AmershamPharmacia, Braunschweig  |
| QIAquick DNA Purification Kit       | Qiagen, Hilden                   |
| QIA-Plasmid Mini Kit                | Qiagen, Hilden                   |
| QIA-Plasmid Midi Kit                | Qiagen, Hilden                   |
| QuickChange in-vitro-Mutagenese Kit | Stratagene, Heidelberg           |
| RNeasy Mini Kit                     | Qiagen, Hilden                   |
| Hot-Star-Taq PCR Kit                | Qiagen, Hilden                   |
| T4-Cloning Kit                      | New England Biolabs, USA         |
| ABI PRISM Dye Terminator            | Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA |

### 3.1.7 Antikörper

#### 3.1.7.1 Primärantikörper

| Name                 | Antigen                       | Immunisierte Spezies          | Aufarbeitung         | Referenz              |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|
| $\alpha$ -GFP (JL-8) | Green-Fluoresz. Protein (GFP) | Maus, monoklonal IgG2a Isotyp | Affinitäts-gereinigt | CLONTECH LABORATORIES |

#### 3.1.7.2 Sekundärantikörper/ Tertiärantikörper

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| Kaninchen anti Maus               | Dianova, Hamburg |
| Ziege anti Kaninchen, AP-Konjugat | Dianova, Hamburg |

### 3.1.8 Lektine und Streptavidin-AP-Konjugat

|  |   |
|--|---|
| biotinyliertes <i>Aleuria aurantia</i> -Lektin | Vector Laboratories (Burlingham, USA) über ALEXIS, Grünberg |
| Streptavidin-AP-Konjugat (AP-Polymer)          | Sigma, Deisenhofen  |

### 3.1.9 Radioaktive Substanzen

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP, Redivue<br>3000 Ci/ mmol                         | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| GDP-[ <sup>14</sup> C]Fukose, Ammoniumsalz<br>wässrige Lösung, 287 – 310 mCi/ mmol  | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| UDP-[ <sup>3</sup> H]Galaktose, Ammoniumsalz<br>wässrige Lösung, 9,7 –16,8 Ci/ mmol | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| [Methoxy- <sup>14</sup> C]Inulin, 0,33 MBq/ g                                       | Amersham-Buchler, Braunschweig |

### 3.1.10 Vektoren

|                  |                        |
|------------------|------------------------|
| pBluescript SKII | Stratagene, Heidelberg |
| pGEMT-Easy       | Promega, Madison, USA  |
| pLIB             | Clontech, Heidelberg   |
| pLIB-EGFP        | Clontech, Heidelberg   |
| pLNCX2           | Clontech, Heidelberg   |

### 3.1.11 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von DNA im Prokaryontensystem wurden *E. coli* Bakterien der Stämme:

1) **XL-Blue** (Genotyp: F<sup>-</sup>::Tn10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>  $\Delta$  (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal) thi hsdR17 (rKmK+) supE44 relA1 lac)

2) **DH-5a** (Genotyp: F<sup>-</sup> deoR recA1 endA1 hsdR1(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) supE44 1-thi gyrA96 relA1 verwendet.

### 3.1.12 Zelllinien

#### primäre Fibroblasten:

| Zelllinie                     | Beschreibung   | Referenz               |
|-------------------------------|--|------------------------|
| Patient A.C.                  | Primäre Fibroblasten aus einer Oberarm-Hautbiopsie des Patienten A.C.              | Marquardt et al., 1999 |
| Mutter A.C.                   | Primäre Fibroblasten aus einer Oberarm-Hautbiopsie der Mutter des Patienten A.C.   | Lübke et al., 1999     |
| Vater A.C.                    | Primäre Fibroblasten aus einer Oberarm-Hautbiopsie des Vaters des Patienten A.C.   | Lübke et al., 1999     |
| 6 Kontroll-fibroblastenlinien | Primäre Fibroblasten aus Oberarm-Hautbiopsien sechs verschiedener Kontrollpersonen |                        |

#### EBV-transformierte Lymphoblasten:

| Zelllinie                         | Beschreibung  | Referenz             |
|-----------------------------------|---|----------------------|
| Patient M.                        | EBV-immortalisierte Lymphoblasten des Patienten M.          | Lübke et al., hier   |
| Patient Y.W.                      | EBV-immortalisierte Lymphoblasten des Patienten Y.W.        | Etzioni et al., 1998 |
| Drei Kontroll-Lymphoblastenlinien | EBV-immortalisierte Lymphoblasten von drei Kontrollpersonen |                      |

#### Retrovirale Verpackungszelllinien:

| Zelllinie  | Beschreibung   | Referenz                          |
|--|--|-----------------------------------|
| FNX-Eco (ATTC, durch Prof. G. Nolan, Stanford, USA lizenziert) | Retrovirale, ecotrope Verpackungszelllinie (293T, primäre, humane Nierenepithelzellen). Stabil transfiziert mit a) Moloney GagPol-IRES-Lyt2 (Hygro-Selektion) und b) ecotrope Moloney Hüllprotein (Diphtheria-Selektion) | Nolan et al., Stanford University |
| RetroPack PT67 (Clontech)                                      | Dualtrope, retrovirale Verpackungszelllinie (NIH 3T3-Derivate); Expression des dualtropischen Hüllproteins 10A1 (DHFR-Selektion). Moloney GagPol (TK-Selektion)  | Miller et al., (1994)             |

### 3.1.13 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

10 x PBS: 80 g NaCl und 1,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

TBS: 10 mM Tris/HCL pH 7,4  
150 mM NaCl

|                        |   |
|------------------------|---|
| Hankspuffer            | 8 g NaCl<br>0,4 g KCl<br>0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>0,35 g NaHCO <sub>3</sub><br>1 g Glucose<br>wurden in 1000 ml dest. H <sub>2</sub> O gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.  |
| 50 x TAE:              | 2 MTris-Base und 100 mM EDTA wurden mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt.  |
| 20% SDS:               | 20 g Natriumdodecylsulfat wurden in 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. bei 65°C gelöst und sterilfiltriert.  |
| 0,5 M EDTA:            | 181,1 g Dinatriummethylendiaminotetraacetat x 2 H <sub>2</sub> O wurden in 800 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, der pH-Wert mit 20 g NaOH oder konzentrierter Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. |
| 10 x TE:               | 100 mM Tris/HCl (pH 7,6) und 10 mM EDTA   |
| 1 M Tris/ HCl:         | 121,1 g Tris wurden in 800 ml H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert zwischen 7,2 und 9,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.   |
| 20 x SSC:              | 175,3 g NaCl und 88,2 g Na-Citrat wurden in H <sub>2</sub> O bidest. gelöst, der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt, und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.  |
| 50 x Denhardts:        | 1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon und 1% BSA  |
| DEPC-H <sub>2</sub> O: | Dest. H <sub>2</sub> O wurde auf 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) eingestellt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und autoklaviert.   |
| PCI:                   | Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 und das Produkt wiederum 1:1 mit Phenol gemischt.   |

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschriften aus dem Laborhandbuch von SAMBROOK et al. (1989) angesetzt.

### 3.1.14 Medien zur Anzucht von prokaryontischen Zellen

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Das LB-Medium wurde bei 4 °C gelagert.

Zur Bakterienanzucht auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt. Die Agarlösung wurde in 9 cm Ø Petrischalen gegossen, bei RT abgekühlt und anschließend bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

### 3.1.15 Zellkulturmedien und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

PBS (Zellkultur):

|              |  |
|--------------|--|
| 150 mM       | NaCl   |
| 120 mM       | KCl  |
| 10 mM        | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 |
| 0,002% (w/v) | Phenolrot  |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)             | Gibco BRL, Eggenstein    |
| Fötale Kälberserum (FKS)                            | Gibco BRL, Eggenstein    |
| L-Glutamin (200 mM)                                 | Gibco BRL, Eggenstein    |
| RPMI 1640   | Seromed/Biochrom, Berlin |
| Trypsin-EDTA-Lösung                                 | Gibco BRL, Eggenstein    |
| 0,05% (w/v) Trypsin                                 |                          |
| 0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck`s Salzlösung |                          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Penicillin/Streptomycin<br>(10 000 U bzw. 10 000 µg/ml) | Gibco BRL, Eggenstein |
|---|-----------------------|

Medium für die Kultivierung von FNX-Eco- und AmphoPack PT67-Zellen (Virusmedium)



|          |                              |
|----------|------------------------------|
|          | DMEM (Gibco BRL, Eggenstein) |
| 10%      | FKS hitzeinaktiviert         |
| 2 mM     | L-Glutamin                   |
| 100 U/ml | Pen/Strep                    |

### Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum

Inkubation des gefrorenen Serums für 45 min bei 56°C in einem geschlossenen Wasserbad. Nach Abkühlen des Serums auf 37°C Zugabe zum Medium in einer Endkonzentration von 10%.

### **3.1.16 EDV**

Hardware:

|                              |                 |
|------------------------------|-----------------|
| Apple Macintosh LCII         | Apple Macintosh |
| Apple Laser Writer 16/600 PS | Apple Macintosh |
| CanoScan D660U Scanner       | Canon           |
| Epson StylusColor 680        | Epson           |
| Lexmark Optra SC 1275        | Lexmark         |
| PC-System Pentium 800        |                 |

Software:

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| Adobe-Photoshop 6.0                   | Adobe Systems Inc. |
| DNA Star (MegAlign; MapDraw; Protean) |                    |
| Windows 98                            | Microsoft          |
| Windows Office 98 (Word, Power Point) | Microsoft          |
| Image Reader                          | Fuji               |
| Image Gauge 3.0                       | Fuji               |
| Kaleidagraph Grafikprogramm           |                    |

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

Alle folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ von SAMBROOK et al. (1989) entnommen.

#### 3.2.1.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und die Konzentration der Kationen mit der angegebenen Salzlösung eingestellt:

|                  | Stammlösung: | Endkonzentration: |
|------------------|--------------|-------------------|
| Na-Acetat pH 5,2 | 3 M          | 0,3 M             |

Die DNA-Probe wurde mit 2 Vol. -20 °C kaltem Ethanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 25 min bei -70 °C, 10 min auf Trockeneis oder über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde durch 10 minütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend wurde 1 x mit 70% igem Ethanol gewaschen und wiederum 5 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde 3-5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet.

#### 3.2.1.2 Extraktion von DNA mit Phenol, Chloroform oder Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Die Extraktion mit Phenol, Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI) oder Chloroform ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäure-Präparationen. Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit einem Volumenteil der vorgenannten Lösungen gut gemischt und 3 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und weiterverarbeitet.

#### 3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Photometrische Analyse:

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm gegen TE oder H<sub>2</sub>O in einer Quarzküvette.  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ ml RNA.

### 3.2.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(LEHRACH & FRISCHAUF, 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden. Um sicherzustellen, dass die Verdauung quantitativ abläuft, wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt. Die Verdauung genomischer DNA erfolgte über Nacht.

Reaktionsansatz:

|      |  |
|------|--|
| x µg | DNA  |
| 2 µl | geeigneter 10 x Puffer (nach Angaben der Hersteller) |
| 2 U  | Restriktionsendonuklease                             |
|      | auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O auffüllen             |

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot im Agarosegel analysiert. Präparative Verdauungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt.

Als Reaktionspuffer wurde das Gibco BRL REact™ oder das New England Biolabs (NEB) Puffer-System verwendet. Diese Puffer werden von den Herstellern zusammen mit den Enzymen geliefert. Das REact™ System besteht aus 11 verschiedenen REact™Puffern; die vier sogenannten Basispuffer bestehen aus folgenden Komponenten:

REact™ 1: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl<sub>2</sub>

REact™ 2: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 50 mM NaCl

REact™ 3: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl

REact™ 4: 20 mM Tris/HCl (pH 7) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 50 mM KCl

Das NEB System besteht neben enzyspezifischen Puffern ebenfalls aus vier Basispuffern:

NEB 1: 10 mM Tris/HCl (pH 7) + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM DTT

NEB 2: 10 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM DTT + 50 mM NaCl

NEB 3: 50 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM DTT + 100 mM NaCl

NEB 4: 20 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgAc<sub>2</sub> + 1 mM DTT + 50 mM KAc

Alle angegebenen Konzentrationen sind 1 × Konzentrationen; die Puffer wurden in 10 × Konzentrationen geliefert.

### **3.2.1.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

#### **3.2.1.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien**

1 Tag vorher wurden 3 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 99 ml Medium A mit 1 - 2 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD von 0,4 - 0,6 im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und danach bei 4°C, bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann vorsichtig in 1 ml kalten Medium A resuspendiert, 2,5 ml Lösung B dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde in 200 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

100 ml Medium A: LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O + 0,2% Glucose, sterilfiltrieren!

10 ml Lösung B: 36% Glycerin, 12% PEG (MW 7500), 12 mM MgSO<sub>4</sub> in LB, pH 7,0

#### **3.2.1.5.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung**

100 µl kompetente *E. coli* XL-Blue (Herstellung s.3.2.1.5.1) wurden auf Eis aufgetaut, 1 ng ligierte Plasmid-DNA dazugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C unterzogen und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurden unter sterilen Bedingungen 500 µl LB-Medium dazugegeben und 60 min auf dem Drehrad bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50-100 µl des Transformationsansatzes auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin enthielt (entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit den am nächsten Morgen gewachsenen Kolonien wurden 5 ml LB mit 200 µg/ml Ampicillin angeimpft. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden die Platten mit 40 µl IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid; 100 mM in H<sub>2</sub>O) und 40 µl X-Gal (4% in Dimethylformamid) vorbehandelt.

### 3.2.2 Isolierung von DNA

#### 3.2.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)

(Plasmid-Handbuch, März 2000)

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

5 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin wurden mit einer transformierten *E.coli* Kolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden 5 min in der Eppendorffzentrifuge bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 250 µl kalten P1-Puffer resuspendiert, mit 250 µl P2-Puffer versetzt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert.

Nach der Zugabe von 350 µl N3-Puffer, mischen erfolgte eine Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge bei 13 000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde auf eine Qia-Prep-Minisäule gegeben und eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, auf die Säule 750 µl PE-Puffer gegeben und wieder eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen, und zum Entfernen der Ethanolreste wurde die Säule wiederum eine Minute zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte je nach gewünschter Konzentrierung der DNA mit 10 – 50 µl destilliertem Wasser.

#### 3.2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen)

(Qiagen-Handbuch April 1997)

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

|     |           |                           |
|-----|-----------|---------------------------|
| P1: | 50 mM     | Tris/HCl; pH 8,0          |
|     | 10 mM     | EDTA                      |
|     | 100 µg/ml | RNAse A                   |
| P2: | 0,2 M     | NaOH                      |
|     | 1%        | SDS                       |
| P3: | 3 M       | Kaliumacetat (KAc) pH 5,5 |

|             |        |                  |
|-------------|--------|------------------|
| QBT-Puffer: | 750 mM | NaCl             |
|             | 50 mM  | MOPS; pH 7,0     |
|             | 15%    | Ethanol          |
|             | 0,15%  | Triton X-100     |
| QC-Puffer:  | 1.0 M  | NaCl             |
|             | 50 mM  | MOPS; pH 7,0     |
|             | 15%    | Ethanol          |
| QF-Puffer:  | 1,25 M | NaCl             |
|             | 50 mM  | Tris/HCl; pH 8,5 |
|             | 15%    | Ethanol          |

Es wurden 100 ml einer Bakterienkultur bei 8500 x g im JA-10 Rotor (800 rpm) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml P1 resuspendiert, in JA-20 Röhrchen überführt, mit 4 ml P2 versetzt, vorsichtig durch Rollen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml kaltem P3 wurde neutralisiert und anschließend 10-15 min auf Eis inkubiert.

Die Suspension wurde 30 min in einem JA 20-Rotor (Beckman) bei 18.000 rpm zentrifugiert (4°C), auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen; die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt und bei 5.000 rpm (4°C) in der Labofuge für mindestens 45 min zentrifugiert. Das weiße Pellet wurde mit 70 % Ethanol in ein Eppendorfcup überführt, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch eine OD<sub>260</sub>-Messung bestimmt.

### 3.2.2.3 Isolierung genomischer DNA

(HOGAN et al., 1986)

|              |        |                    |
|--------------|--------|--------------------|
| Lysispuffer: | 50 mM  | Tris/ HCl, pH 8,0  |
|              | 100 mM | EDTA               |
|              | 100 mM | NaCl               |
|              | 1%     | SDS (autoklaviert) |

Eukarontische Zellen wurden von den Zellkulturplatten abgeschabt, pelletiert und in 0,7 ml Lysispuffer überführt. 30 µl frisch angesetzter Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml Proteinase K in Lysispuffer) wurde dem Ansatz zugegeben und dieser über Nacht im Schüttelwasserbad bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Phenol wurden die Proben eine Minute geschüttelt und 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und nochmals mit Phenol extrahiert. Anschließend folgte eine zweimalige Chloroformextraktion mit 1 Vol. Chloroform.

Die hochmolekulare DNA aus der oberen Phase wurde mit 2 Vol. Ethanol gefällt, mit einer Kanüle oder Pasteurpipette entnommen, mit 70% Ethanol gewaschen und etwa 2 Min. bei RT getrocknet. Je nach Menge der DNA wurde sie in 200 - 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Nach 90 min Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad war die DNA vollständig gelöst. Die Lagerung genomischer DNA erfolgte bei 4°C.

#### 3.2.2.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Die für die Gele benutzte Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

| Agarosekonzentration (%) | Trennbereich (kb) |
|--------------------------|-------------------|
| 0,6                      | 20 - 1            |
| 0,9                      | 7 - 0,5           |
| 1,2                      | 6 - 0,4           |
| 1,5                      | 4 - 0,2           |
| 2,0                      | 3 - 0,1           |

Proben-Puffer (LP IV): 0,25% (w/v) Bromphenolblau  
40% (w/v) Saccharose in 1 X TAE

Die erforderliche Agarose-Menge wurde in 300 ml 1x TAE aufgekocht (Mikrowelle) und nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Agarose wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die Proben wurden mit 10% Probenpuffer versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3 - 4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht

als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator analysiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

### 3.2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Qiagen)

(Qiagen Gel Extraktions Kit, Handbuch, April 1997)

Lösungen: Der Inhalt der Puffer wird von Qiagen nicht angegeben.

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht (UV-Handlampe) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Nach Zugabe von 3 Volumen QX1-Puffer wurde die Agarose durch Inkubation von 10 min bei 50°C aufgelöst. 1 Volumen Isopropanol wurde hinzugefügt und die Lösung auf eine QIAquick Zentrifugationssäule aufgebracht und für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an die Säule. Die Säule wurde dann mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

### 3.2.2.6 Ligation

Über Ligation können DNA-Fragmente in einen Vektor integriert werden. Dazu wurde der Vektor durch Inkubation mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen im Klonierungsabschnitt geöffnet, über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und der geschnittene Vektor aus dem Gel isoliert. Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach folgendem Schema:

|                  |           |   |
|------------------|-----------|---|
| Ligationsansatz: | x µl      | Vektor-DNA  |
|                  | y µl      | DNA-Fragment (3-5 molarer Überschuß)  |
|                  | 1 µl      | 10 × T4-Ligase-Puffer (Endkonzentration: 50 mM Tris/HCL ph 7,5; 10 mM MgCL <sub>2</sub> ; 10 mM DTT; 1 mM ATP, 25 µg/ ml BSA) |
|                  | 1 µl      | T4-DNA-Ligase (80 NEB-Einheiten/ µl)  |
|                  | auf 10 µl | mit Wasser auffüllen  |

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad.



### 3.2.2.7 DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion

(SAIKI et al.; 1986; SAIKI et al.; 1988)

Die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können.

Die PCR basiert auf 3 Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind.

- 1) Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- 2) Annealing = Bindung von Oligonukleotidprimern an beide Einzelstränge
- 3) Extension = Synthese der DNA durch die Polymerase ausgehend von den gebundenen Primern.

Auswahl und Konzentration der Oligonukleotid-Primer, Qualität des Templates, Pufferbedingungen, Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte, beeinflussen die Synthese der DNA. Als Template wurde genomische DNA, Plasmid-DNA oder mittels Reverser Transkription hergestellte cDNA verwendet.

#### PCR-Ansatz:

PCR-dNTP-Mix: je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
10 x PCR Puffer: 500 mM KCL, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCL ph 9,0  
Taq-DNA-Polymerase: (5U/μl)

Die für die Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente verwendeten Oligonukleotid-Primer sind im Anhang explizit mit ihren Sequenzen aufgeführt.

### 3.2.2.8 Herstellung einer cDNA über die Reverse Transkription und anschließender Amplifikation mittels PCR (RT-PCR)

(Qiagen Omniskript Reverse-Transkriptase-Handbuch, April 1999)

Die RT-PCR ist eine Methode zur Herstellung einer cDNA ausgehend von RNA mittels der Aktivität der Reversen-Transkriptase (RT). Die Reaktion verläuft in zwei Schritten, die wie folgt ablaufen:

- 1) Reverse Transkription vom 3'-Ende der RNA Matrize durch Anlagerung eines, der zu amplifizierenden Sequenz, flankierenden Primers.

- 2) Amplifikation der cDNA mittels der PCR, in der Primer eingesetzt werden, die die cDNA 3' und 5' - terminal flankieren.

### 3.2.2.8.1 Reverse-Transkription

Rnase-freies Wasser, die Omniscript Reverse-Transkriptase, RT-Puffer und dNTP's wurden von Qiagen bereitgestellt. Es wurden folgende Ansätze pipettiert:

| <u>eingesetztes Volumen/ 20 µl Ansatz</u>  | <u>Endkonzentration</u> |
|--|-------------------------|
| 2 µl 10 µM Primer (3' -terminal);          | 1 µM                    |
| 5 µl 10 x RT-Puffer;                       | 1 ×                     |
| 2 µl 5 mM dNTPs;                           | 0,5 mM dNTPs            |
| 0,5 µl Omniscript RT;                      | 4U                      |
| auf 20µl mit Rnase-freiem Wasser auffüllen |                         |

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach für 5 min bei 95°C gekocht, um die Reverse-Transkriptase zu inaktivieren. Die so hergestellte cDNA wurde dann in der nachfolgenden PCR als Ausgangsmaterial eingesetzt.

### 3.2.2.8.2 PCR mittels der Hot-StarTaq- Polymerase

(HotStarTaq PCR Handbuch, Qiagen März 1999)

In der darauffolgenden PCR wurde 2 µl des in 3.2.4.8.1 hergestellten Ansatzes eingesetzt. Die Primer liegen 3' -und 5' -terminal des zu amplifizierenden Genbereichs. Alternativ zur Taq-Polymerase kann bei Herstellung einer cDNA die sogenannte HotStarTaq-Polymerase verwendet werden, die sich durch eine höhere Spezifität auszeichnet. Bei Verwendung dieser Polymerase findet zu Beginn durch eine 15 minütige Inkubation bei 95°C ein Aktivierungsschritt der Polymerase statt, die bei niedrigeren Temperaturen in einer inaktiven Form vorliegt.

|                |         |   |
|----------------|---------|---|
| <u>Ansatz:</u> | 5 µl    | 10 × PCR Puffer                                       |
|                | 10 µl   | Q-Solution (Hersteller)                               |
|                | 2 µl    | dNTP Mix (10 mM/ dNTP)                                |
|                | 50 pmol | Primer 1  |
|                | 50 pmol | Primer 2  |
|                | 2 µl    | DNA Template auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O auffüllen |

|                  |         |      |           |
|------------------|---------|------|-----------|
| <u>Programm:</u> | 15 min  | 95°C | 1 ×       |
|                  | 15 sec  | 96°C |           |
|                  | 30 sec  | 56°C | 35 Zyklen |
|                  | 2,5 min | 72°C |           |
|                  | 10 min  | 72°C | 1 ×       |
|                  | ∞       | 4°C  |           |

### 3.2.2.9 *in vitro* Mutagenese

(Stratagene, Quick change™ *in vitro* Mutagenese Handbuch, 1998)

Die *in vitro*-Mutagenese ist eine Methode mittels derer Punktmutationen innerhalb bestimmter Genbereiche eingeführt werden können, zum Austausch von Aminosäuren oder zur Einführung neuer Restriktionsschnittstellen und Entfernung bestehender.

Die Replikation der DNA-Matrize, in die die Mutationen eingeführt werden soll, wird von der Proof-Reading-Frame-Polymerase katalysiert (PFU-Polymerase), die eine geringere Mutationsrate bei der Replikation im Gegensatz zur herkömmlichen Taq-Polymerase aufweist. Die einzusetzenden Primer müssen die gewünschten Mutationen tragen und die zu mutierende Sequenz 3' und 5' flankieren.

|                |  |                          |
|----------------|--|--------------------------|
| <u>Ansatz:</u> | 5 µl                                     | PCR-Puffer (10 ×)        |
|                | je 125 ng                                | Primer 1 und 2           |
|                | 1 µl                                     | 10mM dNTP                |
|                | 1 µl                                     | PFU-Polymerase (2,5U/µl) |
|                | auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O auffüllen |                          |

| Schritt | Zyklus | Temperatur | Zeit              |
|---------|--------|------------|-------------------|
| 1       | 1      | 95°C       | 30 sec            |
| 2       | 16     | 95°C       | 30 sec            |
|         |        | ~ 55°C     | 1 min             |
|         |        | 68°C       | 2 min/ kb Plasmid |

Nach Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz 2 min auf Eis abgekühlt. Durch Zusatz von 1 µl des Enzyms *Dpn I* (10U/ µl) direkt zum *in vitro*-Mutagenese Ansatz wird die parentale, nicht-mutierte und methylierte DNA verdaut, während die neu amplifizierte, mutierte und unmethylierte, DNA unverdaut bleibt. Der Verdau erfolgte bei 37°C für zwei Stunden. Direkt nach dem Verdau wurde 5 µl des Ansatzes in kompetente XL-Blue-Zellen transformiert und die Plasmid-DNA nach herkömmlichen Bedingungen isoliert.

### 3.2.3 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Fibroblasten und Lymphoblasten wurde das RNeasy-System der Firma Qiagen verwendet. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach dem Qiagen-Protokoll (RNeasy Handbook, 2000).

### 3.2.4 Northernblot

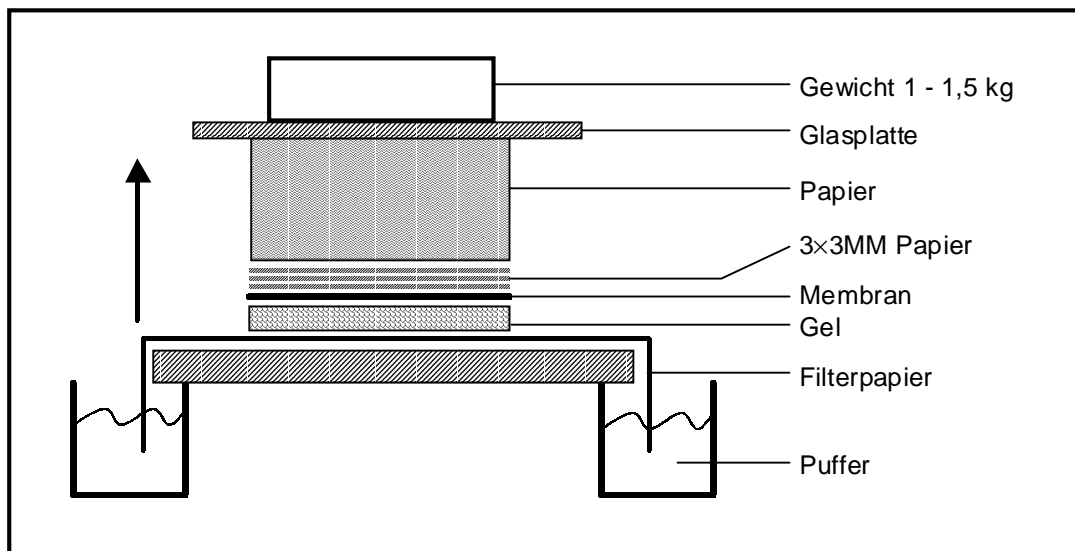
DEPC-Wasser      0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) in ddH<sub>2</sub>O  
Über Nacht rühren, autoklavieren

10 × Laufpuffer    200 mM MOPS  
                          50 mM Natriumcitrat  
                          10 mM EDTA  
                          pH 7,0 mit NaOH

5 × Ladepuffer     16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung  
                          80 µl 500 mM EDTA, pH 8,0  
                          720 µl Formaldehyd (37%)  
                          2 ml Glycerol  
                          3,084 ml Formamid  
                          4 ml 10 × Laufpuffer  
                          ad 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

|         |  |
|---------|--|
| RNA-Gel | 1 Teil 10 × Laufpuffer                         |
|         | 9 Teile DEPC-H <sub>2</sub> O                  |
|         | 1% (w/v) Agarose, aufkochen, auf 65°C abkühlen |
|         | 2% (v/v) Formaldehyd (37%)                     |
|         | 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ ml) je 100 ml Gel |

Der Northernblot wird dazu verwendet, RNA qualitativ und quantitativ zu analysieren. Dazu wird RNA der entsprechenden zu analysierenden Zellen mit Ladepuffer versetzt und bei 65°C für 5 min erhitzt. Die Proben werden auf das Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetragen und bei etwa 60 – 70 V in 4 – 5 aufgetrennt. Danach wird das Gel mit angelegtem Lineal als Längenstandard dokumentiert, und die RNA direkt auf eine Nylonmembran transferiert (Abb. 7). Durch kurze Exposition in UV-Licht (15 sec) wird die RNA an die Membran gebunden und anschließend bei 60°C getrocknet. Danach kann die Hybridisierung mit der entsprechenden radioaktiv-markierten Sonde erfolgen.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Kapillartransfers von RNA bei der Northern-Blot Analyse. Der Pfeil gibt die Richtung des Flüssigkeitsstroms an.

### 3.2.5 Markierung einer DNA-Sonde mit $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP

Zur Markierung wurden etwa 25 ng einer zu markierenden DNA-Sequenz verwendet. Die DNA wurde auf 45  $\mu\text{l}$  mit HPLC-Wasser aufgefüllt, bei 95°C 5 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wurde zu einem Aliquot des RediPrimell Labeling Kit Lyophilisats (Amersham Pharmacia) gegeben und das letztere dadurch gelöst. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -dCTP wurde kurz gemischt und 10 - 12 min bei 37°C inkubiert. Um die markierte Sonde von freien Nukleotiden zu trennen, wurde eine Gelfiltration über eine mit Sephadex-G50 gefüllte kleine Säule durchgeführt. Dazu wurde die Spitze einer 1 ml Eppendorfspitze mit Glaswolle verschlossen, in TE-Puffer gequollenes und autoklaviertes Sephadex-G50 eingefüllt und bei 3000 rpm 2 min zentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0). Der Markierungsansatz wurde mit TE-Puffer auf ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$  gebracht, auf die vorbereitete Säule aufgetragen und bei 3000 rpm 2 min zentrifugiert. Das Eluat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 1% des Volumens gezählt (Cerenkov). Die Ausbeute der Markierung wurde berechnet und ca.  $3 \times 10^6$  cpm je ml Hybridisierungsansatz eingesetzt. Zur radioaktiven Sonde wurde je ml Hybridisierungslösung 10  $\mu\text{l}$  SSP hinzugefügt, zusammen aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und zur vorinkubierten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C unter Rotation. Dann wurden die Membran  $2 \times 15$  min mit Waschlösung 1 bei RT und  $2 \times 15$  min bei  $T_m - 5^\circ\text{C}$  mit Waschlösung 2 unter leichtem Schwenken gewaschen und die Strahlungsintensität mit dem Handcounter überprüft. Lag die gemessene Strahlung unter dem Gefahrenwert von etwa 30 cpm, so wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt und die Banden durch Exposition auf Biolmager-Screens detektiert.

|                           |                                       |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 20 $\times$ SSC           | 175,3 g NaCl                          |
| (standard saline citrate) | 88,2 g Natriumcitrat                  |
|                           | ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0 |
| 50 $\times$ Denhardts     | 1% Ficoll                             |
|                           | 1% Polyvinylpyrrolidon                |
|                           | 1% BSA                                |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Hybridisierungsmix        | 72 ml Formamid<br>36 ml 20 × SSC<br>1,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5<br>1,5 g SDS<br>3 ml 50 × Denhardts<br>15 g Dextransulfat<br>ad 150 ml ddH <sub>2</sub> O |
| Salmon Sperm DNA<br>(SSP) | 10 mg/ ml Salmoniden Spermien DNA in ddH <sub>2</sub> O   |
| Waschlösung 1             | 2 × SSC mit 0,1% SDS  |
| Waschlösung 2             | 0,2 × SSC mit 0,1% SDS  |

### 3.2.6 Sequenzierung von DNA

Die DNA wurde in einem Kapillarelektrophorese Verfahren in einem DNA-Sequenzierer (Typ 310, PE Biosystems, Norwalk, USA) automatisch sequenziert. Hierzu wurde das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Bei der Durchführung der Sequenzierreaktion und der anschließenden Aufreinigung der Produkte wurde jeweils nach den Protokollen des Herstellers verfahren.

## 3.3 Zellbiologische Methoden

### 3.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37°C vorgewärmt. Im Allgemeinen erfolgte die Kultivierung der Zellen mit folgendem Medium: DMEM + 10% FKS + 1 × Penicillin/Streptomycin + 1 × Glutamin. EBV-transformierte Lymphoblasten wurden in RPMI-Medium + 10% FKS (hitze-inaktiviert) + 1 ×

Pen/Strep + 1 × Glutamin gehalten; Virale Verpackungszellen (AmphoPack PT67 und FNX-Eco) in DMEM + 10% FKS (hitze-inaktiviert) + 1 × Pen/Strep + 1 × Glutamin.

Medien zur Selektion stabil infizierter Zellen enthielten zusätzlich 335 µg/ ml G418 (Neomycin). Wobei der Selektionsdruck für 10 Tag aufrechterhalten wurde, ehe die Zellen auf Normalmedium gebracht wurden.

### 3.3.1.1 Trypsinieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (w/v) Trypsin  
0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck`s Salzlösung

Die Passagierung der Zellen erfolgte routinemäßig nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen etwa 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zur Abrundung der Zellen (mikroskopische Kontrolle) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von Serum-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und die Zellzahl pro Milliliter mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät oder zur weiteren Verarbeitung durch Zentrifugation pelletiert (1000 rpm, 5 min, Labofuge), mit 1 × PBS gewaschen und bei -20°C gelagert.

### 3.3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium: 10% (v/v) DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und in der Labofuge pelletiert (1000 rpm, 5 min, Labofuge). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C in einer Styropor-Schachtel eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.



### **3.3.1.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen**

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es etwa 1 min bei RT erwärmt und anschließend in 70% Ethanol bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 5 ml kaltes Medium (4°C) überführt und in der Labofuge 5 min bei 1000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml kaltem Medium ohne Selektionsantibiotikum resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde standardmäßig das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen sowie, falls erforderlich, Selektionsantibiotikum zuzuführen.

### **3.3.2 Transfektion mit dem FuGENE™6 Transfektionsreagenz**

(Roche, Mannheim; FuGENE™6 Transfektionsreagenz Handbuch)

Die Transfektion wurde mit adhärennten Zellen auf 6 cm-Zellkulturplatten nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden Zellen 24 – 36 h vor der Transfektion in der gewünschten Dichte auf den Platten ausgesät. Für die Transfektion wurden 3 Teile FuGENE6 Transfektionsreagenz mit 94 Teilen Serumfreiem DMEM vorsichtig vermischt und 5 min bei RT inkubiert. 2 - 4 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (0,2 – 2 µg/ µl) wurden in ein separates, steriles Eppendorfcup überführt und mit dem DMEM-FuGENE6-Mix vermischt. Der komplette Ansatz wurde für 20 – 30 min bei RT inkubiert und schließlich tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

### **3.3.3 Histochemische Methoden**

#### **3.3.3.1 Gelatinisieren von Deckgläschen und Zellkulturgefäßen**

Zur Kultivierung der FNX-Eco Verpackungszellen wurden die benötigten Zellkulturgefäße für 4-16 h bei 37°C mit steril-autoklavierter 1%iger Gelantinelösung in PBS inkubiert. Vor dem Überführen der Zellen in die Gefäße wurde die

Gelantinelösung von den Platten und Flaschen gründlich abgesaugt. Sterile Deckgläschen wurden in 24-well Platten mit der 1%igen Gelantinelösung bedeckt und für 2-12 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Deckgläschen steril unter der Hood auf der 37°C-Heizplatte getrocknet. Dieses so präparierten Deckgläschen konnten sofort verwendet werden oder für einige Tage steril bei 4°C gelagert werden.

