

**Untersuchungen zur biologischen Funktion  
der „Processing“- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA  
mittels „knock out“-Mäusen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michaela Hauptmann

aus

Lingen/Ems

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Bause

2. Referent: Prof. Dr. Koch

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.06.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

I INHALTSVERZEICHNIS

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	V
III	Abbildungen	VIII
1.	Einleitung	1
1.1	Biosynthese von N-glykosidisch gebundenen Glykoproteinen	1
1.2	Struktur und Eigenschaften der Enzyme des „frühen Oligosaccharid-Processings“	5
1.3	Funktion N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide	7
1.4	Congenital Disorders of Glycolysation (CDG)	10
1.5	$\alpha$ -Glykosidase defiziente „knock-out“-Mäuse als Modelle für CDG`s	14
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2.	Ergebnisse	16
2.1	„Knock out“ des Mannosidase IA-Gens (Man <sub>9</sub> -Mannosidase) mit Hilfe eines „Replacement“-Vektors	16
2.1.1	Aufbau der genomischen Struktur der Mannosidase IA aus Maus	16
2.1.2	Isolierung spezifischer Mannosidase IA-DNA-Klone	17
2.1.3	Herstellung des hloxpSK-ManIA-„Replacement“-Vektors	18
2.2	Transfektion embryonaler Stammzellen mit dem hloxpSK-ManIA-Vektor und Nachweis der homologen Rekombination	20
2.3	Erzeugung Mannosidase IA-defizienter Mäuse	26
2.3.1	Erzeugung von chimären Mäusen mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen	26
2.3.2	Zucht und Charakterisierung heterozygoter (ManIA <sup>+/-</sup> ) und homozygoter (ManIA <sup>-/-</sup> ) Mannosidase IA-Mäuse	26
2.4	Phänotypische Auswirkungen des Mannosidase IA „knock outs“	31
2.4.1	Der Mannosidase IA „knock out“ führt bei weiblichen Mäusen zur Infertilität	32
2.4.1.1	Makroskopische und histologische Untersuchung adulter Ovarien von Mannosidase IA-defizienten Mäusen	33
2.4.1.2	Unbefruchtete Oozyten aus Mannosidase IA-defizienten Weibchen sind unter Kulturbedingungen instabil	34

## I INHALTSVERZEICHNIS

2.4.1.3	Oozyten aus Mannosidase IA defizienten Weibchen sind nicht befruchtungsfähig	37
2.4.2	Expression der Mannosidase IA in verschiedenen Geweben von Wildtyp-Mäusen	38
2.4.3	Eine Mannosidase IA-Defizienz lässt sich nicht durch Veränderungen im Glykosylierungsmuster des Serumtransferrins nachweisen	40
3.	Diskussion	43
4.	Zusammenfassung	50
5.	Experimenteller Teil	52
5.1	Material	52
5.1.1	Geräte	52
5.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	53
5.1.3	Mausstämme	55
5.1.4	Bakterienstämme	55
5.1.5	Zelllinien	55
5.1.6	Lösungen und Medien	55
5.1.6.1	Lösungen und Medien für die Bakterienkultur	55
5.1.6.2	Langzeitlagerung von Kulturen	56
5.1.6.3	Lösungen und Medien für die ES-Zellkultur	56
5.1.6.3.1	HM-1-ES-Kulturmedium	56
5.1.6.3.2	Hepes-gepufferte Salzlösung (10x HBS) für die Elektroporation	56
5.1.6.3.3	Gelantinelösung	57
5.1.6.3.4	Trypsinlösung	57
5.1.6.3.5	2x Einfriermedium	57
5.2	Methoden	57
5.2.1	Molekularbiologische Methoden	58
5.2.1.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	57
5.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmidmidi/-minipräparation)	58

## I INHALTSVERZEICHNIS

5.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion	58
5.2.1.4	Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen und Mannosidase IA-defizienten Genotypen durch PCR	59
5.2.1.5	Automatische DNA-Sequenzierung	59
5.2.1.6	<i>in vitro</i> Mutagenese-Experimente	60
5.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA	61
5.2.1.8	Agarosegelelektrophorese	61
5.2.1.9	Reinigung von DNA-Fragmenten	62
5.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	62
5.2.1.11	Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus	62
5.2.1.12	Präparation genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen	63
5.2.1.13	DNA-Transfer nach Southern	63
5.2.1.14	RNA-Isolierung aus Gewebe	63
5.2.1.15	RT-PCR	63
5.2.1.16	Northern-Blot-Hybridisierung	64
5.2.1.17	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	64
5.2.1.18	Hybridisierung von Cosmid-Filtern und Southern-Blots	65
5.2.1.19	Herstellung von Mauslebermikrosomen	66
5.2.2	Allgemeine analytische Methoden	66
5.2.2.1	Proteinbestimmung nach Lowry	66
5.2.2.2	SDS-Page nach Laemmli	66
5.2.2.3	Isoelektrische Fokussierung	67
5.2.2.4	Coomassie-Färbung	68
5.2.2.5	Proteintransfer auf Membranen	68
5.2.2.6	Ponceau-Färbung	68
5.2.2.7	Immunoblotanalyse	68

## I INHALTSVERZEICHNIS

5.2.3	Zellkultur	69
5.2.3.1	Kultivierung von HM-1-Zellen	69
5.2.3.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	69
5.2.3.1.2	Stabile Transfektion zur homologen Rekombination	70
5.2.3.1.3	Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination	70
5.2.3.1.4	Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	71
5.2.4	Tierexperimentelles Arbeiten	73
5.2.4.1	Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen	72
5.2.4.2	Scheinschwangerschaft und Vasektomie von NMRI-Männchen	72
5.2.4.3	Superovulation von C57BL/6 Spenderweibchen	73
5.2.4.4	Injektion von ES-Zellen in Blastozysten	73
5.2.4.5	Überprüfung der Keimbahngängigkeit	75
5.2.4.6	Zucht- und Verpaarungsbedingungen der ManIA <sup>-/-</sup> -Zucht	75
5.2.4.7	Isolierung von Eizellen aus Mannosidase IA defizienten Mäusen	76
5.2.5	Gewebefärbung von Paraffinschnitten	76
6.1	Primer	77
6.2	Literaturverzeichnis	80
6.3	Erklärung	85
6.4	Danksagungen	86

## II ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	“complementary DNA”
cpm	Impulse pro Minute
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octan
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dol-P/-PP	Dolicholphosphat/-pyrophosphat
Dpc	Tage nach Kopulation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endo-b-N-Acetylglucosaminidase H
FCS	Fötales Rinderserum
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HT	Hypoxanthin-Aminopterin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-D-1-Thiogalaktopyranosid
k	kilo-(10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobasen

## II ABKÜRZUNGEN

kDA	kilo-Dalton
LB	Luria-Broth Medium
LIF	Leukämie-Inhibierender Faktor
M	molar
mA	milli Ampere
Man	Mannose
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
<sup>32</sup> P	Phosphor 32
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Amino-Methan
U	Unit
ÜK	Übernachtskultur
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid



### III ABBILDUNGEN

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Reaktionen des Dolicholphosphat-Zyklus und der N-Glykosylierung durch OST	2
Abbildung 1.2:	Schematische Ablauf des Oligosaccharid-Processings in Säugern	3
Abbildung 1.3:	Typische Strukturen N-gebundener Oligosaccharide	5
Abbildung 2.1:	Genomischer Aufbau des Mannosidase IA-Gens aus Maus und Mensch	17
Abbildung 2.2:	Reinigung der $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA spezifischen PCR-Produkte für die Vektorkonstruktion	19
Abbildung 2.3:	Schematische Struktur des „Replacement“-Vektor hloxpSK-ManIA	20
Abbildung 2.4:	Gene-Targeting Strategie und homologe Rekombination des $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gens	22
Abbildung 2.5:	Nachweis der homologen Rekombination des hloxpSK-ManIA-Vektors in transfizierten ES-Zellen	23
Abbildung 2.6:	Southern-Blot-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen	24
Abbildung 2.7:	Karyotypanalyse eines ES-Zellklons mit einem Chromosomensatz von n=40	25
Abbildung 2.8:	Chimäre ♂ 1 mit einem Chimärismusgrad von ca. 40%	27
Abbildung 2.9:	Genotypisierung heterozygoter Mäuse mittels PCR	28
Abbildung 2.10:	Genotypisierung homozygoter (ManIA <sup>-/-</sup> ) Mäuse mittels PCR	29
Abbildung 2.11:	Southern Blot Analyse mit DNA aus den Schwanspitzen einer Man IA <sup>-/-</sup> , Man IA <sup>+/+</sup> - und einer Wildtyp-Maus sowie der DNA aus ES-Zellklon 63	30
Abbildung 2.12:	Westernblot Analyse von Mikrosomen aus einer Man IA <sup>-/-</sup> , Man IA <sup>+/-</sup> - und einer Wildtyp-Maus	31
Abbildung 2.13:	Hämatoxilin und Eosin gefärbte Ultradünnschnitte von Ovarien homozygoter (ManIA <sup>-/-</sup> )- und Wildtyp-Mäuse	34
Abbildung 2.14:	Unbefruchtete Eizellen aus ManIA <sup>-/-</sup> - und Wildtyp-Weibchen	35
Abbildung 2.15:	Stabilität unbefruchteter Eizellen aus Man IA <sup>-/-</sup> - und Wildtyp-Mäusen unter Kulturbedingungen	36
Abbildung 2.16:	Mikroskopische Aufnahmen von befruchteten und unbefruchteten Eizellen aus Man IA <sup>-/-</sup> -und Wildtyp-Mäusen	38

### III ABBILDUNGEN

Abbildung 2.17:	Northern Blot Analyse verschiedener Gewebe einer weiblichen Wildtyp-Maus	39
Abbildung 2.18:	Schematische Darstellung des humanen Serum-Transferrins	40
Abbildung 2.19:	Isoelektrische Fokussierung und SDS-Page von Serum-Transferrin aus einer Man IA <sup>-/-</sup> , einer Wildtyp-Maus und eines Patienten mit CDG-Ia	41
Tabelle 1.1:	Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)	11

## 1.1 Biosynthese von N-glykosidisch gebundenen Glykoproteinen

Viele sekretorische und membranständige Proteine sowie Proteine der extrazellulären Matrix von Säugetieren enthalten kovalent gebundene Zucker und werden deshalb als Glykoproteine bezeichnet. Je nach Art der Verknüpfung zwischen Glykan und Polypeptidkette lassen sich diese in zwei Typen unterteilen:

- O-Glykoproteine, bei denen Zuckerketten an die Hydroxylgruppe z.B. von Serin und Threonin gekoppelt sind.
- N-Glykoproteine, bei denen die Bindung der Zuckerkette über die  $\beta$ -Säureamidfunktion von Asparagin erfolgt.

Während O-glykosidisch gebundene Zuckerketten posttranslational im Golgi unter Beteiligung spezifischer O-Glykosyltransferasen und Verwendung Nukleosiddiphosphat-aktivierter Monosaccharide aufgebaut werden [Hart *et al.*, 1989], erfolgt die Biosynthese N-glykosidisch gebundener Glykanketten in einer wesentlich komplexeren Abfolge von Reaktionen, die sich formal in drei molekulare Ereignisse unterteilen läßt:

- 1.) Synthese eines  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläufermoleküls an Dolichol-Pyrophosphat als lipophilem Anker
- 2.) „*en-bloc*“-Transfer des Dol-PP-aktivierten Oligosaccharidvorläufers durch Oligosaccharyltransferasen (OSTs) auf die wachsenden Polypeptidkette
- 3.) Umbau des proteingebundenen  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläufers zur reifen Zuckerstruktur [Kornfeld and Kornfeld, 1985]

Die Dol-PP- $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ -Vorläuferstruktur wird in einer komplexen Reaktionsfolge, die als Dol-P-Zyklus bezeichnet wird, aufgebaut [Liu *et al.*, 1979; Rosner *et al.*, 1982; Burda and Aebi, 1999]. Dolichol, ein Polyisoprenyl Derivat, dient dabei zur Verankerung der wachsenden Oligosaccharidkette in der ER-Membran (Abb. 1.1 ). Die Synthese beginnt auf der zytosolischen Seite der ER-Membran mit der Übertragung eines N-Acetylglucosamin-1-phosphatrestes von UDP-GlcNAc auf Dol-P unter Bildung von Dol-PP-GlcNAc, das durch Übertragung eines weiteren GlcNAc-Restes sowie von fünf Mannoseresten zum Dol-PP- $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$  verlängert wird (wobei ausschließlich NDP-aktivierte Zucker als Donoren fungieren). Durch einen Mechanismus, der durch eine ATP-abhängige bidirektionale „Flippase“ katalysiert wird, wird die lipid-gebundene Heptasaccharidkette dann auf die luminal Seite der ER-Membran transloziert und dort durch Anheftung von vier weiteren Mannosen und drei Glucosen zum Dol-PP- $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ -Vorläufer verlängert

[Hirschberg and Snider, 1987]. Anders als bei der Synthese des Dol-P-Heptasaccharids werden hier Dol-P-Mannose bzw. Dol-P-Glucose als Glykosyldonoren verwendet, die vorher aus Dolichol-Phosphat und UDP-Glucose bzw. GDP-Mannose gebildet wurden.

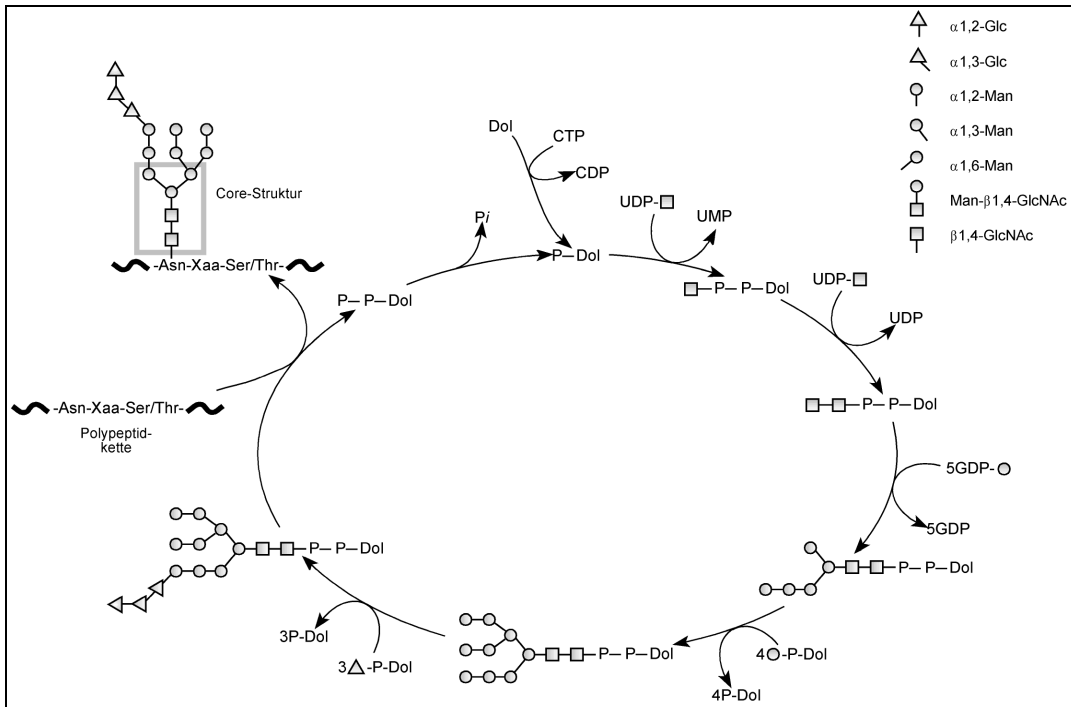


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Reaktionen des Dolicholphosphat-Zyklus und der N-Glykosylierung durch OST

Nach Fertigstellung wird das Dol-PP-gebundene Tetradasaccharid dann *en bloc* durch die membranständige Oligosaccharyltransferase (einem hetero-oligomeren Proteinkomplex) auf spezifische Asparaginreste der wachsenden Polypeptidkette übertragen [Kornfeld and Kornfeld, 1985]. Eine notwendige, allerdings nicht hinreichende Bedingung für diesen N-Glykosylierungsschritt ist, dass die Akzeptoraminosäure innerhalb einer Triplettssequenz vom Typ Asn-Xaa-Ser/Thr liegen muss, wobei Xaa jede Aminosäure außer Prolin sein kann [Marshall, 1974; Bause and Hettkamp, 1979; Bause, 1983].

Der Umbau des proteingebundenen  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläufers zur „reifen“ Zuckerstruktur beginnt noch während der Translationsphase mit der Abspaltung der terminalen  $\alpha 1,2$ -gebundenen Glucose durch ER-Glucosidase I (Abb. 1.2). Anschließend werden die beiden inneren  $\alpha 1,3$ -gebundenen Glucosereste durch ER-Glucosidase II entfernt [Hettkamp *et*

*al.*, 1984; Lucocq *et al.*, 1986]. Die resultierende  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur kann entweder als „high mannose“-Oligosaccharid erhalten bleiben oder durch ER-Mannosidase I bzw. II unter Bildung unterschiedlicher  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Isomere weiter prozessiert werden [Spiro, 2004]. Neben der Abspaltung der drei Glucosereste durch die beiden ER-Glucosidasen I und II wurde ein alternativer Deglukosylierungsweg nachgewiesen, der durch endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase katalysiert wird [Lubas and Spiro, 1987]. Dieses Enzym, das im Golgi lokalisiert ist, spaltet spezifisch  $\text{Glc}_{3-1}\text{Man}_{9-7}\text{GlcNAc}_2$ -Intermediate, wobei  $\text{Man}_{8-6}\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{Glc}_{3-1}\text{Man}$  als Hydrolyseprodukte entstehen [Moore and Spiro, 1990].

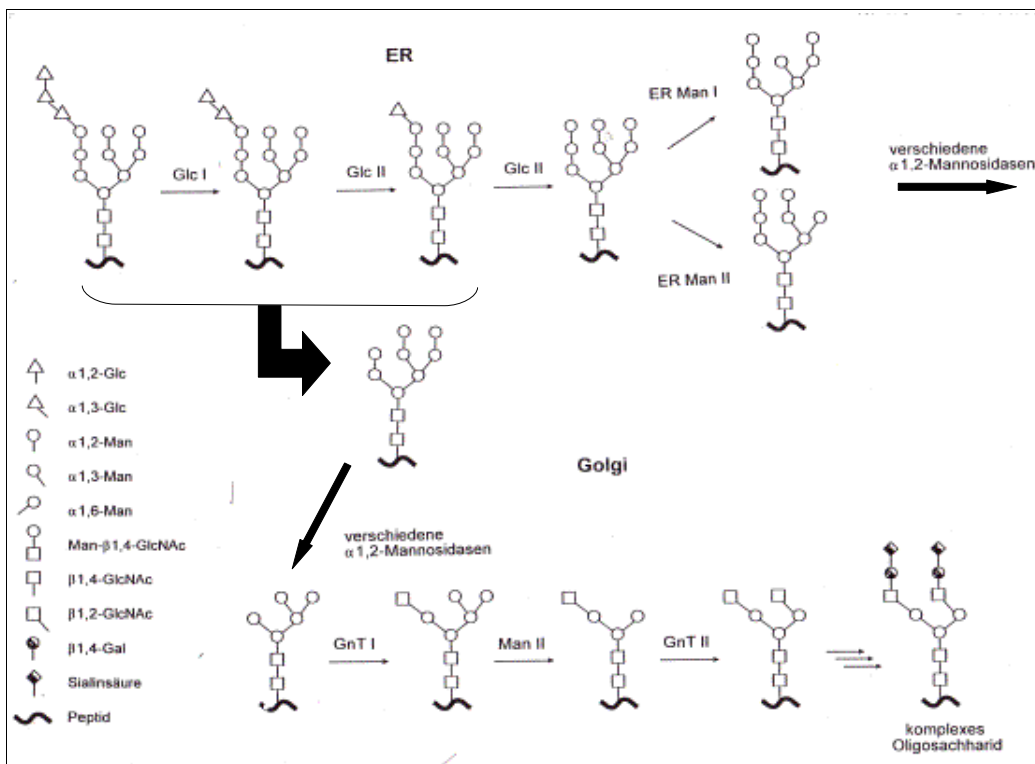
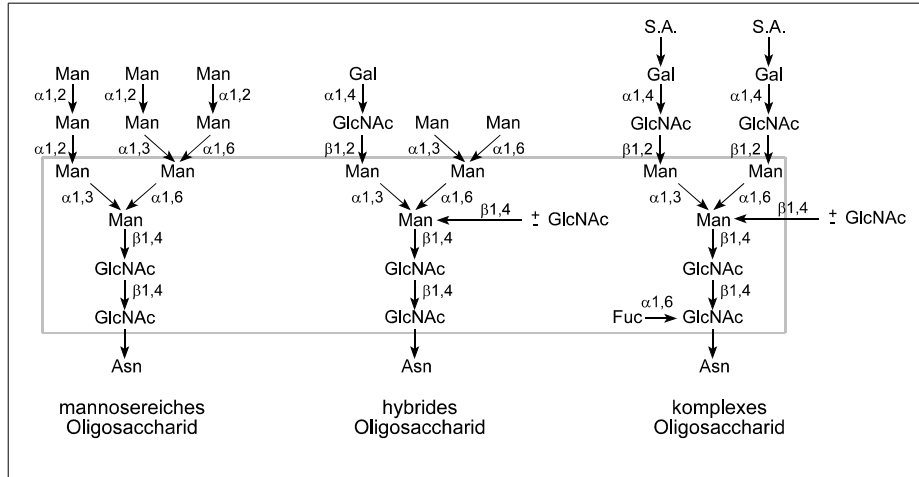


Abb. 1.2 Schematischer Ablauf des Oligosaccharid-Processings in Säugern

Die weitere Modifikation/Reifung der N-gebundenen „high mannose“-Oligosaccharide erfolgt dann im Golgi durch spezifische Glykosidasen und Glykosyltransferasen [Kornfeld and Kornfeld, 1985]. Zunächst werden durch verschiedene Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen ( $\alpha$ 1,2-Mannosidasen IA-C) die  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannosereste unter Bildung von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  von der  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Struktur abgespalten [Moremen *et al.*, 1994; Pinto, 1999; Tremblay and Herscovics, 2000]. Die Reihenfolge der Mannose-Abspaltung scheint dabei von der Spezifität dieser drei  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen, der Natur des N-Glykoproteins und von den sterischen Verhältnissen im Bereich der Zuckerkette abzuhängen.

Die Reaktionsschritte, durch die die  $\text{G}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur zu  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  abgebaut wird, und an denen die beiden ER-Glucosidasen I und II, Golgi-Endomannosidase und  $\alpha$ 1,2-Golgi-Mannosidasen beteiligt sind, können als „frühes Oligosaccharid-Processing“ bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu kann man den weiteren Umbau der  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Struktur zu komplexen Zuckerketten, der im Wesentlichen Reglycosylierungsschritte beinhaltet, als „spätes Oligosaccharid-Processing“ bezeichnen.

Schlüsselschritt auf dem Weg zu den hybriden und komplexen Oligosacchariden bildet dabei die Übertragung eines GlcNAc-Restes auf  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , der durch die GlcNAc-Transferase I katalysiert wird. Erst durch diesen Reglycosylierungsschritt wird die resultierende  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{Glc}_2$ -Struktur von der Mannosidase II als Substrat erkannt, die die äußere  $\alpha$ 1-3/ $\alpha$ 1-6-Mannose-Verzweigung auflöst [Tulsani, 1977]. Das gebildete  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ -Intermediat wird dann durch verschiedene Glykosyltransferasen (GlcNAc-Transferase II-VI, Galactosyl-, Sialyl-, Fucosyltransferasen) mehrfach reglycosyliert. Typische Beispiele für Oligosaccharide vom „high mannose“, hybriden und komplexen Typ sind in Abb. 1.3 dargestellt. Dieser Biosyntheseweg erlaubt es der Zelle, aus einem gemeinsamen  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläufer ein breites Spektrum unterschiedlichster Zuckerstrukturen zu bilden.



**Abb.1.3 Typische Strukturen N-gebundener Oligosaccharide.** Der eingerahmte Bereich zeigt die allen N-gebundenen Oligosacchariden gemeinsame Core-Struktur (Asn: Asparagin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Man: Mannose; Glc: Glucose; Gal: Galactose; S.A.: Sialinsäure; Fuc: Fucose) [Kornfeld and Kornfeld, 1985]

## 1.2 Struktur und Eigenschaften der Enzyme des „frühen Oligosaccharid-Processings“

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche  $\alpha$ -Glykosidasen des „frühen Oligosaccharid-Processings“ aus verschiedenen tierischen Geweben und Organen isoliert und bezüglich ihrer strukturellen und enzymchemischen Eigenschaften detailliert charakterisiert (Glucosidase I und II, endo- $\alpha$ 1,2-Mannosidase, mehrere exo- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen) [Hettkamp *et al.*, 1984; Schweden and Bause 1989; Moremen *et al.*, 1994; Herscovics, 1999].

ER-Glucosidase I, die erstmals in unserer Arbeitsgruppe aus Schweine- und Kalbsleber zur Homogenität gereinigt und kloniert wurde [Hettkamp *et al.*, 1984; Bause *et al.*, 1989; Kalz *et al.*, 1995], ist ein Typ II-Transmembranprotein, das aus einer kurzen N-terminalen Peptidomäne, einer Transmembrandomäne (TMD) und einer großen katalytischen Domäne besteht, die zum ER-Lumen hin orientiert ist. Die zytosolische Peptidomäne des Enzyms enthält in Position 7-9 relativ zum N-Terminus eine Tri-Arginin-Sequenz, die, wie Arbeiten von Hardt *et al.* (2003) gezeigt haben, ER-dirigierende Eigenschaften besitzt, jedoch für die ER-Lokalisation des Enzyms nicht zwingend notwendig zu sein scheint.

Im Gegensatz zur Glucosidase I ist Glucosidase II ein hetero-dimerer Enzymkomplex, der aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit (107 kDa) und einer kleinen  $\beta$ -Untereinheit (54 kDa) besteht. Funktionsanalysen zeigten, dass die  $\beta$ -Untereinheit selbst zwar nicht katalytisch aktiv, jedoch für die Faltung der  $\alpha$ -Untereinheit zum katalytisch aktiven Protein essentiell ist. Darüber hinaus enthält die  $\beta$ -Untereinheit ein C-terminales HDEL-Sequenzmotiv, durch welches der dimere Glucosidase II-Komplex im ER zurückgehalten wird [Trombetta *et al.*, 1996; Hentges and Bause, 1997; Treml *et al.*, 2000].

Endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase, die 1987 erstmals von Spiro beschrieben wurde, ist in unserer Arbeitsgruppe aus Schweineleber gereinigt und bezüglich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert worden [Bause and Burbach, 1996]. Zudem wurde die cDNA für das humane Enzym kloniert [Hardt *et al.*, 2005]. Wie Glucosidase I, besitzt auch die endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase eine Typ II-Membrantopologie mit einer kurzen zytosolischen Domäne (7 AS), einer Transmembrandomäne (19 AS) und einer langen katalytisch aktiven, luminalen Domäne (434 AS). Vorläufige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe sprechen dafür, dass bestimmte Sequenzmotive auf der zytosolischen und luminalen Seite der TMD wichtige Informationen für die Golgi-Lokalisation des Enzyms enthalten [Bause, unveröffentlicht].

An der Abspaltung der  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannosereste von  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , die zu  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  führt, sind nach heutigen Kenntnissen neben zwei ER-lokalisierten  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen (ER-Mannosidase I und II) vermutlich drei Golgi-spezifische  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen (Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-C) beteiligt. Wie Glucosidase I gehören auch die verschiedenen  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen zu den Typ II Transmembranproteinen. Allerdings unterscheiden diese sich deutlich in ihrer Aminosäuresequenz. Während die drei Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen untereinander eine relativ hohe Sequenzhomologie (55-63%) aufweisen, ist die Sequenzübereinstimmung zwischen den beiden ER-Mannosidasen und den drei Golgi-Mannosidasen deutlich geringer (33-41%). Die Gene der verschiedenen Processing-Mannosidasen sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Auffallend ist, dass die fünf Enzyme signifikante Unterschiede in ihrer gewebe- bzw. organspezifischen Expression aufweisen [Tremblay *et al.*, 1998]. Ferner zeigen die ER- bzw. Golgi-lokalisierten Mannosidasen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Substratspezifität. So spalten die beiden ER-Mannosidasen ausschließlich einen Mannoserest unter Bildung spezifischer  $\text{Man}_8$ -Isomere ab, während die drei Golgi-Mannosidasen die  $\alpha$ -mannosidischen Bindungen in



Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> unter Bildung von Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> hydrolysieren [Daniel *et al.*, 1994; Herscovics, 1999; Tremblay and Herscovics, 2000]. Hierbei sind die Unterschiede in der Reihenfolge der Mannoseabspaltung bei diesen drei Enzymen, zumindest unter *in vitro* Bedingungen, nicht sehr ausgeprägt. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die erstmals von uns aus menschlicher Niere (bzw. aus Schweineleber) gereinigte Man<sub>9</sub>-Mannosidase ( $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA), vergleichbar mit den  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen IB und IC, bevorzugt drei der vier  $\alpha$ 1,2-mannosidischen Bindungen im Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Substrat hydrolysiert [Schweden and Bause, 1989; Bause *et al.*, 1992; Bieberich and Bause, 1995]. Der nur langsam bzw. nicht abgespaltene (vierte) Mannoserest wird hingegen durch die ER-Mannosidase I bevorzugt abgespalten, was für eine komplementäre Spezifität dieser beiden Enzyme spricht. Das Vorkommen verschiedener ER- und Golgi-Mannosidasen ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass nach Deglucosylierung des Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Vorläufers - je nach N-Glykoproteintyp und möglicherweise kontrolliert durch Protein-spezifische Struktursignale - unterschiedliche Trimming-Wege eingeschlagen bzw. unterschiedliche „high mannose“-Intermediate gebildet werden können. Dies wäre aus funktioneller Sicht durchaus sinnvoll, da auf diese Weise das große Strukturpotential, welches in den entsprechenden isomeren Oligosaccharidstrukturen vorliegt, genutzt werden könnte, um bestimmte N-Glykoproteine mit spezifischen Adressen für unterschiedliche Stoffwechselwege und Funktionen zu versehen. Ob und wie dies im Einzelfall geschieht, ist - ebenso wie die spezifische Bedeutung der nur transient vorkommenden Glucosen - noch nicht vollständig aufgeklärt.

### 1.3 Funktion N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide

Die spezifische zelluläre Funktion der N-gebundenen Zuckerketten ist bis heute in vielen Punkten noch unverstanden. Bekannt ist seit längerem, dass die Oligosaccharid-Seitenketten physikochemische Eigenschaften, wie z.B. Löslichkeit, Konformation und Viskosität der N-Glykoproteine, beeinflussen [Springer, 1990; Lis and Sharon, 1993; Parodi, 2000]. Dass die N-gebundenen Glykanketten darüber hinaus auch an spezifischen zellulären Prozessen beteiligt sind, deutete sich bereits vor mehreren Jahrzehnten an, nachdem die Einzelschritte ihrer Biosynthesesequenz in verschiedenen eukaryontischen Zellen/Organismen aufgeklärt worden war. Man erkannte, dass die einleitenden Schritte der N-Glykoproteinbiosynthese

(Synthese des Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>-Vorläufers, dessen Übertragung auf Protein sowie die Abspaltung der drei Glucosereste) in einfachen und höheren Eukaryonten hochkonservierte Ereignisse darstellen, während der Umfang der weiteren Processing-Reaktionen offensichtlich erst mit der Entwicklung zu komplexeren Organismen signifikant anwächst. In der Tat existiert z.B. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur eine ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidase, die Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> in ein spezifisches Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Isomer überführt, während in multizellulären Organismen, wie z.B. dem Parasit *Trypanosoma cruzi* oder dem Fadenwurm *C. elegans*, bereits mehrere Processing- $\alpha$ -Mannosidasen exprimiert werden [Parodi, 1993; Moremen *et al.*, 1994]. Demgegenüber besitzen Säugetierzellen ein umfangreiches Arsenal verschiedener  $\alpha$ -Glykosidasen und Glykosyltransferasen, durch deren koordiniertes Zusammenwirken eine Vielzahl von N-Glykanstrukturen vom „high-mannose“--, hybriden und komplexen Typ gebildet werden können [Kornfeld and Kornfeld, 1985]. Allein der direkte Vergleich der in den verschiedenen Eukaryonten vorkommenden Processing-Reaktionen war bereits ein erster und deutlicher Hinweis darauf, dass der Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Vorläufer, ebenso wie die nur transienten Glucosereste und deren Abspaltung, für zelluläre Prozesse essentiell sein mussten, während hingegen das große Strukturpotential in den verschiedenen Zuckerketten, die im Verlaufe der Processing-Reaktionen in höheren Eukaryonten gebildet werden, offensichtlich erst mit der Entwicklung zu komplexeren Organismen genutzt wurden.

In der Tat gibt es mittlerweile zahlreiche überzeugende Belege dafür, dass N-gebundene Oligosaccharidketten an wichtigen Prozessen, wie z.B. Zellwachstum, Zellentwicklung und Zellkommunikation, mittelbar oder unmittelbar beteiligt sind. Ebenso spielen sie, wie man heute weiß, intrazellulär eine wichtige Rolle z.B. bei der Faltung, Stabilisierung und Sortierung von Proteinen, sowie dem Proteinabbau [Paulson, 1989; Varki, 1993; Gahmberg and Tolvanen, 1996; Sharon and Weis, 1998; Drickamer and Taylor, 1998].

Untersuchungen zur Funktion der (transienten) Glucosereste lieferten Hinweise dafür, dass die Glc<sub>3</sub>-Einheit im Dol-PP-gebundenen GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>-Vorläufer das Glykolipid vor Abbau durch Phosphodiesterasen schützt [Hoflack *et al.*, 1981]. Arbeiten von Spiro *et al.* (1979) lassen andererseits vermuten, dass die drei Glucosen eine Art „Signal“ für die Übertragung des Oligosaccharidvorläufers auf die wachsende Polypeptidkette durch OST darstellt. Für eine derartige „Signalfunktion“ sprechen in der Tat Ergebnisse von Akzeptormessungen mit synthetischen Peptidsubstraten. Diese wiesen deutlich schlechtere

Bindungskonstanten auf, wenn anstelle von Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> kürzerkettige Glykolipide (z.B. Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>) als Donoren in der OST-katalysierten N-Glykosylierungsreaktion eingesetzt wurden [Breuer and Bause, 1995].

Nach einem erstmals von Helenius *et al.* (1994) vorgeschlagenen Modell spielen N-gebundene Glc<sub>1</sub>Man<sub>9,7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Zwischenstufen eine Schlüsselrolle bei der Faltungskontrolle von N-Glykoproteinen im ER. So werden N-Glykoproteine, die mono-glukosylierte Man<sub>9,7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Ketten tragen, von Calnexin oder Calreticulin - zwei im ER lokalisierte Chaperone mit Lektin-Eigenschaften - spezifisch erkannt und gebunden. An den N-Glykoprotein/Lektin-Komplex bindet dann Erp 57, eine zur Proteindisulfid-Isomerase homologe Thioloxydoreductase, wodurch der Faltungsprozess initiiert wird. Anschließend wird der terminale Glucoserest durch Glucosidase II abgespalten und die N-Glykoproteine, sofern sie korrekt gefaltet vorliegen, vom ER zum Golgi transportiert und dort weiter prozessiert. Fehlerhaft gefaltete N-Glykoproteine hingegen werden von der UDP-Glucose: Glykoprotein-Glykosyltransferase (GT) reglucosyliert und erneut der Calnexin/Calreticulin-abhängigen „Faltungsmaschinerie“ zugeführt [Parodi, 2000; Ritter and Helenius, 2000].

Liegen N-Glykoproteine auch nach Durchlaufen des Calnexin/Calreticulin-Zyklus nicht korrekt gefaltet vor, werden diese im ER zurückgehalten und abgebaut, um ihre Akkumulation und die Entstehung einer Stresssituation für die Zelle zu verhindern. Bei diesem als ERAD (**ER** assoziierte **D**egradation) bezeichneten Abbauprozess spielen die ER-Mannosidasen eine zentrale Rolle. So wurde gezeigt, dass die Abspaltung des  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannoserestes vom mittleren Ast der Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Struktur durch ER-Mannosidase I zur Bildung eines Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Isomeren (Man<sub>8</sub>B) führt. Man<sub>8</sub>B wird spezifisch durch ein Lektin, das sog. EDEM (**ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein**) erkannt, und auf diesem Weg das nicht korrekt gefaltete N-Glykoprotein für die Retranslokation markiert und so dem Abbau im Zytosol (proteasomale Degradation) zugeführt [Werner *et al.*, 1996; Hosokawa *et al.*, 2001]. Hingegen entfernt ER-Mannosidase II den  $\alpha$ 1,2-Mannoserest auf dem C-Ast der Man<sub>9</sub>-Struktur und erzeugt auf diese Weise das Strukturisomer C, welches Signal für die nicht-proteasomale Degradation zu sein scheint [Spiro, 2004].

Neben der Abspaltung der drei Glucosereste durch Glucosidase I und Glucosidase II wurde ein alternativer Deglukosylierungsweg unter Beteiligung einer endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase nachgewiesen [Lubas and Spiro, 1987]. Dieses Enzym, das offensichtlich in „intermediate

compartements” und im cis-Golgi lokalisiert ist, spaltet spezifisch Glc<sub>3-1</sub>-Man-Einheiten von Asn-gebundenen Glc<sub>3-1</sub>Man<sub>9-8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Oligosacchariden ab [Moore and Spiro, 1990]. Bisher wurde angenommen, dass die endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase eine Art „Sicherheitsfunktion“ ausübt, die darin besteht, ein weiteres Processing nicht vollständig im ER deglukosylierter N-Glykoproteine zu garantieren. Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass der durch die endo- $\alpha$ -1,2-Mannosidase katalysierte Reaktionsweg, ähnlich dem Glucosidase II-Calnexin/Calreticulin-System, an der Faltungskontrolle bestimmter N-Glykoproteine beteiligt sein könnte [Zuber *et al.*, 2000].

Die dargestellten Beispiele sind ein Beleg dafür, dass spezifische Oligosaccharidstrukturen, die während des „frühen Oligosaccharid-Processings“ gebildet werden, in den Zellen für verschiedene unterschiedliche Funktionen genutzt werden.

#### 1.4 Congenital Disorders of Glycolysation (CDG)

Aufgrund der Komplexität der Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Vorläuferstruktur sowie der zahlreichen N-Glykanstrukturen, die im Verlaufe der Processing-Reaktionen gebildet werden, ist es nicht überraschend, dass genetisch bedingte Störungen im N-Glykoproteinstoffwechsel - bedingt durch reduzierte oder fehlende Aktivität einzelner an der Biosynthese beteiligter Enzyme - massive Auswirkungen auf zahlreiche intra- und extrazelluläre Prozesse haben.

1980 wurde erstmalig von dem belgischen Kinderarzt Jaeken eine genetisch bedingte Störung im N-Glykoproteinstoffwechsel beschrieben, deren molekulare Ursache auf eine reduzierte Aktivität der Phosphomannomutase zurückgeführt werden konnte [Jaeken *et al.*, 1980; von Schaftingen *et al.*, 1995]. Bei dem untersuchten Patienten wurde als Folge dieses Enzymdefektes eine deutlich reduzierte Konzentration an GDP-Mannose gefunden (~10% des normalen GDP-Mannose-Pools), was zu schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen (z.B. psychomotorischer Retardierung und Wachstumsstörungen) führte. Diese autosomal rezessiv vererbaren Störungen des N-Glykoproteinstoffwechsels, von denen seither zahlreiche weitere Fälle beschrieben wurden, werden als CDG's („Congenital Disorders Of Glycosylation“, früher „Carbohydrate Deficient Glycoprotein Syndrom“) bezeichnet. In Abhängigkeit vom Ausmaß des jeweiligen Enzymdefekts variiert das klinische Bild der CDG-Erkrankungen ausgehend von milden Verlaufsformen, über stark pathologische Symptome (z.B. geistige Retardierung, organischen Dysfunktionen, Beeinträchtigungen des

endokrinen Systems), bis hin zur Lethalität [Freeze, 2002].

Wegen der großen Zahl der Enzyme, die an der Glykoproteinbiosynthese beteiligt sind, werden die CDG's in zwei Gruppen unterteilt: CDG's vom Typ I umfassen Defekte von Enzymen, die am Aufbau des Dol-PP-gebundenen  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharids und dessen Übertragung auf Proteine beteiligt sind. Als CDG's Typ II werden Enzymdefekte bezeichnet, die das anschließende Processing der N-gebundenen Oligosaccharidketten betreffen [Keir *et al.*, 1999; Marquart and Freeze, 2001; Schachter, 2001]. In Abhängigkeit von der Position und dem Ausmaß des jeweiligen Enzymdefekts kann es dabei zu einer unzureichenden Übertragung von Zuckerketten (Hypoglykosylierung) kommen, oder die Oligosaccharidketten weisen eine abnorme Struktur auf. Die fehlerhafte N-Glykosylierung führt häufig zu Unterschieden in der Ladung und molekularen Masse der betroffenen N-Glykoproteine und damit zu einem veränderten Laufverhalten bei isoelektrischer Fokussierung und/oder SDS-Page, was in der Routineanalytik bei Verdacht auf CDG als diagnostischer Parameter genutzt wird [Durand *et al.*, 2000]. In den vergangenen Jahren wurde eine zunehmende Zahl genetisch bedingter N-Glykosylierungsstörungen auf molekularer Ebene aufgeklärt. Die bis heute bekannten CDG-Typen, von denen 12 auf eine reduzierte/fehlende Aktivität von Enzymen des Dol-P-Zyklus (Typ Ia-II) und sechs auf Störungen im Oligosaccharid-Processing beruhen (Typ IIa-IIf), sind in Tabelle 1.1 zusammenfassend dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind die pathologischen Konsequenzen je nach Enzymdefekt sehr unterschiedlich, was ein Grund dafür ist, dass die Diagnose einer CDG-Erkrankung außerordentlich schwierig ist.

CDG -Typ	Enzym- oder Protein-Defekt	Gen	OMIM*	Gen Lokus	Anzahl an Patienten	Krankheits-symptome (Beispiele)	Ref.
Ia	Phosphomannomutase (PMM)	PMM2	212065 601785	16p13.3- p13.2	~300	Psychomotorische Retardierung	Van Schaftingen <i>et al.</i> , 1995
Ib	Phosphomannose Isomerase (PMI)	MPI	602579 154550	15q22-qter	~20	Leberfibrose, Wachstums-hemmung	De Koning <i>et al.</i> , 1998; Jaeken <i>et al.</i> , 1998; Niehues <i>et al.</i> , 1998
Ic	Dol-P-Glc:Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dol $\alpha$ 1,3-glucosyltransferase	ALG6	603147 604566	1p22.3	~30	Coagulopathie, Psychomotorische Retardierung	Imbach <i>et al.</i> , 1999; Burda <i>et al.</i> , 1998

1 EINLEITUNG

Id	Dol-P-Man:Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolα1,3-mannosyltransferase	ALG3	601110 608750	3q27	2	Mikrocephalie, Hypotonie	Korner <i>et al.</i> , 1999
Ie	Dol-P-Man-Synthase I	DPM1	603503 608799	20q13.13	4	Verzögerte Myelinierung	Imbach <i>et al.</i> , 2000; Kim <i>et al.</i> , 2000
If	Dol-P-Man-utilization Defekt 1	MPDU1	604041 609180	17p13.1-p12	4	Blindheit	Schenk <i>et al.</i> , 2001; Kranz <i>et al.</i> , 2001
Ig	Dol-P-Man:Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolα1,6-mannosyltransferase	ALG12	607144 607143	22	5	Coagulopathie, Hypotonie	Chantret <i>et al.</i> , 2002
Ih	Dol-P-Glc:Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolα1,3-glucosyltransferase	ALG8	608103 608104	11pter-p15.5	5	Encephalopathie	Chantret <i>et al.</i> , 2003; Schollen <i>et al.</i> , 2004; Eklund <i>et al.</i> , 2005
Ii	GDP-Man:Man <sub>1</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolα1,3-mannosyltransferase	ALG2	607905 607906	9q22	1	Mentale Retardation, Gerinnungsstörungen	Thiel <i>et al.</i> , 2003
Ij	Dol-P-GlcNAc-phosphotransferase	ALG7	191350 608093	11q23.3	1	Mentale Retardation, Mikrocephalie	Wu <i>et al.</i> , 2003
Ik	GDP-Man:GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolβ1,4-mannosyltransferase	ALG1	605907 608540	16p13.3	2	Hepatosplenomegalie, Hydrops	Kranz <i>et al.</i> , 2004; Schwarz <i>et al.</i> , 2004
Il	Dol-P-Man:Man <sub>(6)</sub> <sub>(8)</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dolα-mannosyltransferase	ALG9	606941 608776	11q23	2	Gehirnatrophie, verzögerte Myelinierung	Frank <i>et al.</i> , 2004; Weinstein <i>et al.</i> , 2005
Ila	UDP-GlcNAc:α-6-D-Mannoseβ-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase II (GnT II)	MGAT2	603585 212067 212066 602616	14q21	6	Psychomotorische Retardierung, Ventrikeldefekt	Jaeken <i>et al.</i> , 1994
Ilb	α-1,2-Glucosidase I	GCS1	601336	2p12-13	1	siehe Einleitung	De Praeter <i>et al.</i> , 2000
Ilc		-	266265	11p11.2	4	Kurze Arme u. Beine,	Lühn <i>et al.</i> ,

IId	GDP-Fucose-Transporter (Zytosol→Golgi)	B4GALT	-	9	1	verzögerte Entwicklung Hydrocephalus, Myopathie	2001; Lübke <i>et al.</i> , 2001 Hansske <i>et al.</i> , 2002; Peters <i>et al.</i> , 2002
IIf	UDP-Galactose:N-Acetylglucosamin-β1,4Galactosyltransferase	COG7			3	Epilepsie	Wu <i>et al.</i> , 2004
IIf	conserved oligomeric golgi complex Golgi CMP-sialic acid transporter		605634		2	spontane massive Blutungen	Martinez <i>et al.</i> , 2005

**Tab.1.1 : Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)** [modifiziert nach Bradley and Hudson, 2003]

\*OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Unsere Arbeitsgruppe hat in Zusammenarbeit mit R. van Coster erstmalig eine N-Glykosylierungsstörung (CDG IIb) aufgeklärt, die auf einem genetisch bedingten Defekt der Glucosidase I beruht [De Praeter *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 2002]. Typisches Merkmal dieser CDG-Erkrankung war das massive Auftreten eines Glc-α1,2-Glc-α1,3-Glc-α1,3-Man-Tetrasaccharids im Urin. Die Patientin war compound-heterozygot für zwei Mutationen im Glucosidase I-Gen mit einem T→C-Austausch im väterlichen Allel und einem G→C-Austausch im mütterlichen Allel, welche beide zu entsprechenden Aminosäure-Substitutionen und inaktiven Glucosidase I-Proteinen führten. Die fehlende Aktivität des Enzyms (< 3%) hatte schwerwiegende pathologische Konsequenzen und führte letztlich zum frühen Tod des wenige Wochen alten Mädchens. Die Patientin litt an einer Tonusherabsetzung der Muskulatur bis hin zum Atemstillstand und wies eine Reihe von dysmorphen Merkmalen auf. Auffallend waren eine abnorme Entwicklungen des Knochengerüsts so wie Fehlbildungen am Kopf, überlappende Finger und eine thorakale Skoliose. Die visuelle und auditive Wahrnehmung der Patientin war stark eingeschränkt. Zudem zeigte sie Krämpfe und die neurologischen Dysfunktionen schritten bis zu rhythmischen vertikalen Augenbewegungen und tonischen Spasmen der Extremitäten fort. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass Glucosidase I für eine normale Entwicklung zu einem lebensfähigen Organismus essentiell ist und dass das Fehlen dieses Enzyms, welches die Oligosaccharid-Processingsequenz einleitet, mit dem Leben nicht vereinbar ist.

## 1.5 $\alpha$ -Glykosidase defiziente „knock-out“-Mäuse als Modelle für CDG`s

Störungen des N-Glykoproteinstoffwechsels führen beim Menschen, wie beschrieben, zu Multisystemerkrankungen (CDG`s), wobei die resultierenden Symptome in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzymdefekt sehr unterschiedlich und heterogen sein können (siehe Tab. 1.1). Die genaue Diagnose dieser Krankheiten, und insbesondere die Aufklärung der molekularen Ursache, ist in der Regel sehr schwierig bzw. experimentell aufwendig und erfordert molekularbiologische und biochemische Analyseverfahren, die in den meisten klinischen Laboren nicht zur Verfügung stehen. Um die molekularen Ursachen von Störungen des von N-Glykoproteinstoffwechsel besser untersuchen zu können, wurden in den letzten Jahren zunehmend „knock out“-Mäuse als Tiermodelle für CDG`s etabliert, bei denen einzelne Enzyme in der Biosynthesesequenz spezifisch ausgeschaltet wurden. Für CDG`s vom Typ II (Oligosaccharid-Processing) wurden bisher zwei Mausmodelle etabliert, bei denen entweder das Gen für GnT II (Mgat2-Gen) oder das Gen für die Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IB ausgeknockt wurden. Das Ausschalten des Mgat2-Gens (CDG Iia) führte hinsichtlich des Phänotyps zu vielen Übereinstimmungen mit der humanen CDG-Erkrankung. Sowohl die Mgat2-defizienten Mäuse, als auch Patienten mit CDG Iia zeigten z.B. ein verzögertes Wachstum, verringerte psychomotorische Aktivität, Tremor und Splenomegalie [Jaeken, *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2001]. Das Fehlen der Golgi-Mannosidase IB-Aktivität führte hingegen bei den Mäusen zu respiratorischem Stress und neonataler Letalität [Tremblay *et al.*, 2007]. Ein entsprechender CDG-Typ, bei dem dieses Enzym defekt ist, ist beim Menschen bisher nicht beschrieben worden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass, zumindest in einigen Fällen, frühe neonatale Lungenprobleme die bei Säuglingen diagnostiziert wurden, durch einen  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IB-Defekt verursacht worden sein könnten. Die dargestellten Beispiele machen deutlich, dass die Herstellung von „knock-out“-Mäusen ein sinnvoller Ansatz ist, um die funktionelle Bedeutung der an der Biosynthese von N-Glykoproteinen beteiligten  $\alpha$ -Glykosidasen und Glykosyltransferasen näher zu untersuchen.



## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Arbeitsgruppe von Bause beschäftigt sich seit Jahren mit der Charakterisierung und Funktionsanalyse der Enzyme des „frühen Oligosaccharid-Processings“, zu denen auch die Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA (Man<sub>9</sub>-Mannosidase) gehört. Die  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA baut, ebenso wie die Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen IB und IC, die nach Deglucosylierung vorliegenden „high-mannose“-Intermediate zu Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ab. Ob den von den Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen gebildeten Oligosaccharid-Intermediaten eine spezifische Rolle im zellulären Kontext zukommt, ist in vielen Punkten noch unverstanden. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit eine „knock out“-Maus hergestellt werden, bei der das  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gen spezifisch ausgeschaltet werden sollte. Anschließend sollte untersucht werden, welche Folgen der Mannosidase IA-Gendefekt auf zell- und entwicklungspezifische Prozesse der Maus hat.

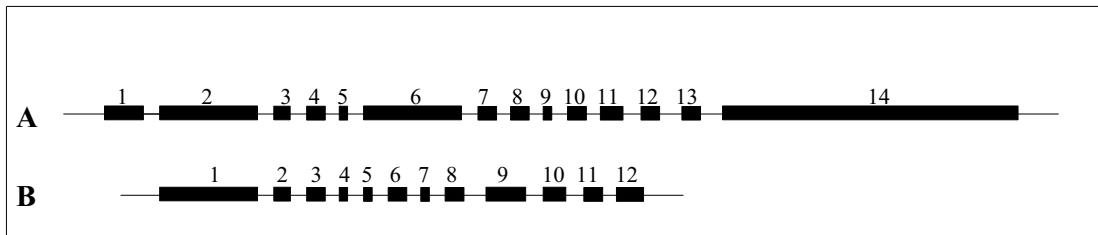
## **2.1 „Knock out“ des Mannosidase IA-Gens (Man<sub>9</sub>-Mannosidase) mit Hilfe eines „Replacement“-Vektors**

Die gezielte Inaktivierung von Genen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ist ein fester Bestandteil der modernen Molekularbiologie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der klassische Ansatz zur Herstellung einer Nullmutante für das  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gen verwendet. Um die Ausschaltung des Gens zu erreichen, wurde ein sogenannter „Replacement“-Vektor konstruiert, bei dem zwei zur Zielsequenz des  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gens homologe Bereiche eine transkriptionell aktive Selektionskassette einschließen. Die Selektionskassette ersetzt dabei mehrere Exons und verhindert auf diese Weise die Transkription des ursprünglichen Zielgens, wodurch das gewünschte Null-Allel entstehen sollte.

### **2.1.1 Aufbau der genomischen Struktur der Mannosidase IA aus Maus**

Für die Konstruktion des „Replacement“-Vektors muss zunächst die genomische Sequenz, welche ausgeschaltet werden soll, bekannt sein. Zu Beginn dieser Arbeit war weder die genomische Sequenz der Mannosidase IA aus Maus bekannt, noch standen genomische Klone zur Verfügung. Deshalb sollte zunächst mittels Sequenzierung der Aufbau der Intron/Exon-Struktur des Mannosidase IA-Gens aufgeklärt werden. Um spezifische Oligonukleotidprimer für die Sequenzierung zu erhalten, wurden auf Basis der bekannten humanen genomischen Sequenz (UniGene Hs.102788) im Bereich der Intron/Exon-Übergänge entsprechende Primer abgeleitet. Diese Vorgehensweise war gerechtfertigt, da ein Vergleich der cDNA-Sequenzen, die für die Mannosidase IA aus Maus und Mensch kodieren, sowohl eine hohe Basenhomologie (88%) als auch eine vergleichbar hohe Übereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen (90%). Die entsprechenden Primer wurden in eine Sequenzierungs-PCR mit genomischer DNA aus Maus als Template eingesetzt (5.2.1.5). Durch anschließendes „Primerwalking“ konnte der überwiegende Teil der Exon/Intron-Übergänge im Mausgen ermittelt werden. Im Verlauf der Sequenzierungsarbeiten wurde die vollständige genomische Sequenz der Mannosidase IA durch das Maus-Genom-Projekt [The FANTOM Consortium and RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group, 2005] veröffentlicht (UniGene Mm.117294). Erwartungsgemäß stimmten die durch eigene Sequenzierung ermittelten Daten mit den publizierten Sequenzen überein. Der Intron/Exon-Aufbau des Mannosidase IA-Gens aus Maus zusammen mit der entsprechenden

Genesequenz für das menschliche Enzym ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1: Genomischer Aufbau des Mannosidase IA-Gens aus Maus (A) und aus Mensch (B)**

Ein Vergleich der Strukturen des  $\alpha$ 1,2-Mannosidase-Gens aus Maus (Abb. 2.1 A) und aus Mensch (Abb. 2.1 B) zeigte eine hohe Homologie im Intron/Exon-Aufbau; allerdings besteht das Mannosidase IA-Gen der Maus aus 14 Exons und enthält damit zwei exonische Bereiche mehr (Exon 1 und 14) als das menschliche Gen. Exon 1 des Maus-Gens enthält ausschließlich nicht-translatierte Sequenzen, Exon 2 hingegen eine 100bp nicht-translatierte Sequenzen im 5'Bereich und im 3'Bereich die kodierende Sequenz für die N-terminale Domäne, die zytosolische Domäne, die Transmembrandomäne sowie 348 bp der luminalen Domäne des Enzyms. Der größte Teil der luminalen Domäne wird von den Exons 3-14 kodiert, wobei das Stop-Codon 100 Basenpaare stromabwärts in Exon 14 liegt.

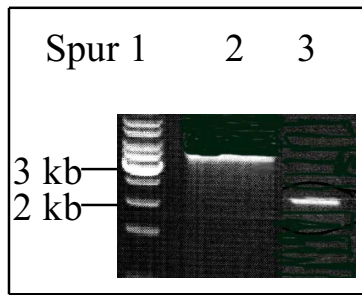
### 2.1.2 Isolierung spezifischer Mannosidase IA-DNA-Klone

Um Genfragmente für die Konstruktion des „Replacement“-Vektors zu isolieren, wurde eine genomische-Maus-DNA-Bank der Firma RZPD mit Hilfe von radioaktiv markierten DNA-Sonden gescreent, die für N- bzw. C-terminale Sequenzen kodierten (5.2.1.13; 5.2.1.17). Die genomische DNA-Bank bestand aus 11 „high density clone“-Filtern, auf die Cosmid-Klone mit einer Insertgröße von durchschnittlich 38 kb punktförmig in einem quadratischen Muster aufgetragen waren, wobei ein Punkt/Spot einem unabhängigen Cosmid-Klon entsprach. Nach Hybridisierung der Filter mit den entsprechenden radioaktiv markierten Sonden wurden mehrere Cosmid-Klone identifiziert, die entweder mit der N- oder C-terminalen Sonde hybridisierten. Die N-terminale Sonde hybridisierte mit drei unabhängigen Cosmid-Klonen auf den Filtern und die C-terminalen Sonde mit sieben. Die entsprechenden Koordinaten auf den Filtern wurden nach Angaben des Herstellers ermittelt und die dazugehörigen Cosmid-

Klone von der Firma RZPD zur Verfügung gestellt. Die als Agarstabilate erhaltenen Klone wurden dann in einem speziellen Selektionsmedium (5.1.6.1) angezogen, die DNA isoliert (5.2.1.2) und teilsequenziert (5.2.1.5). Zwei der Cosmid-Klone, die mit der N-terminalen Sonde hybridisierten und sechs der sieben Klone, die mit der C-terminalen Sonde hybridisierten, erwiesen sich nach der Sequenzierung als falsch positiv. Nur jeweils ein Klon enthielt die komplementäre Sequenz zur N- bzw. C-terminalen Sonde (N-Terminus: MPMMGC121F766Q2; C-Terminus: MPMGC121E11138Q1).