### 3.3.3.2 Histochemische Anfärbung von primären, humanen Fibroblasten mit dem Fukose-spezifischen *Aleuria aurantia* Lektin

|                     |  |
|---------------------|--|
| Fixierungsmittel:   | Aceton/ Methanol (1:1)   |
| Lektin:             | 2 mg/ ml biotinyliertes <i>Aleuria aurantia</i> -Lektin in PBS   |
| Streptavidin-AP:    | 1 mg/ ml Streptavidin-AP Konjugat in PBS   |
| AP-Puffer:          | 0,1 M Tris/ HCl pH 9,5<br>0,1 M NaCl<br>5 mM MgCl <sub>2</sub>   |
| Entwicklungslösung: | siehe AP-Puffer<br>0,4 mM Nitroblau-tetrazolium (NBT)<br>0,38 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidinum<br>(BCIP)<br>2 mM Levamisol |

Die benötigte Anzahl retroviral transduzierter Patientenfibroblasten, nicht-infizierter Patientenfibroblasten bzw. Kontrollfibroblasten wurden für mehrere Tage in den entsprechenden Zellkulturgefäßen (24-well-Platten mit gelantinierten Deckgläschen, 6-well Platten, 10 cm oder 15 cm Ø Zellkulturplatten) kultiviert, ehe die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden. Zur Fixierung wurden die Zellen für 3 min bei RT mit Aceton/ Methanol (1:1) überschichtet und vorsichtig geschwenkt. Nach dem Absaugen des Fixierungsmittels wurden die Zellen für 10 min an der Luft getrocknet und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Zellen mit filtriertem (0,2 µm Filter, Sartorius) PBS/ 1% BSA für 45 min bei RT unter leichtem Schwenken blockiert. Die Markierung der Zellen erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation mit filtriertem 2 µg/

ml biotinylierten *Aleuria aurantia* Lektin in PBS/ 1% BSA bei RT. Im Anschluss an die Markierung wurden die Zellen viermal für 2 min mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Lektine zu entfernen. Zum Nachweis des Lektins wurden die Zellen für 30 min mit 2 µg/ ml Alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppeltem Streptavidin in PBS/ 1% BSA bei RT inkubiert. Zum Farbnachweis markierter Zellen wurden die Ansätze wiederum viermal für 2 min mit PBS gewaschen, 10 min in AP-Puffer äquilibriert und für 5 - 10 min bei RT mit der Entwicklungslösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Durch die Umsetzung des Nachweissubstrats bilden sich violette Präzipitate an *Aleuria*-markierte Zellstrukturen. Bei Versuchen, in denen die Zellen direkt auf Zellkulturschalen fixiert und markiert wurden, konnten die Platten nach dem Trocknen für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden. Deckgläschen mit *Aleuria*-markierten Fibroblasten wurden nach dem Abstoppen der Reaktion mehrere Male in H<sub>2</sub>O und einmal in 100% Ethanol getaucht und nach dem Trocknen auf Objektträgern in Mowiol eingebettet.

### **3.3.3.3 Histochemische Färbung von primären, humanen Fibroblasten nach einer Infektion mit dem „Enhanced Grün fluoreszierenden Protein“ Reporter gen im pLIB-Vektor**

Fixierungsmittel, Puffer und AP-Nachweisreagenz, siehe 3.3.2.2

1. Antikörper-SL:            α-GFP (Clontech; Maus IgG2a Isotyp); 1 mg/ ml
2. Antikörper-SL:           Kaninchen-α-Maus (Dianova); 10 mg/ ml
3. Antikörper-SL:           Ziege-α-Kaninchen, AP-Konjugat (Dianova); 1 mg/ ml

Primäre, humane Fibroblasten, die mit dem Reporter gen Plasmid pLIB-EGFP infiziert wurden, konnten aufgrund eines hohen Streulichtanteils nicht direkt im Fluoreszenzmikroskop bezüglich ihrer Transduktionseffizienz analysiert werden. Stattdessen wurden die Zellen wie bei der *Aleuria aurantia* Markierung mit Methanol/ Aceton fixiert und für 60 min bei RT mit 2 µg/ ml α-GFP Antikörper in PBS/ 1% BSA markiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Fibroblasten für 45 min bei RT mit 2 µg/ ml Kaninchen-α-Maus Sekundärantikörper in PBS/ 1% BSA inkubiert und danach wiederum dreimal gewaschen. Mit dem AP-gekoppelten Ziege-

$\alpha$ -Kaninchen Nachweisantikörper (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS/ 1% BSA) wurden die Ansätze für weitere 45 min bei RT inkubiert, bevor die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer äquilibriert wurden. Die Ansätze wurden für die Färbereaktion mit dem Nachweisreagenz (NBT/ BCIP in AP-Puffer mit Levamisol) bei 37°C für etwa eine Stunde inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen der fixierten Fibroblasten mit PBS wurde die Reaktion abgestoppt. Die getrockneten Zellen konnten für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

(LOWRY, 1951)

- Lösung 1:            100 Teile  3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 N NaOH  
                         1 Teil  4% NaK-Tartrat  
                         1 Teil  2%  $\text{CuSO}_4$   
                         die einzelnen Bestandteile kurz vor Gebrauch mischen
- Lösung 2:            Folin-Ciocaltus Phenolreagenz 1:2 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnen
- Lösung 3:            1 mg/ ml BSA in  $\text{H}_2\text{O}$

10  $\mu\text{l}$  eines Zellextraktes und 5, 10, 20  $\mu\text{l}$  Lösung 3 (Standard) werden mit 1 N NaOH auf 100  $\mu\text{l}$  gebracht, mit 1 ml Lösung 1 für 10 min bei RT inkubiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Lösung 2 versetzt (Farbreaktion). Die Ansätze werden für weitere 10 min bei RT inkubiert, ehe sie bei  $\text{OD}_{660\text{ nm}}$  gegen 1 N NaOH im Spektralphotometer gemessen werden. Die Extinktion der Zellextrakte werden zu denen des Standards ins Verhältnis gesetzt und so die Proteinmenge bestimmt.

### **3.4.2 Ernten und Aufschluß von primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten**

Puffer A: 0,25 M Sucrose in 3 mM Imidazol, 1 mM EDTA pH 7,4

Puffer B: 0,25 M Sucrose in 3 mM Imidazol pH 7,4

Die Zellaufarbeitung fand bei 4°C im Kühlraum statt. Konfluente Kulturschalen mit primären, humanen Fibroblasten wurden zunächst 3 × mit eiskaltem Hankspuffer gewaschen und danach für 30 sec mit eiskaltem Puffer A inkubiert. Dies bewirkt ein Quellen der Zellen und erleichtert den Aufschluss der Zellen im Dounce-Homogenisator. Die Zellen wurden in Hankspuffer von den Platten abgeschabt und zum Pelletieren in der Labofuge GL bei 500×g für 5 min in ein 10-ml Röhrchen überführt. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem Puffer B resuspendiert und mit circa 25 Hüben im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 1000×g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um die Zellkerne und nicht-aufgeschlossene Zellen von dem ersten Post-nukleären Überstand (PNS1) zu trennen. Das verbleibende Pellet wurde wie zuvor in 2 ml Puffer B resuspendiert und homogenisiert, um einen zweiten Überstand (PNS2) zu erhalten. Bei dem Aufschluss von Lymphoblasten aus der Suspensionskultur wurden die Zellen 3 × durch Zentrifugation und Resuspendierung mit eiskaltem Hankspuffer gewaschen, ehe sie direkt wie Fibroblasten homogenisiert wurden, um zwei Post-nukleäre Überstände zu erhalten.

### **3.4.3 Präparation Golgi-angereicherter Fraktionen aus primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten**

(Leelavathi et al, 1970)

Golgi-angereicherte Vesikel aus Fibroblasten bzw. Lymphoblasten zur Bestimmung der Zuckernukleotid Transport Aktivität (siehe 3.4.4) wurden aus zwei konfluenten 15-cm Zellkulturplatten (~ 3 – 6 mg Gesamtprotein des Homogenats) bzw. dicht gewachsenen Lymphoblasten Suspensionskulturen (~ 5 – 8 mg Gesamtprotein des Homogenats) präpariert. Zellernte und Aufschluß erfolgten wie unter 3.4.2 beschrieben. Die beiden resultierenden Post-nukleären Überstände wurden gepoolt

und vorsichtig zur Dichtegradientenzentrifugation auf 5 ml eines Sucrosekissens aus 1,3 M Sucrose, 3 mM Imidazol pH 7,4 in einem SW-40 Polyallomer Röhrchen gegeben. Die Zentrifugation erfolgte für 70 min bei 4°C mit 100.000×g in einem SW-40-Rotor (Beckman Instruments). Die Golgi-angereicherten Vesikel sammelten sich an der 0,25 – 1,3 M Sucrose Interphase und konnten mit einer Pasteurpipette als Membranfeld (MF) geerntet werden. Aliquots der einzelnen Anreicherungsschritte sowie des Membranfelds wurden für eine Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt.

#### **3.4.4 Bestimmung der GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose und UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose Import Aktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln von primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten**

(Perez und Hirschberg, 1987)

Puffer C:                    10 mM Tris/ HCl pH7,5  
                                  150 mM KCl  
                                  1 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                  und zum Transportassay mit 3 µM GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose oder 0,5 µM  
                                  UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose supplementiert

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 140 µl der Golgi-angereicherten Vesikel (75-160 µg Protein) zu 330 µl Puffer C gestartet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ansätze unter Standardbedingungen (3 µM GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose oder 0,5 µM UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose) 10 min bei 30°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 0,8 ml eiskalter Puffer C ohne radioaktiv-markierte Zuckernukleotide zu dem Ansatz gegeben und sofort zum Pelletieren der Vesikel bei 100.000×g für 30 min bei 4°C im TLA-45 Rotor (Beckman Instruments) zentrifugiert. Um den Background unspezifisch an Vesikel gebundener, radioaktiv-markierter Zuckernukleotide zu bestimmen, wurden t<sub>0</sub>-Werte mitgeführt, die direkt vor der Zentrifugation bei 4°C pipettiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und zur Bestimmung der tatsächlich eingesetzten Radioaktivität im Puffer C verwendet [S<sub>M</sub>]. Das Pellet wurde dreimal mit eiskaltem Puffer C gewaschen (100.000×g, 10 min, 4°C im TLA-45-Rotor) und anschließend in 0,5 ml Lysispuffer (50 mM Tris/ HCl pH 8,8 mit 5 mM EDTA, 2% SDS) durch Ultraschall für 4 × 30 sec resuspendiert und solubilisiert. Die

freigesetzte Radioaktivität des Pellets stellt die importierte Menge an Zuckernukleotid dar [ $T_T$ ]. Durch eine anschließende Säurefällung mit 50  $\mu$ l 20% TCA, 1% Phospho-Wolfram-Säure in 0,5 N HCl konnte die importierte Zuckernukleotidmenge in zwei Komponenten differenziert werden: Eine Säure-fällbare Komponente, die den Anteil an auf Makromoleküle transferierte Zuckernukleotide enthielt [T] und den Importanteil löslicher GDP- $^{14}$ C]Fukose bzw. UDP- $^3$ H]Galaktose im Golgi [ $S_T$ ], die durch die Säurefällung nicht präzipitierbar war. Der lösliche Anteil wurde nach der Fällung über Nacht und Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 4°C in der Eppendorffzentrifuge als Überstand abgenommen und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Das Pellet aus fällbarem Material wurde dreimal mit 500  $\mu$ l 20% TCA, 1% Phospho-Wolfram-Säure in 0,5 N HCl gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 0,2 ml 2,5 N NaOH aufgenommen und für 10 min bei 95°C resuspendiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurde mit 0,6 ml H<sub>2</sub>O und 0,2 ml Eisessig neutralisiert und die Proben zur Bestimmung der importierten Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit überführt und vermessen.

### **3.4.5 Bestimmung der GDPase Aktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln der primären, humanen Fibroblasten und EBV-immortalisierten Lymphoblasten**

(Ames, 1966)

|                     |   |
|---------------------|---|
| Puffer D:           | 20 mM Imidazol pH 7,4<br>2 mM CaCl <sub>2</sub>   |
| Puffer E:           | siehe Puffer D<br>+ 0,1% Triton X-100   |
| Puffer F:           | siehe Puffer E<br>+ GDP als Substrat  |
| Entwicklungslösung: | a) 10% Ascorbinsäure in H <sub>2</sub> O (frisch ansetzen)<br>b) 0,42% Ammoniummolybdat $\times$ 4 H <sub>2</sub> O in 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |

Kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1 Teil a) mit 6 Teilen b) mischen

Zur Präparation von Golgi-angereicherten Membranen zur Bestimmung der GDPase Aktivität im Golgi wurden Fibroblasten einer konfluenten 15-cm Platte dreimal mit Hankspuffer gewaschen und mit 1 ml Puffer D von der Platte abgeschabt. Die Zellen wurden durch 25maliges Passagieren durch eine 22G-Kanüle homogenisiert. Kerne und intakte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3200 rpm in der Eppendorffzentrifuge pelletiert und der resultierende Post-nukleäre Überstand (PNS) in ein Ultrazentrifugen-Eppendorffgefäß überführt. Die Membranen des PNS wurden durch Zentrifugation bei 100.000×g bei 4°C, 30 min im TLA-100.3-Rotor als Pellet gesammelt und vorsichtig in 300 µl Puffer D resuspendiert. Von den einzelnen Zwischenschritten wurde Aliquots zur Proteinbestimmung nach Lowry entnommen. Etwa 20 µg der resuspendierten Membranen wurden mit Puffer F auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht, wobei sich die Substratkonzentration (GDP) und Inkubationszeiten nach dem Versuchsaufbau richteten. Zudem wurden Substratleerwerte und Enzymleerwerte mitgeführt, um den Hintergrund an freiem Phosphat in den Ansätzen zu bestimmen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl 5%iger SDS-Lösung abgestoppt und anschließend mit 180 µl Puffer E auf ein Volumen von 0,3 ml gebracht, ehe 0,7 ml Entwicklungslösung (s.o.) hinzugefügt und die Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Die Auswertung der kolorimetrisch erfassten Phosphatfreisetzung als Indikator der GDPase Aktivität erfolgte am Photometer bei 820 nm, wobei eine OD<sub>820 nm</sub> von 0,26 einer freigesetzten Phosphatmenge von 10 nmol entspricht.

### **3.4.6 Bestimmung der Galaktosyl-Transferase Aktivität in Zellhomogenaten, Post-nukleären Überständen (PNS) und Golgi-angereicherten Vesikeln**

(Brändli et al, 1988)

Puffer G:            10 mM Tris/ HCl pH 7,4  
                         0,25 M Sucrose  
                         0,5 % Triton X-100  
                         1 mM EDTA

Substratmix:        87 µl 0,5 M Tris/ HCl pH 7,4



(15 Ansätze)            260 µl H<sub>2</sub>O  
                              75 µl 0,2 M MnCl<sub>2</sub>  
                              15 µl UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose als [<sup>3</sup>H]Galaktose-Donor  
                              7,5 µl 0,2 M ATP  
                              12 mg/ ml Ovalbumin als [<sup>3</sup>H]Galaktose-Akzeptor

Um die Anreicherung von Golgi-Vesikeln aus Zellhomogenaten zu bestimmen, wurde die Galaktosyl-Transferase Aktivität in den Zellhomogenaten, PNS und Golgi-angereicherten Vesikeln des Membranfelds bestimmt. Dazu wurden 5 µl der Aliquots der einzelnen Anreicherungsschritte mit 95 µl Puffer G verdünnt und 20 µl dieser verdünnten Proben mit 30 µl des Substratmix für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml einer 10%igen, frisch angesetzten TCA-Lösung abgestoppt und über Nacht bei 4°C gefällt. TCA-fällbares Material der Proben wurde durch Zentrifugation bei 14.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge präzipitiert, und das resultierende, weiße Pellet wurde dreimal mit eiskalter, frisch angesetzter 5%iger TCA-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 0,2 ml 2,5 N NaOH aufgenommen und für 10 min bei 95°C resuspendiert. Abschließend wurden die Proben mit 0,6 ml H<sub>2</sub>O und 0,2 ml Eisessig neutralisiert und in Szintillationsflüssigkeit überführt, um die auf das Ovalbumin transferierte [<sup>3</sup>H]Galaktose in den Proben zu bestimmen. Die Galaktosyl-Transferase Aktivität der Ansätze wurde um die eingesetzte Proteinmenge und die spezifische Radioaktivität der eingesetzten UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose normalisiert, um die spezifische Aktivität in pmol transferierter [<sup>3</sup>H]Galaktose/ mg Protein/ min zu berechnen.

## 3.5 Methoden zur Arbeit mit Retroviren

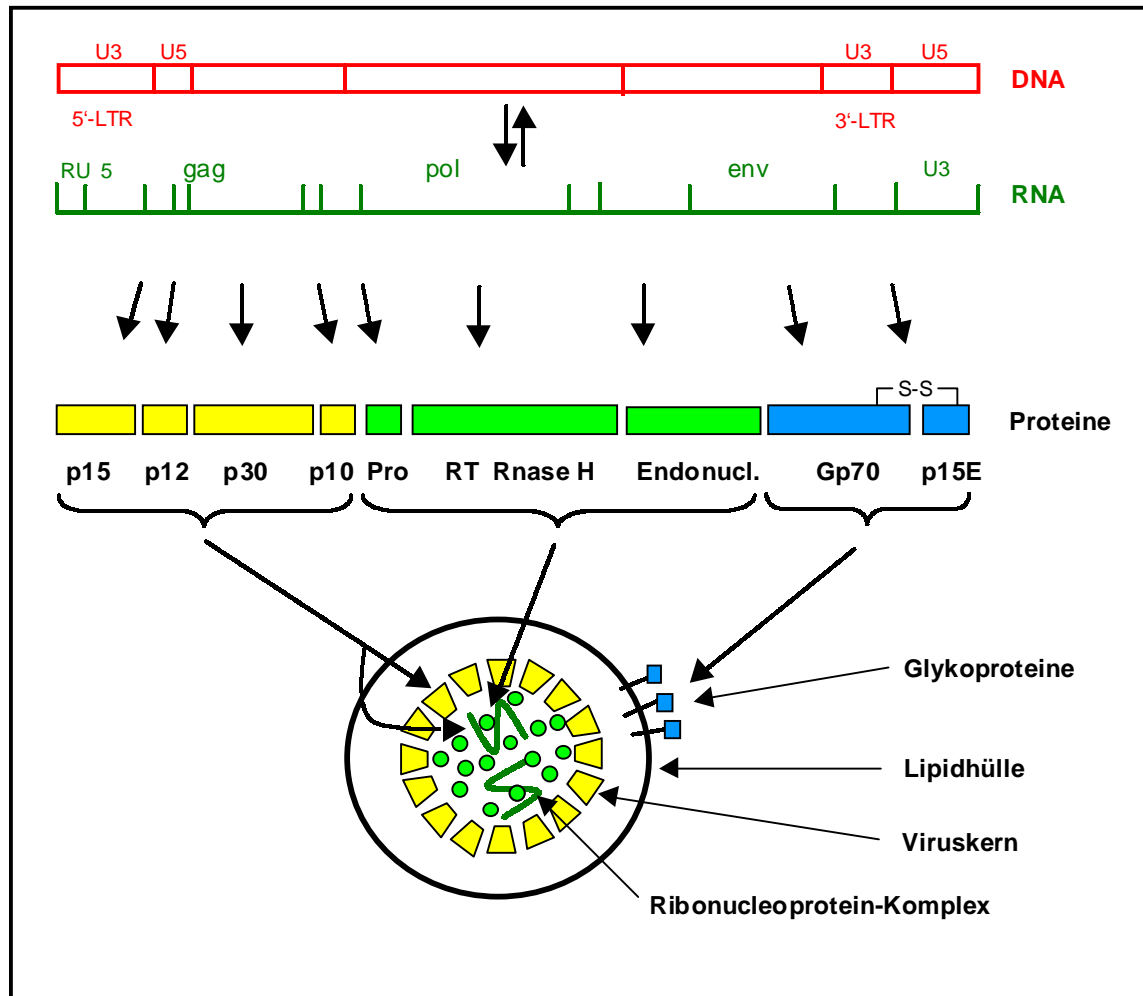
### 3.5.1 Taxonomie der Retroviren

Untersuchungen zur Erforschung der Retroviren begannen schon um 1910 mit den Arbeiten von Rous, Ellermann und Bang. Sie konnten zeigen, dass zellfreie Extrakte aus Tumorzellen von Hühnern nach Injektion in gesunde Tiere zur Ausbildung von Tumoren führten. Retroviren sind im Tierreich weit verbreitet und ihre Erforschung hat tiefe Einblicke in die Genetik der Eukaryonten und vor allem zum Verständnis der Krebsentstehung beim Menschen ermöglicht. Bekannte Retroviren der Primaten sind das HIV (human immune deficiency virus), das an der Entstehung von AIDS (acquired immune deficiency syndrome) beteiligt ist und die HTLV I und II (human T cell leukemia virus), die eine seltene Form der Leukämie im Menschen verursachen können. Retroviren können „horizontal“ durch Infektion weitergegeben werden, aber auch „vertikal“ durch Vererbung über die Keimbahn. Die Bezeichnung eines Retrovirus leitet sich meist aus der Art des Tumors und dem Wirtsorganismus ab. Zudem wird zur genaueren Bezeichnung oft der Name des Entdeckers des Virus hinzugefügt. So wird ein Virus, das in der Maus eine Leukämie auslösen kann (mouse leukemia virus, MLV) aufgrund des Vorkommens mehrerer solcher Viren nach seinem Entdecker J.B. Moloney, der dieses Virus 1960 erstmals beschrieb, Moloney-MLV (MMLV) genannt.

### 3.5.2 Struktur der Retroviren

Alle Retroviren enthalten zwei identische RNA-Stränge als Genträger, die wie typische eukaryontische mRNAs am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz tragen. Die RNA besteht aus etwa 8000 Nukleotiden und enthält drei Genbereiche: gag, pol und env (Abb. 8). Die ganze RNA wird von zwei „long terminal Repeats“ (LTRs), die aus Folgen von etwa 70 Nukleotiden bestehen, flankiert. Am 5'-Ende befindet sich das 5'-LTR, das als Promotor dient; am 3'-Ende befindet sich das 3'-LTR, welches das Poly-A-Signal beinhaltet. Neben der RNA besteht das Viruspartikel aus mehreren Reversen Transkriptase Molekülen und tRNA, die als Primer für die Synthese des ersten cDNA-Stranges dienen. Die entstehende cDNA wird zunächst zirkularisiert und wird schließlich durch die Aktivität der Virus-kodierten Integrase (Endonuclease) in das Genom der Wirtszelle integriert, so dass Tochterzellen bei folgenden Zellteilungen die virale Sequenz vererbt bekommen (endogene Proviren). Die

integrierte Virus-DNA wird wie zelluläre Gene von der RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert. Die Transkriptionsprodukte können als mRNA für die Expression viraler Gag-, Env- und Pol-Proteine dienen oder können als virale RNAs in Virushüllen verpackt werden.



**Abb. 8:** Schematische Übersicht zur Struktur eines Retrovirus. Die RNA des Retrovirus kann in der infizierten Zelle drei Funktionen übernehmen: Sie kann als Matrize für die Synthese einer DNA-Kopie dienen, die Rolle einer mRNA übernehmen oder in Viruspartikel verpackt werden. Transkripte des gag-Gens werden als Polyproteine translatiert und durch eine Protease in vier Bestandteile zerlegt, die man nach ihrem Molekulargewicht als p15, p12, p30 und p10 bezeichnet. Diese Proteine sind Bausteine der inneren Virushülle (gelb). Der pol-Polyprotein wird analog dem gag-Polyprotein in drei Proteine zerlegt (grün): In eine Protease, eine Reverse Transkriptase (+ RNase H) und eine Endonuclease (Integrase). Die env-Sequenz kodiert zwei Proteine, die als Spaltprodukte aus einem Polyprotein hervorgehen, aber durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (blau). Das fertige Viruspartikel entsteht durch die Anlagerung des fertigen Viruskerns von innen an die Zellmembran der Wirtszelle. Die Membran stülpt sich aus und umkleidet den Viruskern als Lipidhülle, in die virale Env-Proteine eingebaut sind.

### 3.5.3 Infektionsweg von Retroviren

Das retrovirale Partikel bindet an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der Wirtszelle und fusioniert mit der Ziellmembran, um den Viruskern in das Zytoplasma der Zielzelle zu entlassen. Das Vorhandensein der Rezeptoren entscheidet darüber, ob ein Viruspartikel eine Zelle zu infizieren vermag (Tropismus). Die RNA des infizierenden Virus wird von der mitgebrachten Reversen Transkriptase im Zytoplasma der Wirtszelle in DNA umgeschrieben. Die DNA gelangt in den Zellkern und wird dort mit Hilfe der Virus-eigenen Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut (Abb. 9). Die integrierte Virus-DNA verhält sich wie ein zelluläres Gen. Sie kann von einer Zellgeneration zur nächsten weitergegeben werden und von der zelleigenen RNA-Polymerase II transkribiert werden. Die Transkripte dienen als mRNA zur Herstellung von Virus-Proteinen oder als Genom neuer, abknospender Viruspartikel.

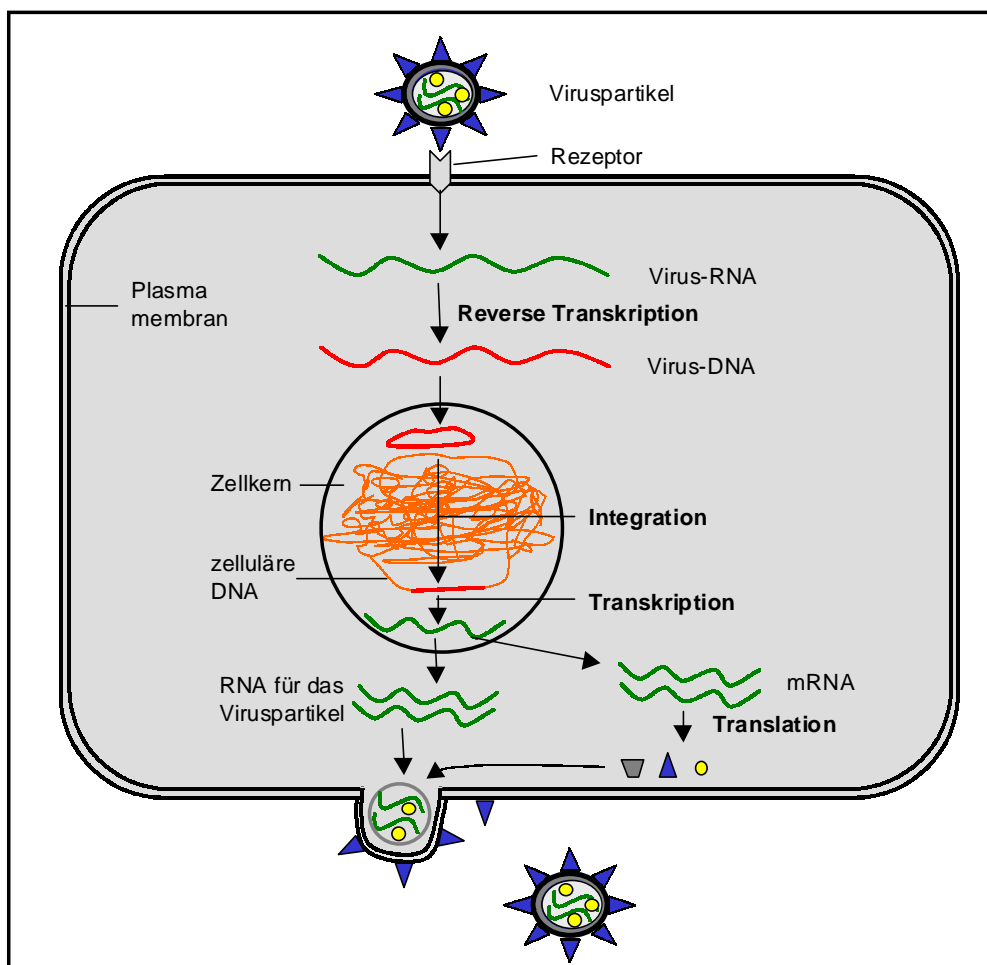
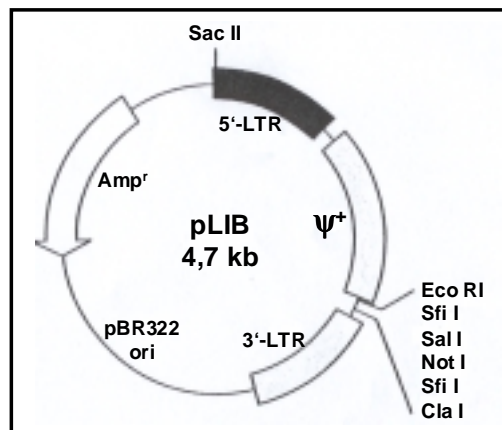


Abb. 9: Infektionsweg eines Retrovirus (aus Knippers, Molekulare Genetik).

### 3.5.4 Vorstellung des retroviralen Gentransfersystems

(Retroviral Gene Transfer and Expression User Manual, Clontech)

Der Gentransfer in Eukaryonten-Zellen mit Hilfe von retroviralen Partikeln stellt eine Alternative zu den klassischen Methoden (z.B. das Lipofektin-System oder die Calcium-Phosphat-Technik) des Gentransfers dar. Anwendung findet die retrovirale Gentransfermethoden, wenn die entsprechenden Zielzellen nicht über klassische Methoden zu transfizieren sind oder nicht ausreichend hohe Transfektionseffizienzen liefern. Die breite Wirtsspezifität moderner retroviraler Gentransfersysteme bietet den Vorteil, dass selbst schwerst zu transfizierende primäre Zelllinien effektiv mit dem Gen der Wahl zu transduzieren sind, vorausgesetzt, die Zellen sind teilungsaktiv. Ein weiterer Vorteil des Systems liegt darin, dass eine transferierte DNA-Sequenz in einfacher Kopienzahl stabil in das Genom der Zielzellen integriert. Für die Expressionsklonierung einer cDNA, die den GDP-Fukose Import Defekt in den CDG-IIc Patientenfibroblasten komplementiert, wurde ein retrovirales Gentransfersystem der Firma Clontech bezogen. Aus Sicherheitsgründen besteht dieses retrovirale Gentransfersystem aus zwei Komponenten: Zum einen aus einem retroviralen Vektor (pLIB), der neben den retroviralen Long terminal repeats (LTRs) des Moloney Maus Leukämie Virus (MMLV) das retrovirale MMLV-Verpackungssignal zwischen den LTRs trägt. Des weiteren befindet sich, von den LTRs flankiert, eine cDNA-Bank im Vektor, die über eine artifizielle NotI-Schnittstelle in den retroviralen Vektor kloniert ist. Zur Propagierung bzw. Selektionierung in *E.coli*-Bakterien besitzt der Vektor noch ein pBR322-Replikationsursprung bzw. das prokaryontische Selektionsmarkergen Amp<sup>r</sup> (Abb. 10).



**Abb. 10:** Karte des retroviralen pLIB-Vektors. Das Rückgrat des Vektors besteht aus Teilen des Moloney Maus Leukämie Virus (MMLV): 5'-LTR,  $\psi^+$ -Verpackungssignal und 3'-LTR. RNA des Vektors kann in infektiöse, jedoch Replikations-inkompetente Partikel verpackt werden.

Wie in der Vektorkarte des pLIB-Vektors exemplarisch gezeigt wird, fehlen dem retroviralen Vektor die essentiellen viralen Gene gag, pol und env. Die Genprodukte Gag, Pol und Env werden von der zweiten Komponente des Gentransfersystems den Verpackungszelllinien in „trans“ exprimiert und zur Verfügung gestellt. Die Deletion der viralen Sequenz aus dem Bereich zwischen den LTRs erfüllt zwei Aufgaben. Zum einen können ausschließlich retrovirale Verpackungszelllinien, die die viralen Strukturproteine stabil exprimieren, nach einer Transfektion oder Infektion mit einem retroviralen Vektor infektiöse, retrovirale Partikel herstellen. Andere Zellen wie primäre, humane Fibroblasten dagegen, können infiziert und mit Hilfe der im Viruspartikel mitgebrachten Reversen Transkriptase und Integrase transduziert werden; jedoch sind diese Zellen nicht in der Lage wiederum selber virale Partikel zu produzieren.

Zum anderen kann durch die Deletion der viralen Gene eine retroviral zu transferierende DNA-Sequenz in den Vektor inseriert werden. Die maximale Aufnahmekapazität an RNA in retrovirale Partikel liegt bei 8,5 kb. Durch die Bereitstellung der Strukturproteine in trans durch die Verpackungszellen können DNA-Sequenzen bis maximal 5 kb in den pLIB-Vektor integriert werden. Für die Expressionsklonierung der cDNA, die den Fukosylierungsdefekt in Fibroblasten des

Patienten A.C. komplementiert, ist es wichtig, auch große cDNAs in der pLIB-basierenden Bank zu repräsentieren. Aus diesem Grund wurde bei der Klonierung des Bankplasmids auch auf ein ko-integrierendes, eukaryontisches Markergen verzichtet. Verpackungszelllinien sind für die Bereitstellung der retroviralen Strukturproteine verantwortlich. In dem verwendeten System kommen zwei Verpackungszelllinien sequentiell zur Anwendung. Beide Zelllinien exprimieren stabil ein Moloney-MLV gag-pol Transkript, jedoch unterschiedliche Env-Proteine mit denen die retroviralen Partikel ausgestattet werden (Tropismus). Das auf der Virusmembran exponierte Env-Protein bestimmt die Wirtsspezifität eines Virus. FNX-Eco Verpackungszellen wurden durch die stabile Transfektion von humanen Nierenepithelzellen (HEK 293) von Prof. G. Nolan (Stanford, USA) generiert und zur Verfügung gestellt. Diese Zellen exprimieren das natürliche Env-Protein des Moloney-MLV, gp70 und sind somit als ecotrope Verpackungszellen charakterisiert. Die Gene gag, pol und env wurden zur stabilen Expression in den FNX-Eco Zellen voneinander getrennt und durch zwei unabhängige Transfektionen mit entsprechenden Markergenen in die HEK 293 Zellen eingebracht und selektioniert (Tab. Dm). Diese Strategie hat gegenüber der einmaligen Transfektion mit einem gag-pol-env Konstrukt den Vorteil, dass die Gefahr der Bildung von Wildtyp-Viren aufgrund von Rekombinationsereignissen minimiert ist. Mit ecotropen Virus-Überständen der FNX-Eco Zellen können ausschließlich Maus- und Rattenzellen infiziert werden. Die zweite verwendete Verpackungszelllinie basiert auf murinen NIH 3T3-Fibroblasten und entspricht somit dem Wirtsspektrum der ecotropen Virus-Überstände. Diese Zellen der Firma Clontech wurden mit einem Moloney-MLV gag-pol-Konstrukt und einem amphotropischen 10A1env-Gen transfiziert. Virale Partikel aus dem Überstand dieser Zellen besitzen durch das 10A1-Glykoprotein auf ihrer Membran eine breite Wirtsspezifität innerhalb der Säuger (Nager-, Hunde-, Katzen-, Affen- und humane Zellen). Auf der Membran der Zielzellen können zwei Rezeptoren (GALV und RAM1) zur Bindung der amphotropischen Viruspartikel fungieren (Miller et al., 1994; Tab. 4).

|                                      | <b>FNX-Eco</b><br>(Prof. G. Nolan, Stanford, USA) | <b>RetroPackPT67</b><br>(Clontech Laboratories) |
|--------------------------------------|---|---|
| <b>Zelltyp</b>                       | HEK 293   | NIH 3T3   |
| <b>Tropismus</b>                     | Ecotrop   | Amphotrop                                       |
| <b>Zielzellen</b>                    | Maus und Ratte                                    | viele Säugerzellen                              |
| <b>Hüllprotein (Env)</b>             | gp70  | 10A1  |
| <b>Rezeptor (Zielzelle)</b>          | mCAT-1  | GALV + RAM1                                     |
| <b>Selektionsmarker <sup>a</sup></b> |   |   |
| <b>Gag-pol</b>                       | Hygro <sup>r</sup>                                | TK  |
| <b>env</b>                           | Diphtheriatoxin <sup>r</sup>                      | DHFR  |

**Tab. 4:** **Verwendete Verpackungszelllinien.** Aufgrund der Ko-Integration der Selektionsmarker <sup>a</sup> mit den gag-pol- bzw. env-Genen ist eine Re-Selektion der Verpackungszellen möglich: Hygro<sup>r</sup> = Hygromycinresistenzgen; Diphtheriatoxin<sup>r</sup> = Diphtheriaresistenzgen; TK = Thymidin-Kinasegen; DHFR = Dihydrofolat-Reduktasegen

Zellkulturüberstände mit amphotropen, retroviralen Partikeln zur Infektion von primären, humanen Fibroblasten können direkt über eine pLIB-Transfektion der PT67 Verpackungszelllinie generiert werden. Höhere Virustiter im infektiösen Überstand erhält man jedoch nach einer vorgeschalteten pLIB-Transfektion der FNX-Eco Zellen. Die resultierenden ecotropen Überstände werden dann zur effizienten Infektion der PT67-Zellen verwendet. Bei direkter Transfektion der PT67 Zellen werden in Abhängigkeit zur Transfektionsmethode etwa 10 – 30% der Zellen erreicht, während etwa 40 – 60% der FNX-Eco Zellen unter identischen Bedingungen zu transfizieren sind (eigene Beobachtungen, siehe 4.5.2). Bei der darauffolgenden Infektion der PT67-Zellen mit ecotropen Überständen konnten bis zu 95% der Zellen transduziert werden, so dass die Anzahl der Zellen, die amphotrope, retrovirale Partikel bilden, gegenüber einer direkten Transfektion mindestens verdreifacht wird. Ein weiterer Vorteil infizierter



Zellen gegenüber transfizierter Zellen liegt darin, dass transduzierte Zellen nach einer Selektion wesentlich stabiler in der Expression der integrierten cDNA sind.