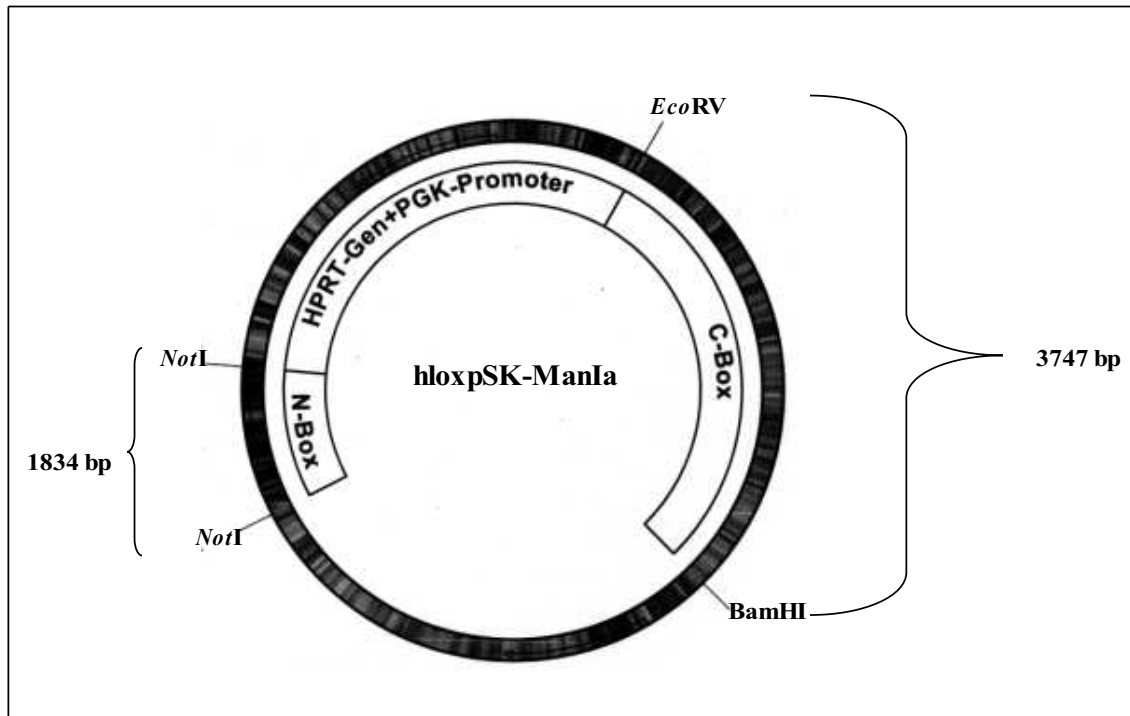
### **2.1.3 Herstellung des hloxpsK-ManIA-„Replacement“-Vektors**

Um das Mannosidase IA-Gen in den embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination mit dem „Replacement“-Vektor gezielt auszuschalten, wurde ein Vektor konstruiert, der als komplementäre Homologie-Bereiche zum Mannosidase IA-Gen Mannosidase IA spezifische DNA-Sequenzen enthielt, die aus dem nicht kodierenden N-terminalen (N-Box) und C-terminalen (C-Box) Bereich des Gens stammten. Die Basensequenz der N-Box hatte eine Länge von 1847 bp, beginnend 78 Basen 5'wärts des Start-ATG's in Exon 2. Sie enthielt darüber hinaus die gesamte Sequenz von Intron 1 und Exon 1 und endete 1575 Basen stromaufwärts im intronischen Bereich vor Exon 1. Die C-Box enthielt einen Sequenzabschnitt von insgesamt 3747 bp, beginnend 1068 Basen stromabwärts vom Stop-Codon in Exon 14 und endete 2717 Basen im intronischen Bereich hinter Exon 14 (Abb.2.4 A). Beide DNA-Fragmente (N- und C-Box) wurden mit der aus den entsprechenden Cosmid-Klonen isolierten DNA (s.o.) als Template durch PCR amplifiziert (5.2.1.3). Die PCR-Produkte wurden 5'-wärts bzw. 3'-wärts in den hloxpsK-Vektor so inseriert, dass sie die HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase)-Selektionskassette flankierten und unter der Kontrolle des im HPRT-Minigen enthaltenen Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotors standen [Magin *et al.*,1992] (siehe Abb. 2.3 und 2.4 B).



**Abb. 2.2: Reinigung der  $\alpha$  1,2-Mannosidase IA spezifischen PCR-Produkte für die Vektorkonstruktion.** Die abgebildeten DNA-Fragmente wurden durch PCR amplifiziert (5.2.1.3) mit der DNA aus den entsprechenden Cosmid-Klonen als Template. Spur 1: 1 kb DNA-Marker; Spur 2: C-terminales PCR-Produkt (3747 bp); Spur 3: N-terminales PCR-Produkt (1834 bp)

Abbildung 2.2 zeigt die amplifizierten N- bzw. C-Box spezifischen PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Wie in Spur 2 zu sehen ist, hatte das C-Box spezifische PCR-Produkt die erwartete Größe von ungefähr 4 kb, während das N-Box spezifische PCR-Produkt eine Größe von etwa 2 kb aufwies (Spur 3). Die beiden Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (5.2.1.9) und nach Restriktionsverdau (5.2.1.7) mit *NotI* bzw. *EcoRV/BamHI* (entsprechende Schnittstellen wurden über die verwendeten Primer eingefügt) nacheinander in den hloxpSK-Vektor inkloniert. Die Struktur des hloxpSK-ManIA-„Replacement“-Vektors ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt. Die korrekte Insertion der N- und C-Box wurde durch Sequenzierung überprüft. Der Vektor wurde anschließend für die Transfektion der ES-Zellen eingesetzt.

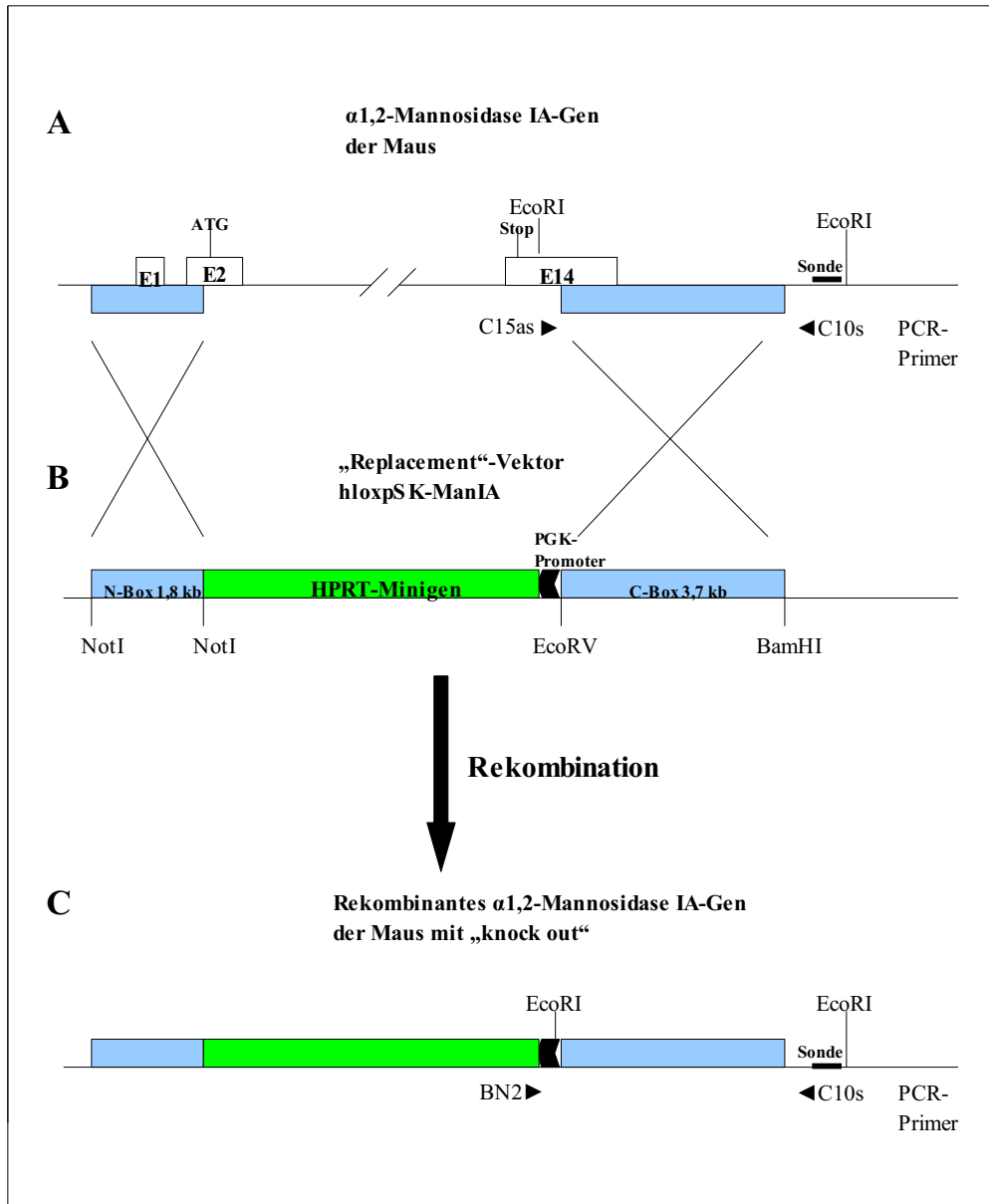


**Abb.2.3: Schematische Struktur des „Replacement“-Vektor hloxpSK-ManIA mit den eingefügten PCR-Produkten aus Abb. 2.2 für den N-Terminus (N-Box) und für den C-Terminus (C-Box)**

## 2.2 Transfektion embryonaler Stammzellen mit dem hloxpSK-ManIA-Vektor und Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen

ES-Zellen sind für die homologe Rekombination besonders geeignet, da sie *in vitro* manipuliert und selektioniert werden können und als permanente Zelllinie zu kultivieren sind, ohne ihre Totipotenz zu verlieren [Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981]. Mit Hilfe eines geeigneten Vektorkonstruktes, das in ES-Zellen eingebracht wird und entsprechende zum Zielgen homologe Sequenzbereiche enthielt, die die HPRT-Minigensequenz flankieren, lässt sich durch doppeltes Überkreuzen („Crossing over“) die Sequenz des Zielgens durch die manipulierten Sequenzen chromosomal ersetzen (Abb.2.4). Aufgrund der geringen Rekombinationsrate beim „Crossing over“, die im Bereich von  $1:10^6$  bis  $1:10^7$  liegt, werden homolog rekombinierte ES-Zellen durch die mit Hilfe des Vektors eingebrachte Selektionskassette und speziellen Selektionsmedien angereichert (z.B. HAT-Selektion, G418 Selektion). Für die Transfektion mit dem hloxpSK-ManIA-Vektor wurden ES-Zellen vom Typ Sv129P/OlaHsd HM1-ES-Zellen verwendet, welche von Prof. Magin (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurden. Nach Elektroporation mit dem durch *ClaI* linearisierten Vektor (5.2.3.1.7) wurden die transfizierten

ES-Zellen auf die erfolgreiche Integration der Fremd-DNA über die Anwesenheit des HPRT-Minigens (Selektionskassette) in HAT (**H**ypoxanthin, **A**minopterin, **T**hymidin)-haltigem Medium selektioniert (5.2.3.1.3). Nur ES-Zellen, die durch homologe Rekombination das HPRT-Selektionsgen aufgenommen und damit eine HAT-Resistenz erworben hatten, ließen sich unter diesen Bedingungen kultivieren. Die ES-Zellen, die unter HAT-haltigen Kulturbedingungen überlebten, wuchsen nach etwa 10 Tagen zu sichtbaren Einzelklonen heran. Es konnten 384 ES-Einzelklone nach HAT-Selektion isoliert werden. Diese Einzelklone wurden anschließend in größere Kulturschalen umgesetzt und weiter kultiviert, um eine ausreichende Zellzahl für die nachfolgende genomische Charakterisierung durch PCR und Southern-Blotting zu erhalten (5.2.1.4; 5.2.1.13).



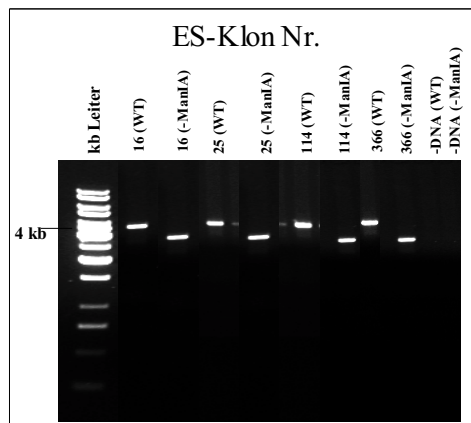
**Abb.2.4: Gene-Targeting Strategie und Homologe Rekombination des  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gens.** A und C zeigen die verwendeten PCR-Primer (C15as u. C10s für das WT-Allel; BN2 u. C10s für das mutierte Allel). In B sind die Restriktionsschnittstellen dargestellt, die für die Konstruktion des „Replacement“-Vektors verwendet wurden (NotI/NotI u. EcoRV/BamHI). C zeigt die Lage der Sonde an, die für die Southern-Blot Hybridisierung verwendet wurde.

Zur näheren Charakterisierung der 384 isolierten ES-Zellklone wurde die aus den Zellen isolierte DNA (s.o.) zum Nachweis des Wildtyp-Allels bzw. zum Nachweis des durch homologe Rekombination mutierten Mannosidase IA-Allels als Template in einer PCR eingesetzt (5.2.1.4). Zur Amplifikation des Wildtyp-Allels wurden Primer verwendet, deren



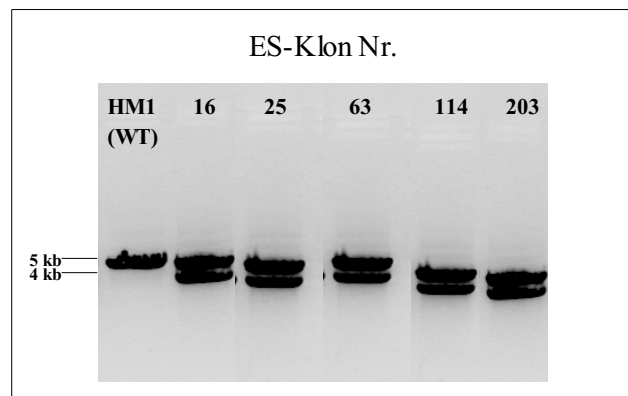
Sequenz außerhalb der C-Box lagen, wobei die Position des Antisense-Primers (C15as) 5'wärts der C-Box in Exon 14 und die Sequenz des Sense-Primers (C10s) im nicht-translatierten Bereich hinter Exon 14 lag (siehe Abb. 2.4 A). Mit dieser Primerkombination sollte ein 4,1 kb PCR-Produkt amplifiziert werden. Zum Nachweis des mutierten Mannosidase IA-Allels wurde der gleiche Sense-Primer (C10s) verwendet und zudem ein Antisense-Primer (BN2), der zu einem Sequenzabschnitt aus der Selektionskassette komplementär war (Abb.2.4 C). In diesem Fall sollte ein 3,7 kb großes PCR-Fragment synthetisiert werden.

Bei sechs der 384 isolierten und untersuchten ES-Zellklone konnte das Vorhandensein des mutierten Mannosidase IA-Allels (Klon Nr. 16, 25, 63, 114, 203 und 366) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Ergebnisse für vier der sechs positiven Klone sind in Abbildung 2.5 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, war bei diesen Klonen sowohl das 4,1 kb große PCR-Produkt, welches das Wildtyp-Allel anzeigt, als auch das mutierte Mannosidase IA-Allel, was ein 3,7 kb großes PCR-Produkt lieferte, nachweisbar.



**Abb. 2.5: Nachweis der homologen Rekombination des hloxpsK-ManIA-Vektors in transfizierten ES-Zellen.** Doppelte PCR-Analyse von vier ausgewählten ES-Zellklonen (Nr. 16, 25, 114, 366). Die linke Spur zeigt jeweils das PCR-Produkte, welches durch Amplifikation mit den Primern für das Wildtyp-Allel entstanden. In der rechten Spur sind die PCR-Produkte aufgetragen, die mit den Primern für das mutierte Mannosidase IA-Allel amplifiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden PCR-Ansätze ohne DNA-Zugabe verwendet.

Zur weiteren Absicherung der PCR-Daten wurde mit der isolierten DNA aus den sechs PCR-positiven ES-Zellklonen eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt (5.2.1.13). Hierzu wurde zunächst die DNA mit *EcoRI* gespalten. Aufgrund der unterschiedlichen Position der *EcoRI*-Schnittstellen im Wildtyp- bzw. im mutierten Allel sollte die Restriktionsspaltung im Falle des Wildtyp-Allels zu einem 4,8 kb großen und im Falle des mutierten Mannosidase IA-Allel zu einem 4,1 kb großen Spaltprodukt führen (Abb. 2.4 A und C). Diese Spaltprodukte wurden anschließend mit Hilfe einer etwa 600 bp langen radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen, die im 3' Bereich der beiden *EcoRI*-Spaltprodukte hybridisierte. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse, die in Abbildung 2.6 dargestellt sind, zeigen, dass nach *EcoRI*-Spaltung der DNA aus fünf der sechs untersuchten ES-Zellklone Fragmente der erwarteten Größe gebildet wurden (4,8 kb und 4,1 kb).



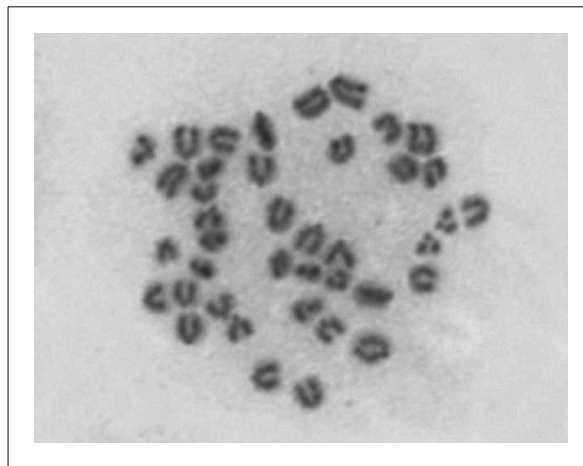
**Abb. 2.6: Southern-Blot-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen.** Die aus den ES-Zellen isolierte DNA wurde nach *EcoRI*-Verdau und Southern-Blotting mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert. Bei fünf der sechs Zellklone konnte das entsprechende DNA-Fragment für das WT-Allel (4,8 kb) und das mutierte Allel für die Mannosidase IA (4,1 kb) nachgewiesen werden.

Da es unter Zellkulturbedingungen häufig zu chromosomalen Abnormalitäten kommt, wurden die zuvor durch PCR und Southern-Blotting charakterisierten ES-Zellklone einer Karyotypanalyse unterworfen (5.2.3.1.4) [Liu *et al.*, 1997]. Die Ergebnisse der Karyotypanalyse sowie die Ergebnisse der PCR, Southern-Blot-Analyse und morphologischen Charakterisierung sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Klon Nr.	PCR		Southern-Blot Hybridisierung		Morphologie	Karyotyp
	WT (4,1kb)	HR (3,7kb)	WT (4,8kb)	HR (4,1kb)		
16	+	+	+	+	Gut	54,00%
25	+	+	+	+	Gut	60,00%
63	+	+	+	+	Sehr gut	73,00%
114	+	+	+	+	Mittel	32,00%
203	+	+	+	+	Gut	51,00%
366	+	+	-	-	-----	

Charakterisierung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen mit mutiertem Mannosidase IA-Allel

Wie zu sehen ist, variierte der Anteil der ES-Zellen mit korrektem Chromosomensatz von  $n=40$  deutlich und lag bei den verschiedenen Klonen zwischen 32% und 73%. Ein Zellklon mit der korrekten Chromosomenzahl ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abb. 2.7: Karyotypanalyse eines ES-Zellklons mit einem Chromosomensatz von  $n=40$ .** Die ES-Zellen wurden durch Zugabe von Demecolcine in der Metaphase der Mitose arretiert, auf Objektträger aufgetropft und die Chromosomen durch Färbung mit Giemsa'sg. sichtbar gemacht.

Die mikroskopische Beurteilung der ES-Zellen ergab, dass bis auf Klon 114 die Zellen nur vereinzelt Anzeichen von Differenzierung (strahlenförmiger Wuchs) zeigten. Dabei wiesen die ES-Zellklone mit dem höchsten Prozentsatz an korrekter Chromosomenzahl auch die beste Morphologie auf (Klon 63, 25, 16, 203). Dies ist in der Tabelle mit „sehr gut“ und „gut“ angegeben. Im Gegensatz dazu zeigte Klon 114 starke Abweichungen bezüglich der richtigen Chromosomenzahl und vermehrt Anzeichen von Differenzierung. Von den verschiedenen Zellklonen wurden die ES-Zellklone 25 und 63 für die Blastozysteninjektion ausgewählt, da

diese Klone den höchsten Anteil an Zellen mit korrektem Chromosomensatz besaßen und zudem morphologisch unauffällig waren.

### **2.3 Erzeugung Mannosidase IA-defizienter Mäuse**

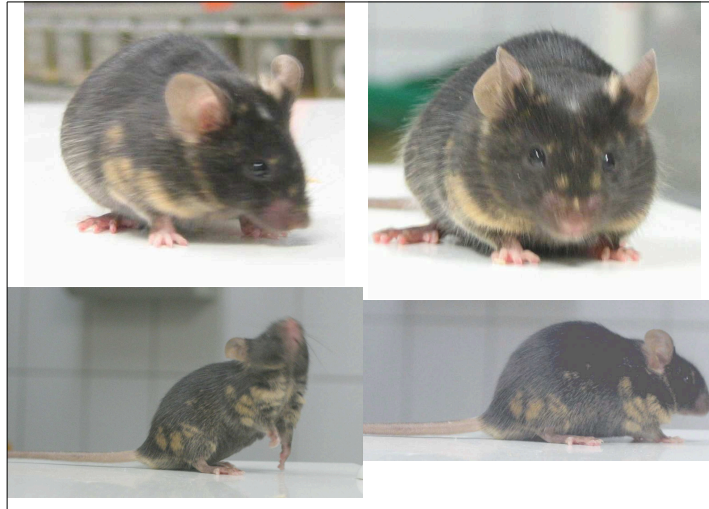
#### **2.3.1 Erzeugung von chimären Mäusen mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen**

Mit Hilfe totipotenter ES-Zellen lassen sich durch die Technik der Morula-Aggregation bzw. der Blastozysten-Injektion (5.2.4.4) chimäre Mäuse erzeugen, die den veränderten Genlocus an ihre Nachkommen weitergeben können. Die ausgewählten Zellklone 25 und 63 wurden in Blastozysten injiziert, die aus schwarzen C57/BL6-Weibchen entnommen wurden, und anschließend in Ammentiere reimplantiert. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Willecke (Institut für Genetik der Universität Bonn) durchgeführt. Nach Reimplantation der Blastozysten, in die Klon 63 injiziert wurde, und einer Tragzeit von 21 Tagen wurden vier lebensfähige chimäre Nachkommen geboren (drei Männchen und ein Weibchen), welche einen Chimärismusgrad von ca. 40-60% aufwiesen. Im Falle von Klon 25 wurden auch nach mehrfacher Wiederholung des Experiments keine chimären Nachkommen, sondern ausschließlich schwarze Jungtiere geboren.

#### **2.3.2 Zucht und Charakterisierung heterozygoter ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) und homozygoter ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Mannosidase IA-Mäuse**

Die vier chimären Nachkommen (drei Männchen und ein Weibchen) wurden nach Erreichen ihrer Geschlechtsreife mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Verpaarungen mit diesem Mausstamm sollten, insofern eine Keimbahntransmission vorlag, heterozygote ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) Nachkommen mit agouti-farbenem Fell hervorbringen. Diese braune Fellfarbe ist ein Merkmal der Sv129P2/Ola-Mäuse, aus denen die ursprünglichen HM1-ES-Zellen isoliert wurden. Alle vier chimären Tiere waren fertil, jedoch vererbte nur eines der drei männlichen Tiere (Abb. 2.8 Chimäre ♂1) das oben beschriebene Keimbahntransmissionsmerkmal an 50% seiner Nachkommen. Aus den Verpaarungen der Chimäre ♂1 mit C57BL/6-Weibchen gingen insgesamt 38 Jungtiere hervor (F1-Generation), von denen 18 ein agouti-farbenes Fell

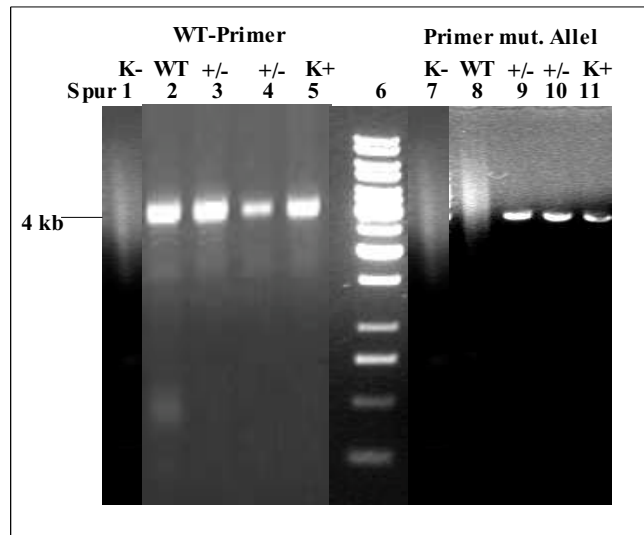
besaßen und damit potentiell heterozygot waren. Im Gegensatz hierzu führte auch die mehrfache Verpaarung von C57BL/6-Tieren mit den drei anderen chimären Mäusen (Chimäre ♀1, Chimären ♂2 und ♂3) ausschließlich zu schwarzen Nachkommen.



**Abb. 2.8: Chimäre ♂ 1 mit einem Chimärismusgrad von ca. 40%.**  
Nur diese Chimäre brachte nach Verpaarungen mit C57BL/6 Weibchen agouti-farbene Nachkommen hervor und vererbte das mutierte Mannosidase IA- Allel an etwa die Hälfte aller Nachkommen weiter.

Nach Genotypisierung (5.2.1.4; 5.2.1.13) wurden die heterozygoten Nachkommen bis zur dritten Rückkreuzungsebene mit C57BL/6-Tieren verpaart, um einen genomischen C57BL/6-Stammhintergrund zu erreichen und Inzuchtprobleme zu vermeiden. Der jeweilige Genotyp der aus diesen Verpaarungen resultierenden Tiere der F2-Generation (insgesamt 34 Mäuse) wurde anschließend mittels PCR bestimmt. Als Template für die PCR wurde die DNA eingesetzt, die aus den Schwanzspitzen der Tiere isoliert wurde. Zum Nachweis des Wildtyp- bzw. des mutierten Allels wurden die gleichen Primerkombinationen verwendet, wie in Kapitel 2.2. beschrieben (Primer C10s/C15as bzw. C10s/BN2). Um falsch positive Signale auszuschließen, wurde jeweils ein PCR-Ansatz ohne Template unter ansonsten gleichen Inkubationsbedingungen mitgeführt. Als „Positivkontrolle“ diente die DNA als Template, die aus ES-Zellklon 63 isoliert wurde. Die Ergebnisse der PCR-Analyse einer Wildtyp-Maus, zweier heterozygoter Mäuse und dem ES-Zellklon 63 sind in Abb. 2.9 exemplarisch dargestellt. Die Spuren 1-5 zeigen die PCR-Produkte, die mit der Wildtyp-Allel spezifischen Primerkombination gebildet wurden, die Spuren 7-11 die Produkte, die mit den spezifischen Primern für das mutierte Allel entstanden. Wie zu sehen ist, lieferte die PCR im Falle der Wildtyp-Allels ein 4,1 kb großes PCR-Produkt (Spur 2), nicht jedoch das 3,8 kb große

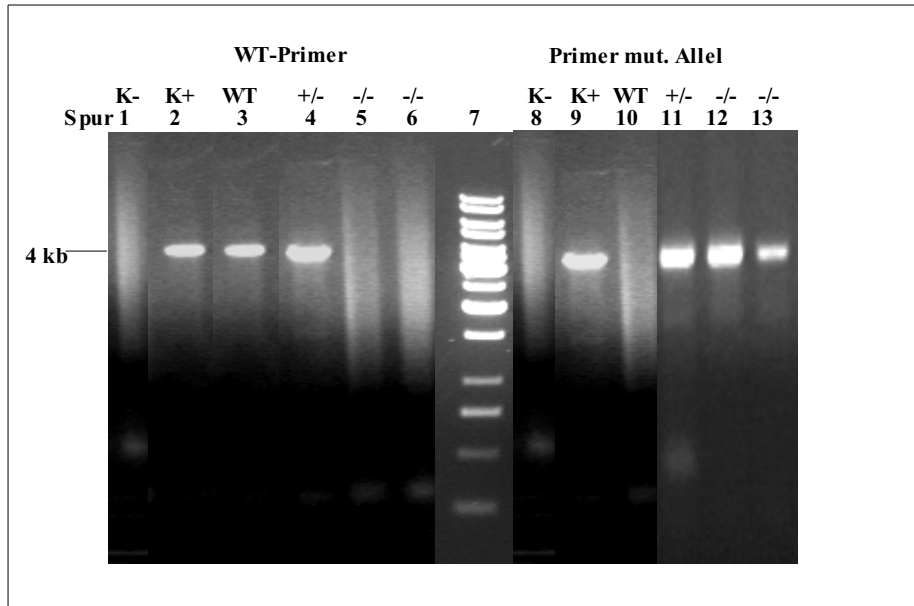
Produkt für das mutierte Allel (Spur 8). Im Gegensatz hierzu lieferten die heterozygoten ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) Tiere sowie der ES-Zellklon 63, wie erwartet sowohl ein 4,1 kb PCR-Produkt (Spur 3, 4 und 5) als auch ein  $\sim 3,8$  kb großes PCR-Produkt (Spur 9, 10 und 11), was das Vorhandensein beider Allele dokumentierte. Von den insgesamt 34 untersuchten Mäusen erwiesen sich 17 Tiere der F2-Generation als heterozygot (10 Weibchen, 7 Männchen). Dies bedeutete, dass das mutierte Mannosidase IA-Allel somit an etwa 50% der Nachkommen weitervererbt wurde.



**Abb. 2.9: Genotypisierung heterozygoter Mäuse mittels PCR.**  
 Aus den Schwanzspitzen isolierte DNA wurde als Template für die PCR verwendet und die erhaltenen DNA-Fragmente anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 u. 7: Negativkontrolle (ohne DNA); Spur 2 u.8: Wildtyp (+/+); Spur 3 u. 9: Maus 8443 (+/-); Spur 4 u. 10: Maus 8446 (+/-); Spur 5 u. 11: ES-Zellklon 63 (+/-); WT-Primer (C10s/C15as); Primer für das mutierte Mannosidase IA-Allel (C10s/BN2)

Die heterozygoten Tiere der F2-Generation wurden anschließend untereinander gekreuzt, um homozygote ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Mäuse mit einem vollständigen „knock out“ des Mannosidase IA-Gens zu erhalten. Aus diesen Verpaarungen gingen 21 Nachkommen hervor (F3-Generation), die durch PCR und Southern-Blotting genotypisiert wurden. Abbildung 2.10 fasst einige ausgewählte Ergebnisse der PCR-Analyse zusammen, wobei auf der linken Seite des Agarosegels wie in Abb. 2.9 die Wildtyp spezifischen PCR-Produkte aufgetragen wurden (Spur 1-6) und auf der rechten Gelhälfte die entstandenen PCR-Produkte für das mutierte Allel (Spur 8-13). Erwartungsgemäß, war im Falle der Wildtyp-Maus ausschließlich das 4,1

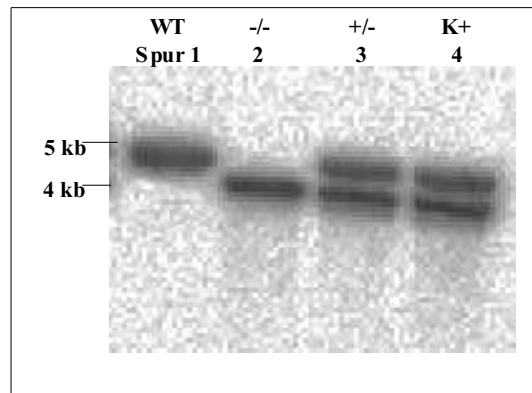
kb große Produkt nachweisbar (Spur 3), im Falle der homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Mäuse ausschließlich das 3,8 kb PCR-Produkt. (Spur 12 und 13). Im Falle der heterozygoten Maus und des ES-Zellklons 63 wurde sowohl ein 3,8 kb Produkt als auch ein 4,1 kb großes Produkt gebildet (Spur 2 und 9; 4 und 11). Bei 11 der insgesamt 21 untersuchten Mäusen lag ein vollständiger „knock out“ des Mannosidase IA-Gens ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) vor.



**Abb. 2.10: Genotypisierung homozygoter ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Mäuse mittels PCR.** Aus den Schwanzspitzen isolierte DNA wurde als Template für die PCR verwendet und die erhaltenen DNA-Fragmente anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 u. 8: Negativkontrolle (ohne DNA); Spur 2 u.9: ES-Zellklon 63 (+/-); Spur 3 u. 10: Wildtyp; Spur 4 u. 11: Maus 903 (+/-); Spur 5 u. 12: Maus 8444 (-/-); Spur 6 u. 13: Maus 8445 (-/-); WT-Primer (C10s/C15as); Primer für das mutierte Mannosidase IA-Allel (C10s/BN2)

Zur Absicherung der PCR Ergebnisse wurde wiederum mit der DNA von  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Tieren eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde die DNA aus den Schwanzspitzen isoliert, anschließend mit *EcoRI* gespalten und die Spaltprodukte durch Southern-Blotting mit der in 2.2. beschriebenen Sonde nachgewiesen. In Abbildung 2.11 sind exemplarisch die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse für jeweils eine homozygote (-/-) Maus sowie als Kontrolle für jeweils eine Wildtyp (+/+)-, eine heterozygote Maus (+/-) und für den ES-Zellklons 63 dargestellt. Wie aufgrund der Lage der *EcoRI*-Schnittstellen im Wildtyp- bzw. mutierten Allel zu erwarten, lieferte die DNA der Wildtyp-Maus (+/+) ausschließlich eine Bande von ~ 4,8 kb (Spur 1) und im Falle der homozygoten (-/-) Maus ausschließlich ein für

das mutierte Allel typisches 4 kb großes Fragment (Spur 2 = Maus 8444). Im Gegensatz hierzu waren beide Fragmente und damit die Anwesenheit beider Allele im Falle der heterozygoten Maus (+/-) und des ES-Zellklons 63 nachweisbar (Spur 3 = Maus 8443; Spur 4).

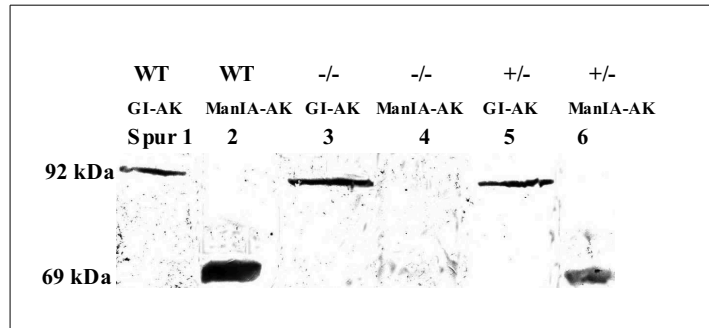


**Abb. 2.11: Southern Blot Analyse mit DNA aus den Schwanzspitzen einer  $ManIA^{-/-}$ ,  $ManIA^{+/+}$  - und einer Wildtyp-Maus sowie der DNA aus ES-Zellklon 63.** Die DNA wurde mit *EcoRI* gespalten und nach dem Blotten mit der in 2.2. beschriebenen Sonde nachgewiesen. Spur 1: Wildtyp (+/+); Spur 2: Maus 8444 (-/-); Spur 3: Maus 8443 (+/-); Spur 4: ES-Zellklon 63 (+/-).

Die übereinstimmenden Ergebnisse der PCR- und Southern-Blot-Analyse zeigen, dass in den  $ManIA^{-/-}$ -Mäusen das Mannosidase IA-Gen vollständig ausgeschaltet war. Diese Aussage entsprach auch den Ergebnissen einer RT-PCR, die mit aus  $ManIA^{+/+}$ ,  $ManIA^{+/-}$  und  $ManIA^{-/-}$  - Mäusen gewonnener mRNA durchgeführt wurde (5.2.1.15). Während im Falle der  $ManIA^{+/+}$  und  $ManIA^{+/-}$ -Tiere unter Verwendung einer Primerkombination aus dem kodierenden Bereich des Mannosidase IA-Gens das erwartete 1kb große PCR-Produkt amplifiziert wurde, war dieses Fragment im Falle der  $ManIA^{-/-}$ -Maus nicht nachweisbar (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit dem Mannosidase IA „knock out“ waren auch die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse (5.2.1.19; 5.2.2.7), die mit Lebermikrosomen aus verschiedenen Tieren durchgeführt wurde (Abbildung 2.12). Während im Falle der  $ManIA^{-/-}$ -Maus keine Expression der Mannosidase IA nachweisbar war (Spur 4), wurde das 69 kDA Protein sowohl in der Wildtyp-Maus (Spur 2) als auch in der heterozygoten Maus (Spur 6) durch einen Anti-Mannosidase IA-Antikörper angefärbt. Der Anti-Glucosidase I-Antikörper detektierte in allen



drei Mikrosomenpräparationen eine 92 kDa große Bande (Spur 1, 3 und 5), die der Molmasse der Glucosidase I entsprach, wodurch ein möglicher experimenteller Fehler bei der Mikrosomenpräparation ausgeschlossen wurde.



**Abb. 2.12: Westernblot Analyse von Mikrosomen aus einer Man IA<sup>-/-</sup>, Man IA<sup>+/-</sup> und einer Wildtyp-Maus.** Jeweils 1 µl Mikrosomensuspension aus Mausleber wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mannosidase IA und Glucosidase I wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen (GI-AK bzw. ManIA-AK). Spur 1 u. 2: Wildtyp (+/+); Spur 3 u.4: homozygote (-/-) Maus; Spur 5 u. 6: heterozygote (+/-) Maus

## 2.4 Phänotypische Auswirkungen des Mannosidase IA „knock outs“

Weder heterozygote (ManIA<sup>+/-</sup>) noch homozygote (ManIA<sup>-/-</sup>) Mäuse zeigten im juvenilen oder im adulten Stadium einen unmittelbar erkennbaren Phänotyp. So waren bei den homozygot defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keinerlei Abweichungen bezüglich ihres Körperbaus, Organentwicklung, Verhaltens und Lebenserwartung festzustellen. Aus mehrfachen Verpaarungsversuchen homozygoter Weibchen (ManIA<sup>-/-</sup>) mit homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Männchen gingen allerdings (auch nach zusätzlicher Superovulation der weiblichen Tiere) keine Nachkommen hervor. Dies sprach dafür, dass das Ausschalten des Mannosidase IA-Gens bei homozygot defizienten Mäusen zur Unfruchtbarkeit führte.

#### 2.4.1 Der Mannosidase IA „knock out“ führt bei weiblichen Mäusen zur Infertilität

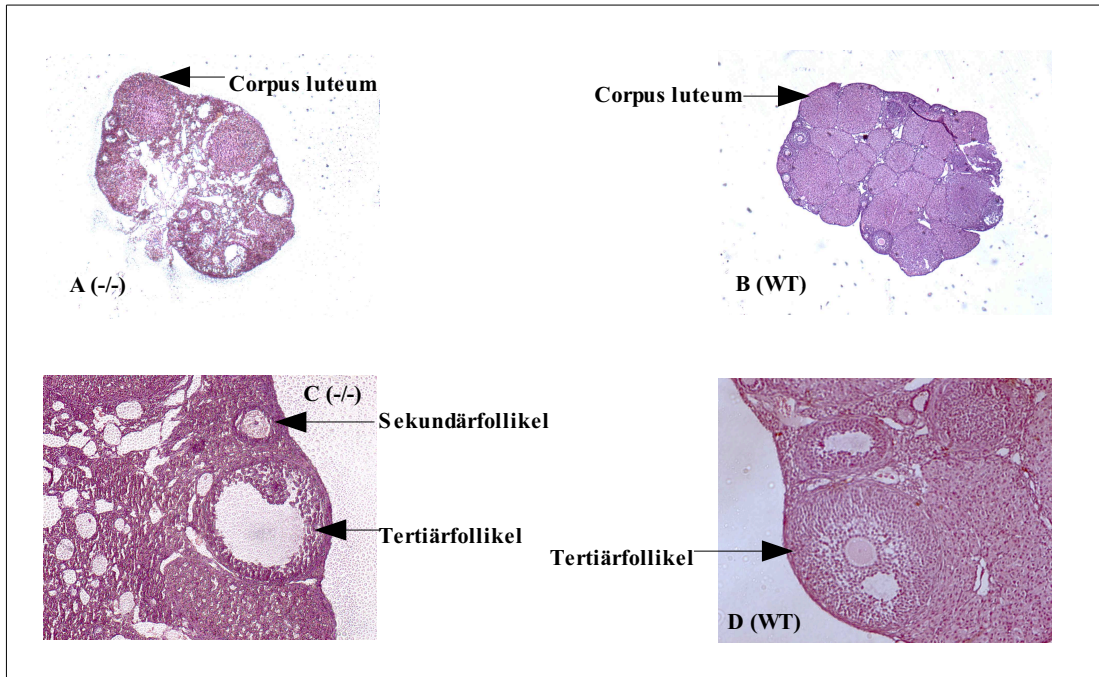
Um zu überprüfen, ob der Mannosidase IA-Gendefekt bei den weiblichen  $\text{ManIA}^{-/-}$ - und /oder bei den männlichen  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Tieren zur Infertilität führte, wurden zunächst homozygot defiziente Männchen ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) mit Wildtyp-Weibchen ( $\text{ManIA}^{+/+}$ ) bzw. mit heterozygoten ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) Weibchen gekreuzt. In sämtlichen Fällen ging aus diesen Verpaarungen eine normale Anzahl an heterozygoten ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) bzw. homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Nachkommen hervor. Dies bedeutete, dass das Fehlen der Mannosidase IA sich nicht auf die Fortpflanzungsfähigkeit der männlichen  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Mäuse auswirkt. Wurden hingegen homozygot defiziente Weibchen ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) mit Wildtyp- ( $\text{ManIA}^{+/+}$ ) bzw. heterozygoten ( $\text{ManIA}^{+/-}$ ) Männchen verpaart, wurden in keinem Fall Jungtiere geboren. Dies zeigte, dass im Gegensatz zu den Mannosidase IA defizienten Männchen homozygote ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen infertil sind.

Um erste Hinweise für die Ursache der Infertilität der  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Weibchen zu erhalten, wurde zunächst der Vaginalzyklus von homozygot defizienten Weibchen mit dem Zyklus von gesunden ( $+/+$ ) Weibchen verglichen. Der Zyklus der weiblichen Maus vollzieht sich über 4 bis 5 Tage und wird in die Phasen Prooestrus, Oestrus, Metroestrus und Dioestrus unterteilt. In dieser Zeit bereitet sich der weibliche Organismus auf die Einnistung des befruchteten Eies vor. Die unterschiedlichen Phasen des Zyklus können durch das Vorhandensein verschiedener Zelltypen in Vaginalabstrichen bestimmt werden. In der Phase des Prooestrus sind hauptsächlich Epithelzellen zu finden, während sich die Oestrusphase durch das Vorkommen sog. Schollen auszeichnet. Im Metroestrus sind im Abstrich neben Epithelzellen und Schollen Leukozyten nachweisbar, während dann die Phase des Dioestrus durch das Vorkommen von Leukozyten und Epithelzellen charakterisiert ist. Bei den untersuchten Tieren ließen sich die verschiedenen Phasen des Zyklus anhand des Vorhandenseins der unterschiedlichen Zelltypen im Vaginalabstrich eindeutig unterscheiden, wobei in keinem Fall Unterschiede zwischen den Wildtyp- und homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen erkennbar waren. Dieses Ergebnis sprach dafür, dass die Infertilität der  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Weibchen nicht auf einer Störung des hormonell kontrollierten Vaginalzyklus beruhen konnte.

#### 2.4.1.1 Makroskopische und histologische Untersuchung adulter Ovarien von Mannosidase IA-defizienten Mäusen

Eine mögliche andere Ursache für die Infertilität der Mannosidase IA-defizienten Weibchen könnte in einer Beeinträchtigung der Follikulogenese begründet sein. Die Follikelreifung beginnt während des Ovarialzyklus mit der Entwicklung eines kleinen Teils der pränatal angelegten Primärfollikel. Mit jedem Ovarialzyklus entwickeln sich mehrere Primärfollikel zu Sekundärfollikeln, welche wiederum zu Tertiärfollikeln (Graaf-Follikel) heranreifen. Sekundärfollikel, die nicht das Tertiärstadium erreichen, gehen zugrunde und bilden sog. atretische Follikel. In den Tagen vor der Ovulation vergrößert sich der Tertiärfollikel. Nach der Ovulation entsteht aus den Resten des Follikelepithels (Granulosazellen) das *Corpus luteum* (Gelbkörper), welcher der Bildungsort von Östrogenen und *Corpus luteum*-Hormonen (Progesteron) ist.

Zunächst wurden jeweils von drei etwa gleich alten Wildtyp-Weibchen und von drei homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen die Ovarien entnommen und makroskopisch beurteilt. Hierbei ließen sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den Ovarien der Mannosidase IA-defizienten Weibchen und der Wildtyp-Weibchen oder Unterschiede im relativen Gewicht der einzelnen Eierstöcke (bezogen auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres) feststellen. Für eine genauere Charakterisierung der Follikelreifung innerhalb der Eierstöcke wurden die entnommenen Ovarien der homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) und der Wildtyp-Weibchen in Paraffin eingebettet, am Ultramikrotom in  $7\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (5.2.5) und die Ultradünnschnitte dann bei 10 bzw. 40 facher Vergrößerung am Lichtmikroskop beurteilt. In den in Abbildung 2.13 dargestellten Ultradünnschnitten zeigte sich, dass die Mannosidase IA<sup>-/-</sup>-Ovarien (A und C) nicht von denen des Wildtyps (B und D) zu unterscheiden waren. So waren in den Präparaten beider Genotypen *Corpora lutea* (Gelbkörper) (A und B) und Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien (C und D) nachweisbar. In keinem Fall fanden sich atretische Follikel. Diese Beobachtungen sprachen dafür, dass der Mannosidase IA „knock out“ sich offensichtlich nicht auf die Follikulogenese auswirkte, und daher eine Störung der Follikelentwicklung als Ursache für die Infertilität der Mannosidase IA defizienten Weibchen eher unwahrscheinlich war.

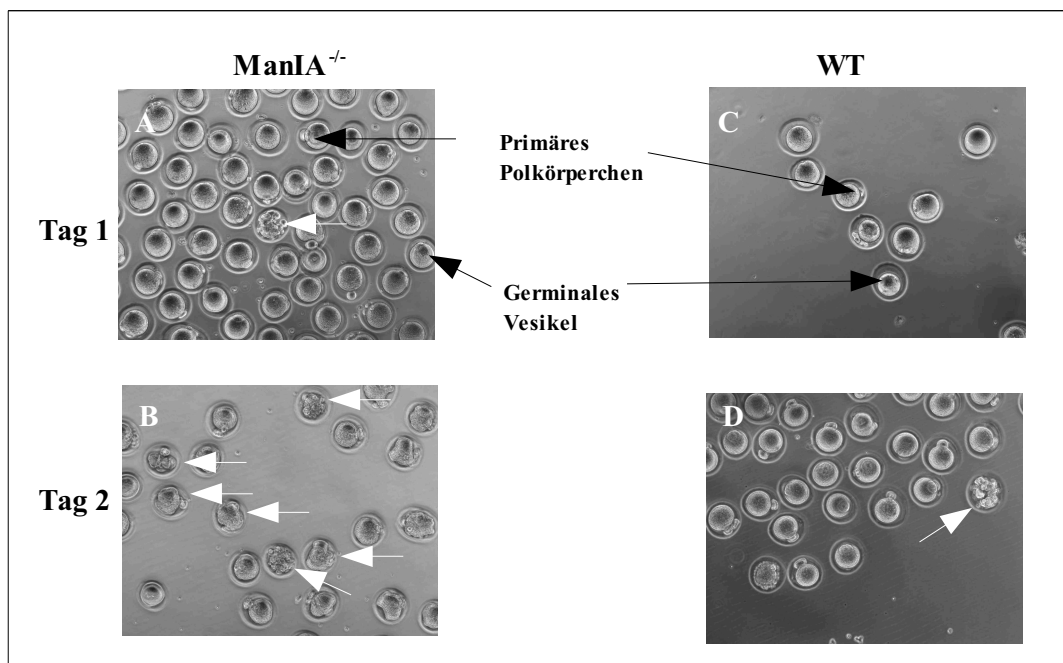


**Abb.2.13: Hämatoxilin und Eosin gefärbte Ultradünnschnitte von Ovarien homozygoter (ManIA<sup>-/-</sup>)- und Wildtyp-Mäuse.** A: Man IA<sup>-/-</sup>, 10fache Vergrößerung; C: Man IA<sup>-/-</sup>, 40fache Vergrößerung; B: WT, 10fache Vergrößerung; D: WT, 40fache Vergrößerung

#### 2.4.1.2 Unbefruchtete Oozyten aus Mannosidase IA-defizienten Weibchen sind unter Kulturbedingungen instabil

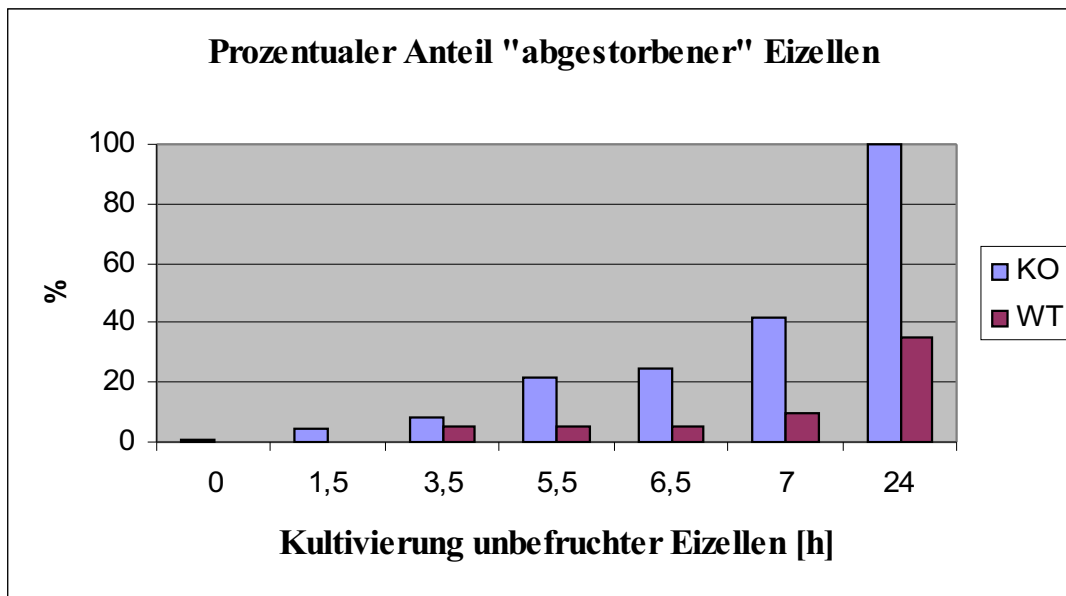
Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen der Mannosidase IA in homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Weibchen weder zu erkennbaren Unterschieden im Ablauf des Vaginalzyklus noch zu Unterschieden in einzelnen Schritten der ovariellen Eizellreifung führte. Um Hinweise zu erhalten, ob der Mannosidase IA „knock out“ die Oozytenentwicklung nach der Ovulation beeinflusst, wurden unbefruchtete Eizellen von superovulierten homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Weibchen sowie unbefruchtete Eizellen aus Wildtyp-Weibchen isoliert und diese 24 h in M2-Medium kultiviert (5.2.4.7). Änderungen in der Morphologie der Eizellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entnahme im Lichtmikroskop beurteilt. Als morphologisch unauffällig wurden Eizellen eingestuft, deren *Zona pellucida* und Zellmembran eine gleichmäßige runde Form aufwiesen. Die eigentliche Oozyte sollte ebenmäßig strukturiert, das germinale Vesikel als dunkler Bereich und evtl. das primäre Polkörperchen zu erkennen sein. Zeigten die Eizellen eine atypische Zellmorphologie

(Spaltbildung zwischen *Zona pellucida* und Oozyte; kein erkennbares germinales Vesikel oder Polkörperchen vorhanden), wurden diese Eizellen als „abgestorben“ angesehen. Abbildung 2.14 zeigt exemplarisch unbefruchtete Eizellen von homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen (A und B) und Wildtyp-Weibchen (C und D) unmittelbar nach der Entnahme (A und C) bzw. nach 24 h in Kultur (B und D). Zum Zeitpunkt der Entnahme zeigten die Eizellen aus beiden Genotypen keine Auffälligkeiten in ihrem Aussehen (A und C). Die *Zona pellucida* war gleichmäßig rund, das germinale Vesikel gut zu erkennen und das primäre Polkörperchen zumindestens in einigen Eizellen sichtbar. Vereinzelt ließen sich Eizellen finden, deren Morphologie atypisch erschien (A, weißer Pfeil), was vermutlich auf eine Beschädigung der Eizellen während der Entnahme zurückzuführen ist. Nach 24stündiger Kultivierung in M2-Medium zeigten sich deutliche Unterschiede in der Morphologie der Oozyten aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) und Wildtyp-Weibchen. Während die Oozyten, die aus gesunden Tieren isoliert wurden, zu diesem Zeitpunkt bis auf wenige Ausnahmen intakt waren (D), war das Zellinnere sämtlicher Eizellen aus Mannosidase IA defizienten Weibchen unregelmäßig strukturiert bzw. „zerklüftet“. Germinale Vesikelstrukturen und Polkörperchen waren nicht mehr zu erkennen (B, weiße Pfeile).



**Abb. 2.14: Unbefruchtete Eizellen aus  $\text{ManIA}^{-/-}$  - und Wildtyp-Weibchen** bei 10facher Vergrößerung. A: Eizellen aus Mannosidase IA<sup>-/-</sup>-Mäusen direkt nach der Entnahme aus dem Ovidukt und nach 24 h in Kultur (B); C: Eizellen aus WT-Weibchen direkt nach der Entnahme und nach 24 h in Kultur (D). Die weißen Pfeile markieren Eizellen, die als abgestorben beurteilt wurden.

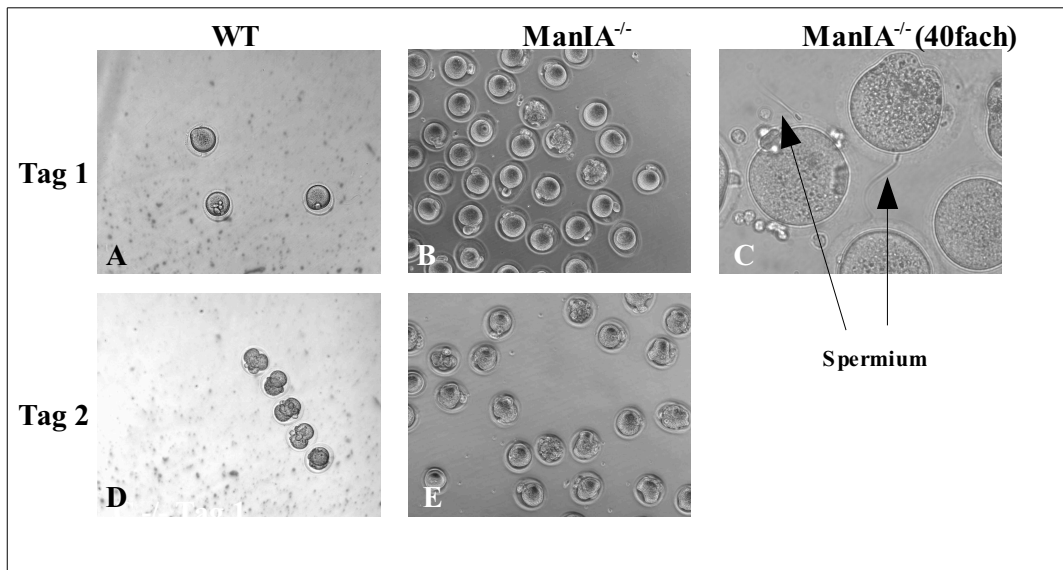
Da bereits nach 24 h in Kultur alle Eizellen aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen drastische Änderungen in ihrer Oozytenstruktur aufwiesen, d. h. vermutlich „abgestorben“ waren, wurde in einem weiteren Experiment der Anteil „abgestorbener“ Eizellen im Vergleich zu „normal“ aussehenden Eizellen als Funktion der Zeit in Kultur bestimmt. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 2.16 dargestellt. Wie in der Zeitkinetik zu sehen ist, lag der Anteil an Eizellen mit morphologischen Auffälligkeiten sowohl bei  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Weibchen als auch bei Wildtyp-Weibchen bis etwa 3-4 h nach der Entnahme bei unter 5%. Dieser Anteil erhöhte sich in den folgenden Stunden nur unwesentlich bei den Eizellen, die aus Wildtyp-Weibchen isoliert wurden und erreichte etwa 30% nach 24 h. Im Gegensatz hierzu nahm der prozentuale Anteil „abgestorbener“ Eizellen, die aus Mannosidase IA defizienten Weibchen stammten im selben Zeitraum signifikant zu und erhöhte sich nach 24 h in Kultur auf nahezu 100% (siehe auch Abb. 2.14 B). Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die Oozyten aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen als Folge des Mannosidase IA-Defekts, zumindest unter *in vitro* Bedingungen, deutlich instabiler waren als Eizellen aus gesunden Mäusen.



**Abb. 2.15: Stabilität unbefruchteter Eizellen aus  $\text{Man IA}^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen unter Kulturbedingungen.** Unbefruchtete Eizellen wurden aus den Mäusen isoliert, in Kultur genommen und zu verschiedene Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt. Als „abgestorben“ wurden die Eizellen bewertet, die deutliche strukturelle Veränderungen aufwiesen.

### 2.4.1.3 Oozyten aus Mannosidase IA defizienten Weibchen sind nicht befruchtungsfähig

Die unter 2.4.1.2 beschriebenen Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass sich das Fehlen der Mannosidase IA offensichtlich negativ auf die Stabilität der Oozyten auswirkt. Da die unbefruchteten ManIA<sup>-/-</sup>-Eizellen zumindest unmittelbar nach der Entnahme morphologisch unauffällig erschienen, sollte untersucht werden, ob die Eizellen noch befruchtet werden konnten. Das entsprechende Experiment wurde wie folgt durchgeführt: Homozygote (ManIA<sup>-/-</sup>) Weibchen und Wildtyp-Weibchen wurden superovuliert und mit gesunden Männchen verpaart. Die Weibchen wurden am Tag nach der Verpaarung getötet und deren Eizellen (mit den im Ovidukt verbliebenen Spermien) isoliert. Anschließend wurden die Eizellen in M2-Medium kultiviert (5.2.4.7) und nach 24 h überprüft, ob die Oozyten das 2-Zellstadium erreicht hatten (ein Indiz dafür, dass eine Befruchtung der Eizellen stattgefunden hat). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 2.16 zusammengefasst, wobei die Abbildungen A, B und C die Eizellen am Tag der Entnahme und die Aufnahmen D und E die Eizellen nach 24 h in Kultur zeigen. Wie Abbildung 2.16 D zeigt, hatten sich die Eizellen aus Wildtyp-Weibchen, wie erwartet, zum 2-Zellstadium geteilt, was anzeigte, dass die Eizellen befruchtet worden waren. Im Gegensatz hierzu konnte bei den Eizellen aus homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Tieren trotz mehrfacher Wiederholung des Experiments in keinem Falle ein 2-Zellstadium nachgewiesen werden (E), obwohl Spermien offensichtlich an die Eizelle binden konnten, wie in der 40fachen Vergrößerung (C) zu erkennen ist. Vielmehr wiesen alle ManIA<sup>-/-</sup>-Eizellen nach 24stündiger Kultivierung die gleichen atypischen Merkmale auf, wie sie nach Kultivierung der unbefruchteten Eizellen aus homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Weibchen beobachtet wurden (E). Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass Eizellen aus Mannosidase IA defizienten Weibchen, trotz Anheftung der Spermien an die *Zona pellucida*, nicht befruchtet werden (konnten).



**Abb. 2.16: Mikroskopische Aufnahmen von befruchteten und unbefruchteten Eizellen aus Man IA<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen.** Die Eizellen wurden aus den Mäusen isoliert und mit den im Ovidukt verbliebenen Spermien in Kulturmedium überführt. Als Indiz für eine Befruchtung wurde eine Teilung der Eizellen in das Zweizellstadium nach 24 h angesehen. Dargestellt sind befruchtete Eizellen aus Wildtyp-Tieren (A u. D= Zweizellstadium) und aus Mannosidase IA<sup>-/-</sup>- Mäusen (B, C u. E=kein Zweizellstadium) bei 10facher Vergrößerung bzw. bei 40facher Vergrößerung (C) im Lichtmikroskop. A, B und C zeigen die Eizellen am Tag der Entnahme. Die Aufnahmen D und E wurden 24 h nach der Entnahme aufgenommen.