### **3.5.5 Vorstellung der retroviralen Leber-cDNA Bank im pLIB-Vektor**

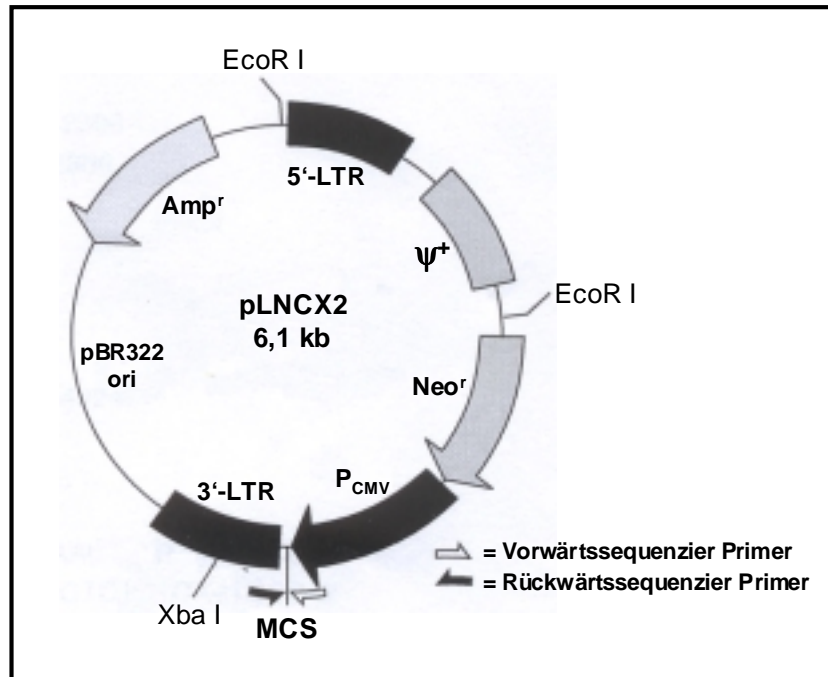
(Clontech, Retroviral cDNA Library User Manual, 1999)

Zur Expressionsklonierung der cDNA, die den Fukosylierungsdefekt in den Fibroblasten des Patienten A.C. komplementieren kann, wurde eine retrovirale, humane Leber-cDNA Bank der Firma Clontech (Cat.#: HL8005BB) bezogen. Die Bank auf der Basis des MMLV-pLIB Vektors beinhaltete  $8,0 \times 10^6$  unabhängige Klone mit einer durchschnittlichen cDNA-Insertlänge von 1,6 kb. Die Größe, der in den Vektor über die Sfi I-Schnittstellen (Abb. Em) ligierten cDNA-Inserts, variierte dabei zwischen 0,6 und 5,0 kb (Datenblatt zur Bank der Firma Clontech, Lot #: 9011128). Um die Repräsentativität der Bank zu überprüfen, wurde die Häufigkeit  $\beta$ -Aktin positiver Klone durch Kolonie-Hybridisierung bestimmt und lag bei 0,39%. Um seltene Transkripte in einer humanen cDNA-Bank zu finden, sollte ein häufiges Transkript wie  $\beta$ -Aktin mit einer Häufigkeit  $>0,1\%$  nachgewiesen werden (Hagen et al., 1988). Mittels PCR-Screening konnte zudem ein seltenes Transkript wie der Transferrin-Rezeptor amplifiziert werden (Datenblatt zur gelieferten Bank, Clontech). Um Transfektions- und Infektionseffizienzen der einzelnen Zwischenstufen zur Transduktion der humanen Fibroblasten unter dem Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen, stand ein spezielles Reporterplasmid auf der Basis des pLIB-Vektors mit einem „enhanced grün-fluoreszierenden Protein“ (pLIB-EGFP, Clontech) als Insert zur Verfügung.

### **3.5.6 Retroviraler Vektor pLNCX2 zur Herstellung stabil exprimierender Zelllinien nach einer Infektion und Selektion**

Zur stabilen Expression der komplementierenden cDNA wurden die primären Fibroblasten nach der Klonierung der entsprechenden Sequenz aus der cDNA Bank mit dem retroviralen, selektierbaren Vektor pLNCX2 (Abb. 11) transduziert. Dieser Vektor integriert neben der gewünschten Sequenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors zusätzlich das Neomycin Resistenzgen als selektierbaren Marker in das Genom der

transduzierten Zellen, so dass nach einer G418-vermittelten Selektion die Zellen verbleiben, die beide Gene ko-integrieren.



**Abb. 11:** Karte des retroviralen pLNCX2-Vektors. Das Rückgrat des Vektors besteht aus Teilen des Moloney Maus Leukämie Virus (MMLV): 5'-LTR,  $\psi^+$ -Verpackungssignal und 3'-LTR. In dem zu integrierenden Bereich zwischen den LTRs (5'  $\rightarrow$  3') befinden sich das Neomycin-Resistenzgen als selektionierbarer Marker und die Multi cloning site (MCS) zur Insertion der Zielsequenz. Das inserierte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

### 3.5.7 Produktion retroviraler Partikel zur Transduktion primärer, humaner Fibroblasten

(Nolan Lab Homepage, Stanford University, USA)

Zur Produktion retroviraler Partikel für die Transduktion primärer, humaner Fibroblasten werden 16 h vor der Transfektion  $0,75 \times 10^6$  FNX-Eco Zellen auf zuvor gelantinierten 6 cm  $\varnothing$  -Zellkulturplatten in 4 ml Virusmedium ausgesät. Die transiente Transfektion der FNX-Eco Zellen wurde, wie unter 3.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C kultiviert, bevor sie für weitere 16 – 24 h auf 33°C, 5% CO<sub>2</sub> zur Produktion viraler Partikel inkubiert wurden. Die Halbwertszeit der retroviralen Partikel verlängert sich durch die reduzierte Temperatur um etwa den Faktor drei und resultiert in höheren Virustitern. Der Überstand der FNX-Eco Zellen, der die ecotropen

Viruspartikel enthält, wurde durch einen sterilen Zellulose-Acetat 0,45 µm-Filter von abgelösten ecotropen Verpackungszellen befreit und mit 6 µg Polybrene/ ml Überstand supplementiert. Polybrene ist ein polykationisches Molekül, das die Ladungs-bedingte Abstoßung zwischen dem Viruspartikel und der Zellmembran reduziert. Zum Filtrieren der Überstände dürfen keine Filter auf Nitrozellulose-Basis verwendet werden, da dieses Material Proteine der Virusmembran binden und folglich die Viren zerstören kann. Mit dem so behandelten ecotropen Überstand wurden  $0,75 \times 10^6$  amphotrope PT67-Verpackungszellen infiziert, die 24 h vor der Infektion auf 6 cm Ø -Platten in Virusmedium ausgesät wurden. 24 h nach der Infektion werden die ecotropen Überstände von den PT67-Zellen abgenommen und die Zellen durch Trypsinieren geerntet, um sie auf 15 cm Ø zu transferieren, auf denen sie in Virusmedium für etwa 16 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Danach erfolgt der Temperaturshift für 16 h auf 33°C, bevor die ersten amphotropen Überstände gewonnen werden können. Auch diese Überstände werden filtriert und mit 4 µg Polybrene/ ml Überstand supplementiert. Die amphotropen Verpackungszellen erhalten ihrerseits frisches Medium und werden für weitere 24 h bei 33°C zur Produktion eines zweiten amphotropen Virus-Überstands kultiviert. Mit dem geernteten ersten Überstand werden die 48 h zuvor in Virusmedium ausplattierten primären, humanen Fibroblasten ( $3,0 \times 10^5$  Zellen/ 10 cm Ø Platte) ein erstes Mal infiziert. 16 h nach der ersten Infektion wird der erste Überstand von den Fibroblasten entfernt und für 8 h gegen frisches Virusmedium ersetzt. 24 h nach Abnahme des ersten amphotropen Überstands wird ein zweiter Überstand von den PT67 geerntet und wie zuvor filtriert und mit Polybrene supplementiert, um die humanen Fibroblasten ein zweites Mal zu infizieren. Diese Prozedur wiederholte sich ein bis zwei weitere Male, so dass schließlich die Fibroblasten drei- bis viermal infiziert wurden. Nach dem letzten Infektionszyklus wurden die Zellen weitere 72 h in frischem Virusmedium kultiviert. Fibroblasten, die auf ihren Fukosylierungsstatus mit dem *Aleuria aurantia* Lektin überprüft werden sollten, konnten fixiert und markiert werden. Bei Kontrollexperimenten zur Bestimmung der Transduktionseffizienz der primären, humanen Fibroblasten wurden die Zellen mit dem pLIB-EGFP Reporter-genplasmid analog der *Aleuria*-Markierung fixiert und mit einem α-GFP Antikörper markiert (3.3.3.3). Stabile Zelllinien wurden durch eine Infektion der Patientenfibroblasten mit dem Vektor pLNCX2, der das zu exprimierende Insert trug, und einer nachfolgenden Selektion der Zellen mit 0,4 mg/ ml Geneticin<sup>®</sup> (Neomycin) im Virusmedium erhalten.

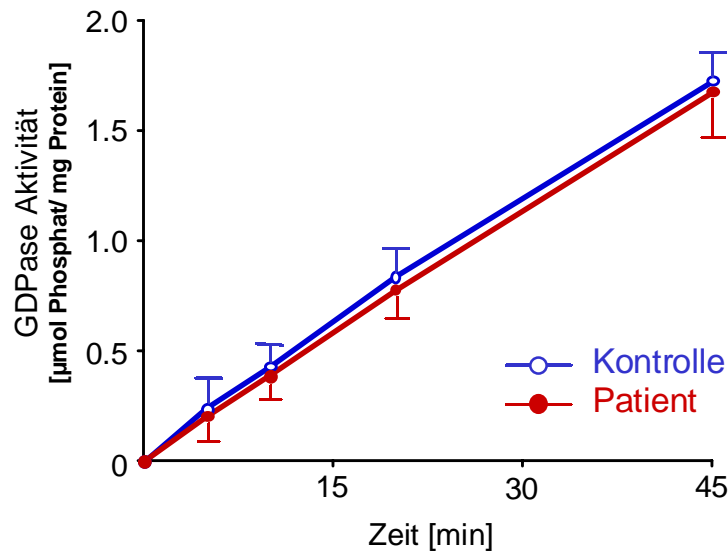
## 4 Ergebnisse

In den Vorarbeiten (siehe 1.3) konnte gezeigt werden, dass bei dem Patient A.C. ein Defekt vorlag, der sich biochemisch von den bisher bekannten LAD II-Fällen unterschied (Körner et al., 1999). Im ersten Teil der Arbeit sollte der dem neuen Patienten zugrundeliegende biochemische Defekt analysiert werden.

### 4.1 GDPase Aktivität in LAD II/ CDG-IIc Fibroblasten des Patienten A.C.

Zur Fukosylierung von Glykoproteinen muss GDP-Fukose in den Golgi importiert werden. Dabei wird GDP-Fukose im Austausch gegen das korrespondierende Nucleosid-Monophosphat GMP durch einen spezifischen Antiport-Transporter in das Lumen des Golgi transportiert. GMP entsteht luminal durch die Aktivität einer Golgi Apyrase (UDP-/GDPase) aus GDP (Hirschberg et al., 1998). Eine solche humane Apyrase wurde 1998 kloniert. Sie ist ubiquitär exprimiert, zeigt hohe Homologie (51 %) auf Aminosäureebene zu der UDPase der Hefe *S. cerevisiae* und vermag  $UDP > GDP > CDP > TDP$  mit fallender Aktivität zu hydrolysieren (Wang et al., 1998).

Um die GDPase-Aktivität dieser Apyrase in den Fibroblasten von Kontrollen und dem Patienten A.C. zu bestimmen, wurden Membranextrakte der Zellen hergestellt. Die Extrakte wurden bis zu 45 min mit 3 mM GDP bei 37°C inkubiert und das freigesetzte anorganische Phosphat zur Bestimmung der GDPase-Aktivität gemessen. In der Abb. 12 wurden die Messwerte auf den Proteingehalt normiert, wobei der Wert  $t_0$  bereits den anderen Werten ( $t_5$ ;  $t_{10}$ ;  $t_{20}$ ;  $t_{45}$ ) als Hintergrund abgezogen wurde. Für den untersuchten Zeitraum konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse des GDPs zu GMP in Patienten - und Kontrollzellextrakten nahezu linear verläuft und dass dabei Membranextrakte aus Kontroll- und Patientenfibroblasten vergleichbare GDPase-Aktivitäten aufweisen (Abb. 12). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Unterfukosylierung der Glykokonjugate bei dem Patienten A.C. durch einen verminderten GDP-Fukose Transport aufgrund einer GDPase-Defizienz hervorgerufen wird.



**Abb. 12:** GDPase Aktivität in Fibroblastenmembranen von Kontrollen und LAD II/ CDG-IIc Patient A.C.. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

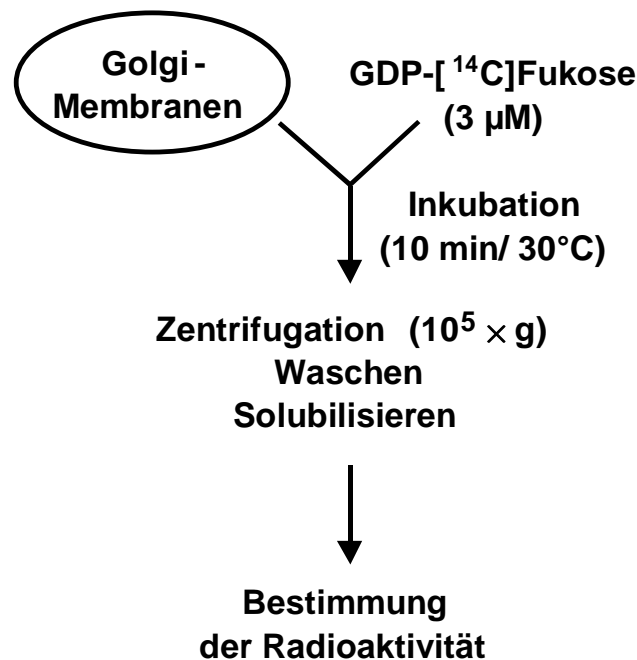
## 4.2 Zuckernukleotid Transport in LAD II/ CDG-IIc-Fibroblasten des Patienten A.C.

Die in 1.3 beschriebenen Versuche zeigten, dass Fibroblasten des Patienten A.C., GDP-Fukose in mit Kontrollfibroblasten vergleichbarer Höhe synthetisieren. Des Weiteren wurde in 4.1 gezeigt, dass aufgrund der GDPase Aktivität in den Patientenzellen ausreichend GMP als Antiportsubstrat für den GDP-Fukose Import vorliegt. Da auch ein Defekt des GDP-Fukose Transporters oder eines Transport-assoziierten Kofaktors zu einer Hypofukosylierung der Glykoproteine des Patienten führen könnte, wurde die GDP-Fukose Importaktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln aus Fibroblasten des Patienten A.C. und Kontrollen bestimmt.

### 4.2.1 Verminderter Import von GDP-Fukose in Fibroblasten (A.C.)

Golgi-angereicherte Vesikel wurden aus Kontroll- und Patientenfibroblasten nach Leelavathi et al. (1970) angereichert, wobei Pufferbedingungen, Aufschlussmethode und Zentrifugationsschritte den Fibroblasten angepasst wurden. Auf eine Subfraktionierung der Membranen in Golgi und ER konnte verzichtet werden, da nur Golgi, nicht aber ER, GDP-Fukose Transport Aktivität besitzt (Capasso et al. 1984a). Ausgehend von zwei konfluenten 15 cm-Zellkulturplatten (2,5 – 4.5 mg Protein)

wurden Golgi-angereicherte Vesikelfractionen (~ 0,6 mg Protein) isoliert. Der Transport-Assay wurde mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Perez und Hirschberg (1987) durchgeführt. Dabei werden die Golgi-Vesikel mit radioaktiv markierten Zuckernukleotiden wie GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose oder UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Pelletieren der Membranen, werden die Vesikel mehrfach gewaschen und solubilisiert (Abb. 13). Die importierten Zuckernukleotide lassen sich in zwei Komponenten unterteilen: Erstens, lösliche Zuckerderivate im Lumen der Vesikel und zweitens, auf Makromoleküle transferierte Zuckerreste. Beide Komponenten lassen sich differentiell nach einer Säure-Fällung der Makromoleküle darstellen.

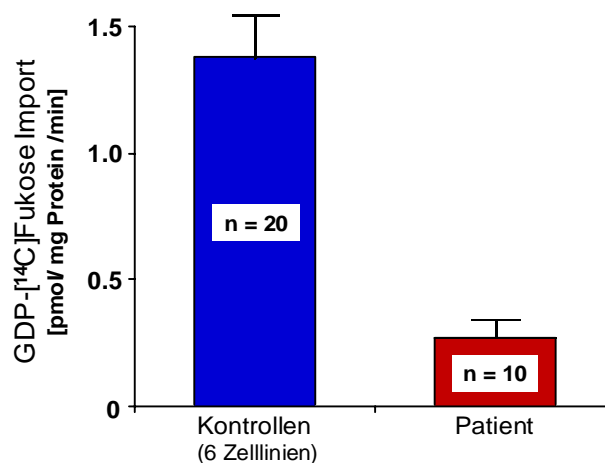


**Abb. 13:** Schematische Darstellung des Transport-Assays.

Bei der Bestimmung des importierten Zuckernukleotids müssen extraluminal mitgeführte Zuckernukleotide als Hintergrund abgezogen werden. Letzterer kann zum einen mit Hilfe eines Makromoleküls wie Methoxy-Inulin, das nicht in den Golgi importiert werden kann, bestimmt werden. Zum anderen kann man unspezifisch gebundene Zuckernukleotide dadurch erfassen, dass der Inkubationsschritt bei 30°C ausgelassen wird und die Membranen sofort nach dem Mischen mit GDP-

[<sup>14</sup>C]Fukose bei 0°C isoliert werden (Ma et al., 1997). Der Wert für die davon abgezogene extraluminale GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose betrug 0,7 – 2,0 pmol/ mg Protein/ min. In den Versuchsansätzen wurden zwischen 80 und 150 µg Protein der Membranfraktionen eingesetzt, und die Messwerte in der Auswertung auf die Proteinmenge normiert.

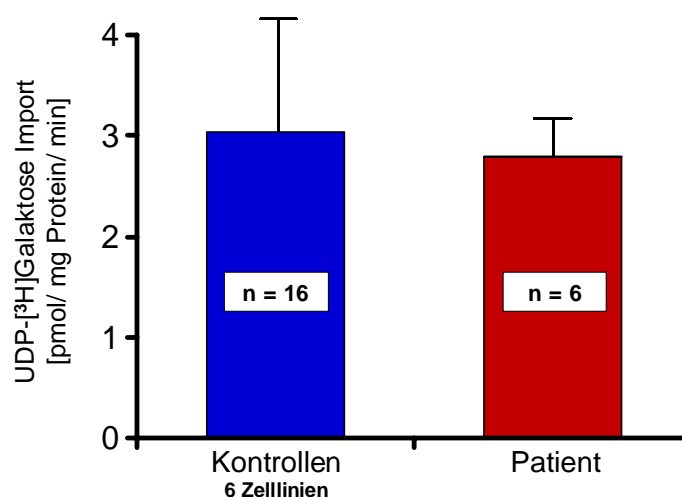
Die GDP-Fucose Import Aktivität von Golgi-Vesikeln aus Fibroblasten sechs verschiedener Kontrollpersonen lag unter Standardbedingungen [3 µM GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose; 10 min Inkubation; 30°C] bei 1,40 (± 0,25) pmol GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose/ mg Protein/ min (n = 20). Die Membranpräparationen des Patienten A.C. wiesen unter den Standardbedingungen eine Verminderung der GDP-Fucose Transport Aktivität um etwa 80% auf 0,27 (± 0,09) pmol GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose/ mg Protein/ min (n = 10) auf (Abb. 14). Der lösliche, intravesikuläre Anteil des importierten Zuckernukleotids variierte in den Präparationen der Kontrollfibroblasten zwischen 55 und 85% des Gesamtimports. Der Anteil übertragener Fukosereste lag in den Transportversuchen mit Kontrollfibroblasten bei durchschnittlich 25%. In Experimenten, in denen der Transport in Golgi-Membranen der Patientenfibroblasten ermittelt wurde, veränderte sich das Verhältnis vom löslichen Anteil zum TCA-fällbaren (transferierten) Anteil beim Gesamtimport zugunsten der transferierten Fukosylreste. So wurden in den Membranextrakten des Patienten zwischen 30 und 70% des importierten Zuckernukleotids als Substrat durch die luminalen Fukosyltransferasen auf Akzeptorproteine übertragen.



**Abb. 14:** Import von GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.). Die hier dargestellten Versuche zeigen den Import radioaktiv-markierter GDP-Fukose unter Standardbedingungen: 3 µM GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose; 10 min Inkubation bei 30°C.

#### 4.2.2 Import von UDP-Galaktose in Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.)

Der Import eines zweiten Zuckernukleotids, UDP- $^3\text{H}$ Galaktose, sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dem verminderten Import von GDP-Fukose in den Golgi der Patientenfibroblasten um einen spezifischen Defekt im Fukose-Import oder um eine allgemeinen Transportdefizienz, die auch den Transport anderer Zuckernukleotide in den Golgi beeinträchtigt, handelte. UDP-Galaktose wird wie auch GDP-Fukose in den Golgi, nicht aber in das ER importiert, wobei der Transport durch einem spezifischen UDP-Galaktose Transporter vermittelt wird (Miura et al., 1996). Der Transport-Assay unter Standardbedingungen mit  $0,5 \mu\text{M}$  UDP- $^3\text{H}$ Galaktose bei 10 Minuten Inkubationszeit und  $30^\circ\text{C}$  Inkubationstemperatur wurde analog dem Versuch mit GDP-Fukose durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass Membranpräparationen von Kontroll- und Patientenfibroblasten vergleichbar hohe UDP- $^3\text{H}$ Galaktose Transportaktivitäten aufwiesen (Abb. 15): Wurden von Kontrollfibroblasten  $3,04 (\pm 1,12)$  pmol UDP- $^3\text{H}$ Galaktose/ mg Protein/ min transportiert ( $n = 16$ ), so zeigten die Fibroblasten des Patienten A.C. ( $n = 6$ ) eine Importaktivität von  $2,8 (\pm 0,32)$  pmol UDP- $^3\text{H}$ Gal/ mg Protein/ min. Die UDP-Galaktose Transport Aktivität der Ansätze spricht für die Integrität der Vesikelpräparationen und zeigt, dass es sich bei der GDP-Fukose Transportdefizienz um einen Patienten-spezifischen Defekt handelt.

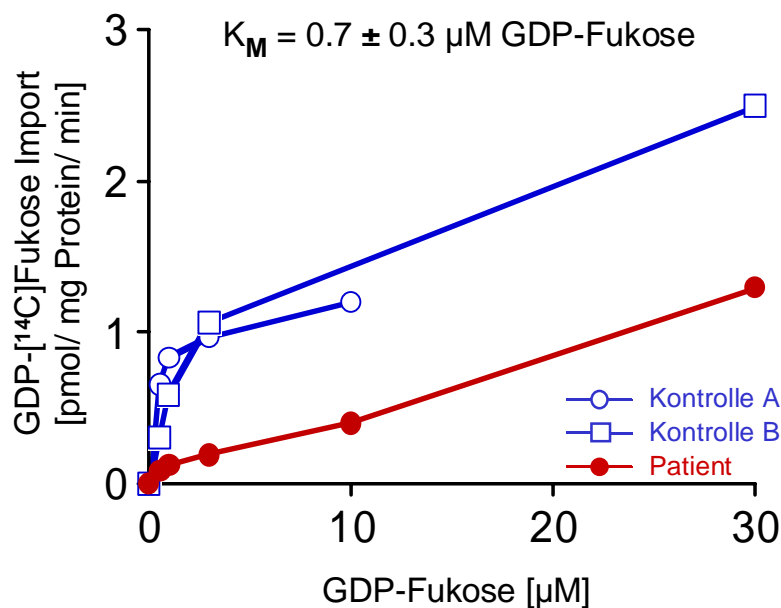


**Abb.15:** Import von UDP- $^3\text{H}$ Galaktose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.). Die hier dargestellten Versuche zeigen den Import radioaktiv-markierter UDP-Galaktose unter Standardbedingungen:  $0,5 \mu\text{M}$  UDP- $^3\text{H}$ Galaktose; 10 min Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$ .



#### 4.2.3 Dosiswirkung von GDP-Fukose auf den Import in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.)

Bei der Bestimmung des Imports in Abhängigkeit der GDP-Fukose Konzentration konnte gezeigt werden, dass der Transport aus einer sättigbaren und einer nicht-sättigbaren Komponente besteht. Unter Standardversuchsbedingungen ( $3 \mu\text{M}$  GDP-Fukose) werden bei Golgi-angereicherten Vesikeln aus Kontrollzellen etwa 85% der GDP-Fukose über den sättigbaren Transportweg, 15% über den nicht-sättigbaren Weg importiert (Abb. 16). Für die sättigbare Aufnahme von GDP-Fukose kann ein  $K_M$ -Wert von  $0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  GDP-Fucose berechnet werden. Die stark verminderte Import Aktivität von GDP-Fukose in Vesikel des Patienten A.C. basiert ausschließlich auf der nicht-sättigbaren Komponente.



**Abb. 16:** Import von GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.) in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Vesikelpräparationen der Kontrollfibroblasten (A;B) und der Patientenfibroblasten wurden mit  $0,5 - 30 \mu\text{M}$  GDP-Fukose inkubiert. Bei den Ansätzen von  $0,5$  bis  $10 \mu\text{M}$  GDP-Fukose wurde GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose mit konstanter spezifischer Aktivität verwendet; bei  $30 \mu\text{M}$  wurde auf GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose mit dreifach geringeren spezifischen Aktivitäten zurückgegriffen.

#### 4.2.4 Zeit-abhängige Aufnahme von GDP-Fukose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.)

Die Zeit-Abhängigkeit der GDP-Fukose Import Aktivität der Golgi-angereicherten Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.) wurde unter Standardbedingungen mit 3  $\mu\text{M}$  GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose bei 30°C durchgeführt. In der Kinetik zeigte sich, dass die GDP-Fukose Aufnahme in den Golgi der Kontrollfibroblasten bis zum Zeitpunkt  $t_{20\text{min}}$  nahezu linear verlief (Abb. 17) und ein Maximum an importierter GDP-Fukose nach 20 min erreicht wurde. Im weiteren Verlauf konnte keine weitere Zunahme an importierten Zuckernukleotiden nachgewiesen werden. In den Membranpräparationen des Patienten A.C. fehlte die Zeitabhängigkeit des GDP-Fukose Transports. Das Maximum der Importaktivität mit 0,18 pmol GDP-Fukose/ mg Protein wurde bereits nach 5 Minuten erreicht.

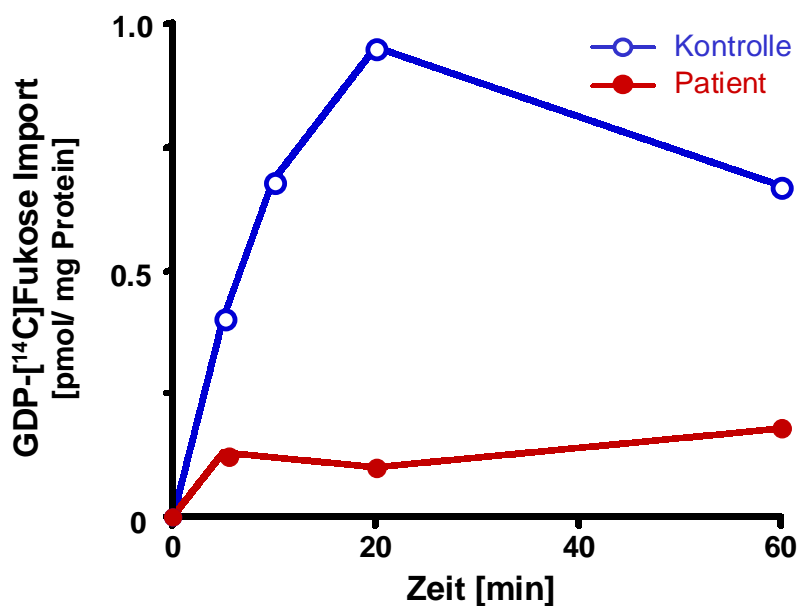


Abb. 17: Import von GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll- und Patientenfibroblasten (A.C.) in Abhängigkeit der Zeit. Golgi-angereicherte Vesikel einer Kontrollfibroblastenlinie und der Patientenfibroblasten wurden mit 3,0  $\mu\text{M}$  GDP-Fukose bei 30°C für die angegebenen Zeiten inkubiert.

### 4.3 Zuckernukleotid Transport in Fibroblasten der Eltern des Patienten A.C.

Der GDP-Fukose Transport Defekt bei Patient A.C. sollte wie der klinische Phänotyp rezessiv vererbt werden. Um dies nachzuweisen, wurde der Import von GDP-Fukose und UDP-Galaktose unter Standardbedingungen [3  $\mu$ M GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose bzw. 0,5  $\mu$ M UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose; 10 min; 30°C] in Golgi-angereicherte Vesikel aus den Fibroblasten des Patienten A.C., der Eltern des Patienten A.C. und Kontrollzelllinien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Membranpräparationen aus maternalen Fibroblasten unter Standardbedingungen normale GDP-Fukose ( $1,26 \pm 0,29$  pmol GDP-Fukose/ mg Protein/ min) und UDP-Galaktose ( $3,47 \pm 1,12$  pmol UDP-Gal/ mg Protein/ min) Transportaktivitäten aufwiesen (Abb. 18). Dagegen war der Transport beider Zuckernukleotide in paternalen Golgi-Vesikel um 40% gegenüber Kontrollen reduziert ( $0,82 \pm 0,14$  pmol GDP-Fuk/ mg Protein/ min sowie  $1,93 \pm 0,24$  pmol UDP-Gal/ mg Protein/ min). Diese Ergebnisse stehen in einem Widerspruch mit einer autosomal rezessiven Vererbung des Defekts.

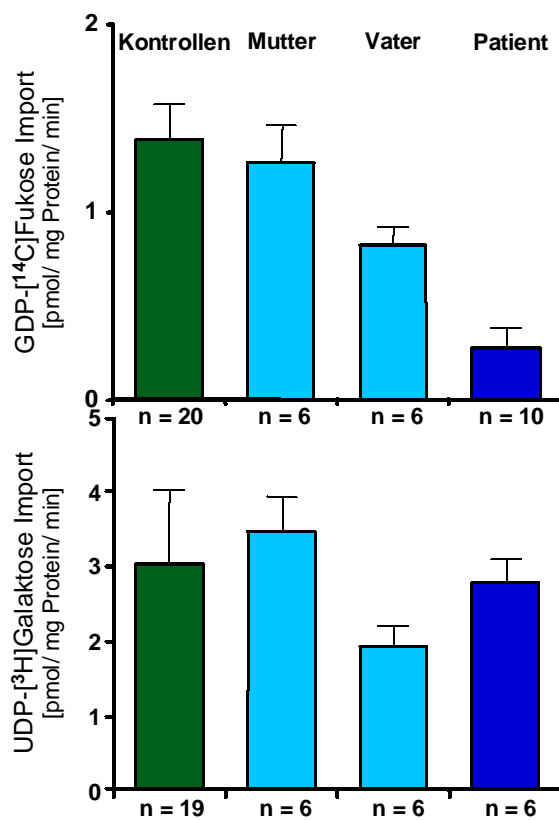


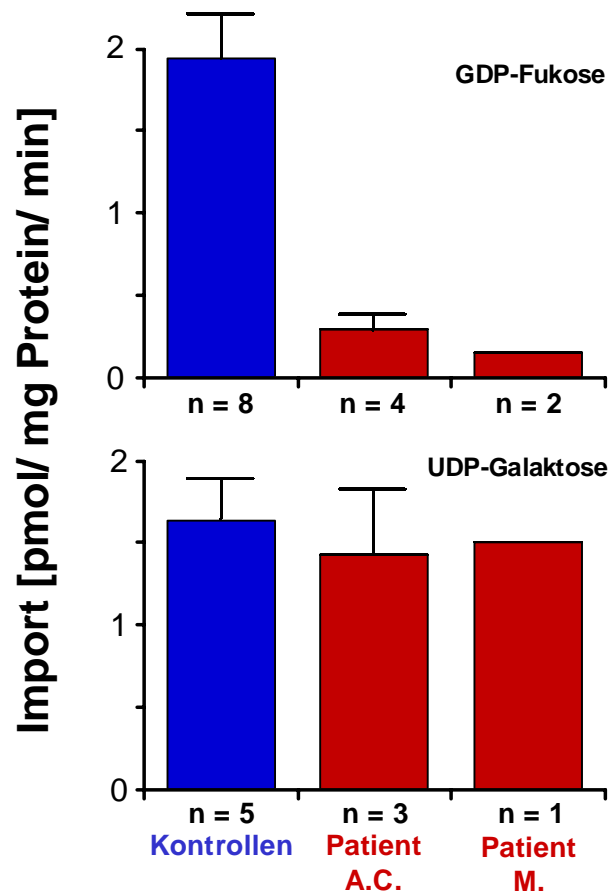
Abb. 18: Import von GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose und UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontroll-, Eltern- und Patientenfibroblasten (A.C.) unter Standardbedingungen.

#### 4.4 Zuckernukleotid Transport in EBV-transformierte Lymphoblasten von LAD II/ CDG-IIc Patienten und Kontrollen

Die vorausgegangenen Experimente sprachen mit Ausnahme der normalen GDP-Fukose Importaktivitäten beider Eltern für einen Defekt des GDP-Fukose Transporters in den Fibroblasten des Patienten A.C.. Um die an Fibroblasten erhaltenen Ergebnisse zu erhärten, sollte die GDP-Fukose Transport Aktivität in anderen Zelltypen des Patienten bestimmt werden. Lymphoblasten des Patienten **A.C.** und mehrerer Kontrollzelllinien wurden uns von Dr. T. Marquardt (Kinderklinik Uni Münster) zur Verfügung gestellt. Lymphoblasten eines weiteren, bisher nicht publizierten LAD II-Patienten **M.**, erhielten wir von Dr. A. Etzioni (Rambam Medical Center, Haifa, Israel). Diese Zellen wurden in der Abteilung von Prof. D. Vestweber (Uni Münster) durch eine Epstein-Bar-Virus(EBV)-vermittelte Transformation immortalisiert. Den Importversuchen in Golgi-angereicherte Vesikel von Fibroblasten analog, wurde der GDP-Fukose und der UDP-Galaktose Import unter Standardbedingungen in den EBV-immortalisierten Lymphoblasten beider Patienten bzw. der Kontrollzellen untersucht (Abb. 19).

Membranpräparationen der Kontrollzellen zeigten dabei Transportaktivitäten von  $1,94 (\pm 0,38)$  pmol/ mg Protein/ min für GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose und  $1,65 (\pm 0,25)$  pmol/ mg Protein/ min für UDP- $^3\text{H}$ Galaktose. Für die EBV-transformierten Lymphoblasten des Patienten A.C. (n=3) konnte mit  $1,43 (\pm 0,5)$  pmol/ mg Protein/ min eine UDP-Galaktose Import Aktivität im Normbereich ermittelt werden, während der Import von GDP-Fukose (n = 4) der A.C. Lymphoblasten um 85% gegenüber den Kontrollzellen auf  $0,3 (\pm 0,12)$  pmol/ mg Protein/ min reduziert war. Für den zweiten Verdachtsfall M., ergab sich ein dem Patienten A.C. vergleichbares Bild: Der Import von GDP-Fukose war bei Patient M. um über 90% gegenüber den Kontrollwerten auf  $0,16$  pmol/ mg Protein/ min reduziert. Der Import von UDP-Galaktose dagegen lag bei Patient M. mit  $1,5$  pmol/ mg Protein/ min im Bereich der Kontrollen.