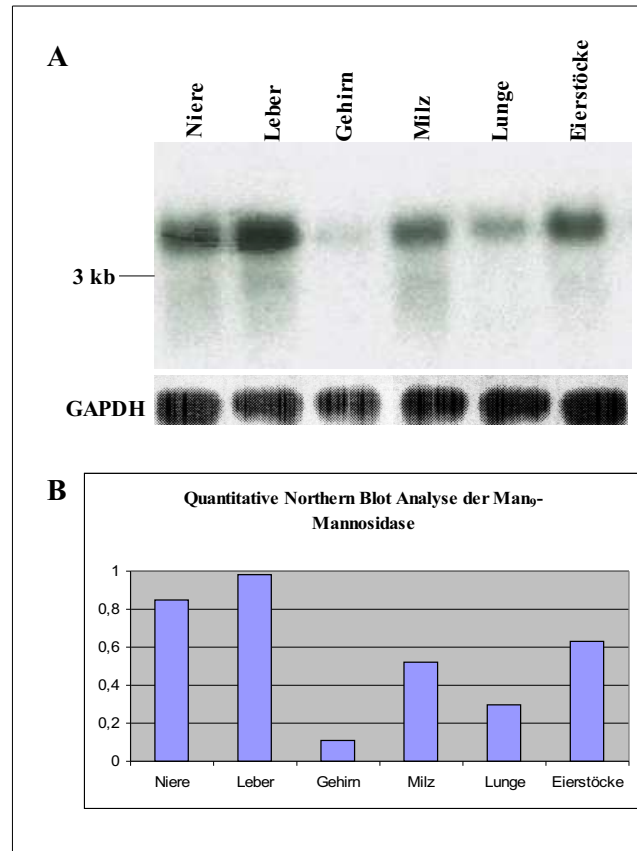
Es war deshalb im nachhinein nicht überraschend, dass im Vorfeld durchgeführte Versuche, Blastozysten aus Mannosidase IA defizienten Weibchen zu isolieren, die mit Wildtyp- (ManIA<sup>+/+</sup>), heterozygoten (ManIA<sup>+/-</sup>) und homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Männchen verpaart wurden, fehlgeschlagen waren (5.2.4.4).

#### 2.4.2 Expression der Mannosidase IA in verschiedenen Geweben von Wildtyp-Mäusen

Die beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass das Ausschalten des Mannosidase IA-Gens offensichtlich sowohl die strukturelle Stabilität als auch die Befruchtung von Oozyten beeinflusst und die Mannosidase IA-defizienten Weibchen deshalb infertil sind. Dies schien ein relativ spezifischer Effekt zu sein, da homozygote (ManIA<sup>-/-</sup>) Männchen im Gegensatz zu den homozygoten (ManIA<sup>-/-</sup>) Weibchen fertil waren. Keine Auswirkungen des Mannosidase IA-Defekts waren hingegen auf Morphologie und Funktion anderer Organe in Mannosidase IA defizienten Weibchen bzw. in Männchen erkennbar. Dies ließ zumindest vermuten, dass die Mannosidase IA eine spezifische Aufgabe bei der Modifikation bestimmter



N-Glykoproteine im weiblichen Reproduktionstrakt hat und deshalb in diesem Bereich besonders stark exprimiert werden sollte. Um dies zu überprüfen wurde eine Northern-Blot-Analyse mit RNA durchgeführt, die aus den Eierstöcken gesunder Tiere isoliert wurde und mit mRNA-Präparationen aus Leber, Niere, Gehirn, Milz und Lunge dieser Tiere verglichen (5.2.1.16). Die Ergebnisse des Northern-Blots sind in Abbildung 2.17 A dargestellt. Abbildung 2.17 B zeigt die entsprechenden Signale nach Normierung auf GAPDH (=100%).



**Abb. 2.17: Northern Blot Analyse verschiedener Gewebe**

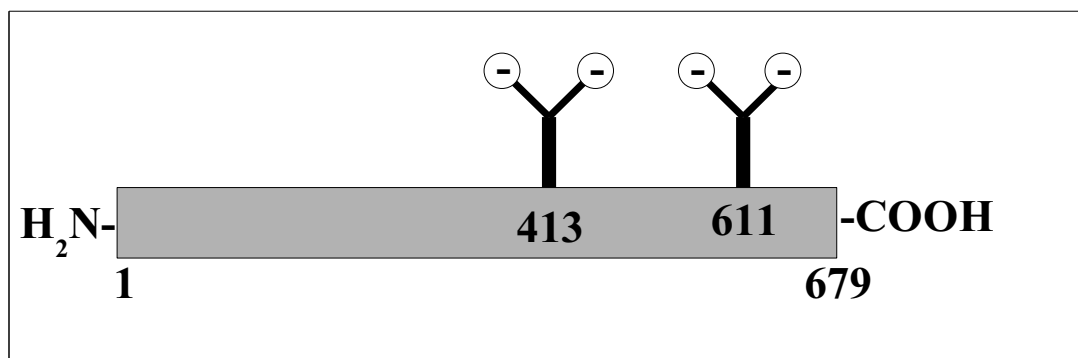
**einer weiblichen Wildtyp-Maus.** A: Pro Spur wurden 20µg Gesamt-RNA aufgetragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen Mannosidase IA bzw. GAPDH hybridisiert. B: Quantitative Auswertung der Mannosidase IA-Expression, normiert auf GAPDH

Wie zu sehen ist, wird das Mannosidase IA-Protein am stärksten in der Leber und Niere, in deutlich niedrigeren Mengen in den Eierstöcken und in der Milz (60% bzw. 50% bezogen auf Leber) exprimiert, während die Expression im Gehirn mit 10% (bezogen auf Leber) am geringsten ist. Ähnlich unterschiedliche Expressionsraten in diesen Organen wurden von

Tremblay *et al.* (2007) beschrieben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mannosidase IA zwar in allen untersuchten Organen, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, exprimiert wird, das Fehlen des Enzyms, wie die Ergebnisse mit den ManIA<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen, sich phänotypisch jedoch „nur“ auf die weibliche Fertilität auszuwirken scheint. Dies würde letztlich bedeuten, dass durch das Ausschalten der Mannosidase IA die Bildung spezifischer Oligosaccharidstrukturen auf bestimmten N-Glykoproteinen nicht möglich ist, die an der Ausprägung der weiblichen Fertilität mittelbar oder unmittelbar beteiligt sind

### 2.4.3 Eine Mannosidase IA-Defizienz lässt sich nicht durch Veränderungen im Glykosylierungsmuster des Serumtransferrins nachweisen

Enzymdefekte, die das Processing N-gebundener Oligosaccharidketten betreffen, können zu einer fehlerhaften Glykosylierung von N-Glykoproteinen führen. Entsprechende Veränderungen im Glykosylierungsmuster werden in der Humandiagnostik bei CDG-Verdachtspatienten durch ein verändertes Laufverhalten des Serumtransferrins nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) bzw. SDS-PAGE nachgewiesen. Normalerweise trägt das Serumtransferrin zwei biantennäre sialylierte Oligosaccharide vom komplexen Typ, die aufgrund der terminalen Sialinsäurereste negativ geladen sind (Abb. 2.18).

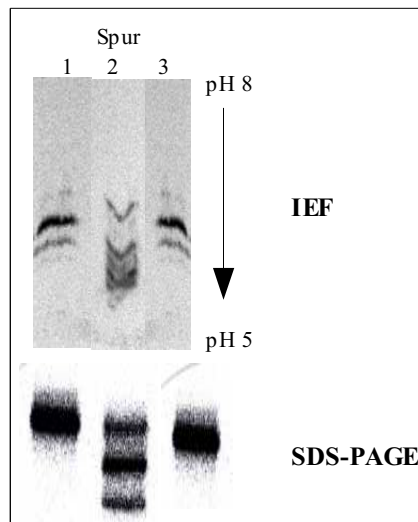


**Abb.2.18 : Schematische Darstellung des humanen Serum-Transferrins**

Das Serum-Transferrin ist an den Asparaginresten 413 und 611 jeweils mit einem biantennären N-Glykan vom komplexen Typ verknüpft und trägt vier terminale negativ geladene Sialinsäurereste [MacGillivray *et al.*, 1983].

Fehlen aufgrund eines N-Glykosylierungsdefekts eine oder beide Zuckerketten oder werden diese nicht korrekt modifiziert, kommt es zu einer Ladungsverschiebung und damit zu einer

Änderung des Laufverhaltens von Transferrin bei der IEF. Jedoch zeigte sich bei den bisher bekannten CDG-Typen, dass nicht alle Enzymdefekte im Bereich der N-Glykoproteinbiosynthese grundsätzlich mit einem veränderten N-Glykosylierungsmuster des Serumtransferrins einhergehen. So konnte bei dem erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen CDG Typ IIb (Glucosidase I-Defekt) kein abweichendes Serumtransferrin-Pattern nach IEF-Analyse festgestellt werden [De Praeter *et al.*, 2000; Völker *et al.*, 2002]. Im Gegensatz dazu war im Serum eines CDG Typ Ia-Patienten ein deutlich verändertes Laufverhalten der Transferrinbanden in der IEF und SDS-PAGE erkennbar. So sind in der IEF im Serum eines Typ Ia-Patienten mehrere Transferrinbanden nachweisbar (Abb. 2.19, Spur 2), während das Transferrinpattern mit Wildtyp-Serum bzw. Serum einer homozygoten Mannosidase IA defizienten Maus eine intensive und eine etwas schwächere Bande enthielt (Spur 1 bzw. 3). Der Immunoblot der drei Seren nach SDS-PAGE lieferte ein ähnliches Ergebnis. Während der Antikörper im CDG Ia-Serum drei Banden gleicher Intensität anfärbte, war im Wildtyp- bzw. ManIA<sup>-/-</sup>-Serum nur eine relativ breite Bande im gleichen Molmassenbereich erkennbar.



**Abb.2.19: Isoelektrische Fokussierung und SDS-Page von Serum-Transferrin aus einer Man IA<sup>-/-</sup>, einer Wildtyp-Maus und eines Patienten mit CDG-Ia.**

Das Serum wurde aus Blutproben der jeweiligen Mäuse bzw. des Patienten separiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Immunoblotting wurde des Serum-Transferrin mittels eines Anti-Transferrin-AK nachgewiesen. Spur 1: WT-Serum; Spur 2: CDG-Ia-Serum; Spur 3: Mannosidase IA<sup>-/-</sup>-Serum

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zuckerketten im Transferrin in den homozygoten Mannosidase IA defizienten Mäusen und in gesunden Tieren offensichtlich identisch sind und trotz Fehlen der Mannosidase IA in den ManIA<sup>-/-</sup>-Mäusen korrekt prozessiert wurden. Dies bedeutet, dass der beschriebene Assay, der in der Humandiagnostik bei Verdacht auf CDG-Erkrankungen eingesetzt wird, eine Glykosylierungsstörung bedingt durch einen  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Defekt nicht anzeigt.

Nach heutigen Kenntnissen existieren in Säugerzellen zwei ER- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen (ER-Mannosidase I und II) und drei Golgi-lokalisierte  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen (Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-IC). Obwohl die Mannosidasen den gleichen  $\alpha$ 1,2-mannosidischen Bindungstyp hydrolysieren, unterscheiden sich die ER- von den Golgi- $\alpha$ Mannosidasen in signifikanter Weise in ihrer Substratspezifität. So spalten die beiden ER-Mannosidasen ausschließlich einen  $\alpha$ 1,2-gebundenen Mannoserest von  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  unter Bildung spezifischer  $\text{Man}_8$ -Isomere ab, während die drei Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen mehrere der vier  $\alpha$ 1,2-mannosidischen Bindungen in  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  hydrolysieren [Hosokawa *et al.*, 2001; Tremblay and Herscovics, 2000; Herscovics, 1999; Werner *et al.*, 1996; Daniel *et al.*, 1994 ]. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die erstmals von uns aus Schweineleber gereinigte  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA, die auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, bevorzugt drei der vier  $\alpha$ 1,2-mannosidischen Bindungen im  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Substrat hydrolysiert [Bieberich and Bause, 1995; Bause *et al.*, 1992; Schweden and Bause, 1989]. Interessanterweise wird der nur langsam bzw. nicht abgespaltene (vierte)  $\alpha$ 1,2-gebundene Mannoserest durch die ER-Mannosidase I abgespalten, was letztlich für eine komplementäre Spezifität der beiden Enzyme spricht. Zumindest unter *in vitro* Bedingungen weisen die beiden Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen IB und IC eine vergleichbare Spezifität mit der Mannosidase IA auf. Northern-Blot-Analysen und *in situ* Hybridisierungen zeigen hingegen, dass die drei Isoformen der Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase (IA-IC) im Verlaufe verschiedener Entwicklungsstadien des Organismus signifikante Unterschiede in ihrer gewebe- bzw. organspezifischen Expression aufweisen [Tremblay *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 1998 ]. Die spezifische physiologische Funktion der drei Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidasen ist bis heute in wesentlichen Punkten noch unverstanden.

Um die Bedeutung der Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA für die Zelle bzw. den Organismus aufzuklären, wurde in dieser Arbeit eine „knock out“-Mauslinie etabliert, bei der das Enzym spezifisch ausgeschaltet ist und anschließend wurden die Auswirkungen dieses Gendefekts auf den Phänotyp näher charakterisiert. Nach Beendigung der experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde von Tremblay *et al.* (2007) eine Arbeit publiziert, in der die Herstellung und die pathologischen Folgen eines Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IB „knock out`s“ in der Maus beschrieben wurden. Die Ausschaltung des Mannosidase IB-Gens führte bereits wenige Stunden nach der Geburt zum frühen Tod der homozygot defizienten Jungtiere. Als Ursache für die neonatale Sterblichkeit der Nullmutanten konnte eine Fehlentwicklung des Lungengewebes nachgewiesen werden, so dass die Tiere letztlich an respiratorischem Stress starben. Darüberhinaus wurden keine weiteren histopathologischen Auffälligkeiten an anderen Organen festgestellt.

Für die Herstellung der  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Nullmutante wurde in der vorliegenden Arbeit der

klassische Ansatz zur Ausschaltung eines Gens verwendet (2.1), der aus folgenden Schritten bestand:

- 1.) Herstellung des „Replacement“-Vektors hloxpSK-ManIA (Abb. 2.3)
- 2.) Transfektion von ES-Zellen mit dem hloxpSK-ManIA-Vektor (2.2)
- 3.) Nachweis der homologen Rekombination in transfizierten und selektierten ES-Zellen (2.2.2)
- 4.) Injektion ausgewählter ES-Zellklone in Maus-Blastozysten (2.3.1)
- 5.) Selektion der Jungtiere auf Chimärismus (2.3.1)
- 6.) Verpaarungen der chimären Mäuse mit C57BL/6-Mäusen zur Erzeugung heterozygoter (ManIA<sup>+/-</sup>) Nachkommen (2.3.2)
- 7.) Kreuzung männlicher und weiblicher heterozygoter (ManIA<sup>+/-</sup>) Tiere zur Erzeugung der homozygot defizienten (ManIA<sup>-/-</sup>) Mauslinie (2.3.2)

Wie im experimentellen Teil dargestellt, wiesen weder heterozygote (ManIA<sup>+/-</sup>) noch homozygote (ManIA<sup>-/-</sup>) Tiere im juvenilen oder im adulten Stadium einen unmittelbar erkennbaren Phänotyp auf. Alle Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine ersichtlichen Abweichungen hinsichtlich Körperbau, Organentwicklung, Verhalten und Lebenserwartung (2.4). Dies ist im Falle der heterozygoten (ManIA<sup>+/-</sup>) Tiere nicht außergewöhnlich, da dieser Genotyp noch ein funktionsfähiges Mannosidase IA-Allel besitzt. Offensichtlich ist die über dieses Allel exprimierte Enzymmenge ausreichend, um die normale Entwicklung des wachsenden bzw. adulten Organismus zu gewährleisten und pathologische Folgen zu verhindern. Das Fehlen eines **erkennbaren** Phänotyps war im Falle der homozygot defizienten Mannosidase IA-Mäuse hingegen überraschend, da in den zwei bisher beschriebenen „knock out“-Mausmodellen, die das Oligosaccharid-Processing betreffen (Mgat2-Gen und Golgi-Mannosidase IB-Gen), dramatische phänotypische Auffälligkeiten beobachtet wurden (s.o.) [Tremblay *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001; Jaeken, *et al.*, 1994].

Weitere Untersuchungen mit der ManIA<sup>-/-</sup>-Mauslinie zeigten dann allerdings, dass sich der Mannosidase IA-Gendefekt sehr wohl phänotypisch auswirkt. So wurde beobachtet, dass trotz mehrfacher Verpaarungsversuche und Superovulation der ManIA<sup>-/-</sup>-Weibchen aus Verpaarungen dieser Weibchen weder mit ManIA<sup>-/-</sup>- noch mit gesunden Männchen Nachkommen hervorgingen. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass das Fehlen der Mannosidase IA-Aktivität sich auf die Fertilität der homozygot defizienten Weibchen auswirkte. Wurden hingegen ManIA<sup>-/-</sup>-Männchen mit gesunden Weibchen verpaart, erhielt man in der Regel die erwartete Anzahl heterozygoter (ManIA<sup>+/-</sup>) Nachkommen (2.4.1). Dies zeigte, dass offensichtlich nur die homozygot defizienten Mannosidase IA-Weibchen von der Infertilität betroffen und die ManIA<sup>-/-</sup>-Männchen normal

fortpflanzungsfähig sind.

Um nähere Hinweise für die Ursache der weiblichen Sterilität als Folge des Mannosidase IA-Gendefekts zu erhalten, wurden verschiedene Stadien im weiblichen Fortpflanzungszyklus untersucht (z.B. Vaginalzyklus, ovarielle Follikelreifung). Ein Vergleich der unterschiedlichen Phasen des Vaginalzyklus zwischen  $\text{ManIA}^{-/-}$ - und gesunden Weibchen ließ keine morphologischen Auffälligkeiten bzw. Unterschiede erkennen. Auch in der mikroskopischen Analyse der Follikulogenese homozygot defizienter Mannosidase IA-Weibchen waren in histologischen Ovarpräparaten keine Unterschiede bezüglich der Follikelreifung im Vergleich zu Wildtyp-Weibchen nachweisbar (2.4.1.1; Abb. 2.14). Diese Beobachtungen deuteten zumindest darauf hin, dass die durch den Mannosidase IA-Gendefekt verursachte weibliche Infertilität vermutlich nicht auf Störungen einzelner Phasen des Vaginalzyklus oder auf Störungen der ovariellen Follikulogenese beruhen.

Anschließende Untersuchungen mit postovulativen Eizellen zeigten dann, dass die aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen isolierten Oozyten unter Kulturbedingungen deutlich instabiler waren als Eizellen, die aus Wildtyp-Weibchen stammten. Während die Struktur der Eizellen beider Genotypen unmittelbar nach der Entnahme und auch noch nach 3-5 Stunden in Kultur ein nahezu identisches Aussehen zeigten, waren bei Oozyten aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen nach längerer Kultivierungszeit drastische strukturelle Veränderungen erkennbar (2.4.1.2; Abb. 2.15 und 2.16). Dies zeigte, dass das Fehlen der Mannosidase IA sich offensichtlich auf die Stabilität der Oozytenstruktur auswirkt. Um zu überprüfen, ob hierdurch die Funktions- bzw. Befruchtungsfähigkeit der  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Eizellen beeinflusst wird, wurden die Oozyten unmittelbar nach der Entnahme (zu diesem Zeitpunkt waren noch keine morphologischen Veränderungen erkennbar) mit Spermien aus gesunden Männchen zusammengebracht.

Der Vorgang der Befruchtung beginnt mit dem Kontakt zwischen Spermium und der äußeren Matrix der Eizelle, welche als *Zona pellucida* (ZP) bezeichnet wird. Am Kopf des Spermiums werden Enzyme freigesetzt, die die ZP im Bereich der Berührungsstelle auflösen, so dass das Spermium in die ZP ein- und diese sodann durchdringen kann, um anschließend mit der Zellmembran der Eizelle zu fusionieren. Im weiteren Verlauf kommt es dann letztlich zur Teilung der befruchteten Eizelle in das Zwei- bzw. Mehrzellstadium. Eine solche Zellteilung, die eine erfolgreiche Befruchtung anzeigt, war unter Kulturbedingungen nachweisbar, wenn Oozyten aus Wildtyp-Weibchen mit Spermien gesunder Männchen zusammengebracht wurden. Wurden

hingegen - unter ansonsten gleichen Kulturbedingungen - Mannosidase IA-defiziente Eizellen anstelle der Wildtyp-Oozyten eingesetzt, dockten die Spermien zwar an die *Zona pellucida* der ManIA<sup>-/-</sup>-Eizellen an und durchdrangen diese (zumindest) teilweise. Es gelang den Spermien jedoch nicht, bis zur Oozytenmembran (Oolemma) vorzudringen und mit dieser zu verschmelzen. Stattdessen schien es, als ob die Spermien innerhalb der ZP „stecken bleiben“. Zudem waren bei den ManIA<sup>-/-</sup>-Eizellen nach längerer Kultivierung ähnliche Veränderungen in der Oozyten- bzw. ZP-Struktur erkennbar, wie sie auch in Abwesenheit von Spermien beobachtet worden waren (2.4.1.3; Abb. 2.17). Diese Beobachtungen waren ein deutlicher Hinweis darauf, dass die fehlende Befruchtungsfähigkeit der ManIA<sup>-/-</sup>-Eizellen - und damit der weiblichen Infertilität – ihre Ursache offensichtlich in einer nicht voll funktionsfähigen *Zona pellucida* hatte. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Mannosidase IA mittelbar oder unmittelbar an der Ausbildung der korrekten *Zona pellucida*-Struktur beteiligt sein muss.

Bei der *Zona pellucida* handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix, welche die Oozyte umgibt und die essentiell für die Oogenese, Fertilisation und frühe Embryogenese ist [Wassarman and Mortillo, 1991]. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Glykoproteinen (ZP1-3), die N- und O-gebundene Zuckerketten enthalten [Talbot *et al.*, 2003; Boja *et al.*, 2003; Aviles *et al.*, 2000; Easton *et al.*, 2000]. Die Biosynthese der ZP-Proteine (und damit letztlich der *Zona pellucida*-Struktur), die zunächst als membranverankerte Vorläufer synthetisiert werden, beginnt mit dem Aufbau der Polypeptidkette am ER-gebundenen Ribosom. Nach Translokation der wachsenden Peptidkette in das ER-Lumen wird die N-terminale Signalsequenz abgespalten und potentielle -Asn-X-Thr-Ser-Akzeptorstellen durch OST glykosyliert. Die gebildeten ZP1-3-Intermediate, die über den C-Terminus mit der Membran verankert sind, werden dann durch Modifikation unter Beteiligung von ER-lokalisierten Enzymen (Glucosidase I, II und ER-Mannosidasen) prozessiert, wobei N-gebundene Oligosaccharide vom „high mannose“-Typ entstehen [Salzmann *et al.*, 1983; Greve *et al.*, 1982]. Nach Transport in den Golgi werden diese „high mannose“-Intermediate durch verschiedene  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen (Mannosidase IA-IC und auf einer spezifischen Zwischenstufe durch Mannosidase II) weiter prozessiert und durch Reglykosilierung (unter Beteiligung von verschiedenen Glykosyltransferasen, die im *medium*- und *trans*-Golgi lokalisiert sind) zu N-Glykanstrukturen mit terminalen Sialinsäureresten vom komplexen Typ umgebaut.

Es wird angenommen, dass die terminalen Sialinsäurereste in den N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen am Transport von ZP 1-3 beteiligt sind, was im Falle von ZP2 experimentell bestätigt werden konnte [Marchuk *et al.*, 2003; Jovine *et al.*, 2002]. Darüber hinaus



### 3 DISKUSSION

erfolgt in verschiedenen Bereichen des Golgi die Synthese der O-glykosidisch gebundenen Zuckerketten. Die noch membrangebundenen ZP1-3-Glykoproteine werden anschließend zur Plasmamembran der Eizelle transportiert, wo ZP2 und ZP3 zu Filamenten polymerisieren, welche durch ZP1 über Disulfidbrücken quervernetzt werden [Wassarman, 1988; Greve and Wassarman, 1985]. Die einzelnen ZP-Glykoproteinspezies werden dann proteolytisch von der Membran abgespalten, wodurch die N-terminale Ektodomäne freigesetzt und in die wachsende *Zona pellucida*-Matrix eingebaut werden kann, und wodurch dann der sog. perivtelline Raum zwischen Oozytenmembran und *Zona pellucida* entsteht [Qi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Rankin *et al.*, 1996]. Der Funktionsverlust der *Zona pellucida* (und die daraus resultierende Infertilität der weiblichen Mannosidase IA-defizienten Mäuse) könnte damit erklärt werden, dass durch das Fehlen der Mannosidase IA die Biosynthesesequenz N-gebundener Oligosaccharidstrukturen auf den ZP-Glykoproteinen im frühen Golgi unterbrochen wird und infolgedessen funktionell essentielle Oligosaccharid-Intermediate nicht gebildet werden können.

Mit Hilfe von Mausmodellen, bei denen das Gen für das jeweilige ZP-Protein ausgeschaltet war, gelang es, den drei ZP-Proteinen bestimmte Funktionen während der Oogenese und Fertilisation zuzuordnen. Dabei zeigte sich, dass homozygot defiziente ZP1-Weibchen fertil sind, obwohl keine Quervernetzung von ZP2 und ZP3 erfolgt [Rankin *et al.*, 1999]. Demgegenüber sind „knock out“-Weibchen für das ZP2 und das ZP3-Protein infertil. Fehlt das ZP3-Protein wird keine *Zona pellucida* gebildet [Rankin, 2001; Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996; Tong *et al.*, 1995]. Heterozygote ZP3-Weibchen sind zwar fertil, aber ihre *Zona pellucida* ist extrem dünn. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ZP2 und ZP3 an der Spermienkennung und -bindung beteiligt sind. ZP3 wird auch als „first sperm receptor“ bezeichnet und initiiert die Akrosomenreaktion im Spermium. Bei der Akrosomenreaktion handelt es sich um eine Art zellulärer Exozytose, die durch die Bindung des Spermienkopfes an bestimmte O-gebundene Oligosaccharidstrukturen im ZP3-Protein ausgelöst wird [Talbot *et al.*, 2003]. Durch die Akrosomenreaktion wird die innere akrosomale Membran exponiert und bindet an das ZP2-Protein („second sperm receptor“). Erst jetzt kann das Spermium die *Zona pellucida* weiter durchdringen und in den perivitellinen Spalt zwischen *Zona pellucida* und Plasmamembran gelangen, wo es schließlich zur Fusion mit der Eizelle kommt [Wassarman, 2005]. Insgesamt gesehen zeigten diese Beobachtungen, dass die ZP-Proteine, die als Strukturproteine die *Zona pellucida* bilden, eine entscheidende Rolle bei der Befruchtung spielen.

Wie die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, sind die  $Man^{-/-}$

Eizellen zwar von einer *Zona pellucida* umgeben, jedoch ist die ZP-Matrixstruktur instabil und offensichtlich in ihrer Funktionsfähigkeit beeinträchtigt (d.h. die Spermien können nicht in die ZP eindringen). Dies bedeutet, dass der Verlust der Mannosidase IA-Aktivität zwar nicht die Bildung der ZP-Matrix komplett verhindert, dass aber durch den Eingriff in die Biosynthese der ZP-Proteine deren Funktionsfähigkeit in erheblichen Maße beeinflusst wird. Ob durch das Ausschalten des Mannosidase IA-Gens bestimmte „high mannose“-Intermediatstrukturen, die als „funktionell“ wichtige Erkennungssequenzen dienen, nicht gebildet werden können, oder ob durch das Fehlen der Mannosidase IA, d. h. durch Eingriffe in die Oligosaccharid-Processingsequenz, „nur“ eine Reifung zu funktionsfähigen ZP-Proteinen verhindert wird, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse jedoch, dass das Ausschalten des Mannosidase IA-Gens zu einem Phänotyp führt, bei dem ausschließlich die Funktionsfähigkeit der *Zona pellucida* und damit die Fertilität der weiblichen Mannosidase IA-defizienten Mäuse betroffen zu sein scheint. Im Gegensatz hierzu sehen die pathologischen Folgen eines Mannosidase IB „knock out’s“ deutlich anders aus [Tremblay *et al.*, 2007]. Dies ist überraschend, da die Mannosidase IA und IB (und letztlich auch Mannosidase IC) zumindest unter *in vitro* Bedingungen eine sehr ähnliche Substratspezifität aufweisen. Dies kann nur bedeuten, dass die drei Isoformen der Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase für das Oligosaccharid-Processing bestimmter N-Glykoproteinspezies verantwortlich sind (z. B. Mannosidase IA  $\rightarrow$  *Zona pellucida*-Glykoproteine; Mannosidase IB  $\rightarrow$  N-Glykoproteine in der Lunge), und dass das Fehlen bzw. die spezifische Funktion eines der  $\alpha$ 1,2-Mannosidase-Isoenzyme zumindest im Falle bestimmter N-Glykoproteine nicht durch die beiden anderen  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen kompensiert werden kann.

Mit der Mannosidase IA-defizienten Mauslinie wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Mausmodell etabliert, bei dem ein Gendefekt eines Enzyms vorliegt, welches am „frühen“ Oligosaccharid-Processing beteiligt ist. In der Literatur wurden bisher zwei Mausmodelle beschrieben, bei denen Enzyme des N-gebundenen Oligosaccharid-Processings spezifisch ausgeschaltet waren (Mgat2-Gen; Mannosidase IB-Gen). Der „knock out“ des Mgat2-Gens in der Maus führte, wie beschrieben, zu einem Phänotyp, der viele Übereinstimmungen mit einer beim Menschen beschriebenen CDG-Erkrankung aufweist (CDG IIa) [Wang *et al.*, 2001; Jaeken, *et al.*, 1994]. Im Falle des Mannosidase IB-Mausmodells wurde bisher kein Patient beschrieben, bei dem dieser Gendefekt als molekulare Ursache für eine entsprechende CDG-Erkrankung festgestellt werden kann. Allerdings postuliert Tremblay *et al.* (2007), dass zumindest in einigen

### 3 DISKUSSION

Fällen, frühe neonatale Lungenprobleme, die bei Säuglingen diagnostiziert wurden, durch einen  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IB-Defekt verursacht worden sein könnten. Es könnte deshalb durchaus sein, dass, die in dieser Arbeit durch das Mannosidase IA-Mausmodell erhaltenen Ergebnisse, auch auf den Menschen übertragbar sind. Das heißt, dass Kinderlosigkeit bei Frauen - zumindest in Einzelfällen - durch einen Mannosidase IA-Gendefekt verursacht werden kann, was allerdings sehr schwierig nachzuweisen wäre. Unabhängig davon stellt die Herstellung von „knock out“-Mäusen, bei denen gezielt einzelne Enzyme der N-Glykoproteinbiosynthese ausgeschaltet werden, sicherlich einen erfolgversprechenden Weg dar, gezielt die biologische Funktion einzelner Enzyme des N-Glykoproteinstoffwechsels zu untersuchen und auf diesem Wege wichtige Informationen und Kenntnisse über entsprechende humane CDG-Erkrankungen zu gewinnen.

Nach heutigen Kenntnissen existieren zwei ER- und drei Golgi-residente  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen, die am „frühen“ Oligosaccharid-Processing von N-Glykoproteinen beteiligt sind. Im Gegensatz zu den beiden ER-Mannosidasen, die  $\text{Glc}_{(x)}\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  zu spezifischen  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_{(x)}$ -Isomeren abbauen, hydrolysieren die drei Isoenzyme des Golgi ( $\alpha$ 1,2-Mannosidasen IA, IB und IC) alle  $\alpha$ 1,2-mannosidischen Bindungen in  $\text{Man}_9$ - $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Intermediaten unter Bildung von  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .

Die zelluläre Bedeutung der verschiedenen  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen ist in vielen Punkten noch unverstanden. Um die spezifische Funktion, der in unserem Arbeitskreis seit längerem untersuchten Golgi-  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA aufzuklären, wurde in der vorliegenden Arbeit eine „knock out“-Mauslinie hergestellt, bei der das  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Gen spezifisch ausgeschaltet war. Anschließend wurden die Auswirkungen dieses Gendefekts auf zell- und entwicklungspezifische Prozesse in der Maus analysiert.

Für die Herstellung der  $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA-Nullmutante wurden molekular- und zellbiologische Standardtechniken verwendet. Der für die Transfektion der ES-Zellen verwendete „Replacement“-Vektor (hloxpsk-ManIA) enthielt eine Selektionskassette an deren 5' - bzw. 3' -Ende ein 4 kb bzw. 2 kb großes Mannosidase-spezifisches DNA-Fragment inseriert wurde (N- und C-Box). Die transfizierten ES-Zellen wurden nach Selektion auf homologe Rekombination analysiert, geeignete ES-Zellklone in Blastozysten injiziert und diese anschließend in Ammentiere reimplantiert. Mit den resultierenden chimären Mäusen konnte dann durch gezielte Kreuzung die heterozygote ( $\text{Man}^{+/-}$ ) und homozygot defiziente Mauslinie ( $\text{Man}^{-/-}$ ) etabliert werden.

Die heterozygote und homozygot defiziente Mauslinie zeigte weder im juvenilen noch im adulten Stadium einen unmittelbar erkennbaren Phänotyp. Kreuzungsexperimente zeigten dann, dass die  $\text{Man}^{-/-}$ -Männchen normal fortpflanzungsfähig, aber die weiblichen Mannosidase IA-defizienten Mäuse infertil waren. Um den Effekt der Mannosidase IA-Defizienz näher einzugrenzen, wurden zunächst verschiedene Stadien des weiblichen Vaginalzyklus und der ovariellen Follikulogenese näher betrachtet. Hierbei konnten keine morphologischen Auffälligkeiten bzw. Unterschiede zwischen  $\text{ManIA}^{-/-}$ - und gesunden Weibchen festgestellt werden. Untersuchungen mit postovulativen Eizellen, die aus homozygoten ( $\text{ManIA}^{-/-}$ ) Weibchen isoliert wurden, zeigten dann, dass die  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Eizellen nach 3-5 Stunden unter Kulturbedingungen wesentlich instabiler waren, als Eizellen aus Wildtyp-Weibchen. Wurden die postovulativen Oozyten unter Kulturbedingungen mit Spermien aus gesunden Männchen zusammengebracht war eine Zellteilung, wie sie bei Eizellen aus Wildtyp-Weibchen beobachtet werden konnte, bei den  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Eizellen nicht nachweisbar. Es zeigte sich, dass die Spermien zwar an die  $\text{ManIA}^{-/-}$ -Eizellen andockten, aber offenbar nicht die

*Zona pellucida* durchdringen konnten. Die *Zona pellucida* (ZP) ist essentiell für die Oogenese, Fertilisation und frühe Embryogenese und umgibt als extrazelluläre Matrix die Oozyte. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass offensichtlich im Bereich der *Zona pellucida* bestimmte N-Glykoproteinstrukturen durch den Verlust der Enzymaktivität nicht korrekt modifiziert werden können, so dass diese funktionell wirksam sind, d.h. dass die *Zona pellucida*-Matrix den Bereich darstellt an dem die Mannosidase IA eingreift. Dies überrascht nicht, denn die ZP-Matrix besteht im wesentlichen aus drei strukturellen Glykoproteinen (ZP1-3), die jeweils spezifischen Funktionen innerhalb der *Zona pellucida* übernehmen und die N- und O-gebundene Zuckerketten enthalten. Die Folgen des Mannosidase IA-Gendefekts lassen sich sehr spezifisch auf den weiblichen Reproduktionstrakt bzw. auf die *Zona pellucida*-Glykoproteine eingrenzen. Dies ist erstaunlich, da dieses Enzym, ebenso wie die Mannosidase IB und IC, in praktisch allen Organen exprimiert wird, wie die Ergebnisse von Northern-Blot-Analysen mit RNA aus verschiedenen Geweben einer weiblichen Wildtyp-Maus zeigten. Offensichtlich gilt diese hochspezifische Funktion auch für die Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IB, bei der (wie in der Literatur beschrieben) durch das Ausschalten des Gens in der Maus ausschließlich das Oligosaccharid-Processing bestimmter N-Glykoproteine im respiratorischen Trakt betroffen zu sein scheint. Dies würde bedeuten, dass jede einzelne Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase für die korrekte Oligosaccharid-Prozessierung ganz bestimmter N-Glykoproteine verantwortlich ist und dass der Verlust der Enzymaktivität einer der drei Isoformen der  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen nicht durch die beiden anderen Enzyme kompensiert werden kann.

Insgesamt gesehen zeigen die beschriebene Ergebnisse, dass der Verlust der Mannosidase IA-Aktivität zwar nicht die Entstehung einer ZP-Matrix verhindert, aber dass durch den Eingriff in die Biosynthesesequenz der N-gebundenen Oligosaccharidstrukturen auf den ZP-Glykoproteinen im frühen Golgi (durch das Ausschalten des Mannosidase IA-Gens) die Funktionsfähigkeit der ZP-Matrix in erheblichen Maße beeinflusst wird bzw., dass keine voll funktionsfähige *Zona pellucida* gebildet werden kann. Ob durch das Fehlen der Mannosidase IA bestimmte Intermediatstrukturen, die als „funktionell“ wichtige Erkennungssequenzen dienen, nicht gebildet werden können, oder ob durch diesen Eingriff in die Oligosaccharid-Processingsequenz, „nur“ eine Reifung zu funktionsfähigen ZP-Proteinen verhindert wird, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

## 5.1 Material

### 5.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 400, Firma H+P Labortechnik
Blotting-Apparatur	Semidry Elektrobplot, Firma Biorad
Brutschrank	Typ BB 18 CU, Firma Heraeus
Dosierpumpe	Duramat 80, CFG ProMinent
Durchlichtmikroskop	Wilovert S, Firma Hund
Entwicklermaschine	Curix 60, Firma Agfa
Gefrierschrank	-86°C FREEZER, Firma Forma Scientific
Gelapparaturen für:	
-Agarosegele	Agagel G45, Firma Biometra
-SDS-Polyacrylamidgele	Mini-ProteanII/III Cell, Firma Biorad
Homogenisator	Elvehjem-Homogenisator „Potter S“, Firma Braun Biotech
Hybridisierungs-ofen	Hybridisierer HB-1D, Firma Techne
Inkubator, geregelte CO <sub>2</sub> -Atmosphäre	Model 361, Firma Thermo Forma
Kameras	Mikroskopkamera MC80 und Belichtungssteuerung, Firma Zeiss
Magnetrührer	RH basic, Firma IKA Labortechnik
Mastercycler	TrioBlock, Firma Biorad
Mikrowellenherd	Mikromat, Firma AEG
Paraffin Gewebeinfiltrationsautomat	Tissue-Tek VIP, Firma Sakura
Paraffineinbettstation	TEC, Firma Sakura
Paraffin-Schnitt-Transfersystem mit Rotationsmikrotom	RM2155, Firma Leica
pH-Meter	pH-Meter 766, Firma Knick
Photometer	Spectrophotometer Ultrospec Plus, Firma Pharmacia; Fluoreszenzspektrophotometer MPF 4, Firma Perkin Elmer; BioPhotometer, Firma Eppendorf
Pipetten	P10, 20, 100, 200, 1000, Firma Gilson
Schüttelinkubator	Typ AK 82, Firma Infors AG
Schüttelwasserbad	Typ SW-20C, Firma Julabo

## 5 EXPERIMENTELLER TEIL

Sequenzier	Typ ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, Firma Applied Biosystems
Spannungsgeräte	Power Pack 300, Firma Biorad
Speed Vac Plus	SC110 A, Savant Instruments
Sterilbank Firma	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2448, Firma Heraeus
Ultraschallbad	Bandelin Super RK 510, SONOREX
Ultraschallstab	Branson Sonifier, Cell Disruptor B15, Firma G.Heinemann; Sonorex Super RK 510, Firma Bandelin electronic
Ultra-Turrax	T 45, Firma Janke & Kunkel AG
UV-Transilluminator	2011 Macrovue, Firma Pharmacia LKB
Video Gel	
Dokumentationssystem	Gel Doc 2000, Firma Biorad
Vortexer	VF2, Firma Janke & Kunkel AG
Waagen	Sartorius BI 1500 S, Firma Sartorius analytic
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Allegra™ GKR mit Rotor JS-4.2, Firma Beckmann; Kühlzentrifuge RC2-B mit Rotor GS-3, Firma Sorvall; Laborzentrifuge Typ 3-12, Firma Sigma; Biofuge fresco und Tischzentrifuge Biofuge pico, Firma Heraeus

### 5.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Applied Biosystems: ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Bayer: Rompun

Beckmann: Ultraclear-Zentrifugenröhrchen

Biochrom: PBS

Biozym Diagnostik GmbH: Gestopfte Spitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl und 1000 µl

Biorad: TEMED; 40 % Monoacrylamid/Bisacrylamid (19:1); 30% Monoacrylamid/Bisacrylamid(37,5:1)

Callbiochem: Mowiol, Pregnant Mare Serum

Clontech: Advantage Genomic PCR Kit

Difco: Bacto-Trypton, Hefeextrakt

Eastman-Kodak: Röntgenfilm X-Omat AR5

Eppendorf: Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml; UV-Küvetten

Falcon Becton: Zellkulturgefäße für ES-Zellkultur, Zellkulturwasser

## 5 EXPERIMENTELLER TEIL

Fluka: Ammoniumacetat, DMSO, 2-Mercaptoethanol, Glycin, SDS, Tween 20, Triton X-100, EDTA, Natriumacetat, HCl, DEPC

Gibco-BRL: *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$ , Select-Pepton 140, Select-Yeast-Extract, Agarose Elektrophorese grade, synthetische Oligonukleotid-Primer, BHK-21 Medium, Natrium-Pyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren, Trypsin, Hühnerserum, Penicillin/Streptomycin, HAT

Greiner: Petrischalen 145/20 mm und 100/20 mm

Hartmann Analytic GmbH: [ $\alpha$   $^{32}$ P]-dATP (spez. Akt. >3000Ci/ mmol)

ICN: Tris (*ultra pure*); HEPES

Invitrogen: pcrII TOPO-Cloning-Kit, Trizol-Reagenz

KMF: Trinatriumacetat

Macherey-Nagel: Nukleosin Extract Kit; Nucleobond AX Kit; AX 100/500 Säulen

MBI Fermentas GmbH: Restriktionsendonukleasen, DNA-Größenstandard 50 bp, 100 bp- und 1 kb-Leiter; Alkalische Phosphatase (CIP); Proteingrößenmarker; T4-DNA-Ligase, Hexa-Labeling-Kit, Taq-Polymerase, PCR-Kit, 2x Probenpuffer für RNA, RNA-Größenstandard

Merck: Bromphenolblau; DMF, Glycerin; Glycin, Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Glucose, Natriumacetat, Chloroform, Ethanol, Isopropanol, Natriumhydroxid, Entellan, Phenol

Nunc: sterile 1 ml-Kryoröhrchen, Kryoeinfrierbox

Organon: Predalon

PAA: L-Glutamin

Pharmacia: Ketavet

Promega: Prime-a-Gene-labeling system

Roche: Ribonuklease A, Desoxyribonuklease, Heringsperma-DNA, Oligo-dT-Cellulose, T4-DNA-Ligase, „rapid ligation kit“, Ethidiumbromid, Proteaseinhibitor

Roth: Ampicillin; BCIP; NBT; EDTA; Dinatrium Dihydrat, HEPES, IPTG, X-Gal, MOPS-Natriumsalz

RZPD: Cosmidfilter, Cosmide

Sarstedt: Polypropylenröhrchen (50 ml); Polystyrolröhrchen mit Schraubenverschluß (15 ml); Einmalspritzen 20 ml und 50 ml; Sterilfilter 0,1  $\mu$ m, 0,2  $\mu$ m und 0,45  $\mu$ m; Perischalen für Bakteriologie 92/16mm

Schleicher & Schüll: Nitrocellulosemembran, Nylonmembran

Serva-Promega: BSA (Fraktion V), Ponceau S, Natriumdodecylsulfat

Sigma, Taufkirchen: Formamid, Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziegen anti-Kaninchen IgG, Ovalbumin, Fötale Kälberserum für ES-Zellen, Ficoll 400, NCS für ES-Zellen, Formaldehyd, Ampicillin, Schweinehaut Typ I Gelatine, HT, Demecolcine solution, Giemsa-Färbelösung 0,4%, Jump Start Taq-Polymerase, RNaseA, SuperscriptII Reverse Transkriptase

Stratagene GmbH: pBluescript II SK phagemid

United States Biochemical: RNase-freies Wasser



### 5.1.3 Mäusstämme

Die Mäusstämme C57/BL6 (Inzuchtstamm, schwarz; Verwendung als Blastozystenpendertiere und zur Rückkreuzung) und NMRI (Auszuchtstamm, albino; Verwendung als Foster-Mütter und vasktomierte Männchen) wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

### 5.1.4 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$ , Gibco-BRL: F<sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74recA1 deoR araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

TOP10, Invitrogen: F<sup>-</sup>mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74recA1 deoR araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

### 5.1.5 Zelllinien

HM-1 embryonale Stammzellen wurden gewonnen aus dem Mäusstamm 129P2/OlaHsd hprt-defizient (Magin *et al.*, 1992).

### 5.1.6 Lösungen und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen und Puffer entsprechend den Angaben in Asubel *et al.* (1989) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgte gemäß den Grundregeln des sauberen mikrobiologischen Arbeitens. Gentechnisch veränderte Organismen wurden nach ihrer Erzeugung erfasst und durch Autoklavieren (Bakterien, Säugerkzellen) oder Verbrennung (Mäuse) vernichtet, wenn sie nicht mehr benötigt wurden.

#### 5.1.6.1 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium: Für 1 l Medium werden 10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in *Aqua dest.* gelöst (für LB-Platten werden zusätzlich 10 g Agarose zugegeben); autoklavieren bei 120°C, 1,6 bar Innendruck für 30 min. Nach dem Abkühlen können zur Herstellung von Selektionsmedium/-platten noch verschiedene Antibiotika zugegeben werden (z.B. 50  $\mu$ g/ml Ampicillin oder Kanamycin)

### 5.1.6.2 Langzeitlagerung von Kulturen

Bakterienstämme können 1:1 mit Glycerinpuffer verdünnt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-70^{\circ}\text{C}$  als sogenannte Glycerin-Stabilate gelagert werden. Ampicillinresistente Bakterien können außerdem in fester Top-Agarose mit Ampicillin gehalten werden.

### 5.1.6.3 Lösungen und Medien für die ES-Zellkultur

Die für das Ansetzen der Medien und Lösungen verwendeten Puffer und das Wasser besaßen Zellkulturqualität.

#### 5.1.6.3.1 HM-1-ES-Kulturmedium

HM-1-ES-Zellen wurden in GMEM-Medium kultiviert.

500 ml GMEM-Medium enthielten folgende Zusätze:

5,6 ml Natriumpyruvat (100mM)

5,6 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 100x

28 ml Fötale Kälberserum

28 ml Neugeborenen Kälberserum

570  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol

570  $\mu\text{l}$  LIF

Das Medium konnte bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu 5 Tage gelagert werden.

#### 5.1.6.3.2 HEPES-gepufferte Salzlösung (10x HBS) für die Elektroporation

Zur Herstellung von 200 ml 10fach HBS-Lösung wurden folgende Substanzen in *Aqua dest.* gelöst:

16 g NaCl

0,74 g KCl

0,252 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

2 g D-Glucose (Dextrose)

10 g HEPES

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,2 eingestellt und die HBS-Lösung wurde zum Sterilisieren durch einen Filter mit Porengröße  $0,1\mu\text{m}$  filtriert.

### 5.1.6.3.3 Gelantinelösung

Es wurde eine 1%ige Stocklösung mit Schweinehaut Typ I Gelatine in Wasser angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurde auf 0,1% mit Wasser verdünnt und nochmals autoklaviert.

### 5.1.6.3.4 Trypsinlösung

Die Trypsinlösung zur Spaltung der ES-Zellen bei der Passagierung bestand aus

400 ml PBS

100 ml EDTA 1,85 g/l

5 ml Trypsin

5 ml Hühnerserum

### 5.1.6.3.5 2x Einfriermedium

Um 20 ml 2faches Einfriermedium zum Einfrieren von ES-Kulturen herzustellen, wurden zu 10 ml HM-1 Kulturmedium, 4 ml DMSO und 6 ml Fötale Kälberserum gegeben.

## 5.2 Methoden

Alle mikro-, molekular- und zellbiologischen Standardtechniken wurden, soweit nicht anders angegeben entsprechend den gängigen Protokollsammlungen (Sambrock *et al.*, 1989; Current Protocols in Molecular Biology) durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen erfolgte nach den Bestimmungen für S1-Labore.

### 5.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Methode zur Herstellung kompetenter Zellen basiert auf der Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  und einem Hitzeschock, dem die Zellen für kurze Zeit ausgesetzt werden. Die genaue Funktionsweise sowohl des  $\text{CaCl}_2$  als auch des Hitzeschocks sind bislang unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass das  $\text{CaCl}_2$  die Bakterienzellwand porös macht und den Zellen somit die Aufnahme der Plasmid-DNA erleichtert. Der Hitzeschock führt wahrscheinlich zu einer Ausdehnung der Zelle und damit zu einer gleichzeitigen Vergrößerung der Poren, durch die die Fremd-DNA leichter eintreten kann. Beim darauf folgenden Abkühlen der Bakterien auf Eis wird wiederum durch das Anlagern der Heat-Schock-Proteine an die Innenseite der Zellmembran das Austreten der Plasmid-DNA aus der Bakterienzelle erschwert. Es besteht eine weitere Annahme, dass eine zweite Gruppe von Heat-Schock-Proteinen die eintretende Fremd-DNA umhüllt und Richtung Zellmitte transportiert

[Hannahan et al., 1983].

Für die Amplifikation rekombinanter Plasmid DNA wurde der *Escherichia Coli* Stamm *DH5a* verwendet (5.1.4). Die Bakterien wurden nach der Kalziumchlorid-Methode für die Transformation kompetent gemacht. 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden mit 50 ng DNA eines antibiotikaresistenten, rekombinanten Plasmids versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch für 1 min bei 42 °C erhitzt (heat shock) und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (5.1.6.1) wurde die Lösung 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 ml des Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C invers inkubiert. Bakterien, die kein Plasmid besaßen und damit keine Antibiotikaresistenz aufwiesen, sollten nicht auf den Platten wachsen

### 5.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmidmini/-midipräparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (XXX) verwendet. Je nach weiterem Verwendungszweck wurde die DNA unterschiedlich gereinigt: Für Anwendungen ohne große Reinheitsanforderungen (z.B. Restriktionsverdau) wurde die Plasmid-DNA nach der Lyse mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Für den Einsatz der DNA z.B. für eine PCR wurden vor der Fällung Anionenaustauschsäulen der Firma Macheray & Nagel eingesetzt und nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

### 5.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *thermophilus aquaticus* durchgeführt. Ein typischer 50 µl Reaktionsansatz für eine PCR enthält folgende Komponenten:

- X µl „template“-DNA (ca. 10 ng)
- 0,5 µl „sense“-Primer (100 pmol/µl)
- 0,5 µl „antisense“-Primer (100 pmol/µl)
- 5 µl 10xPCR-Puffer(0,5 M KCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,4)
- 5 µl dNTP (2,5mM/NTP)
- 2,5 µl DMSO
- 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1 µl *Taq*-Polymerase (1U)
- ad 50 µl steriles Millipore-Wasser

Die PCR wird in so genannten Thermocyclern durchgeführt. Sie enthalten einen temperierbaren Reaktionsraum und ein zyklisch programmierbares Temperaturprogramm. Das Standard-PCR-Programm besteht aus folgenden Schritten:

30 s	96°C	} 35Zyklen
10 s	96°C	
30 s	$T_M (^{\circ}\text{C}) = [2 (A/T) + 4 (G/C)] - 5$	
1 min/1kbp	72°C	
10 min	72°C	

#### 5.2.1.4 Nachweis der homologen Rekombination von hloxpSK-ManIA in ES-Zellen und Mannosidase IA.defizienten Genotypen durch PCR

PCR-Reaktionsansatz zum Nachweis des Wildtyp-Allels:

- X µl „template“-DNA (ca. 10 ng)
- 0,25 µl „sense“-Primer C10s (100 pmol/µl)
- 0,25 µl „antisense“-Primer C15 as (100 pmol/µl)
- 2,5 µl 10xPCR-Puffer(0,5 M KCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Gelatine)
- 2,5 µl dNTP (2,5 mM/NTP)
- 1 µl Jump Start *Taq*-Polymerase (0,05 U)
- ad 25 µl steriles Millipore-Wasser

Für den Nachweis des mutierten Allels wird als „sense“-Primer BN2 eingesetzt.

PCR-Programm:	1 min	94°C	} 35Zyklen
	30 s	94°C	
	30 s	65°C	
	2,5 min	72°C	
	10 min	72°C	

#### 5.2.1.5 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (1979) unter Verwendung des *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Fa. Applied Biosystems. Beim Cycle Sequencing erfolgt durch die Anwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase - analog zur PCR - eine gleichzeitige Amplifikation und DNA-Sequenzierung. Im Gegensatz zur PCR befindet sich in der Reaktion nur ein Primer, weshalb nur linear und nicht exponentiell amplifiziert wird. In einem Gemisch aus Primer, Template, thermostabiler DNA-Polymerase, Didesoxynucleotiden und Desoxynucleotiden wird ein thermisches Profil, bestehend aus Primerdenaturierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese, ca. 30 mal durchlaufen. Durch den Einbau der im Reaktionsgemisch ebenfalls enthaltenen 2',3'-Didesoxynucleotide erfolgt eine Termination der Synthese neuer DNA-Stränge.

Da die 2',3'-Didesoxynucleotide zusätzlich basen-spezifisch mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffmolekül gekoppelt sind, wird in der Sequenzierungsreaktion ein Gemisch von DNA-Strängen synthetisiert, die sich in ihrer Länge unterscheiden und deren 3'-Ende basenspezifisch markiert ist. Die DNA-Stränge werden der Größe nach durch die Kapillarelektrophorese im DNA-Sequencer aufgetrennt. Mit welchem 2',3'-Didesoxynucleotid das vorbeiwandernde DNA-Fragment am 3'-Ende markiert ist, wird während der Elektrophorese mittels eines Lasers und Photoelements detektiert. Aus den detektierten Fluoreszenzsignalen ermittelt ein Computerprogramm dann die Basenabfolge des untersuchten Plasmids.

Für die Cycle-Sequenzierung wird folgender verwendet:

1 µg Template

1 µl Primer (5 pmol/µL)

1 µl DMSO

2 µl *BigDye-Mix* (enthält die fluoreszenz-markierten dNTPs und das Enzym)

4 µL 5x Sample Buffer (200 mM Tris, pH 9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>)

auf 20 µL mit sterilem H<sub>2</sub>O auffüllen

Der Ansatz wird 2 min denaturiert und einem Sequenzierungszyklus von 10 s 96 °C, 5 s 60 °C und 4 min 60 °C unterworfen. Dieser wird 30 mal wiederholt. Anschließend wird die Probe für die automatische Auswertung wie folgt aufbereitet: Der Reaktionsansatz wird mit 30 µl Wasser, 125 µl 100 %iges Ethanol und 5 µl 3 M NaAc pH 5,2 versetzt. Die DNA wird dann 10 min auf Eis gefällt und für 10 min bei RT und 14000 rpm pelletiert. Das kaum sichtbare Pellet wird anschließend mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmal für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet ca. 5 min im Vakuum getrocknet und in 5 µl Wasser angelöst. Abschließend wird die Probe mit 20 µl TSR (Template Supression Reagent-Applied Biosystems) versetzt und mittels Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 5.2.1.6 *in vitro* Mutagenese-Experimente

Um Punktmutationen in die gewünschte cDNA einzubauen, wird die PCR (4.2.1.1) Technik verwendet. Diese Methode basiert darauf, dass der Syntheseprozess durch geschickte Primerwahl dahingehend kontrolliert werden kann, dass eine gezielte Änderung oder Rekombination der neu synthetisierten DNA stattfindet. Dazu wird sowohl ein Primer benötigt, der die entsprechende Mutation und eine geeignete Restriktionsschnittstelle enthält als auch ein zweiter Primer, der selbst eine weitere Restriktionsschnittstelle besitzt oder über eine interne Sequenz geht, die die Schnittstelle trägt. Das PCR-Produkt wird nach einem Verdau (5.2.1.7) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den ebenfalls mit gleichen Restriktionsenzymen verdauten Expressionsvektor inkloniert. Die Richtigkeit der mutierten cDNA wird durch Sequenzierung (5.2.1.5) kontrolliert

### 5.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau wird zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Diese Technik ist für die Klonierung von DNA-Molekülen von großer Bedeutung, da sie sowohl zur Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente als auch zur Identifizierung der entsprechenden Klonierungsprodukte dient. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Aktivität von Restriktionsendonukleasen, die in der Lage sind doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen - den so genannten Restriktionsschnittstellen - zu binden und zu spalten. Diese Erkennungssequenzen sind entweder nativ in der DNA enthalten oder werden mittels Primern in die PCR-Produkte eingefügt.

Zu analytischen Zwecken wird 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 3 U Enzym für 3-20 h bei 37 °C inkubiert. Wenn Fragmente der verdauten DNA aus einem Agarosegel eluiert werden sollen, um sie anschließend bei einer Ligation zu verwenden, werden 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

### 5.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine vielseitig angewandte Methode. Sie dient der Analyse von PCR-Produkten: es kann z.B. festgestellt werden, ob ein PCR-Produkt entstanden ist, ob es im erwarteten Größenbereich liegt oder ob ein PCR-Produkt in einer Restriktionsanalyse die richtigen Fragmente ergibt. Diese Technik wird auch zur Bestimmung des DNA-Gehaltes von Lösungen und zur Überprüfung der Qualität nach Plasmid-präparationen oder Gelelutionen angewandt. Die Agarosegel-Elektrophorese wird zudem präparativ eingesetzt, um gezielt einzelne DNA-Fragmente aus einem Fragmentgemisch isolieren zu können. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

100-300 bp	2%iges Agarosegel
300-500 bp	1,5%iges Agarosegel
>500 bp	1%iges Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese wird im horizontalen Flachbettgel durchgeführt. Zur Herstellung eines Gels wird die entsprechende Agarosemenge durch Erhitzen im Laufpuffer (1x-TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8) gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung mit Ethidiumbromid (5-10 µL/100 mL 1x-TAE-Puffer) versetzt, gut durchgemischt und in einen Gelträger gegossen. Durch Zugabe von Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) kann die DNA unter UV-Licht der Wellenlänge 300-366 nm sichtbar gemacht werden. Die DNA Proben werden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol FF, 3 ml 30% Glycerin in H<sub>2</sub>O, auf 10 ml *Aqua dest.*) versetzt und bei 100V, in 1X TAE elektrophoretisch aufgetrennt.

### 5.2.1.9 Reinigung von DNA-Fragmenten

Eine direkte Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen erfolgt mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit der Fa. Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Bei der Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel werden die aufgetrennten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Pro 100 mg Agarosegel werden 200 µl Bindepuffer (NT-Puffer) hinzu gegeben und solange bei 50°C inkubiert bis die Agarose sich auflöst. Der Ansatz wird dann auf die Säule gegeben und der direkten Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen entsprechend aufgearbeitet.