Die Ergebnisse der Transportexperimente an den EBV-transformierten Lymphoblasten lassen darauf schließen, dass bei den hier untersuchten LAD II/ CDG-IIc Patienten A.C. und M. eine Defizienz des GDP-Fukose Transporters vorliegt, die zu einer generellen Hypofukosylierung bei den Patienten führt. Für den Patienten A.C. kann zusätzlich ein Fibroblasten-spezifischer Defekt des GDP-Fukose Imports ausgeschlossen werden, da die EBV-transformierten Lymphoblasten den gleichen biochemischen Defekt aufweisen.



**Abb. 19:** Import von GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose und UDP- $^3\text{H}$ Galaktose in Golgi-angereicherte Vesikel von EBV-transformierte Lymphoblasten zweier Kontrollzelllinien sowie der Patienten A.C. und M. unter Standardbedingungen ( $3\ \mu\text{M}$  GDP- $^{14}\text{C}$ Fukose bzw.  $0,5\ \mu\text{M}$  UDP- $^3\text{H}$ Galaktose; 10 Minuten Inkubationszeit bei  $30^\circ\text{C}$ ).

## **4.5 Expressionsklonierungs-Strategie zur Isolierung des für den LAD II/ CDG-IIc Defekt verantwortlichen Gens**

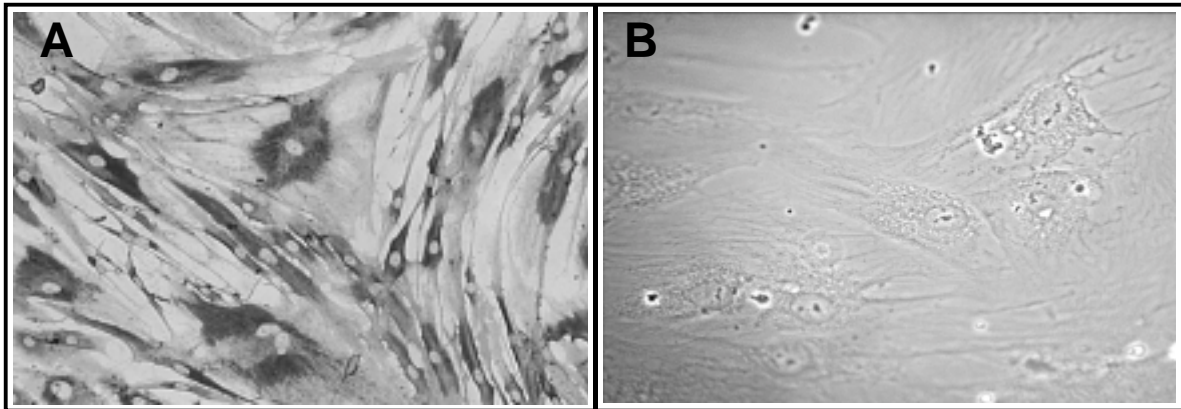
Die klinischen und biochemischen Untersuchungen ließen darauf schließen, dass es sich bei LAD II/ CDG-IIc um einen partiellen Defekt des GDP-Fukose Transporters bzw. eines unbekanntes, Transport-assoziierten Faktors handelte. Letztlich kann nur ein molekulargenetischer Ansatz Aufschluss darüber geben, ob die Unterfukosylierung der Glykoproteine der Patienten auf einen primären Defekt des Transporters oder eines Kofaktors zurückzuführen ist. Das Gen für den GDP-Fukose Transporter selber ist unbekannt und somit für direkte Mutationsanalysen bei den Patienten nicht verfügbar. Homologievergleiche („Blasts“) bekannter Zuckernukleotid Transporter wie z.B. dem humanen UDP-Galaktose Transporter (Miura et al., 1996) oder den GDP-Mannose Transporter aus *S. cerevisiae* (Poster & Dean, 1996) mit Gendatenbanken ergaben keine potentiell Zuckernukleotid Transporter-kodierende Sequenzen. Sequenzvergleichen („Alignments“) der bekannten Zuckernukleotid Transporter untereinander ergaben keine Konsensussequenzen, aus denen degenerierte Oligonukleotide für eine PCR-vermittelte Teilklonierung hätten konzipiert werden können. Daher sollte eine Expressionsklonierung unter Ausnutzung des Patientenphänotyps Verwendung finden, um diejenige cDNA-Sequenz zu isolieren, die den Defekt in den Patientenzellen komplementieren konnte.

### **4.5.1 Lektin-vermittelte Differenzierung zwischen LAD II/ CDG-IIc Patienten- und Kontrollfibroblasten (Lektin-Färbung)**

Zur Klonierung einer den Defekt komplementierende cDNA sollte eine humane cDNA-Bank in den Patientenfibroblasten exprimiert werden. Die Expression einer komplementierenden cDNA sollte die generelle Hypofukosylierung an den Glykoproteinen der Patientenfibroblasten aufheben. Das Fehlen von  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-,  $\alpha$ 1,4- und  $\alpha$ 1,6-verknüpften Fukosylresten an den Glykoproteinen der Patientenfibroblasten sollte mittels eines Fukose-spezifischen Lektins sichtbar gemacht werden. Dazu werden Zellen analog einer indirekten Immunfluoreszenz mit einem biotinylierten Lektin markiert und über Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Streptavidinmoleküle als Signalverstärker detektiert. Bei der Umsetzung eines Farbsubstrats durch die Alkalische Phosphatase bilden sich unlösliche

Präzipitate an markierten Zellstrukturen und färben die Zelle an, während nicht-markierte Zellen keine Anfärbungen aufweisen.

Markierungsexperimente mit verschiedenen Fukose-spezifischen Lektinen zeigten, dass von den getesteten Lektinen ausschließlich *Aleuria aurantia* Lektin Kontrollzellen spezifisch markierten und eine starke perinukleäre Anfärbung der Zellen nach Methanol/ Aceton Fixierung zu beobachten war, während gleich behandelte Patientenfibroblasten keine Anfärbungen zeigten (Abb. 20). *Aleura aurantia* Lektin bindet preferentiell an  $\alpha$ 1,6-fukosylierte N-Acetylglukosamine, wie man sie an „Core“-fukosylierten Glykoproteinen findet und an  $\alpha$ 1,3-fukosylierte N-Acetyllactosamine. Mischexperimente, in denen Kontrollfibroblasten einem Überschuss von Patientenfibroblasten zugesetzt wurden, zeigten, dass die Kontrollzellen nach der Markierung bequem im Durchlichtmikroskop bei geringer Vergrößerung detektiert werden können.



**Abb. 20:** *Aleuria aurantia* Lektin-Färbung von Kontroll- (A) und Patientenfibroblasten (B). Die Zellen wurden Methanol-Aceton fixiert, mit biotinyliertem AAL markiert und mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (S-AP) und einem AP-Färbesubstrat angefärbt.

#### **4.5.2 Retroviraler Gentransfer zur Expressionsklonierung einer humanen cDNA-Bank in Fibroblasten von Patient A.C.**

Zur Identifizierung des molekularen Defekts sollte eine humane cDNA-Bank in den Patientenfibroblasten exprimiert werden und komplementierte Patientenfibroblasten aufgrund der Rekonstitution des perinukleären Fukosylierungsmusters nach der *Aleuria*-Markierung identifiziert werden. Primäre Fibroblasten können jedoch nur mit äußerst geringer Effizienz mittels klassischer Gentransfermethoden wie Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder Elektroporation transfiziert werden (< 1%). Da bei einer Expressionsklonierung statistisch eine ganze cDNA-Bank in die zu komplementierenden Zellen eingebracht werden muss, um auch selten transkribierte Gene repräsentativ zu exprimieren, wurde auf ein retrovirales Gentransferverfahren zurückgegriffen. Der retrovirale Gen-Transfer und dessen Expression bietet den Vorteil hoher Transfereffizienz der in retrovirale Partikel verpackten Gene (in Form von RNA), sowie einer stabilen Integration der transferierten Sequenz in das Genom der infizierten Wirtszelle (Transduktion). Zu infizierende Zellen müssen teilungsaktiv sein und müssen Rezeptoren an ihrer Plasmamembran tragen, die das Andocken der viralen Partikel ermöglichen.

Das zur Anwendung gebrachte retrovirale Gentransfersystem beruht auf dem Moloney murine leukemia virus (MMLV) und besteht aus Sicherheitsgründen aus zwei Komponenten: Erstens, dem retroviralen Vektor pLIB, der neben viralen Sequenzen das entsprechende cDNA-Insert trägt und zweitens, den Verpackungszelllinien, die nach der Transfektion bzw. Transduktion mit dem Vektor pLIB, Strukturproteine zum Zusammenbau der retroviralen Partikel in „trans“ liefern (siehe 3.5.4). Die resultierenden retroviralen Partikel werden in das Medium der Verpackungszellen abgegeben und können zur Infektion der Zielzellen verwendet werden. Die Aufnahmekapazität des Vektors pLIB für Fremdsequenzen ist selbst nach Deletion der drei in trans durch die Verpackungszellen gelieferten Strukturproteine (gag, pol und env) begrenzt. Um eine effiziente Verpackung auch von größeren cDNAs zu ermöglichen, wurde bei der Konstruktion des Vektors auf die Insertion eines Marker- bzw. Reportergens verzichtet. Die Transfektionseffizienz der Verpackungszellen und die Infektionseffizienz der Zielzellen wurde mit einem eigenen Reportergen-Vektor, dem pLIB-EGFP (enhanced grün-fluoreszierendes



Protein) bestimmt (Tab. 5). Allerdings lassen sich die Werte nur begrenzt auf die Transfektions- bzw. Infektionseffizienz der gesamten cDNA-Bank übertragen.

| Methode  | Effizienz (EGFP)           |
|--|----------------------------|
| <b>Transfektion</b> der ecotropen Verpackungszelllinie FNX-Eco (ATCC)<br><br>1. Calcium-Phosphat-Präzipitation<br>2. Effectene (Qiagen)<br>3. FuGene™6 (Roche) | 20-30%<br>20-30%<br>30-60% |
| <b>Infektion</b> der amphotropen Verpackungszelllinie PT67 (Clontech) mit ecotropen, viralen Überständen   | 75-95%                     |
| <b>Infektion</b> der primären Patientenfibroblasten (A.C.) mit amphotropen, viralen Überständen  | 15-50%                     |

**Tab. 5: Effizienz der Teilschritte zur Transduktion von primären Patientenfibroblasten.**  
 Die Effizienzen wurden mit dem pLIB-EGFP Vektor ermittelt. Da die FNX-Eco Zellen nicht auf Deckgläschen adhärten bzw. sich bei einer pFA-Fixierung von den Deckgläschen lösten, konnte GFP-Expression in den Zellen nur in den Zellkulturschalen direkt beobachtet werden und mit minderer Qualität fotografisch dokumentiert werden. Des Weiteren wurde die GFP-Expression in den Patientenfibroblasten aufgrund der geringen Expression und hohem Streulicht-Hintergrund nach Methanol/ Aceton-Fixierung mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper (Clontech) nachgewiesen.

Die durchschnittlich erzielten Transfektionseffizienzen der ecotropen Verpackungszelllinie FNX-Eco lag bei der Verwendung des FuGene™6-Reagenz (Roche) gemessen an der EGFP-Expression bei etwa 40% und war somit höher als mit anderen getesteten Transfektionsmethoden (Tab. 5). Die Transduktionseffizienz amphotroper Verpackungszellen durch ecotrope Überstände lag bei 75 – 90%; die Transduktionseffizienz primärer Fibroblasten durch amphotrope Überstände variierte zwischen 15 und 50%.

## 4.6 Expression der humanen Leber cDNA-Bank nach retroviralem Gentransfer in Patientenzellen (A.C.)

Aufgrund der Methanol/ Aceton Fixierung der Fibroblasten für die *Aleuria*-Markierung, ist die Isolierung der komplementierenden Sequenz an den Einzelzellen erschwert. Die Expressionsklonierung wurde daher strategisch so ausgelegt, dass nach der Identifikation einzelner Komplementationsereignisse, der Zugriff auf die entsprechende cDNA gesichert war.

Aus diesem Grund fand ein Pool-Verfahren Anwendung, bei dem die in den retroviralen Vektor klonierte cDNA-Bank in verschiedene Pools aufgeteilt wurde. Die Transformanten wurden auf 48 LB-Ampicillin-Agarplatten in einer Dichte von etwa 2500 Kolonien pro Platte ausplattiert. Jede dieser 48 Platten repräsentierte einen Pool von 2500 unabhängigen Klonen der cDNA-Bank. Insgesamt repräsentierten die sogenannten A-Pools (A1 → A48) 120000 unabhängige cDNA-Klone. Die durchschnittlichen Größe der cDNA-Inserts im pLIB-Vektor lag bei 1,6 kb, wobei die cDNAs in ihrer Länge zwischen 0,6 und 5,0 kb variierten. Die prozentuale Häufigkeit des  $\beta$ -Aktin in der Bank lag nach Herstellerangaben bei 0,39%. Der prozentuale Anteil solch häufiger Transkripte sollte bei  $>0,10\%$  liegen, um sicherzustellen, dass auch seltene Transkripte in der Bank repräsentiert sind (Hagen et al., 1988, *Biotechniques* 6, 340-345). Die Kolonien der einzelnen Pools wurden mit LB-Medium von den Platten abgeschwemmt. Ein Drittel der Bakterien eines Pools wurden zur Isolierung der Pool-DNA verwendet. Diese heterogene Pool-DNA wurde zur Transfektion von Verpackungszellen verwendet, während die verbleibenden 2/3 der Bakterienkultur jedes Pools für weiterführende Versuche konserviert wurden.

### 4.6.1 Strategie zur retroviralen Komplementationsklonierung

Pools, die komplementierende cDNAs beinhalteten, sollten im Zuge einer Poolverdünnung zur Anreicherung von Einzelereignissen, in weitere Pools unterteilt werden. In der ersten Komplementationsrunde wurden 48 A-Pools zu je 2500 unabhängigen Klonen überprüft. Jeder cDNA-Pool wurde in retrovirale Partikel verpackt. Dazu wurden ecotrope Verpackungszellen (FNX-eco) mit  $\sim 3,5 \mu\text{g}$  DNA des entsprechenden Pools transfiziert. Nach 60 Stunden wurden von den Verpackungszellen infektiöse, ecotrope Überstände geerntet und zur Infektion amphotroper Verpackungszellen verwendet. Mit amphotropen Überständen dieser

Verpackungszellen wurden dann primäre, humane Fibroblasten des Patienten A.C. infiziert. Die Infektion der Patientenfibroblasten erfolgte sequentiell in einem Zeitraum von vier Tagen mit vier Infektions- (16 h) und Regenerationszyklen (8 h). Im Anschluss an die letzte Infektion wurden die Zellen weitere 96 Stunden in Kultur gehalten, ehe die Zellen fixiert und mit dem *Aleuria*-Lektin markiert wurden. Infektion mit einem cDNA-Pool, der eine den Fukosylierungsdefekt korrigierende cDNA enthält, sollte zu *Aleuria*-positive Patientenfibroblasten führen. Die Bakterienkultur dieses komplementierenden A-Pools sollte nach Titrierung der Bakterien in 48 Pools (B-Pools) unterteilt werden, die jeweils etwa 200 unabhängige cDNA-Klone enthalten sollten ( $48 \times \sim 200 \text{ Klone} \approx 9600 \text{ Klone}$ ). Jeder der ursprünglich 2500 Klone des A-Pools ist statistisch gesehen etwa viermal in den B-Pools repräsentiert. In einem B-Pool (1:200) ist die komplementierende cDNA gegenüber einem A-Pool (1:2500) etwa zehnfach angereichert. Dieses Verfahren zur Anreicherung komplementierender cDNAs soll so lange fortgesetzt werden, bis ein komplementierender Einzelklon isoliert wird (Abb. 21).

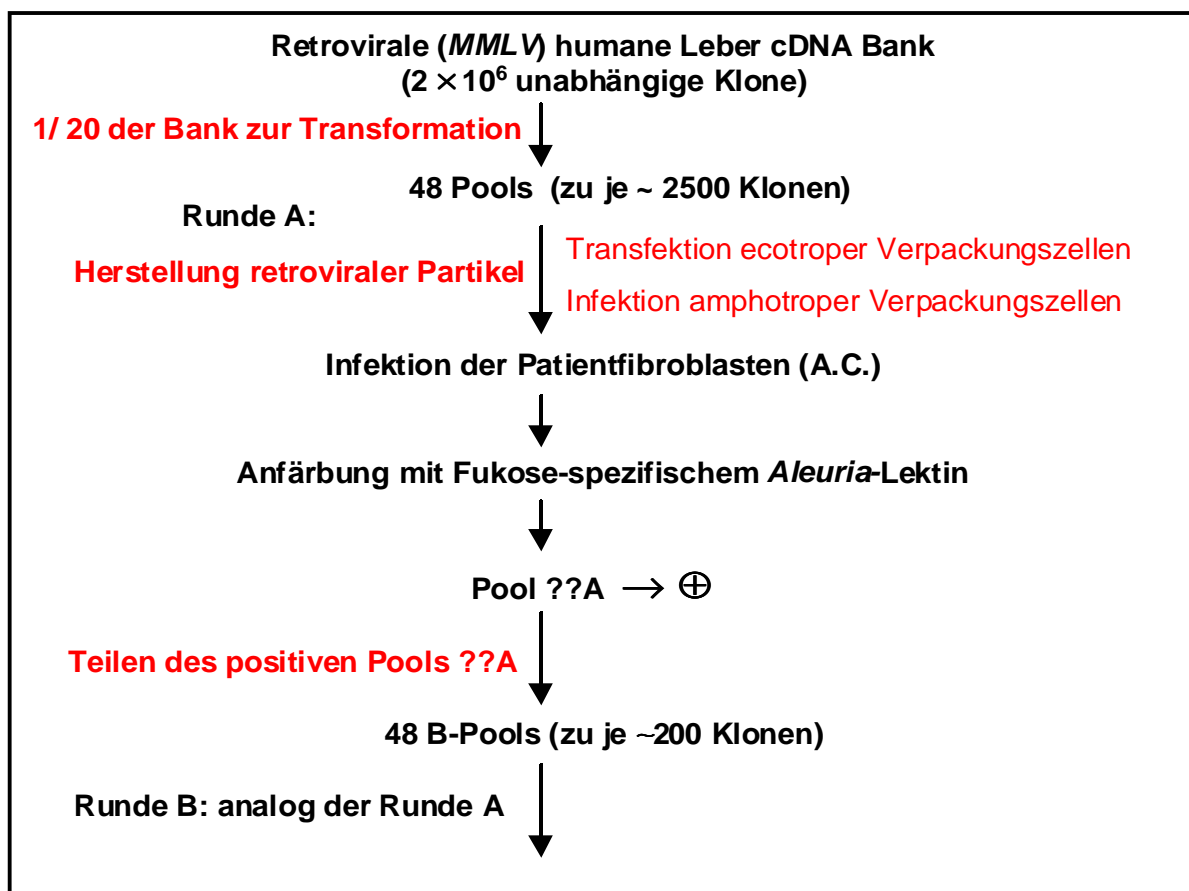


Abb. 21: Schematische Darstellung der ersten Phase der Expressionsklonierung.

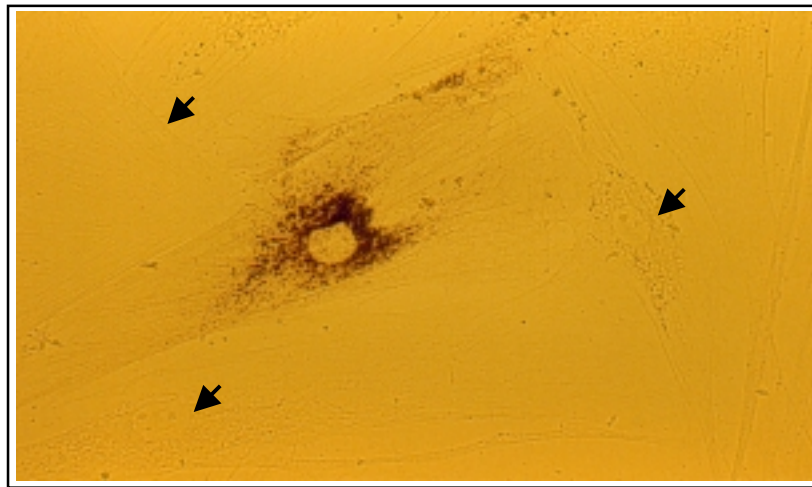
#### 4.6.2 Retrovirale Komplementationsklonierung: Runde A (~ 2500 Klone/ Pool)

Nach der Optimierung der einzelnen Schritte zur Transduktion der primären Patientenfibroblasten mit dem pLIB-EGFP Reportervektor, wurde die erste Runde der Expressionsklonierung so durchgeführt, wie schematisch in Abb. 21 dargestellt. DNA der einzelnen A-Pools (A1 → A48) mit jeweils 2500 unabhängigen Klonen wurde aus den *E. coli*-Bakterien isoliert. Durchschnittlich ergaben die DNA-Präparationen eine Ausbeute von 3,5 – 6 µg der entsprechenden Pool-DNA. In einem ersten Ansatz wurden jeweils 3,0 µg der ersten acht (A1-A8) DNA-Pools in tags zuvor ausplattierte ecotrope Verpackungszellen ( $8 \times (0,5 \times 10^6)$  Zellen) transfiziert. Neben diesen acht Pool-Ansätzen wurden zudem das pLIB-EGFP Konstrukt und der leere pLIB Vektor (mock) in eigenen Verpackungsansätzen simultan mitgeführt. Mit dem mock-Konstrukt sollte gezeigt werden, dass es während des Transduktionsprozesses nicht zu spontanen Revertierungsereignissen kam, die zu falsch-positiven Zellen führen. 60 Stunden nach der Transfektion wurden die ecotrope Überstände geerntet und zur Infektion von amphotropen PT67-Zellen verwendet. An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden amphotrope Überstände abgenommen und zur Infektion von Patientenfibroblasten verwendet. Nach der letzten Infektion wurden die Fibroblasten weitere vier Tage in Kultur gehalten, ehe sie fixiert und mit dem *Aleuria*-Lektin markiert wurden. Die Transduktionsrate mit dem GFP-Konstrukt lag bei etwa 30 - 40%. Die mit den acht Pools A1 bis A8 transduzierten Patientenfibroblasten wiesen ebenso wie die mock-infizierten Zellen nach der *Aleuria*-Markierung keine anfärbbaren Zellen auf. In diesen ersten acht getesteten Pools konnten somit keine komplementierenden cDNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Bei einer über GFP-Expression ermittelten Transduktionsrate von 30 – 40% und bei  $2,5 \times 10^5$  Zielzellen sollten etwa 80000 Zellen infiziert sein, so dass jedes der 2500 unabhängigen Ereignisse, die in einem Pool repräsentiert wurden, etwa 30 Patientenfibroblasten transduzierte.

In einer zweiten Serie wurden Fibroblasten mit acht anderen Pools (A41 – A48) der Runde A, dem GFP-Konstrukt und dem mock-Vektor infiziert und analysiert. Die Zellkulturplatte mit Patientenfibroblasten, die mit retroviral verpackter cDNA des Pools A44 transduziert waren, wies eine Reihe *Aleuria*-positiver Zellen auf (Abb. 22), während die entsprechend mit cDNA anderer Pools infizierten Fibroblasten und die mock-Kontrolle keine *Aleuria*-anfärbbaren Fibroblasten aufwiesen. Dieser Befund

konnte in zwei nachfolgenden Transduktionsexperimenten mit cDNA des Pools A44 und mock als Negativkontrolle reproduziert werden, so dass die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Zellen ausgeschlossen werden konnte. Durchschnittlich konnten pro Platte zwischen 15 und 30 *Aleuria*-markierbare Patientenfibroblasten ( $\sim < 0,1^{0}/_{00}$ ) aufgrund der charakteristischen perinukleären Färbung identifiziert werden. Dies entspricht der erwarteten Zahl komplementierter Zellen in einem positiven Pool.



**Abb. 22:** Zytochemischer Nachweis eines *Aleuria*-positiven Patientenfibroblasten nach der Transduktion mit Pool A44 inmitten nicht-komplementierter Fibroblasten (Pfeile).

#### 4.6.3 Retrovirale Komplementationsklonierung Runde B (~ 200 Klone/ Pool)

Um in einer zweiten Runde der Komplementationsklonierung eine Anreicherung der den Defekt komplementierenden cDNA zu erreichen, wurden die ~ 2500 Einzelklone des Komplementations-kompetenten Pools A44 48 Pools (Runde B) zu je ~ 200 Einzelklone unterteilt. Zur Bestimmung von Kolonien-bildenden Einheiten (cfu = colony forming units) wurden Titrationsreihen der A44 Bakterienkultur ausplattiert, um B-Pools heranzuziehen, die 200 Klone repräsentierten. Ein Drittel der Bakterienkultur eines Pools wurde wiederum zur Isolierung der entsprechenden Plasmid-DNA herangezogen, um ecotrope FNX-Eco Verpackungszellen zu transfizieren. Patientenfibroblasten wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit amphotropen Überständen infiziert und weitere vier Tage zur Expression der cDNAs in Kultur gehalten, ehe sie fixiert und mit dem *Aleuria*-Lektin angefärbt wurden. Nach

Auswertung von 24 B-Pools konnte ausschließlich Pool B23 als Komplementationskompetent identifiziert werden (Abb. 23). Die Anzahl *Aleuria*-markierbarer Patientenfibroblasten stieg in dieser Komplementationsrunde auf 200 – 300 Zellen pro Platte ( $\sim < 0,1\%$ ).



**Abb. 23:** Zytochemischer Nachweis einiger *Aleuria*-positiven Patientenfibroblasten nach der Transduktion mit Pool B23 mit nicht-komplementierten Fibroblasten (Pfeile).

#### 4.6.4 Retrovirale Komplementationsklonierung Runde C (20 Klone/ Pool)

In der dritten Runde (C) zur Expressionsklonierung der retroviralen cDNA-Bank in den Patientenzellen sollte wiederum eine Anreicherung der komplementierenden cDNA aus Pool B23 durch dessen Unterteilung erreicht werden. Dazu wurden Aliquots der Bakterienkultur des Pools B23 ausplattiert, so dass man etwa 1000 Einzelkolonien auf einer der Platte erhielt. Von einer solchen Platte wurden jeweils 20 Einzelkolonien auf jeweils  $2 \times 25$  LB-Platten (25 C-Pools) ausgestrichen, so dass man zum einen eine der beiden *E. coli*-Bakterien-Platten abschwemmen konnte, um die DNA für eine Transfektion zu isolieren und zum anderen Replika-Platten der C-Pools mit 20 Einzelklonen für eine D-Runde zur Verfügung standen. Pool B23 setzte sich aus etwa 200 Einzelereignissen zusammen. Die 25 Pools der Runde C bestanden jeweils aus 20 Einzelklonen, so dass insgesamt 500 Klone zu testen waren. Jeder Klon des Pools B23 war statistisch etwa 2.5-mal in C-Pools repräsentiert. Die Patientenfibroblasten wurden wiederum mit amphotropen,

retroviralen Partikeln infiziert und mit dem *Aleuria*-Lektin auf ihren Fukosylierungsstatus getestet. Im *Aleuria*-Assay konnte gezeigt werden, dass mehrere Pools der C-Serie Patientenfibroblasten phänotypisch komplementieren konnten: 2000 – 3000 Zellen (~ 1 %) der mit Pool C2/ C7/ C8 und C23 transduzierten Ansätzen waren *Aleuria*-positiv. Zur weiteren Isolierung der komplementierenden cDNA wurde Pool C23 eingesetzt.

#### 4.6.5 Retrovirale Komplementationsklonierung Runde D: Analyse der verbleibenden 20 Einzelklone des Pools C23

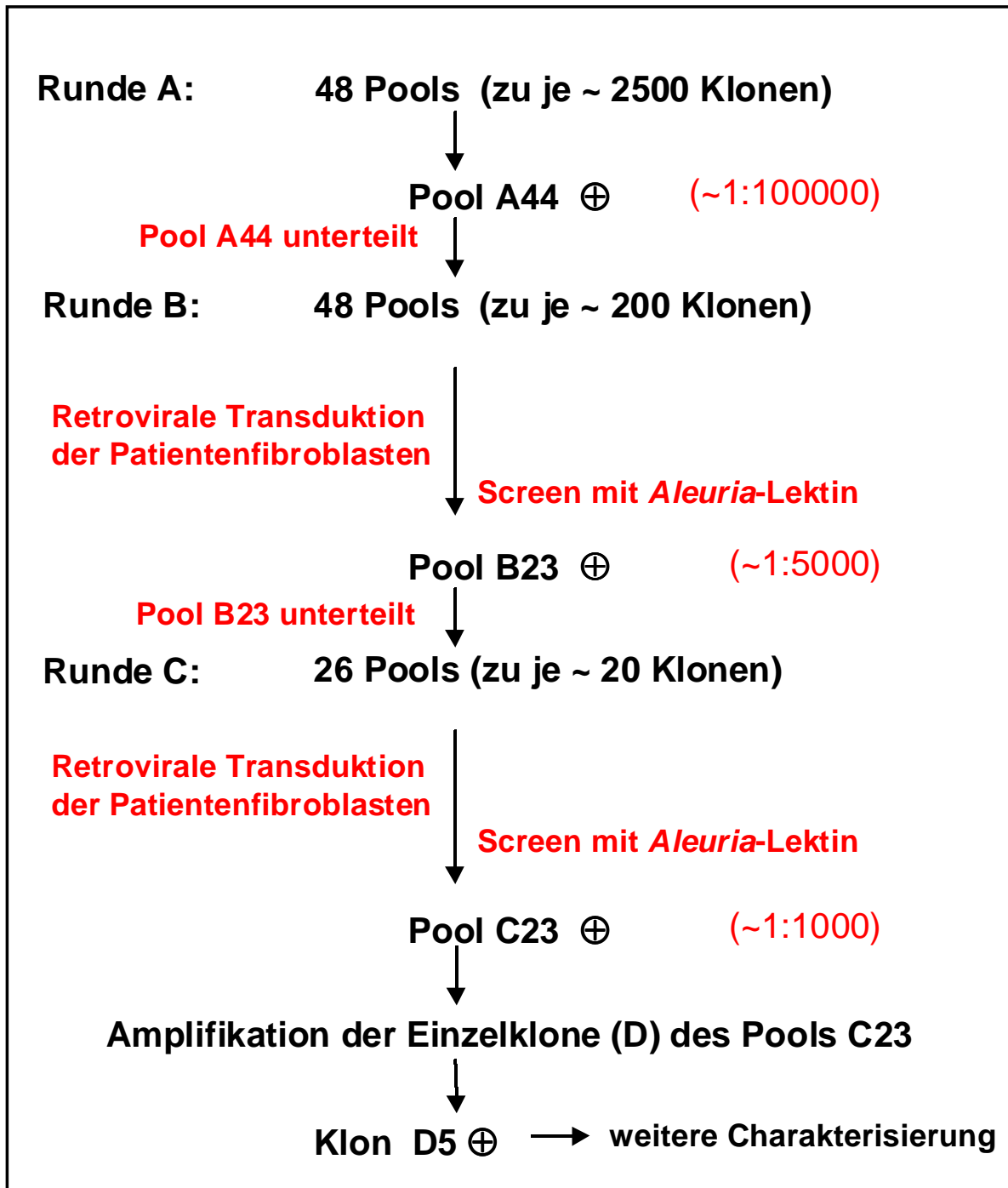
Die individuellen Klone des Pools C23 standen durch die zuvor angelegte Replika-Platte für eine Einzelklon-Analyse in Runde D zur Verfügung. Patientenfibroblasten wurden mit amphotropen, retroviralen Partikeln der Einzelklone transduziert. Zudem wurden parallel die 20 Inserts im pLIB-Vektor mittels Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (Primer) ansequenziert (~ 400 bp). Mit Sequenzinformationen über die einzelnen cDNA-Inserts und deren Homologievergleich in Gendatenbanken (NCBI) erhoffte man sich einen schnelleren Zugriff auf die komplementierende Sequenz als über die zeitlich aufwendigere Expressionsklonierung der einzelnen Klone in den Patientenfibroblasten (siehe unten). Die Ansequenzierung der 20 Einzelklone des Pools C23 und deren Homologievergleich im Gen-Bank BLAST-Programm am Server des NCBI ergab folgende Ergebnisse:

| Einzelklon | Homologie zur [%]                               |
|------------|---|
| D1         | Keine Homologie zu bekannten Genprodukten       |
| D2         | cDNA zum humanen Apolipoprotein A-I 100%        |
| D3         | cDNA zum humanen KIAA0062-Gen 97%               |
| D4         | kurze 22-bp homologe Sequenz zu AA111654        |
| D5         | Keine Homologien zu bekannten Genprodukten      |
| D6         | cDNA zum humanen Apolipoprotein A-I 100%        |
| D7         | cDNA zum Nucleic acid binding protein subunit 2 |
| D8         | Keine Homologien zu bekannten Genprodukten      |
| D9         | cDNA zum humanen Apolipoprotein A-I 100%        |
| D10        | cDNA zum humanen FGF-Rezeptor 99%               |
| D11        | cDNA zum humanen Serum-Albumin 99%              |
| D12        | cDNA zum humanen Serum-Albumin 99%              |
| D13        | MMLV-based pLIB-Vektor mock                     |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| <b>D14</b> | cDNA zum humanen FLJ20617; mitochondriale DNA            | 99% |
| <b>D15</b> | Keine Homologien zu bekannten Genprodukten               |     |
| <b>D16</b> | cDNA zum humanen Asialo-Glykoprotein Rezeptor 1          | 99% |
| <b>D17</b> | cDNA zum humanen Syndecan                                | 95% |
| <b>D18</b> | 186-bp homologe Sequenz zur UDP-Glukuronosyl-Transferase |     |
| <b>D19</b> | Keine Homologien zu bekannten Genprodukten               |     |
| <b>D20</b> | cDNA zum humanen Serum-Albumin                           | 99% |

Neben einer Reihe bekannter Sequenzen, wie für Serum-Albumin und Apolipoprotein, deren Vorkommen in der Leber-cDNA Bank zu erwarten waren, wurden cDNAs ansequenziert, denen keine Homologie zu bekannten Genprodukten zugeordnet werden konnten. Bei näherer Analyse der erhaltenen 400 bp-Sequenzen unbekannter Funktion wie z.B. D5 ergaben sich im Homologie-BLAST keine signifikanten Übereinstimmungen zu z.B. anderen Zuckernukleotid-Transportern, so dass die Ergebnisse aus der Transduktion der Patientenzellen mit den D-Einzelklonen abzuwarten waren. Mittels des *Aleuria*-Assays stellte sich heraus, dass ausschließlich Klon D5 in der Lage war, den Defekt in den Patientenzellen phänotypisch zu korrigieren (Abb. 24). In D5-transduzierten Ansätzen zeigten etwa  $\leq$  30% der Zellen die für Kontrollfibroblasten typische Anfärbung mit dem *Aleuria*-Lektin. Zusätzlich wurden die 20 Klone (D21 – D40) des Pools C2 ansequenziert, der wie C23 *Aleuria*-positive Patientenzellen hervorbrachte. Eine 400 bp-Sequenz des Einzelklons D31 war zu 99% homolog mit der Sequenz von D5. Beide Sequenzen beinhalteten einen offene Leseraster (Nukleotide 171 – ~ 387), der Sequenzierungsbedingt jedoch bereits nach 216 bp, 72 Aminosäuren kodierend, abbrach. Eine BLAST-Analyse des 72 Aminosäuren umfassenden prognostizierten Polypeptids wies keine Homologien zu bekannten Proteinen auf.



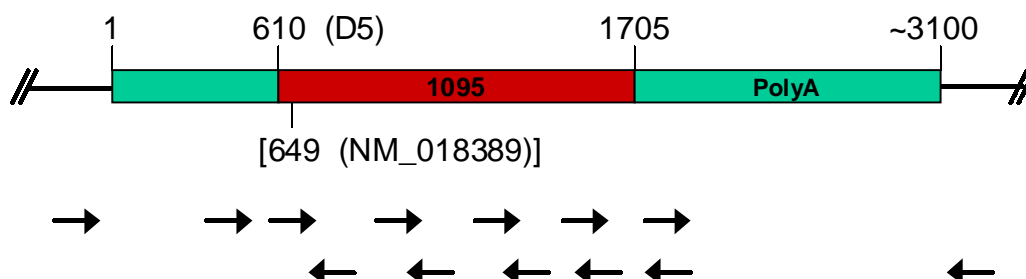


**Abb. 24:** Schematische Darstellung der Expressionsklonierung des Klons D5. Ausgehend von einer retroviral verpackten Leber-cDNA-Bank wurde mittels des *Aleuria*-Screens über mehrere Anreicherungsschritte eine den Fukosylierungsdefekt komplementierende cDNA (D5) isoliert.

## 4.7 Analyse der D5-cDNA

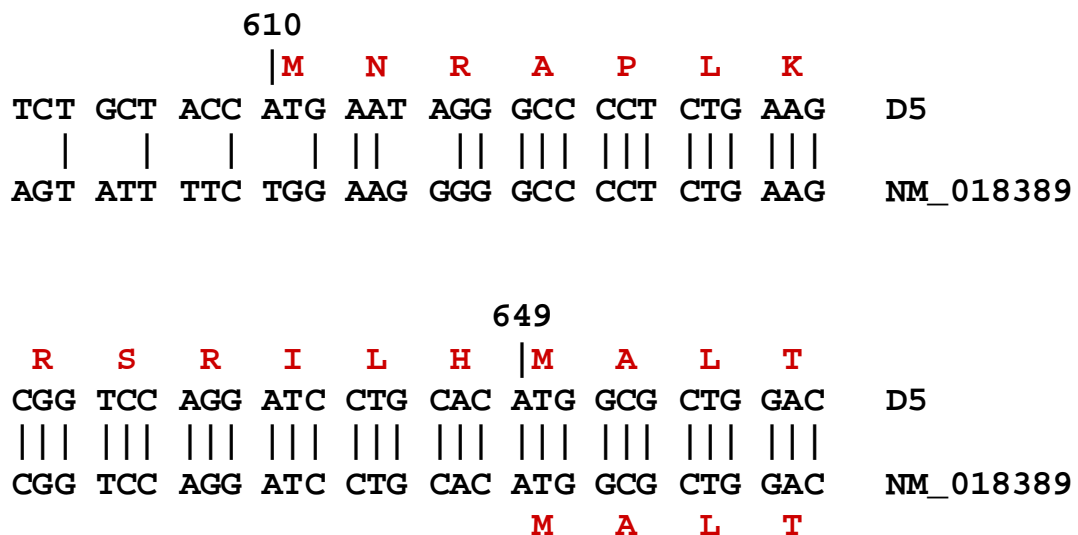
### 4.7.1 Analyse der DNA-Sequenz des Klons D5

„Long-range“ Sequenzierungen (alle verwendeten Primer in dieser Arbeit: siehe Anhang) von etwa 900 bp des cDNA-Inserts des Klons D5 mit dem Vektor-spezifischen Vorwärts-Primer ergaben mehrere offene Leserahmen. In einer BLAST-Suche (NCBI) konnte der sequenzierte Bereich des Leserahmens sechs dem humanen hypothetischen Gen FLJ11320 zugeordnet werden. Die 1432 Nukleotide lange, hypothetische mRNA NM\_018389 kodiert für ein 351 Aminosäuren langes Protein (NP\_060859) und wurde von Isogai et al. (unpublished) im November 2000 im Rahmen des „NEDO human cDNA sequencing project“ in die Bank gestellt. Mit den Sequenzinformationen der „long range“ PCR und der publizierten Sequenz wurde mit Insert-spezifischen Primern, die überlappende Sequenzinformationen lieferten, zuerst der angenommene 5'-nicht-kodierende Bereich (Nukleotid 1 – 648) und Protein-kodierende Bereich (Nukleotid 649 – 1705) des Klons D5 charakterisiert (Abb. 25). Aus den Sequenzierungen ergab sich ein offenes Leseraster aus 1056 Nukleotiden, kodierend für 351 Aminosäuren und dem Stopcodon, mit einem ATG-Startcodon in Position 649-651, der zu 99% homolog mit der NM\_018389 Sequenz aus der NCBI-Genbank war. Der 3'-nicht-kodierende Bereich konnte nur um 456 Nukleotide bis Position 2160 qualitativ sequenziert werden. Vermutlich lassen ausgedehnte PolyA-Signale im weiterführenden 3'-Bereich keine Analyse zu. Die Größe des D5-cDNA Inserts von etwa 3,1 kb wurde nach einem NotI-Verdau im Agarosegel bestimmt.



**Abb. 25:** Schematische Darstellung der D5-cDNA. Der Protein-kodierende Bereich ist rot hervorgehoben. Die Pfeile geben die Lage der Oligonukleotide an, die für die Sequenzierung genutzt wurden.

Der 5'-nicht-kodierende Bereich der D5-Sequenz und der NM\_018389 aus der Bank wichen stark voneinander ab. NM\_018389 wies einen relativ kurzen 5'-nicht-translatierten Bereich von 153 Nukleotiden auf, während der 5'-nicht-translatierte Bereich der D5-Sequenz 648 Nukleotiden besaß. Die homologen Bereiche der Sequenzen beschränkten sich dabei auf die 32 Basen aufwärts des Startcodons 649 – 651 (D5) bzw. 154 - 156 (Banksequenz). NM\_018389 nutzte das erste verfügbare Startcodon, während die D5-Sequenz 39 Nukleotide (13 Aminosäuren) vor jenem ATG ein weiteres potentiell Startcodon (Nukleotid 610 – 612) in bezug auf den beschriebenen Leserahmen aufwies (Abb. 26).



**Abb. 26:** Partielles Nukleotid-Alignment der D5-cDNA und der humanen mRNA NM\_018389 sowie die angenommenen Aminosäure-Sequenzen (rot). Die Nummerierung bezieht sich auf die D5-cDNA Sequenz.

Die Sequenzen um beide potentiellen Startcodons wiesen nur mäßige Homologien zu der Translationsstart-Konsensussequenz 5'-CC(A/G)CC-ATG-G-3' auf (Kozak, 1987), wobei die unterstrichenen Positionen vor und hinter dem ATG für die Funktion besonders wichtig sind. Da die Kozak-Sequenzen keinen Aufschluss über das zu nutzende Startcodon gaben, wurde mit der D5-Sequenz eine BLAST-Analyse in einer Maus-EST-Bank (NCBI) durchgeführt. Es konnten drei D5-homologe Maus-EST Klone bei der Suche identifiziert werden, wobei der längste Klon (889

Nukleotide, BF385316) auch den potentiellen 5'-nicht-translatierten Bereich des Maus-ESTs repräsentierte. In dem Bereich um das vermutete Start-ATG (610 – 612 ± 30 Nukleotide) wies die Maus-Sequenz eine Homologie von 88% zur D5-Sequenz auf (Abb. 27). D5 und Maus-EST besaßen 5' der Startcodons jeweils Stopcodons (-21 → -19) im Leserahmen, so dass kein weiteres Startcodon stromaufwärts für die Translation der offenen Leserahmen verwendet werden konnte (Abb. 27).

|     |     |     |     |            |     |     |     |     |     |     |                        |  |
|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|--|
|     | GCC | GCG | GGG | <u>TGA</u> | CCC | AGC | TCC | TCT | GCT | ACC | D5                     |  |
|     |     |     |     |            |     |     |     |     |     |     |                        |  |
|     | GCC | GTA | AGG | <u>TGA</u> | CCC | AGC | TCT | TCT | GCC | ACC | Maus-EST<br>(BF385316) |  |
| 610 |     |     |     |            |     |     |     |     |     |     |                        |  |
|     |     | M   | N   | R          | A   | P   | L   | K   | R   | S   | R                      |  |
|     | ATG | AAT | AGG | GCC        | CCT | CTG | AAG | CGG | TCC | AGG | D5                     |  |
|     |     |     |     |            |     |     |     |     |     |     |                        |  |
|     | ATG | AAC | AGG | GCG        | CCT | CTG | AAG | CGG | TCC | AGG | Maus-EST<br>(BF385316) |  |
|     |     | M   | N   | R          | A   | P   | L   | K   | R   | S   | R                      |  |

**Abb. 27:** Partielles Nukleotid-Alignment der D5-cDNA und des Maus-EST Klons BF385316 sowie die angenommenen Aminosäure-Sequenzen (rot). Die Stopcodons (Nukleotide -21 → -19 zu den Startcodons) sind unterstrichen. Die Nummerierung bezieht sich auf die D5-cDNA.

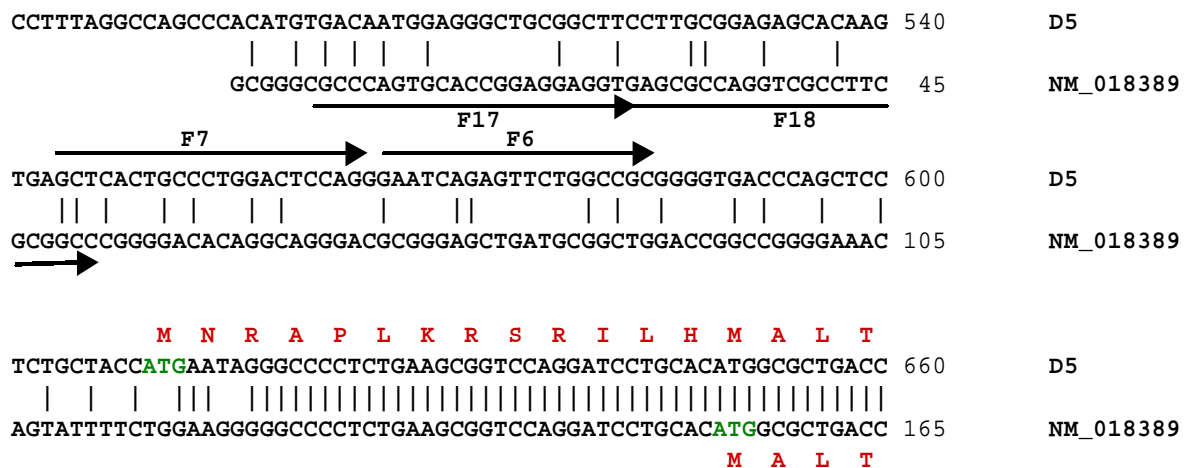
#### 4.7.2 Analyse der 5'-UTR von D5 und NM\_018389 auf genomischer und transkriptioneller Ebene

Genomische DNA wurde mittels PCR mit D5- bzw. NM\_018389-spezifischen Vorwärts-Oligonukleotiden (F7/ F6 bzw. F17/ F18) und gemeinsamen Rückwärts-Oligonukleotiden (R1/ R12), die jeweils beide möglichen Startcodons flankierten, analysiert (siehe Abb. 28). Bei der Sequenzierung ~ 230 bp langer PCR-Fragmente, die mit den Primern F7 und R1 aus genomischer Fibroblasten-DNA des Patienten und von Kontrollen amplifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass auf allen

getesteten Allelen die D5-spezifische Sequenz mit dem Startcodon in Position 610 - 612 zu finden waren, nicht aber der 5'-Bereich der kürzeren Sequenz aus der NCBI-Genbank (NM\_018389), der das Codon 649-651 als Start-ATG verwendet. Mit NM\_018389-spezifischen Primerkombinationen konnten keine Fragmente amplifiziert werden. Die D5-cDNA wurde aus einer Leber-spezifischen cDNA-Bank isoliert, während NM\_018389 aus einer Plazenta-spezifischen cDNA stammte. Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob gewebsspezifische Isoformen transkribiert wurden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus humanen Fibroblasten, humanen Lymphoblasten, humaner Leber und humaner Plazenta mit jeweils einem D5- bzw. NM\_018389-spezifischen Oligonukleotiden revers transkribiert und die resultierende cDNA im Anschluß mit D5- (F7/ F6) bzw. NM\_018389-spezifischen (F17/ F18) Vorwärts-Oligonukleotiden und den gemeinsamen Rückwärtsnukleotiden (R1/ R12) in einer sogenannten „nested-PCR“ amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte zeigte, dass ausschließlich nested RT-PCRs mit den D5-spezifischen Primern (F7+R6/ F6+R5) Fragmente der erwarteten Größe (230 bp) hervorbrachten. Sequenzierungen der Fragmente zeigten, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten um D5-Homologe handelte und den 5'-nicht-kodierenden Bereich der D5-cDNA aufwiesen. Ob die kürzere NM\_018389-Variante gewebes- oder entwicklungs-spezifisch exprimiert wird, konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Durch einen Sequenzvergleich der D5-cDNA (364 Aminosäuren kodierend) und der NM\_018389 cDNA (351 Aminosäuren kodierend) mit der seit Mitte Februar zugänglichen Datenbank des Human Genome Projekts konnte gezeigt werden, dass beide cDNAs durch die Nutzung alternativer Promotoren transkribiert werden können. Das Gen FLJ11320 ist auf Chromosomen 11 in der Position Nukleotid 426455 – Nukleotid 433618 positioniert und besteht aus 3 Exons. Zur Transkription der NM\_018389 RNA werden alle 3 Exons abgelesen: Exon 1 konnte dem 5'-nicht-kodierten Bereich der NM\_018389 cDNA zugeordnet werden und erstreckt sich von Nukleotid 426455 bis 426576. Intron 1 erstreckt sich von Nukleotid 426577 – 427868; Exon 2 von Nukleotid 427869 – 428395 und beinhaltet das Startcodon in Position 427900; Exon 3 mit dem Stopcodon und dem 3'-nicht-translatierten Bereich erstreckt sich von Nukleotid 432836 – 433618. Alle Exon-Intron Übergänge entsprechen der klassischen GT-AG-Regel. Die Transkriptionstart der D5 RNA befindet sich an Position 427252. Das resultierende Exon 2' erstreckt sich von Nukleotid 427252 –

428395 und beinhaltet das Startcodon in Position 427861, 39 Nukleotide 5' des NM\_018389 Translationsstarts und resultiert in einem um 13 Aminosäuren verlängertes Protein. Intron 2 und Exon 3 entsprechen denen der NM\_018389 RNA.



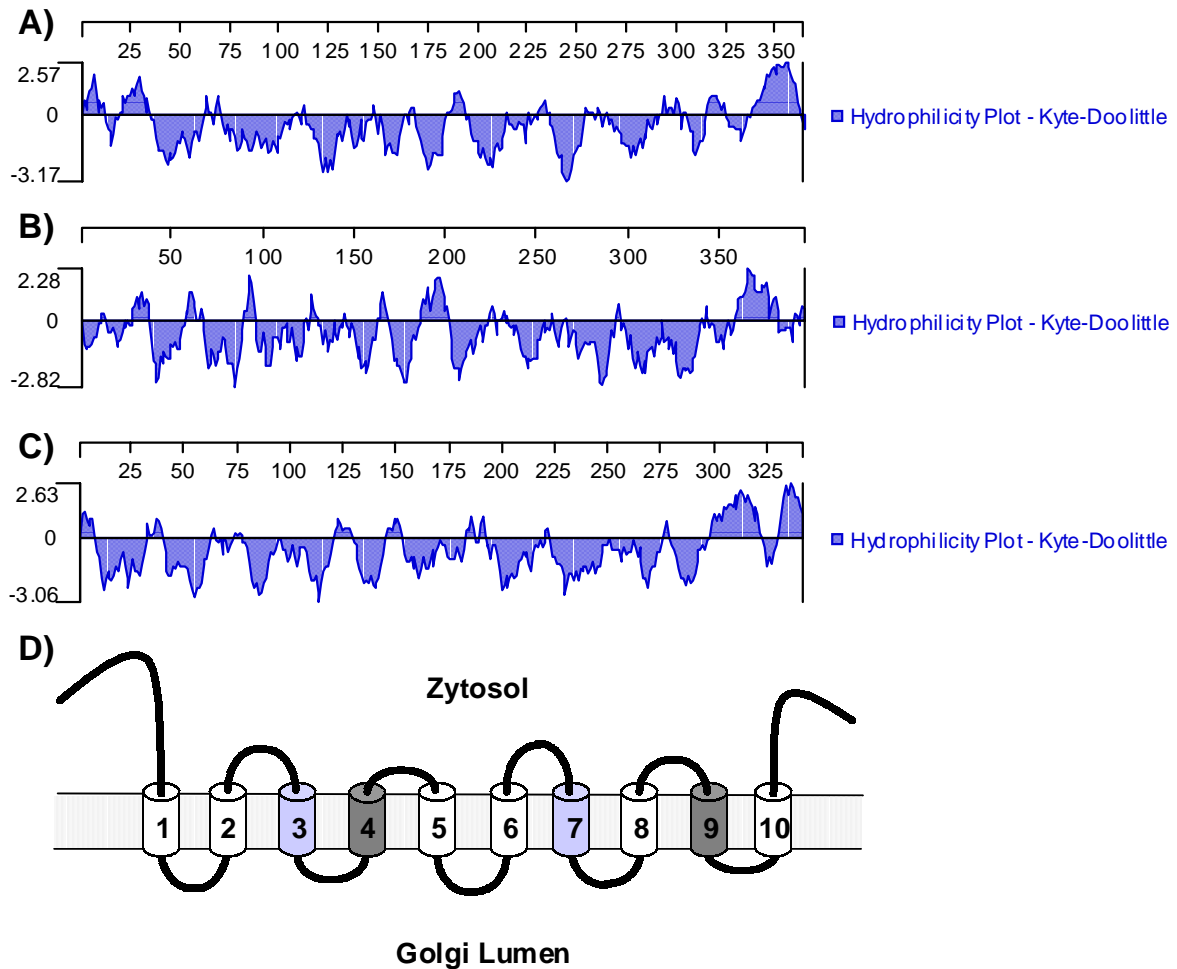
**Abb. 28:** Alignment der 5'-Enden von D5 und NM\_018389 und Lage der spezifischen Oligonukleotide für die Analyse der 5'-nicht-kodierenden Bereiche auf genomischer Ebene sowie der Analyse der Transkription mittels nested RT-PCR mit RNAs verschiedener Gewebe. Position der Rückwärtsprimer in D5: R1 (nt 828-849); R12 (nt 809 – 827).

#### 4.7.3 Analyse der aus D5 abgeleiteten Aminosäure-Sequenz

Für die aus der D5-cDNA abgeleiteten 364 Aminosäuren langen Sequenz ergab sich ein Molekulargewicht von 39,8 kDa für den kodierenden Bereich von Nukleotid 610 – 1705. Im Hydrophilizitätsplot nach Kyte-Doolittle (siehe Abb. 29A) zeigte sich, dass es sich bei dem Protein um ein stark hydrophobes Protein handelte. Ein Vergleich des D5-Plots mit Kyte-Doolittle Hydrophilizitätsplots bekannter Zuckernukleotid Transporter zeigte, dass sich signifikante Ähnlichkeiten in den Plot-Mustern (Abb.

29A-C) ergaben. Dabei unterbrachen kurze hydrophile Sequenzen mehrere hydrophobe Domänen, wobei für eine Reihe von Zuckernukleotid Transportern wie z. B. dem humanen UDP-Galaktose Transporter (Miura et al., 1996, Abb. 29B), der 10 dieser hydrophoben Domänen aufweist, postuliert wurde, dass es sich bei diesen Domänen um Transmembrandomänen handelte. Die Computer-gestützte Topologie-Analyse mit dem TMhmm-Algorithmus (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0>; Sonnhammer et., 1998) der D5-Aminosäuresequenz sprach für 10 dieser Transmembrandomänen, wobei N- und C-Terminus des Proteins in das Cytosol gerichtet waren (Abb. 29D). Die vier Transmembrandomänen 3,4,7 und 9 stellten dabei hochkonservierte Domänen im Vergleich mit Orthologen (siehe 4.8.1) dar. Die Domäne 4 und vor allem Domäne 9 wiesen zudem eine ungewöhnlich hohe Hydrophilizität auf, so dass Domäne 9 mit Standard-Algorithmen (PredictProtein; <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>) nicht zu erfassen war. Dieses Programm wies dem D5-verwandten GDP-Mannose Transporter aus *L. donovani* (Abb. 29C und Dendrogramm Abb. 31) zehn Transmembrandomänen zu. Darüber hinaus wurde allen bisher auf ihre Topologie untersuchten Zuckernukleotid Transportern eine gerade Anzahl von Transmembrandomänen zugeordnet, wobei die N- und C-termini dieser Proteine der zytosolischen Seite zugewandt sind (Eckhardt et al., 1999; Gao et al., 2000).

Die Aminosäuresequenz enthält eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (N-X-S/T) an Position N297 der Aminosäuresequenz. Des weiteren befinden sich eine Reihe von Proteinkinase C- und zwei Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen in der D5-Aminosäuresequenz, über deren Nutzung keine Aussage getroffen werden kann.

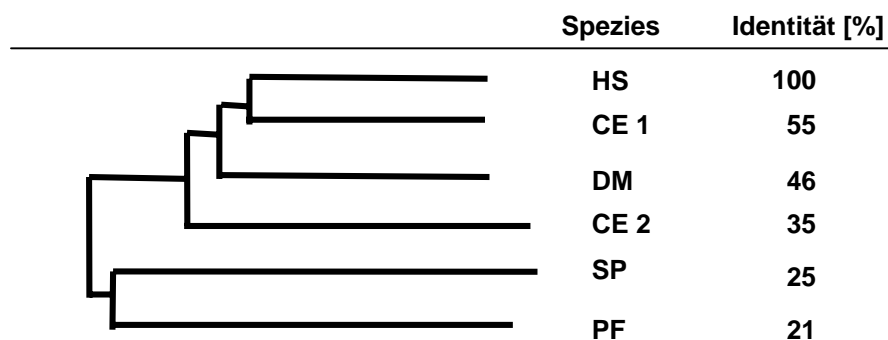


**Abb. 29:** **Hydrophilizitätsplot nach Kyte-Doolittle** (PROTEAN-Programm; DNA Star) **und vorgeschlagene Topologie** der abgeleiteten Aminosäuresequenz der D5-cDNA (A) im Vergleich mit dem humanen UDP-Galaktose Transporter (B) und dem Leishmania GDP-Mannose Transporter (C). Die Flächen oberhalb zeigen hydrophile, Flächen unterhalb der Linie hydrophobe Sequenzen. Die Skalierung oberhalb der Plots weist die Länge des Proteins aus. **D)** Vorgeschlagene Topologie der D5-Aminosäuresequenz in der Golgi-Membran. Die hochkonservierten Transmembrandomänen 3, 4, 7 und 9 sind farblich hervorgehoben. Die Transmembrandomänen 4 und 9 besitzen zusätzlich eine ungewöhnlich hohe Hydrophilie.



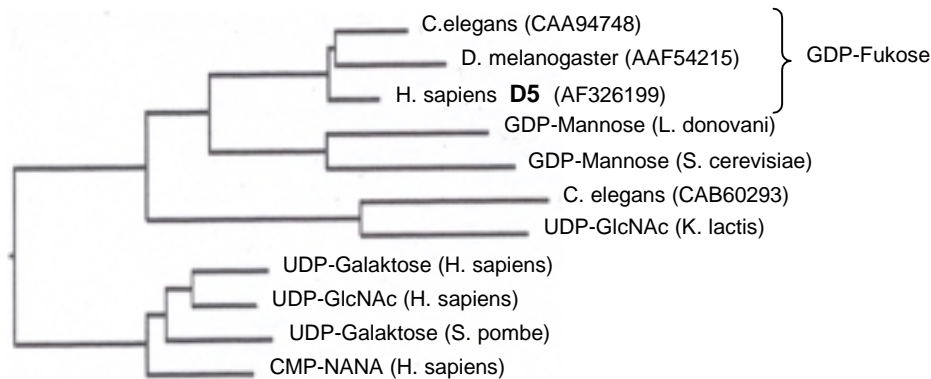
#### 4.7.4 Orthologe und Homologe der D5-Sequenz (GDP-Fukose Transporter)

Mittels Sequenzvergleichen (BLAST-search, BLAST 2 Sequences; NCBI und ClustalW; EMBL) konnten Orthologe zu dem putativen, humanen GDP-Fukose Transporter (D5) in anderen Spezies wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* identifiziert werden. Die Identität der Orthologen dieser Invertebraten mit dem humanen GDP-Fukose Transporter betrug zwischen 35 und 58% (Abb. 30). Zudem konnten ähnliche Gene anderer Funktion in *Schizosaccharomyces pombe* und *Plasmodium falciparum* gefunden werden, die sich zu 25 bzw. 21% identisch mit dem humanen GDP-Fukose Transporter zeigten, jedoch nicht für einen solchen Transporter kodieren sollten, da in keiner der beiden Spezies fukosylierte Strukturen bekannt sind. Bei einem BLAST (NCBI) mit einer Maus-EST-Bank konnten drei unvollständige EST-Klone identifiziert werden, die in den klonierten Bereichen bis zu 81% Homologie auf Aminosäureebene zu D5 aufwiesen (Acc.-Nr.: AI451820; AA244848; AW762672).



**Abb. 30:** Putative GDP-Fukose Transporter Orthologe. Das Dendrogramm der Proteinsequenzen verschiedener Spezies wurde mit dem ClustalW Programm erstellt. Die Abkürzungen stehen für: HS = *Homo sapiens* (D5); CE = *Caenorhabditis elegans*, (1) CAA94748; (2) CAB60293; DM = *Drosophila melanogaster*, AAF54215; SP = *Schizosaccharomyces pombe*, CAB52714; PM = *Plasmodium falciparum*, AAC71896

Sequenzvergleiche mit bereits klonierten Zuckernukleotid Transportern ergaben Homologien auf Aminosäureebene von 13 – 19%, wobei der GDP-Mannose Transporter aus *Leishmania donovani* (Acc-Nr. 1041825) die höchste Identität zum putativen humanen GDP-Fukose Transporter (D5) aufwies (Abb. 31).



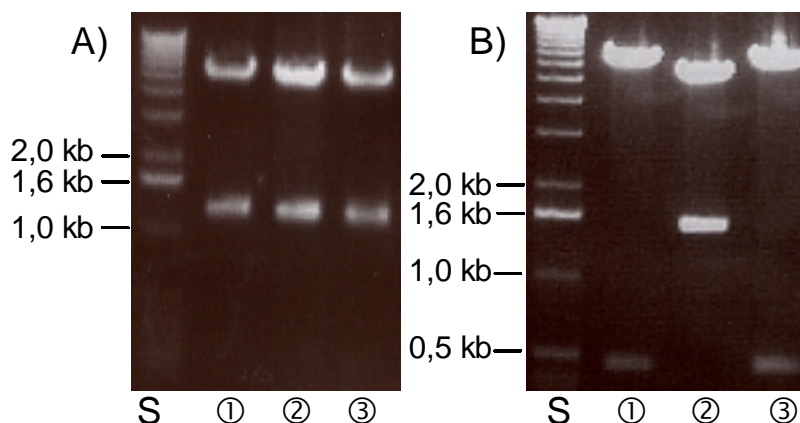
**Abb. 31:** Dendrogramm der D5 Orthologen und einiger bekannter Zuckernukleotid Transporter. Das Dendrogramm der angenommenen Verwandtschaftsverhältnisse wurde mit den ausgewiesenen Aminosäuresequenzen im ClustalW-Programm erstellt.

#### 4.7.5 Korrektur des GDP-Fukose Imports in A.C.-Fibroblasten

Die phänotypische Korrektur der Hypofukosylierung in den Fibroblasten des Patienten A.C. während der Komplementationsklonierung der D5-cDNA, die Ähnlichkeit des aus der D5-cDNA abgeleiteten Proteins im Kyte-Doolittle Hydrophilizitätsplot mit den Plots bekannter Zuckernukleotid Transporter sowie die angenommene Topologie der D5-Proteins sprachen dafür, dass die D5-Sequenz für den GDP-Fukose Transporter kodierte. Letztlich musste ein funktioneller Assay Aufschluss darüber geben, ob der verminderte GDP-Fukose Import in den Golgi-Apparat des Patienten A.C. durch die Expression der D5-cDNA partiell oder vollständig rekonstituiert werden könnte oder ob die phänotypische Korrektur der Hypofukosylierung während der Expressionsklonierung auf einem Sekundäreffekt beruhte.

#### 4.7.5.1 Klonierung der D5-cDNA in den selektierbaren, retroviralen Expressionsvektor pLNCX2

Die retrovirale cDNA-Bank lag in dem pLIB-Vektor vor, der weder einen selektierbaren Marker noch einen starken zusätzlichen Promotor vor dem cDNA-Insert enthält. Für die funktionelle Analyse der D5-cDNA sollte ein hohes Expressionsniveau in den transduzierten Zellen erreicht werden. Die transduzierten Patientenfibroblasten sollten von nicht-transduzierten Zellen selektionierbar sein, um stabil D5 exprimierende Zellen untersuchen zu können. Um diese Erfordernisse zu erfüllen, wurde der kodierende Bereich des D5-Klons mit verkürzten 5'- und 3'-nicht-kodierende Bereichen in den retroviralen Expressionsvektor pLNCX2 kloniert. In diesem Vektor kontrolliert der MMLV-5'-LTR Promotor die Expression des eukaryontischen Selektionsmarkers Neo<sup>r</sup>, während das entsprechende Insert unter der Transkriptionskontrolle des humanen Cytomegalovirus Promotors ( $P_{CMV}$ ) steht. Mittels PCR wurde mit dem Vorwärts-Oligonukleotid F6 (nt 566 – 584 der D5-cDNA) und dem Rückwärts-Oligonukleotid R5 (nt 1761 – 1782, D5-cDNA) ein etwa 1,2 kb großes Fragment (D5') aus dem pLIB-D5 Konstrukt amplifiziert, in den pGEMT-Easy-Vektor subkloniert und über eine NotI-Restriktionsschnittstelle in den pLNCX2-Vektor ligiert. DNA pLNCX2-D5' transformierter Einzelklone durch einen NotI-Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des D5'-Inserts (~1,2 kb) und durch einen BamHI/ XbaI-Doppelverdau auf dessen Orientierung untersucht (Abb. 32). Sequenzierung des Klons ②, der das D5'-Insert in korrekter Orientierung (5'-LTR→5'-Ende D5') trug, stellte sicher, dass durch die PCR und Klonierung keine Mutation in den Klon pLNCX2-D5' gelangt war.

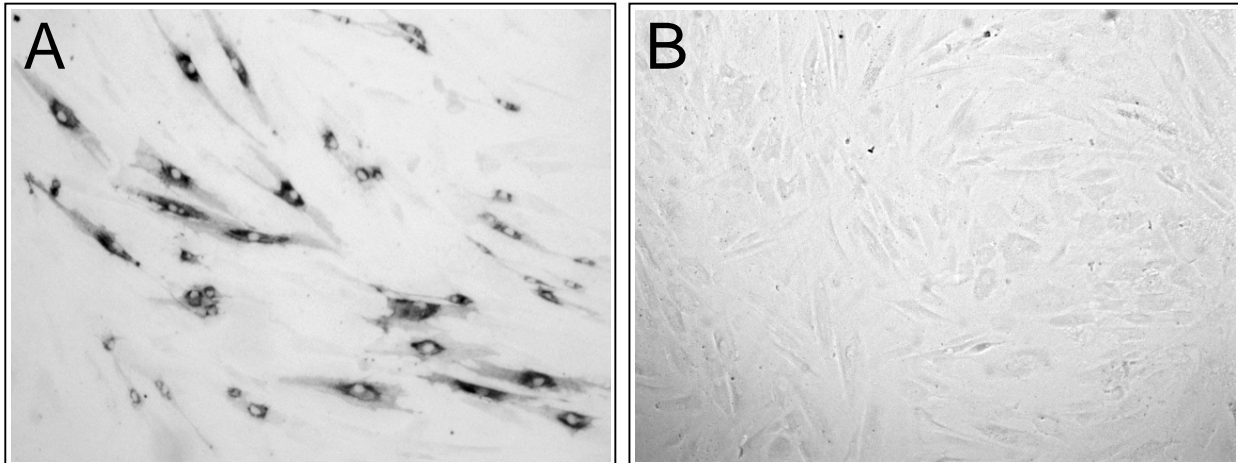


**Abb. 32:** 0,8%iges Agarosegel zur Analyse des Vorhandenseins und der Orientierung der D5'-Sequenz (1,2 kb) im retroviralen pLNCX2-Expressionsvektor (6,2 kb). pLNCX2-D5' Klon ② enthält ein Insert der erwarteten Größe von 1,2 kb (A) und der richtigen Orientierung (B, siehe oben): S = 1 kb-DNA-Standard.

#### **4.7.5.2 Infektion von A.C.-Patientenfibroblasten mit pLNCX2-D5' retroviralen Partikeln und D5'-Expression zur partiellen Rekonstitution des GDP-Fukose Imports**

Um eine mögliche Rekonstitution des GDP-Fukose Transports durch die Expression der D5'-cDNA im pLNCX2-Vektor in den Fibroblasten des Patienten A.C. mit Hilfe eines Transportassays untersuchen zu können, musste das pLNCX2-D5' Konstrukt mit hoher Effizienz in die Fibroblasten eingeschleust und exprimiert werden. In parallelen Ansätzen wurde zudem der leere pLNCX2-Vektor ohne cDNA-Insert („mock“) in die Patientenzellen eingebracht, um auszuschließen, dass durch den pLNCX2-Vektor per se der Fukosylierungsstatus der Patientenfibroblasten verändert wurde. Zur Herstellung infektiöser retroviraler Partikel wurden ecotrope Verpackungszelllinien mit dem mock-Vektor bzw. dem D5'-Konstrukt transfiziert. Nach vier aufeinanderfolgenden Infektionszyklen der Patientenfibroblasten A.C. mit amphotropen Überständen, wurden die Fibroblasten weitere sechs Tage in Kultur gehalten, ehe sie für die Präparation von Golgi-angereicherten Membranen geerntet wurden. Um die Transduktionseffizienz mit dem D5'-Konstrukt bei Patientenfibroblasten bestimmen zu können, wurden Aliquots der retroviralen Überstände zur Infektion von Patientenfibroblasten verwendet. Die Zellen wurden zur Bestimmung der phänotypischen Korrektur der Hypofukosylierung mit dem *Aleuria*-Lektin markiert. Um den Unterschied zu stabil D5'-exprimierenden Patientenfibroblasten nach einer Selektion herauszustellen, wird der hier beschriebene Versuchsaufbau im weiteren Verlauf der Arbeit als „transiente“ Komplementation bezeichnet, obgleich die entsprechende cDNA bei der Transduktion der Fibroblasten stabil in das Genom integriert.

Die *Aleuria*-Markierung infizierter Patientenfibroblasten zeigte, dass zwischen 15 und 50% (Abb. 33A) der Zellen durch Transduktion mit dem D5'-Konstrukt in bezug auf die Hypofukosylierung phänotypisch rekonstituiert wurden, während mock-infizierte Patientenfibroblasten keine *Aleuria*-abhängige Anfärbung zeigten (Abb. 33B).



**Abb. 33:** Fibroblasten des Patienten A.C. nach Infektion und transienter D5'- (A) und mock-Expression (B). Die Fibroblasten wurden histochemisch mit dem biotinylierten *Aleuria*-Lektin angefärbt und lichtmikroskopisch analysiert.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Transport-Versuche dargestellt. Neben der Bestimmung der GDP- $[^{14}\text{C}]$ Fucose Import Aktivität wurde der UDP- $[^3\text{H}]$ Galaktose Import in die Golgi-angereicherten Membranen bestimmt.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde der GDP-Fukose Import nach D5'- bzw. nach mock-Transduktion bestimmt (Tab. 6). Mock-infizierte Patientenfibroblasten wiesen eine Aktivität von  $0,13 \pm 0,06 \text{ pmol GDP-Fukose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$  (9%) gegenüber einer Aktivität der Kontrollfibroblasten von  $1,40 \pm 0,25 \text{ pmol GDP-Fukose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ ; 100%) auf. Es konnte davon ausgegangen werden, dass der mock-Vektor alleine keinen signifikanten Effekt auf die GDP-Fukose Importaktivität besaß (Tab. 6). Die geringere Durchschnittsaktivität der mock-infizierten Zellen gegenüber nicht-infizierten Patientenfibroblasten ( $0,27 \pm 0,09 \text{ pmol GDP-Fukose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ ; 19%) kann durch Änderungen bezüglich der Bestimmung des Hintergrunds bei der Versuchsdurchführung erklärt werden. Die gleichzeitig durchgeführten UDP-Galaktose Transportversuche wiesen annähernd vergleichbare Werte für Kontrollfibroblasten ( $3,04 \pm 1,12 \text{ pmol UDP-Galaktose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ ; 100%), nicht-infizierte ( $2,80 \pm 0,32 \text{ pmol UDP-Galaktose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ ; 92%) sowie mock-infizierte Patientenfibroblasten ( $2,42 \pm 0,21 \text{ pmol UDP-Galaktose} \times$

mg<sup>-1</sup> Protein × min<sup>-1</sup>; 80%) auf, so dass die Integrität der Membranen gewährleistet war.

| <b>Infektion</b>                         | <b>GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose Import</b><br>[pmol × mg <sup>-1</sup> Protein × min <sup>-1</sup> ] | <b>UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose Import</b><br>[pmol × mg <sup>-1</sup> Protein × min <sup>-1</sup> ] |
|--|--|--|
| <b>Patient A.C.</b> n.i.                 | 0,27 ± 0,09<br>(n = 10)  | 2,80 ± 0,32<br>(n = 6)   |
| mock                                     | 0,13 ± 0,09<br>(n = 4)   | 2,42 ± 0,21<br>(n = 3)   |
| Experiment1 D5'<br>(15 – 20%)            | 0,66 ± 0,08<br>(n = 2)   | 2,31 ± 0,04<br>(n = 2)   |
| Experiment2 D5'<br>(~ 50%)               | 0,80 ± 0,19<br>(n = 2)   | 1,07<br>(n = 1)  |
| <b>Kontrollen</b> n.i.<br>(6 Zelllinien) | 1,40 ± 0,25<br>(n = 20)  | 3,04 ± 1,12<br>(n = 19)  |

**Tab. 6: GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose und UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose Import in primäre Fibroblasten des Patienten A.C. und von verschiedenen Kontrollzelllinien.** Die Tabelle stellt die Ergebnisse der Transport-Assays mit den beiden Zuckernukleotiden in Patientenfibroblasten A.C. nach Infektion mit den angegebenen pLNCX2-Konstrukten (mock bzw. D5') bzw. ohne Infektion (n.i.) und den Transport beider Zuckernukleotide in Kontrollfibroblasten ohne Infektion mit pLNCX2-Konstrukten dar. Angegeben sind der Durchschnittswerte und die Standardabweichung der mit n bezifferten Experimente. Die Prozentangaben in den Klammern der D5'-Experimente stellen den Anteil der transduzierten Patientenfibroblasten dar und wurde durch eine Anfärbung nach *Aleuria*-Lektin Inkubation ermittelt.

Im ersten Experiment mit D5'-infizierten Patientenfibroblasten konnte mit dem *Aleuria*-Lektin Assay eine Transduktionseffizienz von 15 – 20% ermittelt werden. Die GDP-Fukose Importaktivität in den D5'-infizierten Zellen war in diesem Experiment

auf 47% ( $0,66 \pm 0,08 \text{ pmol GDP-Fucose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ ) gegenüber der Aktivität in Kontrollzellen (s.o.) gestiegen. Die UDP-Galaktose Import Aktivität in den D5'-infizierten Zellen lag bei  $2,31 \pm 0,04 \text{ pmol UDP-Galaktose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$ . Der gegenüber der Transduktionseffizienz (15 – 20%) vergleichbar hohe Anstieg in der GDP-Fucose Importaktivität kann durch die CMV-Promotor-abhängige Überexpression der D5'-Sequenz erklärt werden. Normalisierte man die durch die D5'-Expression hervorgerufene Erhöhung des GDP-Fucose Importaktivität in den Fibroblasten des Patienten A.C. mit: erstens, der Transduktionseffizienz von 15 – 20%; zweitens, dem basalen GDP-Fucose Import in den mock-infizierten Patientenfibroblasten und drittens, der UDP-Galaktose Transportaktivität, so zeigte sich anhand dieser Berechnung, dass D5'-infizierte Zellen durch die Überexpression eine ~ 3fach erhöhte Importrate gegenüber Kontrollfibroblasten aufwiesen.

Im zweiten Experiment (Tab. 6) mit D5'-infizierten Patientenfibroblasten konnte anhand der phänotypischen Korrektur der Hypofukosylierung an D5'-infizierten Patientenfibroblasten eine Transduktionseffizienz von etwa 50% ermittelt werden (Abb. 33B). Die GDP-Fucose Importaktivität lag in diesen Zellen bei  $0,80 \pm 0,19 \text{ pmol GDP-Fucose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$  und war somit auf 57% verglichen mit der Aktivität von Kontrollfibroblasten erhöht. Die UDP-Galaktose Transportaktivität war in diesem Experiment bei einer Einfachbestimmung mit  $1,07 \text{ pmol UDP-Galaktose} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$  (44%) auf weniger als die Hälfte des Durchschnittswerts in mock-infizierten Patientenfibroblasten (s.o.) reduziert. Wurde die GDP-Fucose Importrate D5'-infizierter Zellen wie im ersten Experiment mit a) der Transduktionsrate, b) der basalen GDP-Fucose Importaktivität in mock-infizierten Patientenfibroblasten und c) der UDP-Galaktose Transportaktivität normalisiert, so konnte für D5'-exprimierende Zellen des zweiten Experiments eine ~ 2,5fach erhöhte GDP-Fucose Importaktivität gegenüber Kontrollfibroblasten errechnet werden.

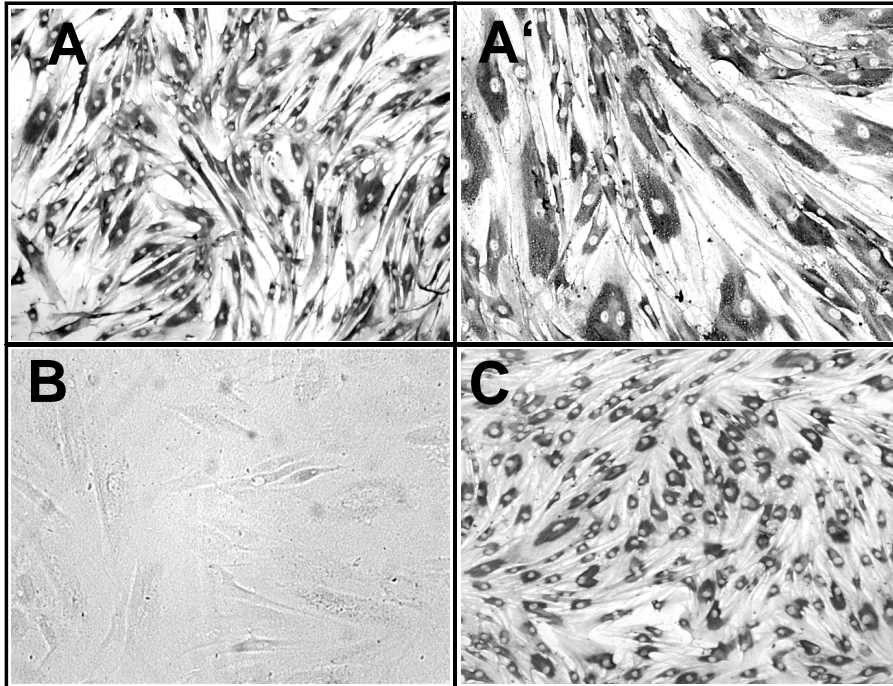
#### **4.7.5.3 Infektion von primären Fibroblasten des Patienten A.C. mit pLNCX2-D5' retroviralen Partikeln zur Herstellung stabil exprimierender Zellen**

Primäre Fibroblasten des Patienten A.C. wurden, wie in 4.2.3.2 beschrieben, mehrfach mit pLNCX2-D5'-haltigen, retroviralen Überständen amphotroper PT67-Verpackungszellen infiziert. Nach Beendigung der Infektionszyklen wurden die Fibroblasten weitere vier Tage in Normalmedium kultiviert, ehe das Medium mit dem Selektionsmarker Neomycin (Geneticin<sup>®</sup>) supplementiert wurde. Transduzierte Patientenfibroblasten, die durch die Integration der LTR-flankierten Sequenz neben der D5'-cDNA auch das Neomycin-Resistenzgen (Neo<sup>R</sup>) erworben hatten, überlebten die Selektion und wuchsen für 10 Tage unter Selektionsdruck, ehe das Selektionsmedium durch Normalmedium ersetzt wurde.

#### **4.7.5.4 Histochemische Analyse stabil D5'-exprimierender Fibroblasten des Patienten A.C. durch *Aleuria*-Lektin Markierung**

Stabil D5'-exprimierende Patientenfibroblasten, transient mock-infizierte Patientenfibroblasten (A.C.) und Kontrollfibroblasten wurden auf gelatinisierten Deckgläschen ausplattiert und für weitere 48 Stunden in Kultur gehalten. Nach der Fixierung und der Markierung mit dem biotinylierten *Aleuria*-Lektin wurden die Zellen lichtmikroskopisch analysiert. Die in Abb. 34 beispielhaft dargestellten Resultate der *Aleuria*-Markierung zeigen deutlich, dass stabil D5'-exprimierende Patientenfibroblasten (A; A') durchweg die typisch perinukleäre Anfärbung aufweisen, wie sie auch in Kontrollfibroblasten (B) vorzufinden sind. Die mock-infizierten Patientenfibroblasten (C) hingegen weisen keine derartige Färbung auf. Dieser Befund unterstreicht die D5'-abhängige Korrektur der Hypofukosylierung von Patientenfibroblasten.



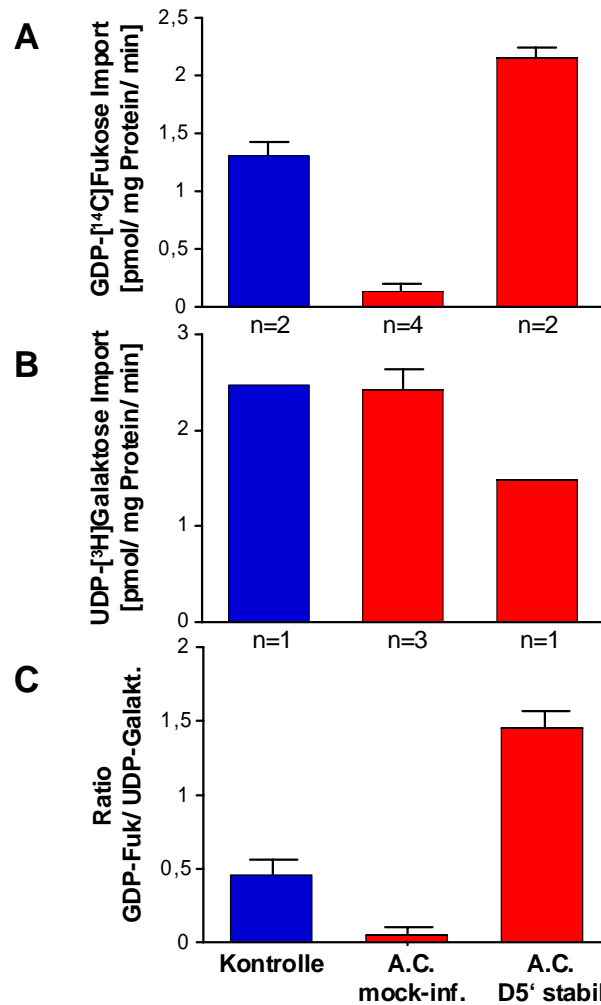


**Abb. 34:** *Aleuria*-markierte Fibroblasten des Patienten A.C. mit stabiler D5'-Expression (A; A') bzw. transients mock-Expression (B) sowie Kontrollfibroblasten (C) zur phänotypischen Analyse fukosylierter Glykokonjugate.

#### 4.7.5.5 GDP-Fukose Import Aktivität stabil D5'-exprimierender Patientenfibroblasten

Zur Bestimmung der GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose bzw. UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose Import Aktivität stabil D5'-exprimierender Fibroblasten des Patienten A.C. wurden Golgiangereicherte Vesikel isoliert und mit den entsprechenden Zuckernukleotiden unter Standardbedingungen inkubiert. Stabil D5'-exprimierende Zellen besitzen mit  $2,15 \pm 0,12$  pmol GDP-Fukose/ mg Protein/ min (164%) nicht nur eine weitaus höhere GDP-Fukose Import Aktivität als mock-infizierte Patientenfibroblasten ( $0,13 \pm 0,09$  pmol GDP-Fukose/ mg Protein/ min, 10%), sondern zeigen in dem dargestellten Versuch einen gegenüber Kontrollfibroblasten ( $1,31 \pm 0,11$  GDP-Fukose pmol GDP-Fukose/ mg Protein/ min; 100%) signifikant erhöhten GDP-Fukose Import (Abb. 35A). Wird die GDP-Fukose Import Aktivität für die UDP-Galaktose Import Aktivität normalisiert (Abb. 35B), so ergibt sich ein noch drastischeres Bild der Rekonstitution des GDP-Fukose Imports in Patientenfibroblasten A.C. durch die D5'-Sequenz (Abb. 35C). Das Verhältnis von GDP-Fukose Importaktivität und UDP-Galaktose Importaktivität zeigt,

dass der Import in stabil D5'-exprimierenden Patientenfibroblasten auf 315% gegenüber Kontrollfibroblasten gestiegen ist. Demnach besitzt jeder der stabil D5'-exprimierenden Patientenfibroblasten durchschnittlich eine um den Faktor drei erhöhte GDP-Fukose Importaktivität, die aufgrund der Kontrolle der D5'-Expression durch den starken CMV-Promotor erreicht werden kann.

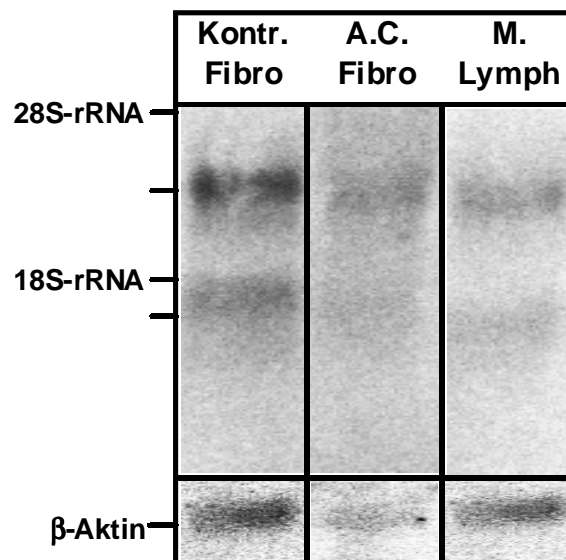


**Abb. 35:** Import von GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose (A), UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose (B) und die Ratio aus GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose über UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose (C) in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontrollfibroblasten sowie Fibroblasten des Patienten A.C. nach retroviraler mock-Infektion (pLNCX2) bzw. mit stabiler D5'-Expression nach Infektion (pLNCX2-D5') und Selektion. Standardbedingungen: 3 μM GDP-[<sup>14</sup>C]Fukose bzw. 0,5 μM UDP-[<sup>3</sup>H]Galaktose; 10 min Inkubationszeit bei 30°C.

## 4.8 Analyse der D5-spezifischen RNA-Transkription

### 4.8.1 Analyse der D5-RNA in Fibroblasten des Patienten A.C., in Kontrollfibroblasten und in Lymphoblasten des Patienten M.

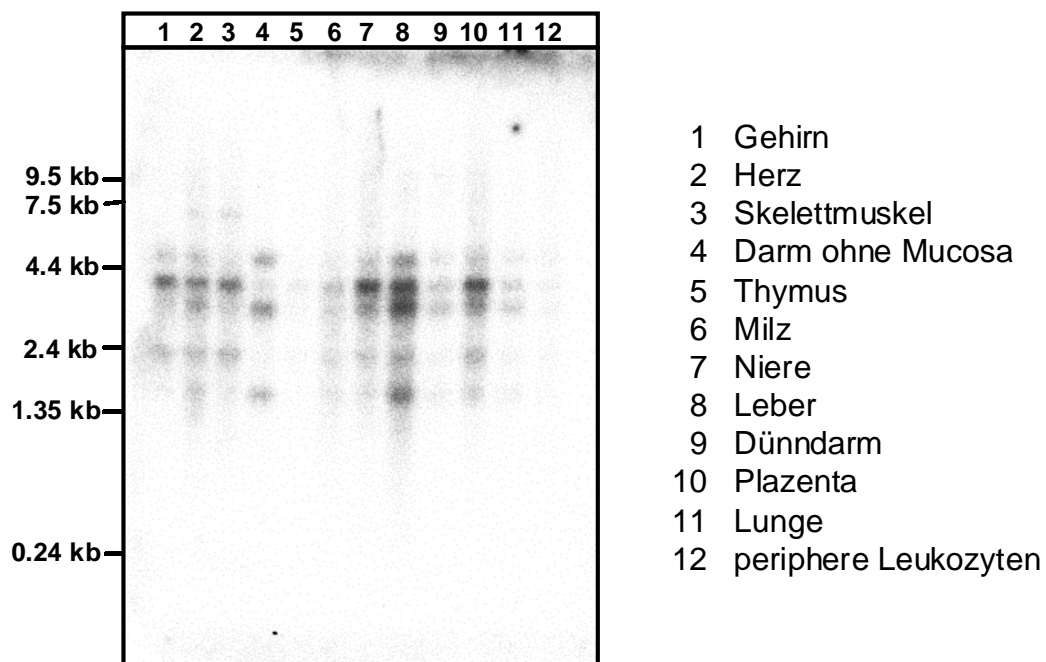
Aus Fibroblasten des Patienten A.C., einer Fibroblasten-Kontrollzelllinie sowie aus Lymphoblasten des Patienten M. wurde Gesamt-RNA isoliert und in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der RNA auf eine Membran, wurde diese mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten D5-cDNA-Sonde (1155 bp), die mittels PCR mit den Oligonukleotiden F1 (nt 627 – 651) und R5 (nt 1761 – 1782) hergestellt wurde, hybridisiert. Wie in Abb. 36 zu erkennen ist, konnten in allen drei Zelllinien jeweils mindestens zwei distinkte Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden. Über Korrelation der in dem Formaldehyd-Agarosegel sichtbaren 28S- und 18S-rRNA-Banden, wurden den beiden Signalen Längen von etwa 2,5 und 1,5 kb zugeordnet. Als interne Kontrolle der RNA-Proben wurde das humane  $\beta$ -Aktin-Transkript detektiert.



**Abb. 36:** Northernblot-Analyse der D5-Transkripte aus Kontrollfibroblasten, Fibroblasten des Patienten A.C. sowie Lymphoblasten des Patienten M.. Gesamt-RNA der Zelllinien (je 6  $\mu\text{g}$ ) wurden im Gel aufgetrennt und mit der radioaktiv markierten D5-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Membran mit einer humanen  $\beta$ -Aktin-Sonde hybridisiert. Die 28S- und 18S-rRNAs sind als Standards dargestellt.

#### 4.8.2 Analyse der D5-Transkripte in verschiedenen humanen Geweben

Zur gewebsspezifischen Analyse der D5-Transkripte wurde ein humaner Northern-Blot (Clontech; MTN™ = multiple tissue northern blot), auf dem PolyA<sup>+</sup>-RNAs zwölf verschiedener Gewebe transferiert wurden, eingesetzt. Die geblottete RNA-Menge ist mittels konstanter  $\beta$ -Aktin Hybridisierungssignale der Gewebe einander angeglichen. Der in Abb. 37 dargestellte Blot wurde mit der in Abschnitt 4.8.1 beschriebenen D5-spezifischen Sonde hybridisiert. Insgesamt konnten in dem Blot sechs verschiedene RNA-Transkripte unterschiedlicher Größe und unterschiedlicher gewebsspezifischer Verteilung detektiert werden, wobei einige Gewebe mehrere Transkripte in unterschiedlicher Stärke exprimierten (z.B. Leber), andere Gewebe wie Darm wenige Transkripte oder aber wie in peripheren Leukozyten keinerlei Transkript zu detektieren war (Abb. 37). Es konnten Transkripte in dem Größenbereich von 1,4 bis 6,4 kb detektiert werden. Die höchste Expression konnte in der Leber mit starken Signalen von 3,4 und 3,1 kb nachgewiesen werden. In allen Geweben, in denen Transkripte zu detektieren sind, ist das 3,4 kb-Signal vorherrschend. Thymus und Leukozyten zeigten unter den gewählten Bedingungen keine Signale, während Darm-RNA ein starkes Signal bei 3,1 kb, nicht jedoch bei 3,4 kb aufwies (Abb. 37).



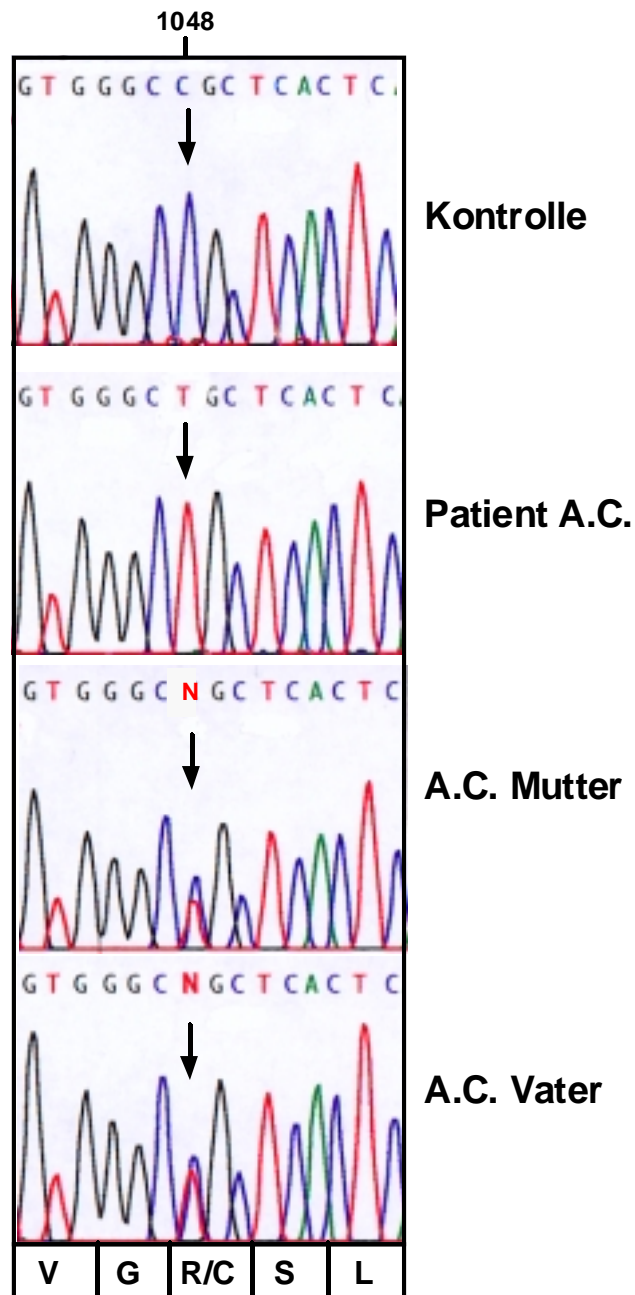
**Abb. 37:** Ein humaner MTN™ (= multiple tissue northern blot) mit zwölf verschiedenen Gewebe-RNAs wurde mit einem D5-spezifischen 1155bp PCR-Sonde hybridisiert.

## **4.9 Mutationsanalyse des GDP-Fukose Transporters (D5) des CDG-IIc Patienten A.C. und der Eltern**

Die phänotypische Korrektur der Hypofukosylierung und die biochemische Korrektur des GDP-Fukose Imports in Fibroblasten des Patienten A.C. durch die D5'-cDNA sollten letztlich durch den molekulargenetischen Nachweis von Mutationen in der D5-cDNA bzw. der genomischen DNA des Patienten A.C. sowie seiner Eltern ergänzt werden.

### **4.9.1 Analyse der GDP-Fukose Transporter Transkripte mittels „nested“ RT-PCR**

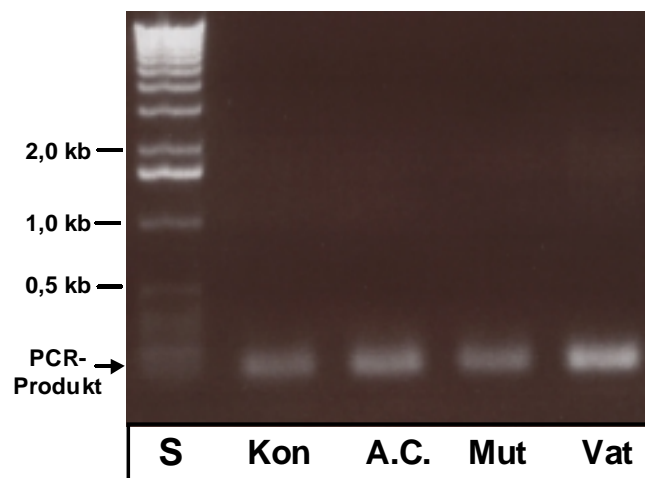
In Abschnitt 4.8.1 konnte mit Northern-Blot Analyse gezeigt werden, dass Fibroblasten des Patienten A.C. gleiche Mengen des D5-Transkript im Verhältnis zu Kontrollfibroblasten aufweisen. Zur molekulargenetischen Untersuchung der Transkripte wurde Gesamt-RNA aus den Fibroblasten des Patienten A.C., der Eltern und verschiedener Kontrollzelllinien analysiert. 1 µg der entsprechenden RNA-Proben wurden mit einer reversen Transkriptase zur Gewinnung von cDNA inkubiert und letztere anschließend in einer nested PCR mit den D5-spezifischen Oligonukleotid-Kombinationen F7/ R6 und F6/ R5 amplifiziert (Nukleotid 566 – 1782), so dass der gesamte kodierende Bereich der D5-cDNA (Nukleotid 610 – 1705) durch überlappende Sequenzierungen analysiert werden konnte. In Produkten unabhängiger RT-PCR Reaktionen des Patienten A.C. konnte stets eine homozygote C>T Transition an Position 1048 innerhalb der kodierenden Sequenz identifiziert werden. Diese Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch eines Arginins gegen ein Cystein an Position 147 der Aminosäuresequenz (R147C). Bei der Analyse der parentalen RT-PCR Produkte konnte anhand der grafischen Darstellung der Sequenzen gezeigt werden, dass beide Elternteile heterozygot in bezug auf die C>T Transition an Position 1048 sind (Abb. 38). In der Analyse sechs unabhängiger RT-PCR Ansätze unterschiedlicher Kontrollzelllinien konnte diese C>T Transition in Position 1048 nicht gefunden werden.



**Abb. 38:** Identifizierung der 1048 C>T Transition in RT-PCR Produkten des Patienten A.C.. Das Alignment mit einer Kontrollsequenz zeigt, dass sich der Patient A.C. homozygot, die Eltern heterozygot in bezug auf die Mutation darstellen. Die Mutation führt zu einem Austausch an Position 147 (R147C) in der Aminosäuresequenz des GDP-Fukose Transporters des Patienten A.C..

#### 4.9.2 Genomische Analyse der GDP-Fukose Transporter Allele bei dem Patienten A.C., den Eltern sowie diversen Kontrollen

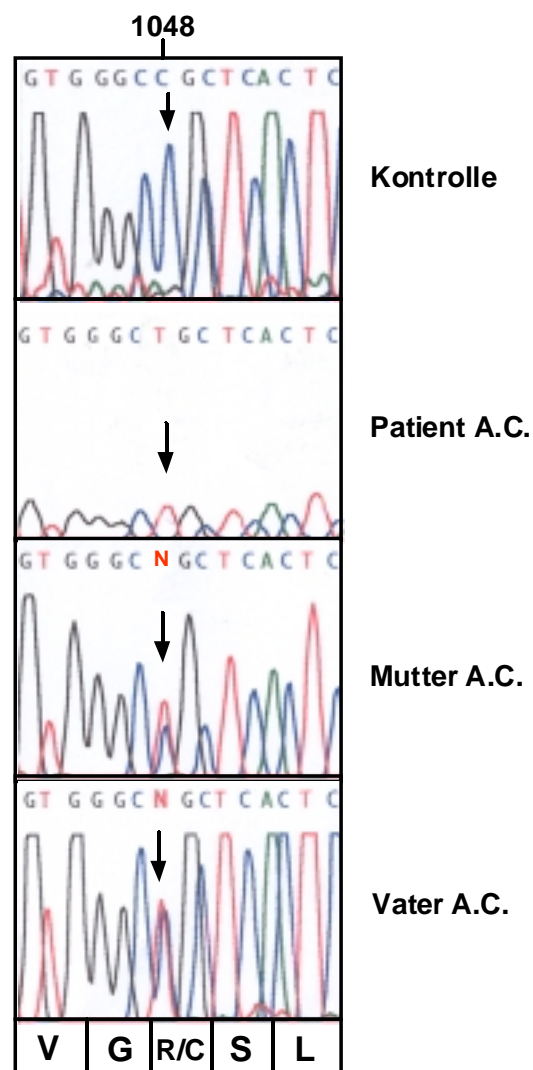
Nach der Identifizierung der 1048C>T Transition in den GDP-Fukose Transporter Transkripten des Patienten A.C. und dem Hinweis auf den Heterozygotenstatus der Eltern bezüglich der Mutation, wurden Oligonukleotide konzipiert, mit deren Hilfe eine Mutationsanalyse auf genomischer Ebene durchgeführt werden sollte. Da die genomische DNA nicht direkt sequenziert werden konnte, mussten die zu untersuchenden Sequenzen zuerst mittels PCR amplifiziert werden. Da keine Information über die Exon-Intron Struktur der genomischen DNA des GDP-Fukose Transporters vorlag, mussten C>T1048-flankierende Oligonukleotide aus der D5-cDNA gesucht werden, mit deren Hilfe kurze genomische Abschnitte mittels PCR zu amplifizieren waren. PCRs auf genomischer DNA mit der Oligonukleotid-Kombination F10 (Nukleotid 976 – 995) und R7 (Nukleotid 1089 – 1110) resultierten in 134 bp-Fragmenten (Abb. 39), die direkt aus dem PCR-Ansatz sequenziert werden konnten.



**Abb. 39:** Analyse der 134 bp-PCR-Produkte, die mit den Primern F10/ R7 aus genomischer DNA amplifiziert wurden. Neben dem 1 kb-Standard (S) wurden 5 µl der PCR-Ansätze einer Kontrolle (Kon), des Patienten (A.C.) und der Eltern (Mutter und Vater) im 1%igen Agarosegel aufgetrennt. 1µl der PCR-Ansätze wurde direkt zur F10-primed Sequenzierung verwendet.

Bei der Sequenzanalyse von 40 Kontrollallelen konnte stets die Wildtyp-Sequenz mit dem Cytosin in Position 1048 detektiert werden (Abb. 40). Bei der Sequenzierung des 134 bp PCR-Produkts (F10/ R7) aus der Amplifikation genomischer Patienten-

DNA (A.C.) wurde auf beiden Allelen die C>T Transition nachgewiesen, während bei der Sequenzierung parental gewonnener PCR-Produkte sowohl ein Wildtyp-Allel als auch ein 1048T-Allel zu finden war. Die Ergebnisse aus der genomischen Analyse der bei Patient A.C. homozygot vorliegenden C>T Transition, sowie der genomisch abgesicherte Heterozygotenstatus der Eltern an Position 1048 im Vergleich zu 40 Wildtypallelen, unterstreichen die Ergebnisse der Transkript-Analyse aus 4.9.1.



**Abb 40:** Alignment der PCR-amplifizierten, genomischen DNA-Fragmente einer Kontrolle, dem in bezug auf die C>T Transition homozygoten Patienten A.C. und der heterozygoten Eltern. Die Transition führt zu einem Aminosäure Austausch (R147C) in dem GDP-Fukose Transporterprotein.



#### 4.9.3 Expression des pLNCX2-D5' Konstrukts nach C>T Mutagenese in Fibroblasten des Patienten A.C.

Um einen Polymorphismus in Position 1048 der D5-cDNA gänzlich auszuschließen, und um die 1048C>T Transition als Krankheits-bedingende Mutation zu verifizieren, sollte der Fukosylierungsstatus der Patientenfibroblasten A.C. nach Infektion mit einer 1048C>T mutagenisierten D5-cDNA überprüft werden. Dazu wurde das pLNCX2-D5'-Konstrukt mittels Sequenz-spezifischer Mutagenese an der betreffenden Position mutagenisiert. Die dazu verwendeten komplementären Oligonukleotide für diese Reaktion (Mut1048F und Mut1048R) tragen an der zu verändernden Position anstelle des Cytosins ein Thymin. Bei einer PCR, in der das pLNCX2-D5'-Konstrukt als Matrize dient, wird das gesamte Plasmid repliziert, wobei durch die mutagenisierten Primer an der gewünschten Stelle ein Basenaustausch stattfindet. Parentale, methylierte Stränge werden anschließend durch einen DpnI-Restriktionsenzymverdau eliminiert und die mutagenisierten, nicht-methylierten Plasmide zur Transformation von *E. coli* verwendet. Die Mini-Prep DNA (pLNCX2-D5' C>T) der erhaltenen Einzelklone wurde durch Sequenzierungen überprüft und zur retroviralen Infektion der Patientenfibroblasten A.C. verwendet. Bei der *Aleuria*-Lektin Markierung der transient D5' C>T-infizierten Fibroblasten des Patienten A.C. (Abb. 41A) konnte keine Rekonstitution der Fukosylierung beobachtet werden, während transient D5'-infizierte Fibroblasten (Abb. 41B) die typische, perinukleäre *Aleuria*-Färbung aufwiesen.

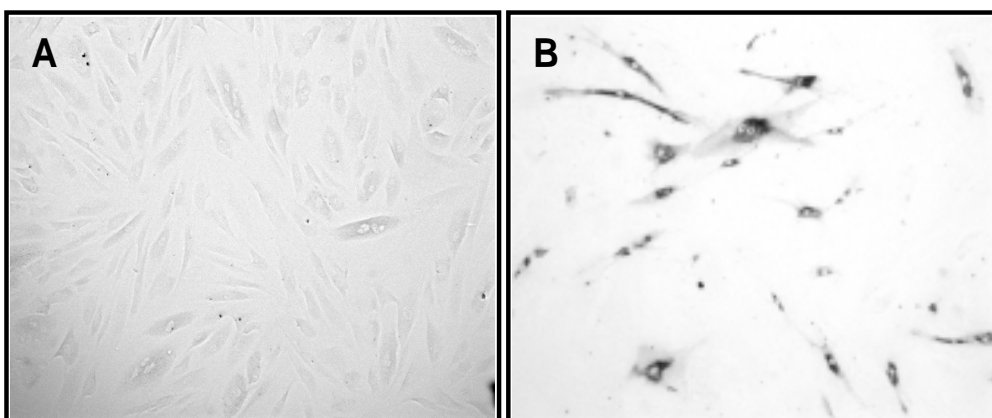


Abb. 41: *Aleuria*-markierte Fibroblasten des Patienten A.C. nach transienter, retroviraler Infektion mit dem mutagenisierten pLNCX2-D5' C>T-Konstrukt (A) und der Wildtyp-Sequenz pLNCX2-D5' (B).

#### 4.9.4 Charakterisierung des R147C Aminosäureaustauschs in der D5-Sequenz im Vergleich zum Wildtyp und den Orthologen

Dem vorgeschlagenen Model der Topologie des GDP-Fukose Transporterproteins folgend, befindet sich der Aminosäureaustausch R147C des Patienten A.C. in der vierten Transmembrandomäne des Proteins. Das hoch konservierte Arginin 147 selber ist Bestandteil einer zwischen dem humanen GDP-Fukose Transporter und seinen Orthologen aus *C. elegans* und *D. melanogaster* hoch konservierten Region aus 16 Aminosäuren (Abb. 42). Zudem findet man ein konserviertes Arginin an analogen Positionen der vierten Transmembrandomäne in dem UDP-GlcNAc aus *K. lactis* und der *C. elegans* Sequenz sqv-7, die sich *in-vitro* für die Translokation von UDP-Glukuronsäure, UDP-GlcNAc und UDP-Galaktose verantwortlich zeigt (Berninsone et al., 2000).

|              |  |                          |
|--------------|--|--------------------------|
| Patient A.C. | V A F Y N V G <sup>147</sup> C S L T T V F N Y | H. sapiens               |
| Kontrolle    | V A F Y N V G R S L T T V F N Y                |                          |
|              | V A F Y Y I G R S L T T V F S V                | D. melanog.              |
|              | V S F Y Y V G R S L T T V F N V                | C. elegans<br>(CAA94748) |

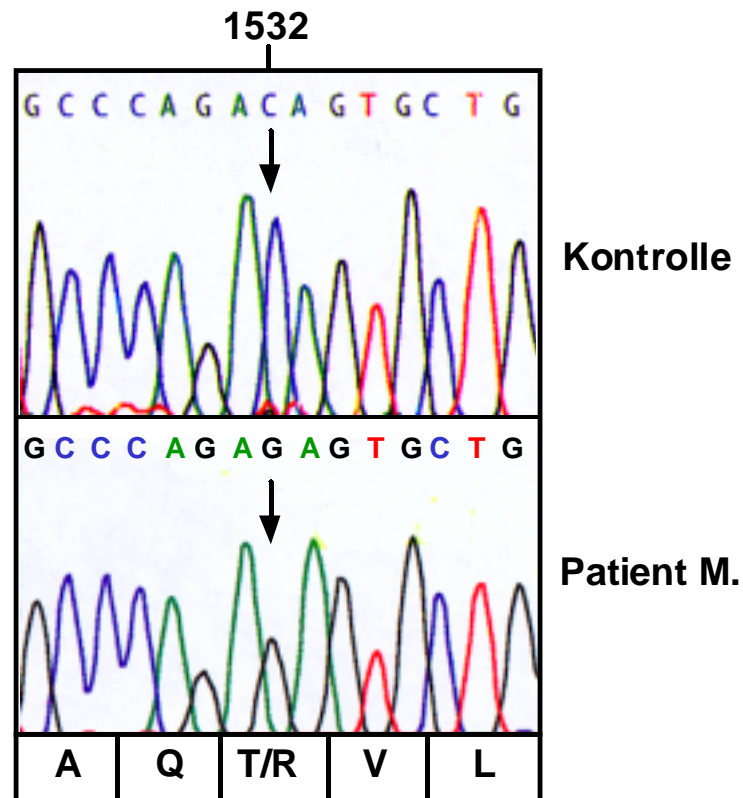
**Abb. 42:** Aminosäure-Austausch R147C im GDP-Fukose Transporterprotein des Patienten A.C.. Der Austausch in der Aminosäuresequenz aufgrund der C>T1048 Missense-Mutation ist durch den grauen Hintergrund hervorgehoben; nicht-konservierte Reste innerhalb der Orthologen sind durch eine Umrahmung gekennzeichnet.

#### **4.10 Mutationsanalyse des GDP-Fukose Transporters (D5) der Patienten M. und Y.W.**

Der zweite in Abschnitt 4.4 anhand von Lymphoblasten als GDP-Fukose Importdefizient identifizierte Patient M. (Etzioni, nicht-publiziert) und ein dritter biochemisch nicht analysierter Patient Y.W. (Etzioni et al., 1998), wurden wie Patient A.C. molekulargenetisch untersucht. Beide Patienten stammen aus arabischen Familien in Israel und zeigen massivere, dem Patienten A.C. jedoch ähnliche klinische Auffälligkeiten, wie schweren Wachstums- und geistigen Entwicklungsstörungen.

##### **4.10.1 Analyse der GDP-Fukose Transporter Transkripte mittels „nested“ RT-PCR des Patienten M. und des Patienten Y.W.**

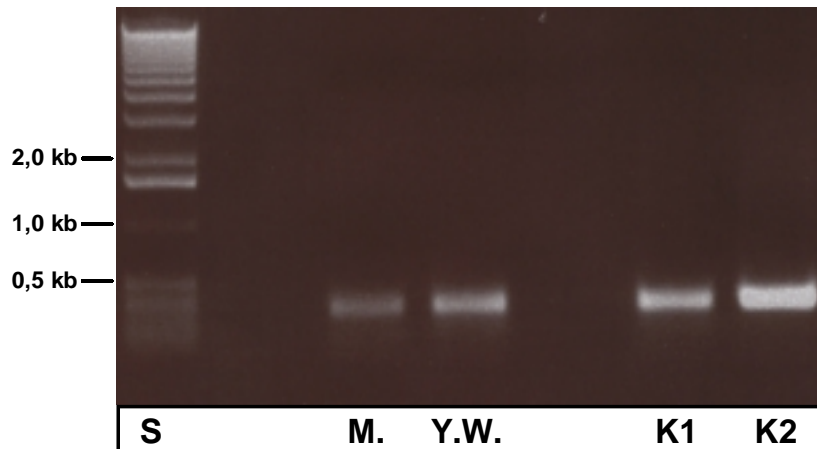
Die Northern-Blot Analyse des Patienten M. in Abschnitt 4.8.1 zeigte, dass D5-spezifische Transkripte vorlagen. Die Mutationsanalysen der Transkripte des Patienten M. und des Patienten Y.W. nach „nested“ RT-PCR und überlappender Sequenzierung der entstandenen Produkte, sollten einen ersten Hinweis auf die vorliegenden molekulargenetischen Defekte liefern. 1 µg Gesamt-RNA aus EBV-transformierten Lymphoblasten der Patienten M. und Y.W. sowie aus Kontrolllymphoblasten wurden mit Hilfe des Oligonukleotids F7 revers transkribiert. Die aus dieser Reaktion resultierende cDNA wurde mit den „nested“ Oligonukleotid-Kombinationen F7/ R6 und F6/ R5 amplifiziert und durch Sequenzierungen analysiert. Das in Abb. 43 grafisch dargestellte Ergebnis zeigt, dass bei Patient M. und Y.W. die gleichen C>G Transversionen in Position 1532 innerhalb der kodierenden Sequenzen zu finden waren und zu einem Aminosäure-Austausch von Threonin zu Arginin in Position 308 führten. Weitere Abweichungen zu verschiedenen Kontrollsequenzen konnten nicht detektiert werden. Mehrere unabhängige RT-PCRs an den Patienten-RNAs konnten die Befunde bestätigen und schlossen PCR-bedingte Artefakte aus.



**Abb. 43:** Identifizierung der 1532C>G Transversion bei Patient M., die zu einem T308R Aminosäure-Austausch in dem GDP-Fukose Transporterprotein führt. Dargestellt ist der Sequenzvergleich der RT-PCR amplifizierten Fragmente aus RNA einer Kontrollzelllinie und des Patienten M.. Bei dem Patienten Y.W. konnte die gleiche Mutation analysiert werden (nicht gezeigt).

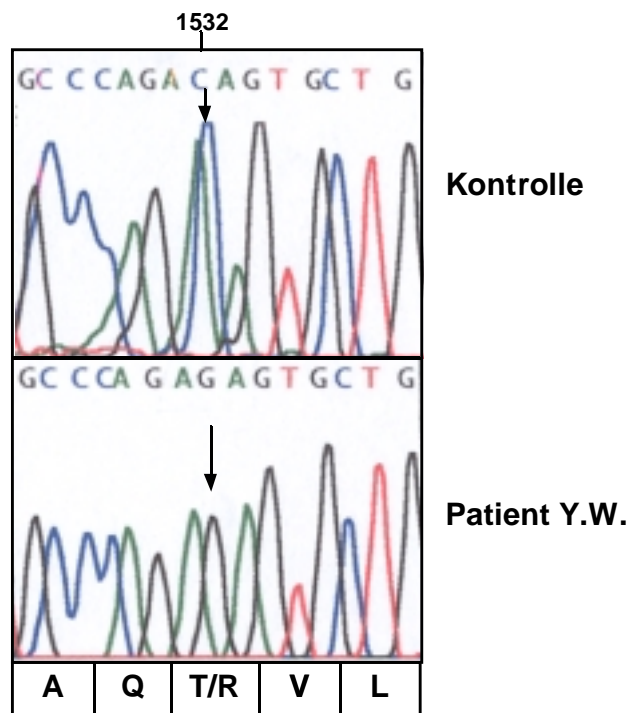
#### 4.10.2 Genomische Analyse der GDP-Fukose Transporter Allele bei den Patienten M. und Y.W. sowie diversen Kontrollen

Nach der Identifizierung der 1532C>G Transversionen in den GDP-Fukose Transporter Transkripten der Patienten M. und Y.W. wurden Oligonukleotide konzipiert, mit deren Hilfe eine Mutationsanalyse auf genomischer Ebene durchgeführt werden sollte. Mit der Oligonukleotid-Kombination F13 (Nukleotid1486 – 1505) und R5 (1761 – 1782) konnten 296 bp-Fragmente aus der genomischen DNA beider Patienten sowie Kontrollzellen amplifiziert werden (Abb. 44).



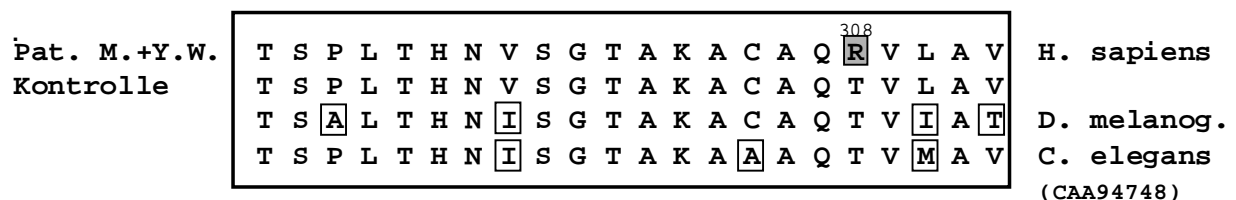
**Abb. 44:** Analyse der 296 bp-PCR Produkte, die mit den Primern F13/ R5 aus genomischer DNA amplifiziert wurden. Neben dem 1 kb-Standard (S) wurden 5  $\mu$ l der PCR-Ansätze der Patienten (M. und Y.W.) und zweier Kontrollen (K1, K2) im 1%igen Agarosegel aufgetrennt. 1  $\mu$ l der PCR-Ansätze wurde direkt zur Sequenzierung mit Oligonukleotid F13 verwendet.

Die Sequenzanalyse der genomischen PCR-Produkte von 30 Kontrollen wies in allen untersuchten Allelen ausschließlich die Wildtypsequenz auf, während sich die Allele der Patienten M. und Y.W. homozygot in Hinsicht auf die 1532C>G Transversion darstellten (Abb. 45). Parentales Material stand für eine molekularbiologische Untersuchung nicht zur Verfügung.



**Abb. 45:** Identifizierung der 1532C>G Transversion in PCR-amplifizierter genomischer DNA einer Kontrollzelllinie und des Patienten Y.W.. Die Transversion resultiert in dem Aminosäure-Austausch von einem Threonin in ein Arginin in Position 308 des GDP-Fukose Transporterproteins des Patienten Y.W.. Patient M. weist die gleiche homozygote Mutation auf (nicht dargestellt).

Das Threonin 308 ist zwischen allen bekannten GDP-Fukose Transporter Orthologen konserviert und befindet sich in einem hoch konservierten Bereich aus 22 Aminosäure (Abb. 46) und ist Bestandteil der neunten, stark hydrophilen Transmembrandomäne.



**Abb. 46:** Aminosäure-Austausch im GDP-Fukose Transporterprotein der Patienten M. und Y.W.. Der Austausch T308R ist durch die grau-hinterlegte Umrahmung hervorgehoben; nicht-konservierte Aminosäuren

## 5 Diskussion

Die Biosynthese der N-Glykane in Eukaryonten stellt einen in seinen Grundzügen hoch konservierten Prozess dar. Ein Charakteristikum der Glykane sind ihre Mikroheterogenität, die in Abhängigkeit zum Organismus, Gewebe, Entwicklung und physiologischen Status der Zelle steht. Ein oft variierender Bestandteil der Glykane sind Anzahl und Bindungsart der Fukosereste. Fukose kann in N-Glykanen der Säugerzellen  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-,  $\alpha$ 1,4- und  $\alpha$ 1,6-glykosidische Bindungen eingehen, wobei diesen Fukoseresten an den Glykoproteinen eine Reihe von Funktionen wie bei der Fertilisation (Sinowatz et al., 1998; Review), der Zell-Adhäsion (Sueyoshi et al., 1994) und der Apoptose (Hiraishi et al., 1993) zugeordnet werden. Signifikante Veränderungen in der Fukosylierung wurden in Krebszellen in Form einer Hyperfukosylierung beschrieben (Fukuda et al., 1996). Dabei korrelieren Anzahl und Bindungstyp der Fukosereste mit spezifischen Tumoren und deren Potential zur Metastasierung. Ähnlich drastische Auswirkungen auf den Organismus sollten andererseits auch bei der Hypofukosylierung von Glykanen zu erwarten sein.

### 5.1 Die Hypofukosylierung von Glykanen bei CDG-IIc Patienten basiert auf einer GDP-Fukose Transport Defizienz

Untersuchungen an Leukozyten und Fibroblasten des Patienten A.C (1.3.1) wiesen auf einen generellen Verlust fukosylierter Oligosaccharide auf Glykoproteinen hin (Marquardt et al., 1999). Anhand dieser Untersuchungen sowie biochemischen Analysen an den Zellen des Patienten konnten Defekte in der Synthese des aktivierten Zuckernukleotids GDP-Fukose, dem Donor bei der Fukosylierung, sowie ein genereller Defekt aller acht bisher bekannten humanen Fukosyltransferasen ausgeschlossen werden (1.3.2). Ein weiterer kritischer Schritt bei der Fukosylierung von Glykoproteinen ist der Transport der im Zytosol synthetisierten GDP-Fukose in das Lumen des Golgi, dem Ort der Fukosyltransferasen. Bei dem für diesen Transport verantwortlichen GDP-Fukose Transporter handelt es sich um einen Antiporter, der zum Import der GDP-Fukose luminales GMP benötigt (Capasso et al., 1984b). Dieses GMP entsteht hydrolytisch durch die Aktivität einer Golgi-ständigen

GDPase aus GDP, das nach dem Transfer des Fukoserestes auf das Glykoprotein vom aktivierten Zuckernukleotid im Golgi vorliegt (Wang et al., 1998a). In Abschnitt 4.1 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Membranextrakte der Fibroblasten des CDG-IIc Patienten A.C. eine mit Kontrollzellen vergleichbare GDPase Aktivität besitzen. Somit konnte eine Defizienz der GDPase Aktivität ausgeschlossen werden, die sekundär zu einem verminderten Import von GDP-Fukose in den Golgi führen würde.

Untersuchungen zur GDP-Fukose Import Aktivität an Golgi-angereicherten Vesikeln aus Fibroblasten und Lymphoblasten des Patienten zeigten signifikante Unterschiede zu der Importaktivität von Kontrollfibroblasten und Lymphoblasten. Vesikel der Patientenzellen zeigten einen um etwa 80 - 90% reduzierten Import des Zuckernukleotids. Die Importrestaktivität der Patientenvesikel war auf etwa 10% reduziert, wenn der Hintergrund an unspezifisch mitgeführtem Zuckernukleotid mit Hilfe von GDP-Fukose bestimmt wurde und nicht, wie in der ersten Serie der Transportexperimente, mit Hilfe des Membran-impermeablen Makromoleküls Methoxy-Inulin. Die Tatsache, dass der UDP-Galaktose Import, eines Golgi-spezifischen Zuckernukleotids, dessen Transport durch einen eigenen Antiporter vermittelt wird, in Patienten- und Kontrollvesikeln ähnliche Aktivitäten aufwies, zeigte, dass es sich um einen spezifischen Defekt im GDP-Fukose Transport handelte.

Der Gesamtimport in Kontrollvesikel setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Einer sättigbaren, hochaffinen Komponente mit einem  $K_M$ -Wert von etwa  $0,75 \mu\text{M}$  und einem niedrigaffinen, nicht-sättigbaren Anteil (Lübke et al., 1999). Der GDP-Fukose Import in Vesikel des Patienten A.C. wird nur von der niedrigaffinen Komponente gebildet. Bei der Bestimmung des Imports in Abhängigkeit zur GDP-Fukose Konzentration wurde die Importaktivität noch über den Methoxy-Inulin Import korrigiert, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Komponente des nicht-sättigbaren Imports in Kontroll- und Patientenfibroblasten tatsächlich niedriger ist.

Ein Schwachpunkt des Transportassays besteht sicherlich darin, dass der Import dann zum Erliegen kommt, wenn kein als Antiportsubstrat benötigtes GMP mehr gebildet wird. Die in den Vesikeln zu fukosylierenden Substrate in Form von Glykoproteinen und Glykolipiden limitieren bei längerer Inkubationsdauer die Bildung von GDP, da den Fukosyltransferasen keine luminalen Akzeptoren für Fukose zur Verfügung stehen.



Puglielli et al. (1999b) konnten eine Proteinfraction aus Rattenleber anreichern, die nach der Rekonstitution in Proteoliposomen eine sättigbare GDP-Fukose Transport Aktivität aufwies. Diese Proteinfraction bestand aus mehreren Banden, doch nur die Fraktion, die exklusiv ein 39 kD Protein aufwies, vermochte Transportaktivität zu vermitteln. Der  $K_M$ -Wert für den GDP-Fukose Import in diese Vesikel lag bei 2,1  $\mu\text{M}$ , konnte jedoch durch ein Beladen der Proteoliposomen mit 100  $\mu\text{M}$  GMP um den Faktor drei stimuliert werden. Der so ermittelte  $K_M$ -Wert entspricht dem in 4.2.3 ermittelten Wert in Vesikelpräparationen von Kontrollzellen.

Der Import in parentale Golgi-Vesikel zeigte keine intermediären GDP-Fukose Import Aktivitäten, wie sie bei einer autosomal, rezessiv vererbten Erkrankung zu erwarten gewesen wären. Normalisiert man den GDP-Fukose Import mit dem UDP-Galaktose Import der Eltern, so ergeben sich noch Importaktivitäten von 72 bzw. 84% (Kontrolle 100%; Patient 10 - 20%). Die annähernd normalen parentalen GDP-Fukose Importaktivitäten könnten durch den Defekt in einem Kofaktor des GDP-Fukose Transports erklärt werden, der sich erst im Homozygotenstatus des Patienten manifestiert. Allerdings konnte die Existenz eines solchen Kofaktors für keinen der bisher klonierten Zuckernukleotid Transporter gezeigt werden. Vielmehr handelt es sich bei den bisher beschriebenen Transportern um Homodimere (Abeijon et al., 1999a). Puglielli et al. (1999b) bestimmten mit Glycerolgradienten Ultrazentrifugation (5 – 30%) die funktionelle Größe des Transporters und fanden die Transportkompetente Fraktion bei etwa 80 kD, was etwa dem zweifachen Molekulargewichts des Monomers in der reduzierenden Gelelektrophorese entspricht und nahelegt, dass der GDP-Fukose Transporter funktionelle Homodimere bildet. Bei gleicher Expressionshöhe beider Allele sollten bei den heterozygoten Eltern 25% der Transporter den Wildtyp-Homodimeren entsprechen, 50% der Homodimere sollten eine defekte und eine Wildtyp Untereinheit enthalten und 25% der Homodimere sollten aus zwei defekten Untereinheiten bestehen. Da der GDP-Fukose Import bei den Eltern nur auf etwa 75% reduziert ist, scheint es, als würden Dimere, die eine defekte und eine Wildtyp Untereinheit enthalten, funktionell sein.

Letztlich konnte nur die molekulargenetische Identifizierung des Gens, das den Hypofukosylierungsdefekt in den Patientenfibroblasten verursacht, Aufschluss darüber geben, ob es sich um einen Defekt im GDP-Fukose Transporter oder in einem Kofaktor handelt.

## 5.2 Retrovirale Expressionsklonierung einer humanen cDNA-Bank in den GDP-Fukose Import-defizienten Patientenfibroblasten

Die biochemische Isolierung des von Puglielli (1999b) beschriebenen putativen 39 kD GDP-Fukose Transporters aus der Rattenleber stellt einen Ansatz für die molekularbiologische Charakterisierung des bislang in keiner Spezies identifizierten GDP-Fukose Transporters dar. Das bis zur Homogenität aufzureinigende Protein sollte in Peptide zu zerlegen sein, um die einzelnen Fragmente N-terminal ansequenzieren zu können. Aus der erhaltenen Aminosäuresequenz könnten degenerierte Primer abgeleitet werden, mit denen die entsprechende cDNA des Transporters in der Ratte zu isolieren wäre, um anschließend mit deren Hilfe den GDP-Fukose Transporter des Menschen zu isolieren.

Die alternative Strategie über die Expressionsklonierung einer cDNA aus einer humanen cDNA-Bank, die den Defekt in den Patientenfibroblasten korrigiert, zielt weniger direkt darauf ab, den Transporter per se zu klonieren, als vielmehr eine cDNA so isolieren, die für die Hypofukosylierung in den Patientenzellen verantwortlich ist, unabhängig davon, ob sie für einen Transporter oder einen Kofaktor kodiert. Die Expressionsklonierung von cDNAs in Zellen mit Glykosylierungsdefekten hat sich als erfolgreiche Strategie bei der Klonierung unbekannter Zuckernukleotid Transporter mehrfach bewährt. Glykosylierungsdefiziente „chinese hamster ovary“-Zellen (CHO) sind aufgrund ihrer Resistenz gegen die zytotoxische Wirkung von pflanzlichen Lektinen isoliert und anhand von Zellfusionsexperimenten in mehr als 40 Komplementationsgruppen eingeteilt worden (Stanley et al., 1985). Deutscher et al. (1984) zeigten biochemisch, dass CHO-Zellen der Lec2-Komplementationsgruppe CMP-NANA Transport-defizient sind. Andere Lektin-resistente Mutanten konnten in Hefen (Abeijon et al., 1996b; Dean et al., 1997), Protozoen (Descoteaux et al., 1995) und *C. elegans* (Herman et al., 1999b) charakterisiert werden. 1996 wurden die ersten Zuckernukleotid Transportergene durch Komplementationsklonierung identifiziert (Abeijon et al., 1996a; Eckhardt et al., 1996). Eckhardt et al. (1996) exprimierten eine Maus-cDNA Bank in Lec2-CHO-Zellen und klonierten den murinen CMP-NANA Transporter. Dabei wurde die Komplementation phänotypisch über den Oberflächenmarker

Polysialinsäure verfolgt, der auf CHO-Wildtypzellen, nicht aber auf Lec2-CHO-Zellen zu finden ist. In Tabelle 7 sind die bisher klonierten Zuckernukleotid Transporter aufgeführt.

| Zuckernukleotid Transporter | Klonierungsstrategie                            | Klonierte Gene  |
|-----------------------------|---|---|
| CMP-NANA Transporter        | Komplementation Lec2-CHO                        | Maus (Eckhardt et al., 1996)<br>Hamster (Eckhardt et al., 1997)<br>Mensch (Ishida et al., 1998) |
| UDP-Galaktose Transporter   | Komplementation Had-1 (Maus)                    | Mensch (Miura et al., 1996)<br>S. pombe (Tabuchi et al., 1997)                                  |
| UDP-GlcNAc Transporter      | Komplementation (mnn2-2, Kluyveromyces lactis)  | K. lactis (Abeijon et al., 1996a)<br>Hund (Guillen et al., 1998)                                |
| GDP-Mannose Transporter     | Komplementation (C3P0, Leishmania donovani)     | L. donovani (Descoteaux et al., 1995)<br>S. cerevisiae (Poster et al., 1996)                    |
| GDP-Fukose Transporter      | Komplementation (CDG IIc-Patientenfibroblasten) | Mensch (Lübke et al., 2001)<br>C.elegans (Lühn et al., 2001)                                    |

**Tab. 7: Übersicht zu bisher klonierten Zuckernukleotid Transportern.**

Fibroblasten des CDG-IIc Patienten A.C. konnten durch Anfärbung mit dem *Aleuria*-Lektin eindeutig in ihrem Phänotyp von Kontrollfibroblasten unterschieden werden (4.5.1). Ein solch differenzierbarer Phänotyp kann als Grundlage für eine Expressionsklonierung einer cDNA-Bank zur Isolierung einer komplementierenden cDNA verwendet werden (Yokota et al., 1985). Solche Komplementationsklonierungen, wie sie schon lange in Bakterien und Hefen Verwendung finden, unterliegen in Säugerzellen einigen Restriktionen. Um ganze cDNA-Banken repräsentativ in den mutierten Zellen zu exprimieren, muss eine ausreichend hohe Gentransfereffizienz (>10%) gewährleistet sein. Etablierte

Zelllinien wie COS-Zellen oder CHO-Zellen erfüllen aufgrund hoher Transfektionseffizienz diese Anforderungen (Gluzman, 1981), während primäre, humane Zellen aufgrund der geringen Transfektionsrate bei klassischen Gentransfermethoden für Komplementationsklonierungen schwer zugänglich sind. Wie anhand der Infektion hämatopoetische Zellen mit retroviral verpackter cDNA gezeigt wurde, können virale Gentransfermethoden für solche Expressionsklonierungen in primären Zellen genutzt werden (Kitamura et al., 1995). Um eine komplementierende cDNA aus einer Bank klonieren zu können, müssen generell folgende Überlegungen bei der Klonierungsstrategie bedacht werden:

1. In welcher Frequenz ist die zu isolierende cDNA in der Bank repräsentiert?

Wird eine häufige cDNA gesucht, so müssen weniger Zielzellen untersucht werden, um eine komplementierende cDNA zu isolieren, als bei seltenen cDNAs.

2. Wieviele unabhängige Klone enthält die cDNA-Bank?

In einer Bank, die wenige Ereignisse repräsentiert ( $< 10^5$ ), ist es unwahrscheinlich, seltene cDNAs durch Komplementation zu identifizieren.

3. Gibt es spontane Revertanten in den Zielzellen, durch die falsch-positive Zellen bei der phänotypischen Analyse identifiziert werden?

4. Ist die komplementierende cDNA nach der phänotypischen Analyse der Zellen für weitere Untersuchungen zugänglich?

Werden die Zellen zur phänotypischen Analyse fixiert, so ist ein direkter Zugriff auf die transferierte cDNA erschwert, und es muss folglich auf einen Komplementationskompetenten cDNA-Pool zurückgegriffen werden.

Expressionsklonierungen aufgrund selektierbarer Zelloberflächenmarker wurden bereits erfolgreich mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Seed und Aruffo etablierten 1987 die sogenannte Panning-Methode, bei der COS-Zellen zur Selektion

eines nach Transfektion exprimierten Antigen auf Antikörper-beschichteten Platten angereichert wurden. Exprimieren komplementierte Zellen bestimmte Oberflächenmarker, so können diese nach der Markierung mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zell Sortierer (FACS) gesammelt und expandiert werden (Yamasaki et al., 1988). Tumor-spezifische Antigene konnten nach retroviraler Infektion humaner Fibroblasten aus cDNA-Banken isoliert werden, da Antigen-tragende Fibroblasten in der Lage sind, Korkultivierte zytotoxische Killerzellen zur Sekretion im ELISA nachweisbarer Zytokine zu stimulieren (Wang et al., 1998b).

Die zur Komplementationsklonierung in CDG-IIc Patientenfibroblasten verwendete retrovirale cDNA-Bank aus humanem Lebergewebe entsprach den Anforderungen auch seltene cDNAs zu beinhalten, da  $8 \times 10^6$  unabhängige Klone in der Bank repräsentiert wurden. Da häufige cDNAs (z.B.  $\beta$ -Actin) bei einer hohen Komplexität der cDNA-Bank im Vergleich zu seltenen cDNAs unterrepräsentiert sind, sollten möglichst viele unabhängige Klone in der Bank enthalten sein. Über die Expressionshöhe des potentiell defizienten GDP-Fukose Transporters lag keine Information vor, so dass möglichst viele unabhängige Klone zur Rekonstitution der Fukosylierung in die Zielzellen gelangen sollten. Um den Zugriff auf eine komplementierende cDNA zu gewährleisten, wurde ein Pool-Verfahren gewählt, da phänotypisch rekonstituierte Zellen bei der Lektin-Markierung fixiert wurden und somit die retroviral transferierte cDNA nur noch schwer zugänglich war. Die in der ersten Komplementationsrunde verwendeten 48 Pools beinhalteten jeweils etwa 2500 unabhängige cDNAs, so dass bei einer angenommenen Anzahl von 10.000 exprimierten Genen in den Leberzellen, jedes exprimierte Gen zehnmal repräsentiert wurde. Nach der Identifikation des komplementierenden Pools A44, wurde dieser in weitere B-Pools (1:200) unterteilt, um eine Anreicherung eines Klons in einem B-Pool gegenüber der ersten Komplementationsrunde (1:2500) zu erreichen. Nach weiteren zwei Expressionsrunden mit fortlaufender Reduzierung der Einzelereignisse pro Pool bis zu Einzelklonen, konnte der Einzelklon D5 als die phänotypisch komplementierende cDNA isoliert werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die retrovirale Expressionsklonierung ganzer cDNA-Banken in primären, humanen Zellen zur Isolierung einer cDNA geeignet ist, wenn die zu komplementierenden Zellen einen signifikant vom Wildtyp abweichenden Phänotypen aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Zellen eines CDG-Patienten über eine spezifische Lektin-Markierung von Kontrollzellen differenziert und so eine den Defekt komplementierende cDNA kloniert werden.

### **5.3 Die phänotypisch komplementierende D5-cDNA kodiert den humanen GDP-Fukose Transporter**

Nach der Isolierung anhand der phänotypischen Korrektur der Hypofukosylierung in der retroviralen Expressionsklonierung wurde die D5-cDNA molekulargenetisch analysiert. Die Sequenz hat eine Länge von 3,1 kb und enthält einen offenen Leserahmen von 1095 bp, dem ein 609 bp langer 5'-nicht-kodierender Bereich vorangeht und kodiert für ein 364 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 39,8 kDa. Das Protein entspricht damit in der biochemischen Analyse dem 39 kDa Rattenleber Proteins, dem Puglielli et al. (1999b) GDP-Fukose Transport Aktivität in Proteoliposomen zuweisen. Die analysierte D5-cDNA zeigte in der Datenbanksuche hohe Identität mit der humanen Plazenta mRNA NM\_018389 unbekannter Funktion. Die beiden Sequenzen unterscheiden sich in dem 5'-Ende der Sequenz. NM\_018389 besitzt eine nur 153 bp lange 5'-nicht-kodierende Region, die von einem 1056 bp langen, 351 Aminosäuren kodierenden offenen Leserahmen gefolgt wird und der die Information für die ersten 13 Aminosäuren der D5-cDNA fehlen. Beide Isoformen werden exprimiert und von dem Gen FLJ11320 auf Chromosom 11 über zwei verschiedene Promotoren in ihrer Expression kontrolliert. Über eine gewebs- oder entwicklungspezifische Kontrolle der Expression der beiden Isoformen kann bislang keine Aussage getroffen werden. So wurde die NM\_018389 Sequenz ursprünglich aus einer Plazenta mRNA isoliert, doch findet man auch in humaner Plazenta Transkripte der längeren D5-Isoform (4.7.2).

Über Computer-gestützte Sequenzvergleiche der D5-cDNA mit entsprechenden Datenbanken konnten mögliche Orthologe in *Sus scrofa*, *Bos primigenius*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert werden. Die Identität der Invertebraten Orthologen lag zwischen 35 und 55%, während diverse EST-Klone einer Maus-Datenbank bis zu 88% Identität aufweisen, jedoch noch keine vollständige mRNA aus der Maus in den Datenbanken zu finden ist.

Analysen der primären Aminosäure Sequenzen der verschiedenen Zuckernukleotidtransporter mit der D5-kodierten Aminosäuresequenz ergaben Homologien zwischen 13 – 19% (siehe 4.7.4), wobei der GDP-Mannose Transporter aus *L. donovani* die höchste Identität zum putativen GDP-Fukose Transporter (D5) aufwies. Ob sich diese im Vergleich zu den anderen bisher bekannten Zuckernukleotid Transporter höhere Identität aufgrund der Erkennung des gleichen Nukleotids ergibt, ist eher fraglich. Bei dem Vergleich anderer Transporter, die das identische Zuckernukleotid erkennen, sind kaum höhere Homologien als zu Transportern für andere Zuckernukleotide zu finden. So weisen die UDP-GlcNAc Transporter aus MDCK-Zellen und aus der Hefe *Kluyveromyces lactis* nur 22% Homologie auf (Guillen et al., 1998), während der murine CMP-NANA Transporter 40% bzw. 50% Identität mit dem humanen UDP-Galaktose Transporter bzw. dem UDP-GlcNAc Transporter aus MDCK-Zellen zeigt (Berninsone et al., 2000).

Das Hydrophiliemuster des D5-abgeleiteten Proteins weist signifikante Übereinstimmungen mit anderen Zuckernukleotidtransportern auf. Alle bisher klonierten Zuckernukleotid Transporterproteine sind stark hydrophob und besitzen eine Reihe von Transmembrandomänen (Berninsone et al., 2000). Eine genaue topologische Analyse zur Anzahl solcher Domänen wurde bisher nur an dem CMP-NANA Transporter aus der Maus über die Einführung von Hämagglutinin-Epitopen in die Intermembran Domänen durchgeführt (Eckhardt et al., 1999). Zehn Transmembrandomänen des murinen CMP-NANA Transporters durchspannen die Golgi-Membran, wobei N- und C-Terminus des Proteins in das Zytosol weisen. Computeranalysen des humanen UDP-Galaktose Transporters (Miura et al., 1996), des UDP-GlcNAc Transporters aus Kaninchen (Guillen et al., 1998) und des GDP-Mannose Transporters aus *L. donovani* (Ma et al., 1997) weisen ebenfalls jeweils zehn Transmembrandomänen auf. Die Computer-gestützte Analyse der Topologie des D5-kodierten Proteins ergab in Abhängigkeit der verwendeten Algorithmen zwischen acht und zehn Transmembrandomänen. Der TMhmm-Algorithmus schlägt dabei zehn dieser Domänen vor, von denen die Transmembrandomänen vier und neun außergewöhnlich hydrophil sind (siehe 4.7.3). Bei der Suche von Transmembrandomänen innerhalb von Proteinen gilt es zu bedenken, dass die Programme nach Domänen suchen, die die Plasmamembran zu durchspannen vermögen. Da jedoch die Golgi-Membran 20 – 25% dünner als die Plasmamembran ist, können Golgi-Transmembrandomänen bei der Analyse übersehen werden.

Der *K. lactis* UDP-GlcNAc Transporter (Abeijon et al., 1996a) und der CMP-NANA Transporter aus der Maus (Eckhardt et al., 1996) besitzen Leucin-Zipper Motive, die zur Dimerisierung zweier Monomere zur Bildung eines funktionellen Homodimers genutzt werden können. Andere bekannte Transporter besitzen solche Dimerisierungsmotive nicht, doch konnte auch für den VRG4 GDP-Mannose Transporter aus *S. cerevisiae* ein funktionelles Homodimer nachgewiesen werden (Gao et al., 2000). Puglielli et al. (1999a bzw. 1999b) konnten UDP-GalNAc bzw. GDP-Fukose Transport-kompetente Proteinfractionen aus Rattenleber anreichern. Die biochemisch als Transporter identifizierten Monomere weisen im SDS-Gel eine Größe von jeweils etwa 40 kDa auf, während die Transportfunktion im nativen Glycerolgradienten von Proteinen vermittelt wird, die jeweils bei 80 – 90 kDa flottieren. Diese Befunde sprechen für eine Homodimerbildung dieser beiden Zuckernukleotid Transporter. Einzig der LPG2 GDP-Mannose Transporter aus *L. donovani* wurde als Hexamer beschrieben, doch liegen noch keine funktionellen Daten für eine solche Oligomerisierung vor (Hong et al., 2000).

#### **5.4 Die Expression des GDP-Fukose Transporters (D5) in hypofukosylierten CDG-IIc Patientenfibroblasten führt zur Rekonstitution des GDP-Fukose Imports**

Die phänotypische Korrektur der Hypofukosylierung in den Patientenfibroblasten während der Expressionsklonierung durch die D5-cDNA und die Ähnlichkeit der aus der D5-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz im Hydrophilizitätsplot zu anderen Zuckernukleotid Transportern sprachen für einen Defekt des GDP-Fukose Transporters (D5) in den Patientenfibroblasten. Die Expression der Wildtyp D5-cDNA nach der retroviralen Infektion der Fibroblasten des Patienten A.C. konnte die GDP-Fukose Transport Aktivität in den Zellen nicht nur rekonstituieren, sondern übertraf bei stabil D5-exprimierenden Patientenfibroblasten gar die Import Aktivität in Golgi-angereicherte Vesikel von Kontrollfibroblasten um den Faktor drei (siehe 4.7.5.5). Somit kann das D5-kodierte Protein einerseits phänotypisch die Hypofukosylierung in den Patientenfibroblasten korrigieren und andererseits GDP-Fukose Transport Aktivität in Golgi-angereicherten Vesikeln des Patienten A.C. vermitteln.



In Northern Blots konnte gezeigt werden, dass die Patienten A.C. und M. normale Mengen des D5-Transkripts aufwiesen. Bei der Sequenzierung der Transkripte und genomischer DNA des Patienten A.C. konnte eine C>T Transition in Position 1048 in der D5-Sequenz nachgewiesen werden, die zum Austausch eines Arginin gegen ein Cystein in Position 147 (R147C) des Proteins führt (siehe 4.9.1). Die Eltern des Patienten A.C. waren für diese Punktmutation heterozygot. Arginin 147 ist Bestandteil der vierten, relativ hydrophilen Transmembrandomäne und liegt in einer bei allen Orthologen hochkonservierten Region aus 16 Aminosäuren. Zwei andere LAD II-Patienten wiesen eine C>G Transversion in Nukleotid 1532 der D5-Sequenz auf, die zu dem Austausch eines Threonins für ein Arginin in Position 308 (T308R) der Aminosäuresequenz führt. Threonin 308 befindet sich in der hochkonservierten, hydrophilen Transmembrandomäne neun (siehe 4.10.2). Die Expression der 1048C>T D5-cDNA in Fibroblasten des Patienten A.C. konnte den hypofukosylierten Phänotypen nicht komplementieren (siehe 4.9.3). Es ist daher davon auszugehen, dass diese Punktmutation in der D5-cDNA zur Expression eines GDP-Fukose Transporters führt, der keine oder nur stark verminderte Importaktivität vermittelt und folglich nicht in der Lage ist, die Fukosylierung der Glykokonjugate in den Patientenzellen zu normalisieren.

Die Aminosäureaustausche R147C und T308R der untersuchten LAD II/ CDG-IIc Patienten liegen beide in hochkonservierten, extrem hydrophilen Transmembrandomänen des GDP-Fukose Transporters. Ob die betroffenen Aminosäuren kritische Funktionen bei der Substraterkennung oder dem eigentlichen Transport erfüllen, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass beide Substitutionen in konservierten Transmembrandomänen ungewöhnlich hoher Hydrophilizität zu finden sind, spricht jedoch für eine Funktion der Aminosäuren beim Durchlass der GDP-Fukose durch die Membran.

Bei dem Patienten A.C. (R147C-Austausch) führt eine orale Behandlung mit Fukose zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome bei gleichzeitiger Normalisierung der Fukosylierung von Glykokonjugaten (Marquardt et al., 1999). Eine ähnliche Behandlung der Patienten mit der T308R Substitution, die sich in einem schwereren klinischen Phänotypen manifestiert, zeigt keinen Einfluß auf den klinischen Verlauf (Etzioni et al., 2000). Folglich könnte es sich bei der R147C Mutation um einen  $K_M$ -Defekt handeln, der durch einen erhöhten intrazellulären GDP-Fukose Spiegel kompensiert wird.

Der Zuckernukleotid Transport kann durch die korrespondierenden Nukleotidmono- und diphosphate, nicht jedoch durch die Monosaccharide inhibiert werden. Vorstellbar ist ein Zwei-Stufen-Prozess, bei dem der Nukleotidanteil zur Erkennung benötigt wird und der spezifische Zucker darüber bestimmt, ob das Zuckernukleotid transportiert wird (Capasso et al., 1984b). Eckhardt et al. (1998) konnten nach der Expressionklonierung des CMP-NANA Transporters in Lec2-CHO Zellen zeigen, dass in diesen Zellen ein hochkonserviertes Glycin in Position 189 des Proteins gegen eine Glutaminsäure ausgetauscht ist. Ersetzt man das Glycin 189 gegen Glutamin oder Isoleucin, so kann der Transport nicht rekonstituiert werden, während bei einem Austausch gegen ein Alanin ein funktioneller CMP-NANA Transporter exprimiert wird. Diese Befunde weisen darauf hin, dass im Fall der G189E Substitution im CMP-NANA Transporter bei Lec2-CHO Zellen eher sterische Gründe als die Ladung zu dem Funktionsverlust führen. In den UDP-Galaktose Transportdefizienten Had-1 Zellen der Maus konnte eine G178D Substitution identifiziert werden. Auch dieses Glycin ist zwischen Zuckernukleotid Transportern hochkonserviert und der Austausch gegen ein Alanin resultiert in einem funktionellen Transporter, so dass auch hier sterische Gründe für eine Fehlfunktion der G178D-Had1 Mutante verantwortlich sein könnten (Ishida et al., 1999). In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich interessant, die basische Aminosäure R147 des D5-kodierten GDP-Fukose Transporters gegen Lysin als andere basische Aminosäure oder gegen einen hydrophoben Rest wie Phenylalanin auszutauschen.

## **5.5 Parallele Identifizierung des GDP-Fukose Transporters aus *C.elegans* durch Expressionsklonierung (Lühn et al., 2001)**

Lühn et al. (2001) nutzten das veränderte *Aleuria*-Bindungsverhalten der CDG-IIc Fibroblasten des Patienten A.C. zur Expression von zwölf putativen Zuckernukleotid Transportersequenzen aus *C. elegans*, um die GDP-Fukose Transporter cDNA zu klonieren. Da *C. elegans* fukosylierte Glykokonjugate exprimiert, sollte eine der Sequenzen den Fukosylierungsdefekt in den Patientenfibroblasten zumindest partiell aufheben. Jeder der Klone wurde nach transienter Transfektion in Patientenfibroblasten exprimiert und durch Immunfluoreszenz nach der *Aleuria*-

Markierung analysiert. Nur eine der exprimierten Sequenzen konnte den Fukosylierungsdefekt phänotypisch aufheben. Der offene Leserahmen (AF323970) kodiert ein Protein aus 363 Aminosäuren und zeigt 55% Sequenzhomologie zu einem Protein unbekannter Funktion aus 351 Aminosäuren, das durch die humane NM\_018389 cDNA kodiert wird. NM\_018389 ist wiederum zu 100% homolog mit der in dieser Arbeit klonierten D5-Sequenz, die jedoch einen am 5'-Ende um 39 Nukleotide elongierten offenen Leserahmen besitzt. Die Tatsache, dass zum einen über die Expressionsklonierung einer humanen cDNA-Bank und zum anderen über die Expression der Orthologen aus *C. elegans* in den Patientenzellen zur Isolierung der komplementierenden Sequenz führt, macht deutlich, dass auch andere monogenische Erkrankungen, die zu einem selektierbaren Phänotypen führen, molekulargenetisch durch eine entsprechende Klonierungsstrategie zur Isolierung und Charakterisierung des betroffenen Gens zu charakterisieren sind.

## 5.6 Ausblick

Der biochemische und molekulargenetische Defekt, der sich bei den in dieser Arbeit untersuchten LAD II/ CDG-IIc-Patienten A.C., M. und Y.W. phänotypisch als generelle Hypofukosylierung der Glykoproteine manifestiert, ist mit der Expressionsklonierung des GDP-Fukose Transporters (D5) und der Analyse der Punktmutationen in den Allelen der Patienten sowie deren Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz aufgeklärt. Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen sollte die molekulargenetische Analyse anderer LAD II-Verdachtsfälle stehen. Vor allem sollten die LAD II-Patienten, bei denen ursprünglich biochemisch ein Defekt der GDP-D-mannose-4,6-dehydratase (GMD) diagnostiziert wurde, einer erneuten genetischen Analyse zugeführt werden, da bei den Patienten keine entsprechenden Mutationen im GMD-Gen gefunden wurden (Sturla et al., 1998). Mit dem in dieser Arbeit klonierten GDP-Fukose Transportergen kann eine mögliche Heterogenität von LAD II durch Vergleiche der beiden Patientengruppen untersucht werden.

Parallel dazu gilt es zu klären, welcher gewebs- und entwicklungs-spezifischer Kontrolle die Expression der beiden Isoformen unterliegt und welche Funktion den 13 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren der längeren D5-Isoform zuzuordnen ist.

Die Generierung eines entsprechenden GDP-Fukose Transporter Knock-out Tiermodells z. B. in der Maus kann sicherlich von großer Bedeutung bei der Untersuchung der Funktion fukosylierter Glykokonjugate *in-vivo* sein. Aufgrund der zentralen Bedeutung des GDP-Fukose Transporters bei der Fukosylierung von Glykokonjugaten und die Bedeutung fukosylierter Glykoproteine bei der Fertilisation, Embryonalentwicklung und Zelladhäsion sollte ein induzierbarer (konditionaler) Knock-out des GDP-Fukose Transportergens angestrebt werden, um die Gefahr der früh-embryonalen Letalität in der Embryonalentwicklung der defizienten Nachkommen zu umgehen.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welcher biochemische Defekt der Fukosylierungsstörung in den Fibroblasten und Lymphoblasten des CDG-IIc/ LAD II Patienten A.C. zugrunde liegt. Die generelle Hypofukosylierung der Glykokonjugate in Patientenzellen konnte auf einen verminderten Import von GDP-Fukose in den Golgi zurückgeführt werden. Die Golgi GDPase (Apyrase) des Patienten wies eine normale Aktivität auf, so dass ein Importdefekt aufgrund einer Defizienz des Antiportsubstrats GMP ausgeschlossen werden konnte. Bei der Bestimmung der GDP-Fukose Import Aktivität an Golgi-angereicherten Vesikeln von Patienten- und Kontrollfibroblasten stellte sich heraus, dass der GDP-Fukose Import in Membranpräparationen des Patienten A.C. um etwa 80% gegenüber der Import Aktivität der Kontrollen reduziert war. Über dies hinaus konnte an Lymphoblasten eines zweiten CDG-IIc/ LAD II Patienten M. eine Reduzierung der GDP-Fukose Transportaktivität um etwa 90% bestimmt werden.

Da das Gen für den GDP-Fukose Transporter noch in keiner Spezies bekannt war und zudem nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Transportdefizienz einen Defekt eines Transport-assoziierten Kofaktors darstellt, wurde eine Expressionsklonierung mit einer retroviralen cDNA-Bank in den Fibroblasten des Patienten A.C. durchgeführt. Kontrollfibroblasten und komplementierte Patientenfibroblasten konnten durch die Markierung mit dem Fukose-spezifischen *Aleuria aurantia* Lektin von nicht-komplementierten Patientenfibroblasten unterschieden werden. Nach vier Komplementationsrunden, in denen cDNA-Pools sukzessive verkleinert wurden, konnte die komplementierende D5-cDNA isoliert werden. Die Aminosäuresequenz der D5-cDNA wies signifikante topologische Übereinstimmungen mit bekannten Zuckernukleotid Transportern auf. Die retrovirale Expression der D5-cDNA normalisierte in Patientenfibroblasten die GDP-Fukose Transport Aktivität und den Fukosylierungsstatus. Bei der molekulargenetischen Analyse von drei Patienten wurden zwei jeweils homozygot vorliegende Punktmutationen detektiert, die zu Aminosäure Austausch in unter allen Orthologen stark konservierten Transmembrandomänen führen. Diese Befunde belegen, dass dem CDG-IIc (LAD II) Syndrom ein Defekt im GDP-Fukose Transportergen zugrunde liegt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe M, Hashimoto H, Yoda K. (1999) Molecular characterization of Vig4/Vrg4 GDP-mannose transporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 458(3):309-12.
- Abeijon C, Yanagisawa K, Mandon EC, Hausler A, Moremen K, Hirschberg CB, Robbins PW. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 122(2):307-23.
- Abeijon C, Robbins PW, Hirschberg CB. (1996a) Molecular cloning of the Golgi apparatus uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter from *Kluyveromyces lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;93(12):5963-8.
- Abeijon C, Mandon EC, Robbins PW, Hirschberg CB. (1996b) A mutant yeast deficient in Golgi transport of uridine diphosphate N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 271(15):8851-4.
- Abeijon C, Mandon EC, Hirschberg CB. (1997) Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci.* 22(6):203-7. Review.
- Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, Hennet T, Imbach T, Stutz A, Bjursell C, Uller A, Wahlstrom JG, Briones P, Cardo E, Clayton P, Winchester B, Cormier-Dalre V, de Lonlay P, Cuer M, Dupre T, Seta N, de Koning T, Dorland L, de Loos F, Kupers L, et al (1999) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J.* 16(11):669-71.
- Ames BN. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8: 709-715
- Berninsone P, Miret JJ, Hirschberg CB. (1994) The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. *J Biol Chem.* 269(1):207-11.
- Berninsone P, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Hirschberg CB. (1997) Functional expression of the murine Golgi CMP-sialic acid transporter in *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 272(19):12616-9.
- Berninsone PM, Hirschberg CB. (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol.* 10(5):542-7. Review.
- Burda P, Borsig L, de Rijk-van Andel J, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, Berger EG, Aebi M. (1998) A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J Clin Invest.* 102(4):647-52.

- Brändli AW, Hansson GC, Rodriguez-Boulan E, Simons K. (1988) A polarized epithelial cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose into the Golgi complex. *J Biol Chem.* 263(31):16283-90.
- Capasso JM, Hirschberg CB. (1984a) Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into Golgi apparatus vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 777(1):133-9
- Capasso JM, Hirschberg CB. (1984b) Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(22):7051-5.
- Dean N, Zhang YB, Poster JB. (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 272(50):31908-14.
- De Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegenthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, De Paepe AM, Chan NW, Dacremont GA, Van Coster RN. (2000) A Novel Disorder Caused by Defective Biosynthesis of N-Linked Oligosaccharides Due to Glucosidase I Deficiency. *Am J Hum Genet.* 66(6):1744-1756.
- Descoteaux A, Luo Y, Turco SJ, Beverley SM. (1995) A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science.* 269(5232):1869-72.
- Deutscher SL, Nuwayhid N, Stanley P, Briles EI, Hirschberg CB. (1984) Translocation across Golgi vesicle membranes: a CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell.* 39:295-9.
- Deutscher SL, Hirschberg CB. (1986) Mechanism of galactosylation in the Golgi apparatus. A Chinese hamster ovary cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose across Golgi vesicle membranes. *J Biol Chem.* 261(1):96-100.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Gerardy-Schahn R. (1996) Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(15):7572-6.
- Eckhardt M, Gerardy-Schahn R. (1997) Molecular cloning of the hamster CMP-sialic acid transporter. *Eur J Biochem.* 248(1):187-92.
- Eckhardt M, Gotza B, Gerardy-Schahn R. (1998) Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J Biol Chem.* 273(32):20189-95.
- Eckhardt M, Gotza B, Gerardy-Schahn R. (1999) Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J Biol Chem.* 274(13):8779-87.

- Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni-Baruch R. (1992) Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med.* 327(25):1789-92
- Etzioni A, Gershoni-Baruch R, Pollack S, Shehadeh N. (1998) Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 102(2):323-4.
- Etzioni A, Tonetti M. (2000) Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II. *Blood.* 95(11):3641-3.
- Frydman M, Etzioni A, Eidlitz-Markus T, Avidor I, Varsano I, Shechter Y, Orlin JB, Gershoni-Baruch R. (1992) Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype. *Am J Med Genet.* 44(3):297-302.
- Fukuda M. (1996) Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.* 56(10):2237-44. Review.
- Gabius HJ. (1987) Vertebrate lectins and their possible role in fertilization, development and tumor biology (review). *In Vivo.* 1(2):75-83. Review.
- Gao XD, Kaigorodov V, Jigami Y. (1999) YND1, a homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for Golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274(30):21450-6.
- Gao XD, Dean N. (2000) Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 275(23):17718-27.
- Gao XD, Nishikawa A, Dean N. (2001) Identification of a Conserved Motif in the Yeast Golgi GDP-mannose Transporter Required for Binding to Nucleotide Sugar. *J Biol Chem.* 276(6):4424-4432.
- Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23(1):175-82.
- Guillen E, Abeijon C, Hirschberg CB. (1998) Mammalian Golgi apparatus UDP-N-acetylglucosamine transporter: molecular cloning by phenotypic correction of a yeast mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(14):7888-92.
- Hagen FS, Gray CL, Kuijper JL. (1988) Assaying the quality of cDNA libraries. *Biotechniques.* 6(4):340-5.
- Herman T, Horvitz HR. (1999a) Three proteins involved in *Caenorhabditis elegans* vulval invagination are similar to components of a glycosylation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3):974-9.
- Herman T, Hartweg E, Horvitz HR. (1999b) sqv mutants of *Caenorhabditis elegans* are defective in vulval epithelial invagination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3):968-73.



- Hiraishi K, Suzuki K, Hakomori S, Adachi M. (1993) Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology*. 3(4):381-90.
- Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C. (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*. 67:49-69. Review.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E. (1986) *Manipulating the mouse, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Hong K, Ma D, Beverley SM, Turco SJ. (2000) The Leishmania GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry*. 2000 39(8):2013-22.
- Imbach T, Burda P, Kuhnert P, Wevers RA, Aebi M, Berger EG, Hennet T. (1999) A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(12):6982-7.
- Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grunewald S, Bailie NM, King MD, Jaeken J, Matthijs G, Berger EG, Aebi M, Hennet T. (2000) Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J Clin Invest*. 105(2):233-9.
- Ishida N, Yoshioka S, Iida M, Sudo K, Miura N, Aoki K, Kawakita M. (1999) Indispensability of transmembrane domains of Golgi UDP-galactose transporter as revealed by analysis of genetic defects in UDP-galactose transporter-deficient murine had-1 mutant cell lines and construction of deletion mutants. *J Biochem (Tokyo)*. 126(6):1107-17.
- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P. (1980) Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TGB deficiency, increased serum arylsulfatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr Res*. 14: 179
- Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. (1984) Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta*. 144(2-3):245-7.
- Jaeken J, Carchon H. (1993) The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. *J Inher Metab Dis*. 16(5):813-20. Review.
- Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G. (1994) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Arch Dis Child*. 71(2):123-7.
- Karsan A, Cornejo CJ, Winn RK, Schwartz BR, Way W, Lannir N, Gershoni-Baruch R, Etzioni A, Ochs HD, Harlan JM. (1998) Leukocyte Adhesion Deficiency Type II is a generalized defect of de novo GDP-fucose biosynthesis. Endothelial cell fucosylation is not required for neutrophil rolling on human nonlymphoid endothelium. *J Clin Invest*. 101(11):2438-45.

- Kean EL. (1991) Sialic acid activation. *Glycobiology*. 1(5):441-7. Review.
- Kim S, Westphal V, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Karnes PS, Patterson MC, Freeze HH. (2000) Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie) *J Clin Invest*. 105(2):191-8.
- Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP. (1995) Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(20):9146-50.
- Körner C, Lehle L, von Figura K. (1998a) Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. *Glycobiology*. 8(2):165-71.
- Körner C, Lehle L, von Figura K. (1998b) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose. *Glycoconj J*. 15(5):499-505.
- Körner C, Knauer R, Holzbach U, Hanefeld F, Lehle L, von Figura K. (1998c) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type V: deficiency of dolichyl-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-dolichyl glucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(22):13200-5.
- Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, von Figura K. (1999a) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J*. 18(23):6816-22.
- Körner C, Linnebank M, Koch HG, Harms E, von Figura K, Marquardt T. (1999b) Decreased availability of GDP-L-fucose in a patient with LAD II with normal GDP-D-mannose dehydratase and FX protein activities. *J Leukoc Biol*. 66(1):95-8.
- Kornfeld R, Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 54:631-64. Review.
- Kozak M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. 196(4):947-50.
- Kyte J, Doolittle RF. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157(1):105-32. No abstract available.
- Leelavathi DE, Estes LW, Feingold DS, Lombardi B. (1970) Isolation of a Golgi-rich fraction from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*. 211: 124-138
- Lehrach H, Frischauf AM. (1982) *EMBL-Lab-Manual*, Heidelberg

- Lennarz W. (1993) Glycoprotein synthesis and embryonic development. *Crit. Rev Biochem.* 14: 257-272
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurements with the folin reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275
- Lübke T, Marquardt T, von Figura K, Körner C. (1999) A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *J Biol Chem.* 274(37):25986-9.
- Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C. (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc (LAD II), a new type of Congenital Disorders of Glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet.* 28(1):73-6.
- Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D. (2001) The defective gene in leukocyte adhesion deficiency II codes for a GDP-fucose transporter. *Nat Genet.* 28(1):69-72
- Ma D, Russell DG, Beverley SM, Turco SJ. (1997) Golgi GDP-mannose uptake requires Leishmania LPG2. A member of a eukaryotic family of putative nucleotide-sugar transporters. *J Biol Chem.* 272(6):3799-805.
- Maniatis NT, Fritsch EF, Sambrook J. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2. Auflage. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Marquardt T, Brune T, Lühn K, Zimmer KP, Körner C, Fabritz L, van der Werft N, Vormoor J, Freeze HH, Louwen F, Biermann B, Harms E, von Figura K, Vestweber D, Koch HG. (1999) Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr.* 134(6):681-8.
- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaufingen E. (1997) Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome) *Nat Genet.* 16(1):88-92.
- Matthijs G, Schollen E, Pirard M, Budarf ML, Van Schaufingen E, Cassiman JJ. (1997) PMM (PMM1), the human homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics.* 40(1):41-7.
- Matthijs G, Schollen E, Van Schaufingen E, Cassiman JJ, Jaeken J. (1998) Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Am J Hum Genet.* 62(3):542-50.
- Miller DG, Miller AD. (1994) A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry. *J Virol.* 68(12):8270-6.

- Miura N, Ishida N, Hoshino M, Yamauchi M, Hara T, Ayusawa D, Kawakita M. (1996) Human UDP-galactose translocator: molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J Biochem (Tokyo)*. 120(2):236-41.
- Münster AK, Eckhardt M, Potvin B, Mühlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R. (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural Proc Natl Acad Sci U S A. 95(16):9140-5.
- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K, von Figura K, Freeze HH, Harms HK, Marquardt T. (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest*. 101(7):1414-20.
- Panneerselvam K, Freeze HH. (1996) Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest*. 97(6):1478-87.
- Panneerselvam K, Etchison JR, Freeze HH. (1997) Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation. Evidence for the functional importance of transported mannose. *J Biol Chem*. 272(37):23123-9.
- Perez M, Hirschberg CB. (1987) Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Methods Enzymol*. 138:709-15.
- Poster JB, Dean N. (1996) The yeast VRG4 gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes. *J Biol Chem*. 271(7):3837-45.
- Powell LD, Paneerselvam K, Vij R, Diaz S, Manzi A, Buist N, Freeze H, Varki A. (1994) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? *J Clin Invest*. 94(5):1901-9.
- Puglielli L, Mandon EC, Rancour DM, Menon AK, Hirschberg CB. (1999a) Identification and purification of the rat liver Golgi membrane UDP-N-acetylgalactosamine transporter. *J Biol Chem*. 274(7):4474-9.
- Puglielli L, Hirschberg CB. (1999b) Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *J Biol Chem*. 274(50):35596-600.
- Ramaekers VT, Stibler H, Kint J, Jaeken J. (1991) A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 14(3):385-8.

- Rearick JI, Fujimoto K, Kornfeld S. (1981) Identification of the mannosyl donors involved in the synthesis of lipid-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* 256(8):3762-9.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 324(6093):163-6.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91.
- Seed B, Aruffo A. (1987) Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(10):3365-9.
- Sinowatz F, Plendl J, Kollé S. (1998) Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel).* 161(1-4):196-205. Review.
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 6:175-82.
- Stanley P. (1985) Membrane mutants of animal cells: rapid identification of those with a primary defect in glycosylation. *Mol Cell Biol.* 5(5):923-9.
- Sturla L, Etzioni A, Bisso A, Zanardi D, De Flora G, Silengo L, De Flora A, Tonetti M. (1998) Defective intracellular activity of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase in leukocyte adhesion deficiency type II syndrome. *FEBS Lett.* 429(3):274-8.
- Sueyoshi S, Tsuboi S, Sawada-Hirai R, Dang UN, Lowe JB, Fukuda M. (1994) Expression of distinct fucosylated oligosaccharides and carbohydrate-mediated adhesion efficiency directed by two different alpha-1,3-fucosyltransferases. Comparison of E- and L-selectin-mediated adhesion. *J Biol Chem.* 269(51):32342-50.
- Tabuchi M, Tanaka N, Iwahara S, Takegawa K. (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* gms1+ gene encodes an UDP-galactose transporter homologue required for protein galactosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 232(1):121-5.
- Tan J, Dunn J, Jaeken J, Schachter H. (1996) Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am J Hum Genet.* 59(4):810-7.
- Tatu U, Helenius A. (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 136(3):555-65.

- Turco SJ, Stetson B, Robbins PW. (1977) Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(10):4411-4.
- Van Schaffingen E, Jaeken J. (1995) Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.* 377(3):318-20.
- Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 3(2):97-130. Review.
- Wang TF, Guidotti G. (1998a) Related Articles, Protein, Nucleotide Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem.* 273(18):11392-9.
- Wang RF, Wang X, Johnston SL, Zeng G, Robbins PF, Rosenberg SA. (1998b) Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58(16):3519-25.
- Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science.* 241(4867):825-8.
- Yokota T, Arai N, Lee F, Rennick D, Mosmann T, Arai K. (1985) Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(1):68-72.

## 8 Anhang

### 8.1 Partielle Nukleotidsequenz der humanen D5-cDNA (GDP-Fukose Transporter, ohne 3'-Ende der cDNA)

|   |      |
|---|------|
| GGGAAGGCAGCGAGACGTGGGCGCCGGCCAGCCCCCTCCCGCGTCCTTCAGCCCCAAGC             | 60   |
| CCCGAGCCCCCTCTGACCCTTCCGCAGCCCTCCCTCCAGCCGCGCCCGGCTCCGGCAGCT            | 120  |
| CCCTGTACGCCTCCCTCCCCCTGCCGCCCCCTCCCTCCACAGCCGCCATGACGCCCTC              | 180  |
| TCGGCACCTCTTCCCACTCTGCCACGCGTCCTTTTCTGCACCTTCGCCCCGCGTACCTA             | 240  |
| CTCCTGCCCGGCCCTGCCATTCCCTCTCCCTCCCTTCTCTCTGCGACCCCTCCCTGTTAG            | 300  |
| GCCCCAGCCTCTTCTCCCCTCACAGGTCTTCTCTGTCTGGCCTCACCGCCTTATCCTAT             | 360  |
| TCCTCTCCCTTGCCCTGTGTCTTGTCTCAGAGCCCCCTCGGGGTGGGAGTAGGTTGTGGA            | 420  |
| GCAGCACAACCTGGGCTCACCCCAAAGCAGAACCTTCTCAATCCATGAGGACAATGGGGAGG          | 480  |
| CCTTTAGGCCAGCCACATGTGACAATGGAGGGCTGCGGCTTCCTTGCGGAGAGCACAAAG            | 540  |
| TGAGCTCACTGCCCTGGACTCCAGGGAATCAGAGTTCTGGCCGCGGGGTGACCCAGCTCC            | 600  |
| TCTGCTACCA <b>ATGA</b> ATAGGGCCCCCTCTGAAGCGGTCCAGGATCCTGCACATGGCGCTGACC | 660  |
| GGGGCCTCAGACCCCTCTGCAGAGGCAGAGGCCAACGGGGAGAAGCCCTTTCTGCTGCGG            | 720  |
| GCATTGCAGATCGCGCTGGTGGTCTCCCTCTACTGGGTACCTCCATCTCCATGGTGTTC             | 780  |
| CTTAATAAGTACCTGCTGGACAGCCCCCTCCCTGCGGCTGGACACCCCATCTTCGTCACC            | 840  |
| TTCTACCAGTGCCTGGTGACACGCTGCTGTGCAAAGGCCTCAGCGCTCTGGCCGCCTGC             | 900  |
| TGCCCTGGTGCCGTGGACTTCCCCAGCTTGCCTGGACCTCAGGGTGGCCCGCAGCGTC              | 960  |
| CTGCCCTGTGCGTGGTCTTCAATCGGCATGATCACCTTCAATAACCTCTGCCTCAAGTAC            | 1020 |
| GTCGGTGTGGCCTTCTACAATGTGGGCGGCTCACTCACCACCGTCTTCAACGTGCTGCTC            | 1080 |
| TCCTACCTGCTGCTCAAGCAGACCACCTCCTTCTATGCCCTGCTCACCTGCGGTATCATC            | 1140 |
| ATCGGGGGCTTCTGGCTTGGTGTGGACCAGGAGGGGGCAGAAGGCACCCTGTTCGTGGCTG           | 1200 |
| GGCACCGTCTTCGGCGTGCTGGCTAGCCTCTGTGTCTCGCTCAACGCCATCTACACCACG            | 1260 |
| AAGGTGCTCCCGGCGGTGGACGGCAGCATCTGGCGCCTGACTTTCTACAACAACGTCAAC            | 1320 |
| GCCTGCATCCTCTTCTGCCCTGCTCCTGCTGCTCGGGGAGCTTCAGGCCCTGCGTGAC              | 1380 |
| TTTGCCAGCTGGGCAGTGCCCACTTCTGGGGGATGATGACGCTGGGCGGCTGTTTGGC              | 1440 |
| TTTGCCATCGGCTACGTGACAGGACTGCAGATCAAGTTCACCAGTCCGCTGACCCACAAT            | 1500 |
| GTGTCGGGCACGGCCAAGGCCTGTGCCAGACAGTGCTGGCCGTGCTCTACTACGAGGAG             | 1560 |
| ACCAAGAGCTTCCCTCTGGTGGACGAGCAACATGATGGTGTGGGCGGCTCCTCCGCCTAC            | 1620 |
| ACCTGGGTGAGGGGCTGGGAGATGAAGAAGACTCCGGAGGAGCCAGCCCCAAAAGACAGC            | 1680 |
| GAGAAGAGCGCCATGGGGGT <b>GTGA</b> GCACCACAGGCACCCTGGATGGCCCGGCCCCGGGGC   | 1740 |
| CCGTACACAGGCAGGGCCAGCACAGTAGTGAAGGCGGTCTCCTGGACCCCAAGAGCGTGC            | 1800 |
| TGTGGTGTGGACTGGGTGCTACTTATAGACCCAATCAGAATACGGTGGTTGAGAAGGAAC            | 1860 |
| CAGTGTTTACAAGTAATATCAGAAAGTTGAAGGAACCAGTGTTTACAAGTAATACCAGAA            | 1920 |
| AGTTGCCAAACCCTTCTCTATCCTCTCGTATTTCTGAGTTTTTGTCTTCCCGAGGGAGC             | 1980 |
| ACCCTAGTGAGAGTTGAACCCCTTCTTCTGCCTCCAGGGCCTGTCTGCCTCCACATCAC             | 2040 |
| TCTGAGGACAGGGACAGGCAACAACCTTGAAGGGACAGCAATGGCAAAGCCACAAAGGCT            | 2100 |
| TCACTGTACTCAGGGGAGATGGCCCTACCACAGCCACCTGGAGAGGGTTGGGAAGCCTTC            | 2160 |

## 8.2 Aus der humanen D5-cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz (GDP-Fukose Transporter)

|  |     |
|--|-----|
| MNRAPLKRSRILHMALTGASDPSAEAEANGEKPFLLRALQIALVVSLEYWV  | 50  |
| TSISMVFLNKYLLDPSLRLDTPIFVTFYQCLVTTLLCKGLSALAACCPG    | 100 |
| AVDFPSLRLDLRVARSVLPLSVVFIGMITFNNLCLKYVGVAFYNVGRSLT   | 150 |
| TVFNVLLSYLLLKQTTSFYALLTCGIIIGGFWLGV DQEGAEGTLSWLGTV  | 200 |
| FGVLASLCVSLNAIYTTKVLPAVDGSIWRLTFYNNVNACILFLPLLLLLLG  | 250 |
| ELQALRDFFAQLGS AHFWGMMTLGGLFGFAIGYVTGLQIKFTSPLTHNVSG | 300 |
| TAKACAQTVLAVLYYEETKSFLWWT SNMMVLGGSSAYTWVRGWEMKKTPE  | 350 |
| EPSPKDSEKSAMGV.                                      |     |

## 8.3 Sequenzen der verwendeten Primer (5' → 3')

### D5- und NM\_018389-spezifische PCR- und Sequenzier-Primer:

F1 (5'-GAAGCGGTCCAGGATCCTGCACATG-3')  
 F2 (5'-GATCCTGCACATGGCGCTGACC-3')  
 F3 (5'-GACTTCCCCAGCTTGCGCCTGG-3')  
 F4 (5'-CTCAACGCCATCTACACCACG-3')  
 F5 (5'-CCGTGCTCTACTACGAGGAGAC-3')  
 F6 (5'-GAATCAGAGTTCTGGCCGC-3')  
 F7 (5'-GCTCACTGCCCTGGACTCCAG-3')  
 F8 (5'-CCCCAAAGACAGCGAGAAGAG-3')  
 F9 (5'-CTTCAATAACCTCTGCCTCAAG-3')  
 F10 (5'-GTCTTCATCGGCATGATCAC-3')  
 F11 (5'-CTGCCTCCAGGGCCTTGTCTG-3')  
 F12 (5'-GAGGACAGGGACAGGCAACAACC-3')  
 F13 (5'-CCGCTGACCCACAATGTGTC-3')  
 F17 (5'-GCCCAGTGCACCGGAGGAGGTG-3')  
 F18 (5'-GAGCGCCAGGTGCGCTTCGCGGCC-3')

R1 (5'-CTGGTAGAAGGTGACGAAGATG-3')  
 R2 (5'-GCAGGTAGGAGAGCAGCACG-3')  
 R3 (5'-CAAGGTCACGCAGGGCCTGAAG-3')  
 R4 (5'-GACCCAGGTGTAGGCGGAGGAG-3')  
 R5 (5'-GGAGACCGCCTTCACTACTGTG-3')  
 R6 (5'-CACACCACAGCACGCTTCTGG-3')  
 R7 (5'-GGAGGTGGTCTGCTTGAGCAGC-3')  
 R8 (5'-GGAAGCTCTTGGTCTCCTCG-3')  
 R9 (5'-CGCCCAGCACCATCATGTTGC-3')



**Mutagenese Primer (C>T1048)**

MutC>T1048F (5'-CTTCTACAATGTGGGCTGCTCACTCACCACCGTC-3')

MutC>T1048R (5'-GACGGTGGTGAGTGAGCAGCCCACATTGTAGAAG-3')

**Vektor-spezifische Primer:**

pLIB-Vektor:

5'-LTR-LIB (5'-AGCCCTCACTCCTTCTCTAG-3')

3'-LTR-LIB (5'-ATGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGCCAAACCTAC-3')

pLNCX2-Vektor:

5'-LTR-LNCX2 (5'-AGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATC-3')

3'-LTR-LNCX2 (5'-ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC-3')

pGEMT –EASY-Vektor:

Standard-Sequenzierprimer M13F und M13R

## Danksagungen

Prof. Dr. K. von Figura danke ich herzlich für sein starkes persönliches Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit. Seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Tips haben maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

PD Dr. Christian Körner gilt mein ganz besonderer Dank für das Vertrauen in meine Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft, für die freundschaftliche Atmosphäre, die ich besonders zu Beginn meiner Arbeit hier sehr genossen habe.

Frau Sander danke ich für das herzliche Arbeitsklima und für ihre annähernd mütterliche Güte, die sie mir angesichts meiner Edding-Kleptomanie entgegengebracht. Bengt Hansske, Christian Thiel und Martin Hasilik mussten auch unter meiner Anwesenheit „leiden“, aber es war schön mit euch.

Judith und Anna-Lena danke ich für ihre Freundschaft und für die Zeit, die auch sie am Wochenende im Labor verbrachten. Und, keiner konnte so niedlich mitleiden wie Judith.

PD Dr. Paul Saftig danke ich für sein Verständnis, wenn ich mal aus unserer Männertruppe zu seiner Frauentruppe flüchtete und: „Wäre doch gelacht, wenn wir nicht aufsteigen.“

Prof. Dr. Thomas Braulke, PD Dr. Stefan Höning, Dr. Bernd Kübler, Dr. Rixa von Bülow, Dr. Anja Fingerhut, Chris Mühlhausen, Dr. Stefanie Obermüller, Dr. Doris Ricotta und Dr. Anke Suter danke ich besonders für den netten Empfang und die Unterstützung in der Frühphase meiner Arbeit.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Abteilung von Figura für ihre große Hilfsbereitschaft und für die freundliche Atmosphäre.

Inke danke ich von Herzen für ihr Verständnis und für ihre Geduld mit mir besonders gegen Ende dieser Arbeit.

Schließlich geht ein großer Dank an meine Eltern und Geschwister, die mich über all die Jahre unterstützt haben.

## Lebenslauf

Am 15. November 1971 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern Brunhild Lübke, geb. Stahl und Dieter Lübke in Northeim geboren. Von 1978 – 1982 besuchte ich die Grundschule „Am Sultmer“ in Northeim. Anschließend wechselte ich zur Thomas-Mann-Orientierungsstufe in Northeim. Ab dem Jahr 1984 war ich Schüler des Gymnasiums Corvinianum in Northeim. Meine Schulausbildung schloss ich dort 1991 mit dem Abitur ab. Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im Wintersemester 1992 das Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Meine Vordiplomsprüfung legte ich im Jahre 1994 ab. Die mündliche Diplom-Hauptprüfung erfolgte im Frühjahr 1997 mit der Fächerkombination Zellbiologie, Genetik und Botanik. Meine Diplomarbeit fertigte ich unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Jockusch im Institut für Zoologie/ Zellbiologie der Technischen Universität Braunschweig an. Die Abgabe der Diplomarbeit mit dem Titel „Vergleichende Charakterisierung der Zell-Kontaktproteine  $\alpha$ -Catenin und Vinculin“ erfolgte im Mai 1998.

Im Juni 1998 begann ich am Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie II der Georg-August Universität zu Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. K. von Figura den experimentellen Teil der hier vorliegenden Dissertation mit dem Thema: „Congenital Disorder of Glycosylation (CDG)-IIc: Eine retrovirale Expressionsklonierung identifiziert das CDG-IIc Syndrom (Leukozyten Adhäsionsdefekt II) als eine GDP-Fukose Transporter Defizienz“. Von Juni 1998 bis Juli 1999 war ich Stipendiat im Graduiertenkolleg „Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse“.