### 5.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Grundlage der Ligationsreaktion ist das Enzym T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit DNA-Fragmente mit den passenden Enden in einen zuvor aufgeschnittenen Vektor bzw. Plasmid-Vektor einzubauen, so dass ein rekombinantes Plasmid entsteht. Gereinigte DNA-Fragmente, die nach Restriktionsverdau über ein Agarosegel isoliert wurden, werden durch visuelle Abschätzung auf einem Gel quantifiziert. Um die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Verknüpfung über freie 5'-Phosphatgruppen zu verringern wird linearisierte Vektor-DNA mit Kalbs-Phosphatase (CIP) der Fa. MBI nach Herstellerangaben dephosphoryliert um eine Religation zu vermeiden.

Für die Ligation werden je nach Art der DNA-Enden folgende Mengenverhältnisse eingesetzt:

„blunt-end“: Plasmid : Insert 1:10 (molar)

„sticky-end“: Plasmid : Insert 1:5 (molar)

Die Ligation erfolgt (unter Verwendung des T4-Ligase-Kits der Fa. MBI gemäß Protokoll) bei 22°C für mind. 30 min. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt in eine Transformation eingesetzt (5.2.1.1).

### 5.2.1.11 Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus

Es werden  $1-4 \times 10^7$  ES-Zellen zunächst durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA (5min/37°C) vom Boden der Schalen gelöst und durch Zentrifugation pelletiert (1200 rpm/2 min) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wird in 0,5 ml TE- Puffer resuspendiert und mit 2,5 ml Lysispuffer mit 200 µg/ml Proteinase K und 200 µg/ml RNase A versetzt und über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion der DNA mit anschließender Fällung in Ethanol/NaAc. Das DNA-Pellet wird in einem adäquaten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,5  
5 mM EDTA  
0,2 % SDS  
200 mM NaCl



#### **5.2.1.12 Präparation genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen**

Die Schwanzspitzenbiopsien (ca. 0,3 cm) werden in 400 µl Lysispuffer [Laird *et al.*, 1991] mit 200 µg/ml Proteinase K und 200 µg/ml RNase A in bei 55°C schüttelnd inkubiert. Um Haare, Knochenreste etc. zu entfernen wird die Probe 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand bzw. die DNA wird wie oben beschrieben extrahiert (5.2.2.11).

#### **5.2.1.13 DNA-Transfer nach Southern**

Nach der Methode von Southern wird DNA durch Kapillarkräfte einer aufsteigenden Lösung von einem Agarosegel auf Nylonmembran transferiert. Bis zu 20 µg aufgereinigter genomischer DNA wurden nach entsprechendem Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel luftblasenfrei mit einer Membran und einer ca. 10 cm dicken Schicht von Zellstofftüchern bedeckt. Der Transfer mittels Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1 M NaCl) erfolgt in 4-10 h. Anschließend wird die Membran in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8) geschwenkt, getrocknet und dann 2 h bei 80°C fixiert. Die Hybridisierung erfolgt mit einer radioaktiven Sonde (wie unter 5.2.1.17 beschrieben).

#### **5.2.1.14 RNA-Isolierung aus Geweben**

Spatel, Bechergläser, Rührfische und andere benötigte Instrumente werden vor Gebrauch mindestens 6 h bei 200°C sterilisiert, da RNA sehr empfindlich gegen RNasen ist, die so stabil sind, daß sie nur durch extreme Maßnahmen inaktiviert werden können. DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat (über Nacht gerührt und durch Autoklavieren inaktiviert) wird für Lösungen, die nicht direkt mit DEPC angesetzt werden können (z.B. Tris/HCl) benutzt. Gesamt-RNA wird mit dem RNAeasy RNA-Extraktionskit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

#### **5.2.1.15 RT-PCR**

Nach der Aufreinigung von gesamt RNA aus Gewebe (5.2.2.14) wird ein Teil dieses Ansatzes mit Hilfe von oligo-dT Startermolekülen revers transkribiert, um cDNA der isolierten mRNA zu erhalten. Dazu wird das Enzym Superscript II eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. In einem insgesamt 12 µl umfassenden Ansatz werden 1 µg isolierte gesamt RNA mit 15 pmol des entsprechenden Antisenseprimers und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) vermischt, 5 min bei 65°C und anschließend 1 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz werden 4 µl 5x Puffer, 1 µl Dithiothreitol (0,1 M DTT), 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 1 µl Superscript Reverse Transcriptase II (200 U/µl) zugegeben, bevor der Ansatz 60 min bei 55°C und 15 min bei 70°C denaturiert wird. Die so hergestellte cDNA kann bei -20°C gelagert werden oder direkt für eine first strand cDNA-PCR eingesetzt werden.

### 5.2.1.16 Northern-Blot Hybridisierung

Die zu analysierende RNA wird in 2x Probenpuffer (MBI) aufgenommen und 10 min bei 65°C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 1%igem MOPS-Agarosegel wobei neben den Proben ein RNA-Größenstandard aufgetragen wird. Das Gel wird in 10x SSC getränkt und die RNA über Nacht im Kapillarblotverfahren (5.2.13) ebenfalls in 10x SSC auf eine Nylonmembran übertragen und am nächsten Tag fixiert. Die Markierung mittels einer radioaktiven Sonde erfolgt wie bei der Southern-Hybridisierung (5.2.1.17).

10x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS-Natriumsalz  
0,05 M NaAc, pH 7,0  
0,01 M EDTA

pH 7,0 mit NaOH einstellen

MOPS-Agarosegel: 1% Agarose  
20% Formaldehyd 37%ig  
10% 10x MOPS-Puffer  
1µg/ml Ethidiumbromid

### 5.2.1.17 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Eine spezifische DNA-Sonde, bestehend aus einer Nukleinsäure von komplementärer Sequenz, wird mit random Decameren als Primern und [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP als radioaktivem Isotop markiert. Die Markierung folgt den Anweisungen des Herstellers (Fermentas, HexaLabel DNA Labeling Kit). Ca. 100ng doppelsträngige DNA werden mit 10 µl Reaktionspuffer versetzt und mit sterilem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Anschließend wird 10 min. bei 100°C denaturiert und schnell auf Eis abgekühlt. Die denaturierte DNA wird mit folgenden Reagenzien versetzt:

3 µl Mix C  
6 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (50µCi, 3000 Ci/ mmol)  
1 µl Klenow-Fragment (5U)

Die Reaktion wird 10 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 4 µl dNTP Mix und es wird nochmals 5 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird 1 µl EDTA (0,5 M, pH 8) zugegeben und die nun radioaktive Sonde wird zu ca. 50 ml Hybridisierungslösung gegeben.

### 5.2.1.18 Hybridisierung von Cosmid-Filtern und Southern-Blots

Für die Hybridisierung werden folgende Lösungen mit *Aqua dest.* hergestellt:

Denaturierungslösung:	1,0 M NaCl; 0,5M NaOH
Neutralisationslösung:	1,5 M NaCl; 1M Tris/HCl, pH 7,4
20x SSC:	3 M NaCl; 0,3M Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O
6x SSC:	3:10 Verdünnung von 20x SSC
2x SSC:	1:10 Verdünnung von 20x SSC
10x Denhardt's:	2,5% Ficoll 400; 2,5% Polyvinylpyrrolidon; 2,5% BSA
Hybridisierungslösung:	10x Denhardt's; 6x SSC; 0,1% SDS; 120 mg/l Heringsperma-DNA, 0,05% Na-Azid
Heringsperma-DNA:	Heringsperma-DNA wird in autoklaviertem Wasser unter Erwärmen gelöst und durch zehnmalsiges Auf- und Abpipettieren durch eine 18-Gauge Nadel geschert.

Die gebundene DNA (oder im Falle eines Northernblots RNA) wird mit einer spezifischen Sonde, (5.2.1.17) inkubiert. Nicht gebundene Sonde oder solche, die aufgrund mangelnder Komplementarität nur schwach gebunden vorliegt, wird unter zunehmender Stringenz (steigende Temperatur, abnehmende Salzkonzentration) abgewaschen.

Der Nachweis hybrider DNA-Sequenzen erfolgt hier über eine radioaktiv markierte Sonde in einer Autoradiographie. Die Hybridisierungsbedingungen richten sich primär nach der Länge und Sequenz der Sonde, charakterisiert durch die Kenngröße  $T_m$ , der Temperatur, bei der die Hälfte der DNA als Einzelstränge vorliegt. Nach der Formel von Theillett lässt sich diese Temperatur errechnen; die Hybridisierung sollte ca. 5°C darunter ablaufen. Stringente Waschbedingungen hingegen können sich der  $T_m$  nähern.

Formel von Theillett:

$$69,3 + 0,41 (\%GC) - 650/L \text{ (mit } L = \text{Primerlänge)}$$

Die Cosmidfilter oder Southern-Blots werden mit Hybridisierungslösung bedeckt, mindestens 2 h bei der errechneten idealen Hybridisierungstemperatur prähybridisiert, um freie Stellen auf der Filteroberfläche abzusättigen. Die Filter/Membranen werden bei der gleichen Temperatur über Nacht mit der Sonde inkubiert. Die hybridisierten Filter/Membranen werden dann bei 3-5°C über der Hybridisierungstemperatur einmal mit 6x SSC, 0,1% SDS, einmal mit 2x SSC, 0,1% SDS und solange mit 0,2x SSC, 0,1% SDS gewaschen, bis die Waschlösung keine nachweisbare Radioaktivität mehr enthält. Die Filter werden zusätzlich zur bessern Orientierung an mehreren Stellen mit der Hybridisierungslösung markiert, kurz getrocknet und in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm gelegt, der 1 Stunde bis mehrere Tage (bei -70°C) exponiert wird. Der entwickelte Film zeigt Schwärzung an den Stellen, an denen er einer Strahlung ausgesetzt war, also dort, wo eine radioaktiv-markierte Sonde an komplementäre Sequenzen binden konnte.

### 5.2.1.19 Herstellung von Mauslebermikrosomen

Die kleingeschnittene Mausleber wird in 0,25 M Sucroslösung (400 ml / 100g Gewebe +Proteaseinhibitor) mit dem Ultra-Turrax 30 s zerkleinert und im Elvehjm-Potter 10 mal bei 4°C homogenisiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer etc.bei 3200 rpm für 10 min werden die Mikrosomen für 90 min bei 35.000 rpm aus dem Überstand sedimentiert. Das mikrosomale Pellet wird mit einem Volumenteil Sucroslösung rehomogenisiert. Die Mikrosomensuspension ist bei -20°C haltbar.

### 5.2.2 Allgemeine analytische Methoden

#### 5.2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Versuchsdurchführung nach Lowry erlaubt in Gegenwart von Detergenzien, jedoch nicht in Gegenwart von Reduktionsmitteln, Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Eine Eichkurve wird mit BSA (0-25 µg) aufgenommen. 400 µl Probe werden mit 400 µl Kupfer-Tartrat-Lösung versetzt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 µl Folin-Ciocateus-Phenolreagenz (1:5 verdünnt mit Wasser) zugegeben und 60 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wird photometrisch bei 720 nm bestimmt.

Kupfer-Tartrat-Lösung: Lösung A: Lösung B: Lösung C: Wasser, im Verhältnis 1/1/1/1

Lösung A: 0,2% Kupfersulfatpentahydrat, 0,4% Natrium-Kaliumtartrat, 1:1 in 20% Natriumcarbonat

Lösung B: 10% SDS

Lösung C: 0,8 N Natronlauge

#### 5.2.2.2 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Elektrophoresen werden im diskontinuierlichen System nach Laemmli durchgeführt. Es werden folgende Lösungen verwendet:

1. Elektrophoresepuffer: 0,192 M Glycin, 0,025 M Tris-Base, pH 8,3, 0,1% SDS
2. Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,2% SDS
3. Trenngelpuffer: 0,75 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,2% SDS
4. Probenpuffer: 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 4% SDS, 10% Mercaptoethanol, 0,004% Bromphenolblau
5. Acrylamidkonzentrat: 29,2 g Acrylamid, 0,8 g N,N'-Bisacrylamid ad 100 ml mit Wasser
6. Polymerisationsmittel: Ammoniumperoxodisulfat und TEMED

Für Minigele mit einer Geldicke von 0,75 bzw. 1 mm und einer Trennstrecke von 5 cm werden folgende Lösungen verwendet:

Trenngel 10%ig (12%ig): 7,5 ml (3,75 ml) Trenngelpuffer, 5 ml (2,5 ml) 29,2%ige Acrylamidstammlösung, 2,5 ml (1,25 ml) Wasser werden gemischt und die Polymerisation durch die Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 10 µl TEMED gestartet. Die Lösung wird in das im Ständer eingespannte Plattenensemble bis ca. 1 cm unter den Taschen eingefüllt und mit 2 ml Isopropanol überschichtet.

Sammelgel 3%ig: 2,5 ml Sammelgelpuffer, 0,5 ml 29,2% ige Acrylamidstammlösung und 4 ml Wasser werden gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 100 µl APS und 10 µl TEMED gestartet. Die Lösung wird auf das Trenngel geschichtet und sofort der Taschen formende Kamm in das Gel eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation wird das Gel in die Kammer eingehängt und der Kamm unter Laufpuffer entfernt.

Die Proteinproben werden in maximal 20µl aufgenommen, 5 min bei 100°C erhitzt und unterschichtend in die Probenkammern aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 100 V für 2-3 h durchgeführt. Anschließend werden die Proteine im Gel direkt durch Anfärben mit Coomassie oder indirekt durch Blotten auf eine Membran und Anfärben dieser mit Antikörpern sichtbar gemacht.

### 5.2.2.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist ein Elektrophoreseverfahren zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen entsprechend ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte. Die Ladung des Proteins wird durch seine ionisibaren Gruppen z.B. -COOH oder -NH<sub>2</sub>-Gruppen der Aminosäureseitenketten bestimmt. Die Dissoziation dieser Gruppen ändert sich je nach pH-Wert des umgebenden Milieus, d.h. die Anzahl der positiven und negativen Ladungen des Proteins (Gesamtladung) ändert sich. Ein Teil der positiven und negativen Ladungen eines Proteins heben sich gegenseitig auf; es verbleibt eine Überschussladung oder Nettoladung. Lässt man ein solches Protein mit einer äußeren Nettoladung in einem pH-Gradienten in einem elektrischen Feld wandern, so strebt es durch Aufnahme oder Abgabe von Protonen einen ungeladenen Zustand an. Bei einem bestimmten, für das jeweilige Protein charakteristischen pH-Wert, ist dieser ungeladene Zustand erreicht. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt IP bezeichnet. Dann erfolgt keine weitere Wanderung im elektrischen Feld mehr, da keine Überschussladung mehr vorhanden ist. Das Protein wandert also bis zum IP und wird dort fokussiert. Bei der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Wanderung eines Proteins also immer in Richtung seines IP, d.h. es strebt den ungeladenen Zustand an. Zur Analyse des Serumtransferrins werden jeweils 25µl Serum mit 3µl 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>/10 mM FeCl<sub>3</sub> (1:2) versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird das Serum 1: 20 verdünnt und 2 µl Serum mit 4µl 50% Glycerin vermischt. Die so vorbereiteten Serumproben werden auf fertige Minigele mit einem pH-Gradienten von 5-8 der Fa. Biorad aufgetragen. Die Blotkammer wird entsprechend der jeweiligen Anoden- bzw. Kathoden-Hälfte mit Anodenpuffer (7 mM Phosphorsäure) und Kathodenpuffer (20 mM Lysin, 20 mM Arginin) befüllt. Die Elektrophorese wird 1 h bei 100 V, 1 h bei 250 V und 30 min bei 500 V durchgeführt und die Gele danach 5 min in 0,7% Essigsäure äquilibriert. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt wie unter 5.2.2.2 beschrieben, jedoch wird in diesem Fall die Membran auf das Gel (also auf die Kathodenseite) gelegt und als Blotpuffer wird 0,7% Essigsäure verwendet. Der Transfer erfolgt bei 10 V für 10 min und 15 V für 15 min.

#### 5.2.2.4 Coomassie-Färbung

Ein SDS-Gel wird in Färbelösung (50% Methanol, 12% Eisessig, 0,1% Coomassie Brilliant Blue-R) eine Stunde bei 50°C inkubiert, anschließend wird das Gel in einer Lösung aus 40% Methanol und 6% Essigsäure solange entfärbt, bis der Hintergrund farblos erscheint. Das Gel wird dann in einem Gelrockner 2 h bei 80°C getrocknet. Die Empfindlichkeit dieser Färbung liegt bei 1 µg sichtbarem Protein.

#### 5.2.2.5 Proteintransfer auf Membranen

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf Membranen erfolgt mit Hilfe einer „semi-dry“-Apparatur.

„Semi-dry“-Blot: Auf die Anode wird ein mit Blotpuffer (25 mM TRIS-Base, pH 9, 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränktes 3MM-Papier, darüber eine ebenfalls angefeuchtete Membran (je nach Bedarf: Nitrocellulose), das SDS-Gel und anschließend wieder ein angefeuchtetes 3MM-Papier luftblasenfrei gelegt. Nach Schließen der Apparatur wird der Transfer bei 10 V für eine Stunde durchgeführt

#### 5.2.2.6 Ponceau-Färbung

Die reversible Färbung des Western-Blots mit Ponceau S dient der visuellen Kontrolle des Protein-Transfers auf die Nitrocellulosemembran und der Markierung der Position der Referenzproteine . Der Blot wird 10 min in Färbelösung (0,2% Ponceau S in 3% TCA) inkubiert und anschließend wird die unspezifische Färbung durch Waschen mit Wasser entfernt. Der Farbstoff kann durch Waschen mit PBST vollständig wieder entfernt werden.

#### 5.2.2.7 Immunoblotanalyse

Proteine besitzen meist eine Vielzahl verschiedener antigener Determinanten, mit denen dagegen gerichtete Antikörper über entsprechende Bindungsstellen in Wechselwirkung treten können. Diese Eigenschaft wird bei der Immundetektion ausgenutzt. Die Immundetektion basiert auf der Bindung eines spezifischen Erstantikörpers an die jeweilige Proteinbande auf dem Blot-Streifen, die durch Bindung eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers, der gegen den ersten gerichtet ist, sichtbar gemacht wird. Damit können spezifische Proteine in der Probe nachgewiesen werden [Ramlau, 1987; Peters *et al.*, 1985]. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktionen müssen vor der Durchführung der Immunreaktionen unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Blotmembran möglichst vollständig abgesättigt werden [Wedge and Synneby, 1986].

Dazu wird der Blot für 1 h in einer Blockierlösung (1 %iges BSA in PBST) bei RT inkubiert. Anschließend wird der Blot in eine Antikörperlösung (je nach Antikörper 1:300 bis 1:10000 mit 1 %igen BSA, PBST-Lösung verdünnt) überführt, die mit dem entsprechenden enzym-spezifischen Antikörper versetzt ist, und unter leichter Bewegung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundene

Antikörper werden durch dreimaliges Waschen des Blots mit PBST (je 5-10 min) entfernt. Danach erfolgt eine Inkubation für 1 h bei RT in einer Lösung mit dem sekundären, Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:10000 in 1 %igen BSA, PBST-Lösung) bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:5000 in 1 %igen BSA, PBST-Lösung), der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, um den auf der Blotmembran gebundenen ersten Antikörper zu markieren. Zur Entfernung überschüssiger sekundärer Antikörper wird der Blot ebenfalls 3 mal für je 5-10 min mit PBST gewaschen. Anschließend wird der Blot 1 mal für 5 min in TBS-Lösung (100 mM Tris, pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert, um optimale Bedingungen für die alkalische Phosphatase zu schaffen. Der Blot wird solange mit Substratlösung entwickelt, bis die Banden deutlich sichtbar werden. Die Reaktion wird durch Waschen der Membran mit Wasser abgestoppt. Als Substratlösung dient 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxylphosphat (1mg) und als Farbverstärker Nitroblautetrazoliumchlorid (2mg) in 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 150 mM NaCl.

### 5.2.3 Zellkultur

#### 5.2.3.1 Kultivierung von HM-1- Zellen

HM1 embryonale Stammzellen werden aus agouti-farbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd isoliert [Magin *et al.*, 1992]. Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF in Abwesenheit von Fibroblasten („feeder“-Zellen). Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen erfolgt in Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Angaben über Kultur, Transfektion und Analyseverfahren finden sich auch in Theis *et al.* (2000).

##### 5.2.3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HM1 Zellen werden in ES-WT-Medium gehalten, das nur bei geringer Zelldichte nach der Isolierung von Einzelklonen alle 2-3 Tage, sonst jedoch täglich gewechselt wird. Gesplittet werden HM1 Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 bis 100% durch eine Trypsinierung und anschließender Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3. Bei einer Kulturgröße von 48-Loch- und 24-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden die Zellen ohne eine Zentrifugation gesplittet, ab einer Kulturgröße von 6-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden sie nach dem Trypsinieren abzentrifugiert. Für eine Trypsinierung wird das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit ES-PBS, einmal mit ES-Trypsin gewaschen und anschließend etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe von ES-WT-Medium verdünnt, die Zellen gründlich vereinzelt und die sich in Suspension befindlichen Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 800 rpm, RT) wird nach dem Absaugen des Überstandes das Zellpellet in entsprechender Menge ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium aufgenommen und in der Verdünnung auf gelatinisierte (durch Inkubation von 5 min mit 0,1%iger Gelatine-Arbeitslösung) Kulturschalen ausplattiert. Die neuen Kulturschalen werden anschließend mit frischem ES-Medium

auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt. Die Passagenzahl erhöht sich pro Trypsinierung um eine Anzahl, die auf den Kulturgefäßen notiert wird.

Zum Einfrieren von Kulturzellen werden die Zellen eines T25 Flaschen nach dem Trypsinieren in 10 ml ES-WT-Medium aufgenommen und in 15 ml Rörchen überführt. Diese Suspension wird zentrifugiert (5 min, 800 rpm, RT), die sedimentierten Zellen in 1,5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension werden zu in drei beschrifteten Kryoröhrchen vorgelegten 500 µl ES-Einfriermedium pipettiert und nach Verschließen des Röhrchens kurz gemischt. Das Röhrchen wird durch Inkubationen von 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und über Nacht bei  $-70^{\circ}\text{C}$  langsam eingefroren, bevor es zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wird. Zum Auftauen wird ein Kryoröhrchen durch zügiges Überführen aus der Flüssigstickstoffphase in ein  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem 9 ml ES-WT-Medium vorgelegt sind. Nach einer Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) wird das Zellsediment in 5 ml ES-WT-Medium vorsichtig resuspendiert und auf einer gelatinisierten Schale rekultiviert.

### 5.2.3.1.2 Stabile Transfektion zur homologen Rekombination

Als Transfektion bezeichnet man die Aufnahme freier DNA von eukaryotischen Zellen. Bei der stabilen Transfektion selektioniert man auf das Ereignis der stabilen Integration der transfizierten DNA in die genomische DNA der Ausgangszellen. Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation von linearisiertem Plasmid. Dazu werden 250 µg des aufgereinigten Austauschvektors eingesetzt der durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen wurde.

ES-Zellen mit möglichst niedriger Passagenzahl werden unter Standardbedingungen kultiviert und bis zur Konfluenz einer T75-Flasche herangezogen. Die ES-Zellen werden wie zur Passage trypsiniert und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in soviel HBS-Puffer aufgenommen, dass in 800 µl  $3 \times 10^7$  Zellen enthalten sind. 800 µl Zellsuspension werden mit den 100 µl linearisiertem Austauschvektor vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgt durch Anlegen eines Stromimpulses des Biorad-Gene Pulser von 0,8 Kilovolt mit einer Kapazität von 3 Mikrofarad. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT werden die Zellen vorsichtig in 10 ml ES-WT-Medium resuspendiert und auf mehrere 10 cm-Schalen mit 10 ml ES-WT-Medium unterschiedlicher Verdünnung ausplattiert, wobei Platten mit der Aussaat von 0,5 ml =  $1,5 \times 10^6$  Zellen nach der Selektion meist die besten Resultate in Form von nicht zu dicht gewachsenen einzelnen ES-Zellklonen erbringen.

### 5.2.3.1.3 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination

Die Selektion auf Anwesenheit des in dem Austauschvektor integrierten Selektionsmarkergens HAT wird 24 h nach der Elektroporation durch Wechsel des ES-WT-Mediums zu ES-Selektionsmedium begonnen. Zunächst zweimal nach zwei, anschließend alle 3 Tage wird das HAT-haltige Medium mit den abgestorbenen Zellen gewechselt. Resistente Klone lassen sich nach etwa 5 Tagen



mikroskopisch erkennen, erreichen allerdings erst nach etwa 10 Tagen Selektion eine Größe, welche die Isolierung der einzelnen Zellklone ermöglicht. Dazu werden die Klone jeweils mit Hilfe einer Kolbenhubpipette und gelben Spitzen unter dem Mikroskop von der Kulturschale abgeschabt, in 100 µl Kulturmedium aufgesaugt und in eine Vertiefung einer gelatinisierten 24-Loch-Kulturschale transferiert. Der Zellklumpen wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Abschließend erfolgt die Zugabe von ES-WT-Medium, das alle 2-3 Tage gewechselt wird, bis der Zellklon eine ausreichende Konfluenz zum Trypsinieren besitzt. Bei dem ersten Trypsinierungsschritt von einer 24-Loch- auf eine 6-Loch-Kulturschalenvertiefung wird die Hälfte der Zellsuspension abgenommen, die genomische DNA aus embryonalen Stammzellen isoliert (5.2.1.11) und zur Genotypisierungs-PCR eingesetzt (5.2.1.4). Die Expansion der in der PCR als erfolgreich homolog rekombiniert identifizierten Klone erfolgt schrittweise über eine 24-Loch-, eine 6-Loch-Kulturschale und schließlich zwei konfluente T25 Flaschen. Die Zellen der einen Flasche werden zur später gegebenenfalls erfolgenden Blastozysten-Injektion eingefroren (5.2.4.4), die Zellen des anderen Kolbens werden erneut auf zwei T25-Flaschen gesplittet. Ein Kolben wird zur genomischen DNA-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen (5.2.2.10) und anschließender Southern-Blot Hybridisierung (5.2.1.18) eingesetzt, die andere Flasche für die Karyotypanalyse.

#### 5.2.3.1.4 Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Für die Gewinnung von keimbahngängigen Chimären nach der Blastozysten-Injektion (BCI) ist es essentiell, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten. Daher wurden alle potentiell für die BCI einzusetzenden ES-Zellklone zuvor einer Karyotypanalyse unterzogen. Dazu werden die Zellen einer konfluenten T25-Flasche durch eine Inkubation von 50 min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) mit 0,1 µg/ml Demecolcine (2 ml ES-WT-Medium + 40 µl Demecolcine) in der Metaphase der Mitose arretiert. Die Zellen werden anschließend gewaschen, trypsinieren, in einem 50 ml Röhrchen pelletiert und durch Klopfen in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung und vorsichtigem Mischen schwellen die Zellen für 10 min bei RT osmotisch an. Anschließend werden die Zellen wieder sedimentiert (5 min, 700 rpm), der Überstand abgesaugt und das Pellet durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 min bei RT findet eine erste Fixierung statt, die nach einer erneuten Sedimentation (5 min, 1.200 rpm) noch zweimal mit dem Methanol:Eisessig-Gemisch wiederholt wird. Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen in 1 ml Methanol:Eisessig-Gemisch aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus 20-30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Chromosomen werden durch eine Inkubation von 1 min in Giemsa Färbelösung angefärbt und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die Objektträger werden nach dem Trocknen an der Luft mit Entellan und Deckgläsern eingedeckelt. Mindestens 20 auswertbare Chromosomenanhäufungen einzelner mitotisch arretierten Zellen werden pro ES-Zellklon unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

## 5.2.4 Tierexperimentelles Arbeiten

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche werden nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes nach vorheriger Genehmigung durch die Bezirksregierung in Köln durchgeführt (Aktenzeichen 50.203.2-BN24,21/05(RP Köln)) mit dem Titel „ Funktionsanalyse des frühen Oligosaccharidprocessing und der daran beteiligten Glykosidasen mit Hilfe transgener „knock out“-Mäuse). Adulte Tiere werden durch zervikale Dislokation, alle unter zwei Wochen alten Tiere durch Decapitation getötet.

### 5.2.4.1 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen oder in Mikroisolatorkäfigen des IVC-Typs (individually ventilated cage) bei einem über das Jahr konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die für die jeweiligen Käfiggrößen vorgesehenen Besatzdichten werden eingehalten und die Tiere zweimal wöchentlich in saubere Käfige umgesetzt. Bezüglich der Zucht und Haltung transgener Mäuse sei auf Nagy *et al.* (2003) verwiesen.

Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Verpaarungen werden durch die gemeinsame Haltung eines Männchens mit 1-2 Weibchen in einen Käfig generell nachmittags angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen (auch zur Ermittlung der Scheinschwangerschaft) werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpfropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc (*dies post coitum*) definiert. Den Jungtieren werden im Alter von 4 bis 5 Wochen Ohrmarken zur Identifizierung gesetzt. Gleichzeitig wird von jedem Tier ein Stück der Schwanzspitze abgetrennt, aus dem genomische DNA gewonnen und der Genotyp der Maus mittels PCR bestimmt wurde (5.2.1.4).

### 5.2.4.2 Scheinschwangerschaft und Vasektomie von NMRI-Männchen

Scheinschwangere Weibchen werden als Empfänger-Tiere der injizierten Blastozysten benötigt und durch Verpaarung mit sterilen Männchen erzeugt. Durch den Kopulationsakt werden die Weibchen empfänglich für die Einnistung (Nidation) von Embryonen in den Uterus, die schließlich dazu führt, dass die Schwangerschaft ausgelöst wird. Operativ implantierte Blastozysten aus der BCI können in scheinschwangeren Mäusen nidatieren, während die eigenen, unbefruchteten Eier des Weibchen keinen Einfluß auf die Schwangerschaft haben. Bleibt nach einer Scheinschwangerschaft die Nidation aus, tritt das Tier nach 11 Tagen wieder in den Zyklus ein [Nagy *et al.*, 2003].

Die für die Verpaarung notwendigen sterilen Männchen des Stammes NMRI werden operativ im Alter von etwa 6-8 Wochen durch Verödung des *Vas deferens* mit einer glühenden Pinzette unter Xylazin-Ketamin-Narkose entsprechend der in Nagy. *et al.* (2003) beschriebenen Vorgehensweise erzeugt. Eine Woche nach der Operation wird die Sterilität der operierten Männchen durch eine mindestens drei Wochen andauernde Verpaarung mit NMRI-Weibchen getestet, bevor die Männchen für die Empfänger-Verpaarungen eingesetzt werden. Die Verpaarungen zur Erzeugung scheinschwangerer NMRI-Weibchen werden zeitlich so geplant, dass die Weibchen am Tag des Retransfers injizierter Blastozysten am Tag 2,5 dpc der Scheinschwangerschaft sind.

### 5.2.4.3 Superovulation von C57BL/6 Spenderweibchen

Für die Gewinnung von Eizellen und Blastozysten werden C57BL/6-Männchen mit C57BL/6-Weibchen verpaart. Da ein C57BL/6-Weibchen bei einer normalen Verpaarung nur etwa 8 Blastozysten produziert, werden die einzusetzenden Weibchen zur Verringerung der benötigten Tierzahlen durch eine hormonelle Behandlung stimuliert. Durch diese Hormonbehandlung wird eine vermehrte Follikelreifung und ein koordinierter Eisprung induziert und es können bis zu 20 Blastozysten aus einem stimulierten Weibchen isoliert werden.

Für diese sogenannte Superovulation werden jeweils 8 Weibchen vor Einsetzen des natürlichen Zyklus im Alter von 4 Wochen benötigt. Etwa zur Mitte des Lichtzyklus (12.00 Uhr) werden je Weibchen 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Verpaarungserfolg am nächsten Morgen bestimmt.

### 5.2.4.4 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Retransfer der injizierten Blastozysten

Diese Methode dient zur Erzeugung chimärer Embryonen aus embryonalen Stammzellen und erfordert die Technik der Morula-Aggregation oder der Blastozysten-Injektion [Nagy. *et al.*, 2003; früher Hogan *et al.*, 1986]. Bei der hier beschriebenen Blastozysten-Injektion werden embryonale Stammzellen in ein als Keimbläschen oder Blastozyste bezeichnetes frühes Embryonalstadium der Maus injiziert. Das Stadium der Blastozyste ist bei der Maus am Tag 3,5 nach der Befruchtung erreicht und besteht aus etwa 100 Zellen.

Die im Institut verwendeten HM1 ES-Zellen stammen aus agoutifarbenen Mäusen, so dass schwarze C57BL/6 Blastozystenspendertiere und albino NMRI-Empfängertiere verwendet werden. Die superovulierten C57BL/6-Weibchen (5.2.4.3) werden mit C57BL/6 Männchen verpaart und die Blastozysten 3,5 Tage nach der Kopulation isoliert (5.2.4.5). In die isolierten Blastozysten werden unter einem Mikroskop homolog rekombinierte, getestete und karyotypbestimmte ES-Klon-Zellen injiziert. Diese injizierten Blastozysten werden in den Uterus von scheinsschwangeren NMRI-Weibchen (5.2.4.2) operativ implantiert, die diese manipulierten Embryonen austragen und die resultierenden Jungtiere großziehen. Je nach Beteiligung der ES-Zellen an der Entwicklung des Embryos entstehen mehr oder weniger mosaikartige, chimäre Mäuse, wobei das Verhältnis von agoutifarbenem zu schwarzem Fell eine Auskunft über den Chimärismusgrad gibt. Chimären mit einem Agoutianteil werden mit C57BL/6 Mäusen verpaart, um bei Keimbahngängigkeit der ES-Zellen in der Hälfte der agoutifarbenen Nachkommen das homolog rekombinierte Transgen zu erhalten. Mit diesen Nachkommen können durch gezielte Verpaarungen transgene Mauslinien etabliert werden.

Die Methodik zur Erzeugung chimärer Mäuse ist im Detail von Nagy *et al.* (2003) beschrieben.

Benötigt werden neben einer Sterilbank, einem Auflicht-Dissektionsmikroskop und einem Durchlicht-Dissektionsmikroskop (Leica) auch ein Inversmikroskop (Zeiss Axiovert 10), welches mit zwei Mikromanipulatoren (Eppendorf) ausgestattet ist. Ein Mikromanipulator, an dem die Haltekapillare eingespannt wird, ist mit einem Cell Tram Air (Eppendorf), der andere, an dem die Injektionskapillare eingespannt wird, mit einem Cell Tram Oil (Eppendorf) ausgestattet. Als Injektionskammer dient ein Aluminiumrahmen in Objektträgergröße mit einer Aussparung in der Mitte, die von unten mit einem durch Silikonfett (Beckman) fixierten Deckglas verschlossen ist. In

einem der auf dem Deckglas pipettierten drei Tropfen IM à 13 µl, die mit Mineralöl überschichtet sind, finden die Injektionen statt. Diese Injektionskammer wird auf dem Objektisch des Mikroskops mit einem Peltier-Kühlelement (Micro Incubator 5000, Technology Incorporation) während der Injektionen auf 9°C gekühlt. Die Kapillaren zur BCI werden in fertig gezogenem Zustand bestellt (Haltekapillaren: Eppendorf #5175 108.000; Injektionskapillaren: BioMedical Instruments #GC100T-10 Clark, Größe 38, BW = 20).

Dreieinhalb Tage nach einer erfolgreichen Verpaarung von superovulierten C57BL/6 Spenderweibchen werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die beiden Uterushörner mit Ovar und Eileiter werden herauspräpariert und in einer Schale mit TM gesammelt. Zur Vorbereitung wird eine 1 ml Spritze mit 0,4 ml TM gefüllt und eine stumpfe Kanüle aufgesetzt. Ein Uterushorn wird mit Hilfe einer Pinzette auf einem Papier von außen trockengewischt und in eine Plastikschaale unter ein Auflicht-Dissektionsmikroskop transferiert. Am Übergang vom Eileiter zum Uterus wird mit einer feinen Schere ein Einschnitt vollzogen, die Kanüle in Richtung Uterus eingeführt und anschließend das Uterushorn mit einer Pinzette an der Kanüle fixiert. Das Ausspülen der Blastozysten erfolgt durch die schnelle Injektion der 0,4 ml TM durch das Uterushorn. Die ausgespülten Blastozysten werden mit Hilfe einer Mundpipettierhilfe und einer fein ausgezogenen Pasteurpipette unter einem Durchlicht-Dissektionsmikroskop aufgesammelt, dreimal in 20 µl mit Mineralöl überschichtetem KM gewaschen und bis zur Injektion maximal 30 min im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Frisch trypsinierte ES-Zellen möglichst niedriger Passagenzahl und die isolierten Blastozysten werden unter dem Durchlicht-Dissektionsmikroskop in einen 13 µl IM-Tropfen der Injektionskammer transferiert. Nach dem Fixieren der Injektionskammer und dem Anschluß der Kühlung werden die beiden Kapillaren nach einer Ausrichtung in den Injektionstropfen gebracht. An der Haltekapillare wird eine Blastozyste durch Unterdruck so fixiert, dass die innere Zellmasse bei der Injektion nicht berührt wird. In die Injektionskapillare werden einzelne, glatte ES-Zellen in möglichst wenig Medium aufgesammelt, wobei die Anzahl der aufzusammelnden und schließlich zu injizierenden ES-Zellen von der Passagenzahl abhängig ist und sich berechnet aus  $\frac{1}{2} \cdot \text{Passagenzahl} + 2$ . Anschließend werden die beiden beladenen Kapillaren über dem Boden der Injektionskammer gegeneinander ausgerichtet, die Injektionskapillare an einer Zellgrenze des Trophektoderms in das Blastozoele eingeführt und die ES-Zellen ohne Öl durch sanften Druck injiziert. Nach der Injektion wird die Kapillare vorsichtig zurückgezogen und die injizierte Blastozyste an einer geeigneten Stelle im Injektionstropfen abgelegt. Anschließend wird dieser Vorgang mit allen isolierten Blastozysten wiederholt. Die bei der Injektion kollabierten Blastozysten werden anschließend aus dem Injektionstropfen gesammelt und für etwa 1 h in 20 µl mit Mineralöl überschichtetem KM einer Mikrotropfenkultur im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, wobei die injizierten Blastozysten reexpandieren und wieder ein Blastozoele entwickeln.

Die injizierten Blastozysten werden nach der Erholung in Kultur in den Uterus scheinchwangerer NMRI-Weibchen am Tag 2,5 dpc transferiert. Pro Weibchen werden mindestens 8 (unilateral) und bis zu 20 Blastozysten (bilateral) in den Uterus übertragen.

Die expandierten Blastozysten werden dreimal in 20 µl mit Mineralöl überschichtetem TM gewaschen. In Pasteurpipetten, die eine auf einen Durchmesser von etwa 150 µm ausgezogene, abgewinkelte, feuerpolierte Spitze besitzt, werden zunächst etwas Mineralöl, eine Luftblase und schließlich jeweils etwa 10 Blastozysten in möglichst wenig Medium aufgesogen. Bis zur anschließenden Operation können die so beladenen Transferkapillaren außerhalb des Brutschrankes gelagert werden.

Die Austrocknung der Augen der durch eine intraperitoneale Xylazin-Ketamin-Injektion betäubten Mäuse wird während der Operation durch handelsübliche Augentropfen verhindert. Der Rücken des scheinschwangeren Weibchens wird mit 70% EtOH desinfiziert. Anschließend wird *caudal* des Brustkorbs senkrecht zum Rückgrat ein etwa 1 cm langer Schnitt durch das Fell vollzogen. Nach dem Entfernen der Haare durch Wischen mit einem trockenen Tupfer wird das darunterliegende Bauchfell mit einer Schere eingeschnitten. Durch diese Öffnung wird das Ovar, der Eileiter und der Uterus an dem am Ovar hängenden Fettpolster mit einer stumpfen Pinzette herausgezogen und mit einer Klammer beschwert auf dem Rücken des Tieres postiert. Der Uterus wird mit der Kanüle einer Insulinspritze im proximalen Bereich eingestochen und die mit den Blastozysten bestückte Transferkapillare durch das Loch in das Uteruslumen eingeführt. Mit Hilfe der Mundpipettierhilfe werden die Blastozysten ohne das Öl in den Uterus eingebracht und anschließend der Reproduktionstrakt durch das Loch im Bauchfell in die Leibeshöhle zurück gleiten gelassen. Die Öffnung im Bauchfell wird vernäht, der Fellschnitt geklammert (Autoclip 9 mm, Becton Dickinson) und die Wunde mit einer handelsüblichen Jodtinktur desinfiziert. Gegebenenfalls wird dieser operative Eingriff an dem zweiten Uterushorn der selben Maus wiederholt. Noch vor dem Aufwachen werden die operierten Weibchen zurück in die Tierhaltung gebracht und dort in geringer Dichte gehalten. Nach 14 Tagen werden die Mütter vereinzelt, mit Nestbaumaterial versorgt und bis 1 Woche nach dem Werfen nicht mehr in neue Käfige umgesetzt.

#### 5.2.4.5 Überprüfung der Keimbahngängigkeit

Der Beitrag der ES-Zellen an den geborenen Tieren kann an der unterschiedlichen Fellfarbe des Blastozysten-spender-Stamms (C57BL/6, schwarz) und des ES-Zell-Spender-Stamms (Sv129P2/OlaHsd, agouti) erkannt werden (Fellfarbchimärismus). Ob die injizierten ES-Zellen an der Entwicklung von Spermien oder Eizellen teilnehmen, bleibt jedoch ein zufälliger Prozess. Durch Kreuzung mit C57BL/6-Mäusen werden Chimären mit einem agoutifarbenen Fellanteil >30 % auf Keimbahntransmission überprüft. Das in den ES-Zellen homozygot vorliegende agouti-Allel wirkt gegenüber den Fellfarb-Allelen des C57BL/6-Stammes dominant. Die Keimbahngängigkeit kann folglich an agoutifarbenen Nachkommen aus dieser Kreuzung erkannt werden. Da in den zur Injektion eingesetzten homolog rekombinierten ES-Zellen nur ein Allel mutiert vorliegt, sollte es in der Hälfte der Nachkommen mit dem agouti-Allel übereinstimmen. Der Genotyp am gezielt mutierten Locus agouti-farbener Nachkommen der Chimären wird durch PCR-Analysen (5.2.1.4) und Southern-Blot Hybridisierungen (5.2.1.11) überprüft. Heterozygot mutierte Nachkommen bilden die Basis der weiteren Zucht der transgenen Linie.

#### 5.2.4.6 Zucht- und Verpaarungsbedingungen der $ManIA^{-/-}$ -Zucht

Die heterozygot mutierten Chimärennachkommen ( $ManIA^{+/-}$ ) werden erneut mit C57BL/6-Mäusen verpaart, um ausreichend heterozygot mutierte Tiere für eine Expansion der Linie zu erhalten. Heterozygote Nachkommen werden zur Zucht homozygot mutierter Tiere miteinander verpaart und schließlich in der nächsten Generation homozygot mutierte Tiere ( $ManIA^{-/-}$ ) zu erhalten.

#### **5.2.4.7 Isolierung von Eizellen aus Mannosidase IA defizienten. Mäusen**

Zur Isolierung von einzelligen Embryonen werden die Eizellen am Tag 0,5 nach der Kopulation entnommen. Ein Eileiter wird in ein Schälchen mit M2-Medium mit 300 µg Hyaluronidase/ml überführt. Die Ampulle wird unter dem Stereomikroskop mit zwei spitzen Pinzetten aufgerissen und die Eizellen werden herausgedrückt. Durch die Hyaluronidase werden die die Eizelle umgebenden Cumulzellen entfernt. Anschließend werden die Eizellen unter einem Lichtmikroskop bei 10 bzw. 40facher Vergrößerung beurteilt oder in M2-Medium ohne Hyaluronidase im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert, um die weitere Zellteilung/-entwicklung am nächsten Tag zu beurteilen.

#### **5.2.5. Gewebefärbung von Paraffinschnitten**

Diese Arbeiten wurden in der AG Prof. Magin (Institut für Physiologische Chemie, Uni Bonn) von Frau Ursula Reuter durchgeführt.

Frisch präparierte Gewebe werden in Carnoy's Fixativ oder in Formalin über Nacht fixiert und anschließend im Gewebeeinfiltrationsautomat entwässert und paraffiniert. Danach werden die Gewebe in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte in einer Dicke von 7 µm mit einem Mikrotom (Fa. Leica) angefertigt. Die Schnitte werden 2 h bei 37°C getrocknet und zur Entparaffinierung zweimal für 5 min in Xylol inkubiert. Anschließend werden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (2x 100%, 2x 90%, 1x 70%) für jeweils 45 sec. Getaucht und für 2 min in A. bidest gewaschen und histologisch gefärbt. Zur Untersuchung von Gewebeunterschieden wird mit einer Hämatoxylin-/Eosin-Lösung gefärbt [Bancroft and Cook, 1994].

## 6.1 PRIMER

### **Primer für den N-Terminus der Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA aus Maus:**

Sense-Primer:

Mm1a2N: TGGACAGACTGTCAGCCGGCG  
MouN3s: AAGTTCGTGCTGCTGCTGGTGTTC  
MouN6s: ATCTTCTTCCTGCCTGACTCCTCC  
MouN7s: ATCCGTGAGAAGAGGGCAAAG  
MouN8s: ATAAACGCTATGCGTGGGGCTTGAA  
MouN9s: TGAAGTCAACATACGCTTCGTCGG  
MouN10s: CTTGGGGTAAAATTGCTACCTGC  
MouNNotI: AATGCGGCCGCCCGGCTTGAAAATG

Antisense-Primer:

MouN0as: AAGCGCAGTGGTTAGGAAGGTGCT  
MouN1as: AGGGCTACTGAAGAGCGGCAACA  
MouN4as: CCACCTTTTCCTTCTCCAGCAGAA  
MouN5as: GGTGATGGTAATTGTGCTGCC  
MouN7as: CCGACGAAGCGTATGTTGACTTCA  
MouNRKNotI: AAAGCGGCCGCCTTCTTCTGGGCATAG

### **Primer für den C-Terminus der Golgi- $\alpha$ 1,2-Mannosidase IA aus Maus:**

Sense-Primer

Mm1a2C: GACCTGTTTCTGGTGGACAGA  
MouC1s: TTTGCACTTGGGGCAGATGGAGCT  
MouC3s: GAGCTGAAATTGCCCGCACTTGTC  
MouC6s: CACTGCATACCTTAATAATTCC  
MouC8s: GCTGTAATGTTTTGCCATGTTGC  
MouC10s: GTGCTTACATTCCACATAAAGATC  
MouC11s: CCAGTCTAATACTAGAACACAT

## 6.1 PRIMER

MouC12s: GGAGCATCCACAGCTGGGTGATTA  
MouC13s: CCTTCTGTGTCTTGTCACTGTGAC  
MouC15s: ACCTCGCCTCCGGTGCTCTTAATCA  
MouC16s: AGGGAAAATCCTGCAGCAGGTTCCC  
MouC17s: GTAGGATTCCCATCAGCCTTGGC  
MouC18s: CTCCCTTCTGATAATGATATGGATGC  
MouC19s: TTGGATCACCCCTGCCAGACTTGACA  
MouC22s: GCTTGACACTTAGGTACAATTTGAC  
MouC23s: CACTATCACAGAGTCCATGGG  
MouC24s: CTGAGATATTTTGTCTTAGGC

Antisense-Primer

MouC2as: CTCTGCCAGGAAGAACTTTGCTG  
MouC4as: TGAGTAGCCTCCGTTCACTCTGCA  
MouC5as: ACAGGCAGAATCTGTGGATCTACT  
MouC7as: GCAACATGGCAAAACATTACAGC  
MouC8as: GACCATAGTAGGTTGAAATTGAGG  
MouC9as: CCTTGGGAAAATCATTATAG  
MouC10as: TCTAGTGTATTAGACTGGAGAC  
MouC15as: TGATTAAGAGCACCGGAGGCGAGGT  
MouC21as: GCATATCACTGTGGAGGTGGAC  
MouC20as: CCTATATGTTTGAATATGTTTGGTCCATG  
MouC22as: GAGCTGAATAGAAACATGAAGGTG  
MouC23as: CTGTGTGGATGGCTGACAGTCAGC



## 6.1 PRIMER

### **Primer für den hloxpSK-Vektor:**

BN1: CTATCAGTAACAGCATCTAAGAG  
BN2: ATCATCGCTAATCACGACGCTG  
BN3: TAGACGAGTCTGAAGCTCTCG  
BN4: GATGGCCACAGGACTAGAACAC  
BN5: AGCCTACCCTCTGGTAGATTGTCG  
BN6: CTGTCCATAATCAGTCCATGAG  
PGK2a: TAAAGCGCATGCTCCAGACTGC

### **Sonstige Primer:**

T7: TAATACGACTCACTATAGG  
SP6: ATTTAGGTGACACTATAGAA

## 6.2 LITERATURVERZEICHNIS

- Ausubel FM, Brent A, Kingston RE, Moore DD, Seidman JA, Smith JA, Struhl K. (1989-2001) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York
- Aparicio, R., Hauptmann, M., Bause, E. (2001) Glykokonjugate Journal, Vol. 18, P.105
- Bause, E (1983) Biochem. J. 209: 331-336
- Bause, E Breuer W, Schweden J, Roeser R and Geyer R (1992) Eur. J. Biochem. 208: 451-457
- Bause E and Hettkamp M (1996) J. Biol. Chem. 377: 639-646
- Bause E and Hettkamp H (1979) FEBS Lett. 108: 341-344
- Bause E Schweden J, Gross A, Orthen B (1989) Eur J Biochem. 183(3):661-9
- Bieberich E and Bause E (1995) Eur. J. Biochem. 233: 644-649
- Breuer W and Bause E (1995) Eur J Biochem. 228(3): 689-96
- Burda, P., Aebi, M. (1999) BBA 1426: 239-257
- Burda P, Borsig L, de Rijk-van Andel J, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, Berger EG, Aebi M 1998) J ClinInvest. (1998) 102(4): 647-52
- Bradley A, Zheng B and Liu P (1998) Int J Dev Biol 42:943-50
- Chantret I, Dupré T, Delenda C, Bucher S, Dancourt J, Barnier A, Charollais A, Heron D, Bader-Meunier B, Danos O, Seta N, Durand G, Oriol R, Codogno P, Moore SE (2002) J Biol Chem. 277(28): 25815-22
- Chantret I, Dancourt J, Dupré T, Delenda C, Bucher S, Vuillaumier-Barrot S, Ogier de Baulny H, Peletan C, Danos O, Seta N, Durand G, Oriol R, Codogno P, Moore SE (2003) J Biol Chem. 278(11): 9962-71
- Daniel PF, Winchester B and Warren CD (1994) Glycobiology 4 (5): 551-566
- de Koning TJ, Toet M, Dorland L, de Vries LS, van den Berg IE, Duran M, Poll-The BT (1998) J Inherit Metab Dis. 21(6): 681-2

## 6.2 LITERATURVERZEICHNIS

de Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegenthart JFG, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJR, de Paepe AM, Wen Chun Chan N, Dacremont GA and van Coster R (2000) *Ann. J. Hum. Genet.* 66: 1744-1756

Drickamer K, Taylor ME (1998) *Trends Biochem Sci.* 23(9): 321-4

Durand G and Set N (2000) *Clin. Chem.* 46(6): 795-805

Eklund EA, Freeze HH (2005) *Semin Pediatr Neurol.* 12(3): 134-43  
Gahmberg CG, Tolvanen M *Trends Biochem Sci.* 1996 Aug; 21(8):308-11

Freeze HH, *Biochim. Biophys. Acta.* (2002) 1573(3): 388-93

Gahmberg CG, Tolvanen M *Trends Biochem Sci.* 1996 Aug; 21(8):308-11.

Greve JM, Wassarman PM (1985) *J. Mol. Biol.* 181(2): 253-64

Greve JM, Salzman GS, Roller RJ, Wassarman PM (1982) *Cell* 31(Pt 2): 749-59

Haltiwanger RS, Lowe JB (2004) *Annu. Rev. Biochem.* 73: 491-537

Hansske B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Höning S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Körner (2002) *C J Clin Invest.* 109(6): 725-33.

Hardt B, Kalz-Füller B, Aparicio R, Völker C (2003) *Glycobiology* 13 (3): 159-168

Hardt B, Völker C, Mundt S, Salska-Navarro M, Hauptmann M and Bause E (2005) *Bichimie* 87: 169-179

Hart G, Haltiwanger RS, Holt GD and Kelly WG (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 841-874

Helenius A (1994) *Mol. Biol. Cell* 5: 253-265

Hentges A, Bause E (1997) *Biol Chem.* 378(9): 1031-8.

Hettkamp H, Legler G and Bause E (1984) *Eur. J. Biochem.* 142: 85-90

Herscovics A (1999) *BBA General Subjects* 1473 Issue 1, (17): 96-107

Hoflack B, Cacan R, Verbert A (1981) *Eur J Biochem.* 117(2): 285-90

Hogan B, Costanzini F and Lacy E (1986) *Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G *Arch Dis Child.* 1994 Aug; 71(2):123-7.

Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K (2001) *MBO Rep.* (5): 415-22

Imbach T, Grünewald S, Schenk B, Burda P, Schollen E, Wevers RA, Jaeken J, de Klerk JB, Berger EG, Matthijs G, Aebi M, Hennet T (2000) *Hum Genet.* 106(5): 538-45

## 6.2 LITERATURVERZEICHNIS

- Jaeken J, Fryns JP, Standaert L, de Cock P, van den Berge H (1980) *Ann. Genet.* 23(2): 105-7
- Jaeken J, Matthijs G, Saudubray JM, Dionisi-Vici C, Bertini E, de Lonlay P, Henri H, Carchon H, Schollen E, Van Schaftingen E (1998) *Am. J. Hum. Genet.* 62(6): 1535-9
- Jaeken J, Schachter H, Carchon H, de Cock P, Codeville B, Spik G (1994) *Arch. Dis. Child* 71(2): 123-27
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarmann PM (2002) *Nat. Cell Biol.* 4(6): 457-61
- Kalz-Füller B, Bieberich E and Bause E (1995) *Eur. J. Biochem.* 231: 344-351  
Keir G, Winchester BG and Clayton P (1999) *Ann. Clin. Biochem.* 36: 20-36
- Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, von Figura K (1999) *EMBO J.* 18(23): 6816-22.
- Kornfeld R and Kornfeld S (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631-664
- Kranz C, Denecke J, Lehle L, Sohlbach K, Jeske S, Meinhardt F, Rossi R, Gudowius S, Marquardt T (2004) *Am J Hum Genet.* 74(3): 545-51
- Kranz C, Denecke J, Lehrman MA, Ray S, Kienz P, Kreissel G, Sagi D, Peter-Katalinic J, Freeze HH, Schmid T, Jackowski-Dohrmann S, Harms E, Marquardt T (2001) *J Clin Invest.* 108(11): 1613-9
- Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991) *Nucleic Acid Res.* 19(15): 4293
- Liu T, Stetson B, Turco SJ, Hubbard SC, Robbins PW, *J Biol Chem.* (1979) 254(11): 4554-9
- Lis H and Sharon N (1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 1-27
- Lubas WA and Spiro RG (1987) *J Biol. Chem.* 265(22): 13204-13112
- Lucocq JM, Brada D, Roth J (1986) *J Cell Biol.* 102(6): 2137-46
- Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C (2001) *Nat Genet.* (1):73-6
- Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D (2001) *Nat Genet.* 28(1):69-72
- Magin TM, Mc Whir J and Melton DW (1992) *Nucleic acid Res.* 20: 3795-3796
- Marshall RD (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41: 673-702
- Marquardt T and Freeze H (2001) *Biol. Chem.* 282: 161-177
- Moore SEH and Spiro RG (1990) *J Biol. Chem.* 265(22): 13204-13112
- Moremen KW, Trimble RB and Herscovics A (1994) *Glycobiology* 4: 113-125

## 6.2 LITERATURVERZEICHNIS

Mortillo S and Wassarmann PM (1991) *Development* 113(1): 141-9

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K and Behringer R (2003) *Manipulating the Mouse Embryo; a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, New York

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) *J Clin Invest.* 101(7):1414-20

Pinto BM (Ed.) (1999) *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3, 13-35 Elsevier, Amsterdam

Parodi AJ (2000) *Biochem. J.* 348: 1-13

Parodi AJ (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69: 69-93

Parodi AJ *Glycobiology.* (1993) (3): 193-9.

Paulson JC, Colley KJJ *Biol Chem.* (1989) 264(30): 17615-8.

Rosner MR, Hubbard SC, Ivatt RJ, Robbins PW (1982) *Methods Enzymol.* 83: 399-408

Ritter C, Helenius A (2000) *Nat Struct Biol.* 7(4): 278-80

Salzmann GS, Greve JN, Roler RJ, Wassarmann PM (1983) *Embo J.* 2(9): 1451-6

Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning*. Third Edition. Cold Harbour Laboratory Press, New York

Schachter H (2001) *Cell Mol. Life Sci.* 58: 1085-1104

Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond GV, Hurvitz H, Korn-Lubetzki I, Revel-Vik S, Raas-Rotschild A, Luder AS, Jaeken J, Berger EG, Matthijs G, Hennet T, Aebi M (2001) *J Clin Invest.* 108(11): 1687-95

Schollen E, Kjaergaard S, Martinsson T, Vuillaumier-Barrot S, Dunoe M, Keldermans L, Seta N, Matthijs G (2004) *J Med Genet.* 41(11): 877-80

Schweden J and Bause E (1989) *Biochem. J.* 264: 347-355

Sharon N (1998) *Acta Anat (Basel).* 161(1-4): 7-17

## 6.2 LITERATURVERZEICHNIS

- Spiro RG (2004) *Cell Mol Life Sci.* 61(9): 1025-41
- Spiro RG, Spiro MJ, Bhoyroo VD (1979) *J Biol Chem* 254(16): 7569-67
- Theis M, Magin TM, Plum A, Willeke K (2000) *Methods* 20(2): 204-18
- Thiel C, Schwarz M, Peng J, Grzmil M, Hasilik M, Braulke T, Kohlschütter A, von Figura K, Lehle L, Körner C (2003) *J Biol Chem.* 278(25): 22498-505
- Tremblay LO, Campbell Dyke N and Herscovics A (1998) *Glycobiology* 8(6): 585-595
- Tremblay LO, Herscovics A (2000) *J Biol Chem.* 2000 275(41): 31655-60
- Tremblay LO, Kovacs EN, Daniels E, Wong NK, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A, Marcinkiewicz E, Sedah NG, McKerlie C, Herscovics A (2007) *J Biol. Chem.* 282(4): 2558-2566
- Treml K, Meimaroglou D, Hentges A, Bause E (2000) *Glycobiology.* 10(5): 493-502
- Trombetta ES, Simons JF, Helenius A (1996) *J Biol Chem.* 271(44): 27509-16
- Tulsiani DR, Opheim DJ, Touster O J. *Boil. Chem.* 252: 3227-3233
- van Schaftingen E, Jaeken J (1995) *J FEBS Lett.* 377(3): 318-20
- Varki A, (1993) *Glycobiology* 3(2): 97-130
- Völker C, de Praeter CM, Hardt B, Breuer W, Kalz-Füller B, van Coster RN, Bause E (2002) *Glycobiology* 12: 473-483
- Wassarmann PM (1988) *Sci. Am.* 259(6): 78-84
- Wassarmann PM (2005) *J Cell Physiol.* 204(2): 388-91
- Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24): 13797-801
- Zuber C, Spiro MJ, Guhl B, Spiro RG and Roth J (2000) *Mol. Biol. Cell* 11: 4227-4240

### 6.3 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Michaela Hauptmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Januar 2008

Michaela Hauptmann

#### 6.4 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. E. Bause danke ich für die Möglichkeit zur Promotion auf einem interessanten Forschungsgebiet, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie das große Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Koch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bause danke ich ganz herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Willecke möchte ich für die Ausführung der Blastozysteninjektion danken.

Des weiteren bedanke ich mich bei allen anderen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben.