

# **Studien zur physiologischen Funktion des murinen UDP-Xylose-Transporters Slc35b4**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Jutta Fuhlrott

geboren am 25. August 1979 in Heiligenstadt

2007

Referentin: Prof. Dr. R. Gerardy-Schahn  
Korreferent: Prof. Dr. W. Müller  
Tag der Promotion: 11. Juli 2007

# Inhalt

	Seite
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung ..... 1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract ..... 2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung ..... 3</b>
3.1	Funktion und Struktur von Glykanen ..... 3
3.2	Synthese von Glykokonjugaten ..... 5
3.2.1	Synthese von N-Glykanen ..... 5
3.2.2	Synthese von O-Glykanen ..... 6
3.2.3	Synthese von Glykolipiden ..... 7
3.3	Nukleotidzucker-Transporter ..... 7
3.3.1	SLC35B4 ..... 10
3.4	Defekte im Glykosylierungsweg – <i>congenital disorders of glycosylation</i> (CDGs) 11
3.4.1	Auf Defekten in NSTs beruhende Krankheitsbilder ..... 12
3.5	Xylosehaltige Strukturen in Mammaliern ..... 13
3.5.1	Synthese von UDP-Xylose ..... 13
3.5.2	Vorkommen von Xylose ..... 13
3.6	Notch ..... 14
3.7	Proteoglykane und extrazelluläre Matrix ..... 15
3.8	RNA-Interferenz ..... 16
3.8.1	Funktionstest der shRNAs ..... 17
3.9	Zielsetzung ..... 18
<b>4</b>	<b>Material ..... 19</b>
4.1	Bakterienstämme, Zelllinien und Labortiere ..... 19
4.2	Plasmide und Oligonukleotide ..... 19
4.2.1	Plasmide ..... 19
4.2.2	Oligonukleotide ..... 22
4.3	Antikörper ..... 25
4.3.1	Primäre Antikörper ..... 25
4.3.2	Sekundäre Antikörper ..... 25
4.4	Enzyme ..... 25
4.5	Chemikalien ..... 26
4.6	Nährmedien, Puffer und Zusätze ..... 27
4.6.1	Nährmedien ..... 27
4.6.2	Puffer ..... 29
4.7	Geräte ..... 33

4.8	Verbrauchsmaterialien.....	35
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>37</b>
5.1	Zellbiologische Methoden.....	37
5.1.1	Beschichten von Zellkulturflaschen .....	37
5.1.2	Gewinnung embryonaler Maus-Fibroblasten (MEF) .....	37
5.1.3	Kultivierung von Zellen .....	37
5.1.4	Auftauen von Zellen .....	38
5.1.5	Einfrieren von Zellen.....	38
5.1.6	Elektroporation embryonaler Stammzellen.....	38
5.1.7	Transfektion von NIH/3T3-Zellen mit Superfect.....	39
5.1.8	Durchflusszytometrie .....	39
5.1.9	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	40
5.1.10	Dualer Luciferase-Reporterassay .....	40
5.1.11	Immunzytochemie .....	41
5.1.12	Transformation und Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	41
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	42
5.2.1	Isolierung von DNA .....	42
5.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen .....	43
5.2.3	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA.....	43
5.2.4	Nukleinsäurepräzipitation .....	43
5.2.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	44
5.2.6	Gelextraktion .....	44
5.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	44
5.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
5.2.9	Reverse Transkription .....	45
5.2.10	cDNA-Synthese für die <i>real-time</i> -PCR.....	46
5.2.11	Quantitative <i>real-time</i> -PCR (SyBrGreen-Assay) .....	46
5.2.12	Restriktionsanalyse.....	49
5.2.13	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	49
5.2.14	Ligation .....	49
5.2.15	TOPO-TA Klonierung.....	50
5.2.16	Klonierung des Targeting-Vektors für den konstitutionellen Knockout.....	50
5.2.17	Klonierung des Targeting-Vektors für den konditionellen Knockout.....	51
5.2.18	Vektorbasierte RNA-Interferenz .....	53
5.2.19	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	53
5.2.20	Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	53
5.2.21	Herstellung von DMSO-Stocks von <i>E. coli</i> .....	53
5.2.22	Sequenzierung .....	53
5.2.23	Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter RNA- und DNA-Sonden.....	54
5.2.24	Northern Blot.....	54
5.2.25	Herstellung <sup>32</sup> P-markierter DNA-Sonden .....	56

5.2.26	Southern Blot.....	56
5.3	Proteinbiochemische Methoden .....	57
5.3.1	Aufreinigung von Proteinen mit Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose.....	57
5.3.2	Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	57
5.3.3	Golgipräparation.....	57
5.3.4	Transportassay .....	58
5.3.5	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay .....	58
5.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
5.3.7	Silberfärbung .....	59
5.3.8	Western Blot.....	60
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
6.1	Subzelluläre Lokalisierung des Slc35b4c .....	62
6.3	Gewebsspezifische Expression des SLC35b4 .....	63
6.4	Knockout-Modelle .....	65
6.4.1	Konstitutioneller Knockout .....	65
6.4.2	Konditioneller Knockout .....	69
6.5	Zelluläres Knockdown-Modell.....	71
6.5.1	RNA-Interferenz - Auswahl der Zielsequenz.....	71
6.5.2	Bestimmung der mRNA-Level in shRNA-exprimierenden Klonen .....	74
6.5.3	Transportassay .....	76
6.5.4	Glykosylierung von Notch .....	77
6.5.5	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteoglykane .....	82
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
7.1	Transportspezifität und subzelluläre Lokalisation des murinen Slc35b4.....	85
7.2	Untersuchung der endogenen Expression des Slc35b4.....	86
7.3	Charakterisierung der Zellklone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 .....	86
7.4	Auswirkungen der reduzierten Expression des Slc35b4 auf die Glykosylierung von Notch und die Synthese der Glykosaminoglykane.....	87
7.5	Konstitutioneller Knockout – Problematik bei der Generation von ES-Zellen mit homologer Rekombination .....	89
7.5.1	Probleme beim Screening.....	89
7.5.2	Organisation des Genlokus.....	89
7.5.3	Länge der homologen Bereiche im Targeting-Vektor .....	90
7.5.4	Gendosiseseffekt .....	90
7.6	Ausblick.....	91
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>

9.1	Abkürzungen .....	101
9.2	Lebenslauf .....	103
9.3	Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	104
9.4	Posterpräsentationen.....	104
9.5	Erklärung .....	105
9.6	Danksagungen .....	106

# 1 Zusammenfassung

Für die Synthese von Glykokonjugaten, wie sie auf Zelloberflächen als Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane vorkommen, ist der Transport von Nukleotidzuckern aus dem Zytoplasma, dem Ort ihrer Synthese, ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bzw. des Golgi-Apparates nötig, wo sie Glykosyltransferasen als Substrate dienen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich ein Transportprotein für UDP-Xylose identifiziert (SLC35B4) (Ashikov, 2005). Die Identifikation dieses Proteins war insofern ungewöhnlich, als UDP-Xylose nach heutigem Kenntnisstand im Lumen des Golgi-Apparates aus UDP-Glukuronsäure synthetisiert wird und der Transport aus dem Zytoplasma somit nicht erforderlich wäre. Anhand eines Maus-Deletionsmodells sollte nun die physiologische Funktion dieses Transporters analysiert werden. Dazu wurde zunächst ein homologes Gen der Maus, *slc35b4*, identifiziert. Der genomische Locus befindet sich auf Chromosom 6 und umfasst 28 kbp. Die cDNA codiert für ein stark hydrophobes Protein, für das mit Hilfe eines computergestützten Membrantopologiemodells zehn Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Durch Vergleich der Sequenzen von genomischer DNA und cDNA ergab sich eine Struktur bestehend aus zehn Exons, die von neun Introns unterbrochen werden. Auf dieser Grundlage wurden Strategien zur konstitutionellen sowie konditionellen Inaktivierung des Transporters in der Maus erstellt.

Außerdem wurde anhand eines auf RNA-Interferenz basierenden Ansatzes auf Zellkulturebene untersucht, ob der Transporter für die korrekte Glykosylierung der Proteoglykane und von Notch, einem Membranprotein mit vielfältigen Funktionen in der Embryogenese und Musterbildung, das in bestimmten EGF (*epidermal growth factor like*)-Domänen mit dem Glykan der Struktur  $\text{Xyl}(\alpha 1-3)\text{Xyl}(\alpha 1-3)\text{Glc}(\beta 1-\text{O})\text{Ser}$  modifiziert ist, erforderlich ist. Anhand einer so gewonnenen Zelllinie mit reduzierter Expression des UDP-Xylose-Transporters wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des *Slc35b4* zum Verlust der Xylosylierung der EGF-Domänen von Notch führt. Jedoch ist die Synthese der Xylose-gebundenen Glykosaminoglykane nicht betroffen, was zu der Annahme führt, dass unterschiedliche Kompartimente für den Aufbau der beiden xylosehaltigen Zuckerstrukturen genutzt werden, die verschiedene Quellen für UDP-Xylose verwenden.

Schlagworte: SLC35B4, Nukleotidzucker-Transporter, UDP-Xylose

## 2 Abstract

The synthesis of glycoconjugates like glycoproteins, glycolipids and proteoglycans requires an active transport of nucleotide sugars from the cytosol, where they are synthesised, to the lumen of the endoplasmic reticulum and Golgi-apparatus respectively, where they are utilised by glycosyltransferases.

Recently, in our group a Golgi-resident transport protein specific for UDP-xylose (SLC35B4) has been identified in human (Ashikov, 2005). As UDP-xylose is known to be synthesised inside the Golgi-lumen by decarboxylation of UDP-glucuronic acid, this finding raised questions about the function of this UDP-xylose transporter.

By means of a mouse deletion model the physiological function of this transporter should be elucidated. Initially the homologous mouse gene (*slc35b4*) has been identified: the cDNA encodes a highly hydrophobic protein for which ten transmembrane domains were predicted using bioinformatic methods.

The genomic locus on murine chromosome 6 comprises 28 kbp. Comparison of the cDNA and genomic sequence resulted in ten exons interrupted by nine introns. Based on that, strategies for the constitutive as well as conditional inactivation of *slc35b4* in a mouse model were developed. Furthermore a cell-based system applying RNA-interference was used to investigate the role of Slc35b4 in the glycosylation of proteoglycans and Notch, a membraneprotein with multiple functions during embryogenesis and pattern formation, which can be modified with Xyl( $\alpha$ 1-3)Xyl( $\alpha$ 1-3)Glc( $\beta$ 1-O)Ser in certain EGF (epidermal growth factor like)-domains.

Using a cell line stably expressing shRNA against *slc35b4* mRNA and thus showing a reduced level of *slc35b4* expression, we could show that Slc35b4 is a prerequisite for the formation of the Xyl( $\alpha$ 1-3)Xyl( $\alpha$ 1-3)Glc( $\beta$ 1-O)-glycan. In contrast to that the synthesis of xylose-linked glycosaminoglycans is not impaired leading to the assumption that those xylosylation steps take place in different compartments and use different sources of UDP-Xyl.

Keywords: SLC35B4, nucleotide-sugar transporter, UDP-xylose



## 3 Einleitung

### 3.1 Funktion und Struktur von Glykanen

Lange Zeit bestand das Dogma, dass die genomisch gespeicherte Information ausschließlich über Proteine nutzbar gemacht wird. Jedoch wurde 1968 gezeigt, dass die Glykane von Serumglykoproteinen deren Lebensspanne kontrollieren: Ein in der Membran von Hepatozyten verankertes Lektin erkennt die desialylierte Form der Glykoproteine und steuert deren Aufnahme in die Zelle (Morell, 1968). Zucker dienen der Zelle somit nicht nur als Energielieferanten und Speicherstoffe, sondern sind darüber hinaus wesentlich an Erkennungs- und Interaktionsprozessen beteiligt. Die äußere Hülle tierischer Zellen besteht aus mit Proteinen und Lipiden verknüpften Zuckerketten. Diese die Zellen umgebende Glykokalix (Abb. 1A) stellt nicht nur einen mechanischen Schutz für die Zelloberfläche dar, sondern verbindet die Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus nehmen die Komponenten der Glykokalix an der Erkennung und Bindung regulatorischer Faktoren teil. Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus Proteoglykanen, Kollagenen und verschiedenen anderen Glykoproteinen (Abb. 1B). Sie liegt jenseits der unmittelbaren Umgebung der Plasmamembran und hat in erster Linie eine strukturgebende Funktion (Karp, 2005; Neuberger 1997).

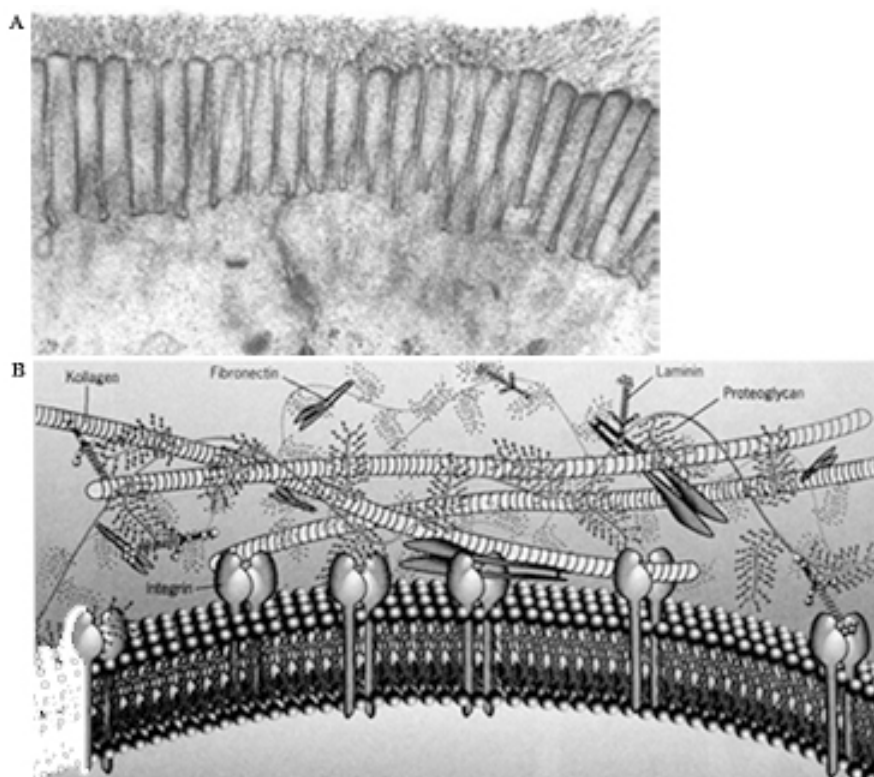


Abb. 1 (A) Glykokalix: Eine Zelle präsentiert sich nach außen über eine komplexe Kohlenhydratschicht (elektronenmikroskopische Aufnahme des Dünndarmepithels, Quelle: <http://www.fortunecity.de/lindenpark/hundertwasser/517/Glykokalyx.html>).  
 (B) Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix (Karp, 2005)

Einen Überblick über die vielfältigen Funktionen der unterschiedlichen Glykokonjugate bietet der Übersichtsartikel von Varki (1993).

Die vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen Monosaccharideinheiten beinhalten ein sehr viel höheres Potential Informationen zu tragen als Oligonukleotide oder Oligopeptide: Zwei Aminosäuren können in der Primärstruktur des Proteins auf nur eine Art miteinander verknüpft sein, in den Polyalkoholen Zucker kann dagegen jede der Hydroxylgruppen an der Ausbildung einer glykosidischen Bindung beteiligt sein. Zudem sind Verzweigungen der Zuckerketten und Modifikationen wie Phosphorylierung, Sulfatierung, N- und O-Acetylierung möglich. Daraus ergeben sich sehr viel mehr Permutationsmöglichkeiten als bei linearen DNA- oder Proteinsequenzen (Reuter, 1999). Anhand der Zusammensetzung der Glykanstrukturen können Zellen Informationen über Struktur und Funktion von Proteinen und deren Lokalisierung innerhalb der Zelle kodieren. Ebenso können Informationen über die Identität der Zelle oder ihr Stadium verschlüsselt werden. Um diese Informationen verarbeiten zu können, werden Erkennungssysteme benötigt. Lektine wurden definiert als kohlenhydratbindende Proteine nicht-immunologischen Ursprungs, die Zellen agglutinieren oder Glykokonjugate präzipitieren (Goldstein, 1980; Barondes, 1988). Pflanzenlektine sind eine heterogene Gruppe von (Glyko)proteinen mit zwei oder mehr Zuckerbindungsstellen, die in der Größe von 8,5 kDa (Brennnessel-Lektin) bis 126 kDa (*Phaseolus vulgaris* L<sub>4</sub> Isolektin) rangieren. Sie erkennen in der Regel Zuckersequenzen von zwei bis fünf Monosacchariden und sind dabei auch spezifisch für die Konformation und Art der Bindung (Goldstein, 1997). Mikroorganismen besitzen ebenfalls Oberflächenlektine, die zu den mikrobiellen Adhäsinen zählen und eine entscheidende Rolle in der Initiation der Infektion und nicht-opsonisierenden Phagozytose spielen, wie beispielsweise das Hämagglutinin des Influenza-A-Virus, das an Sialinsäure bindet (Ofek, 1994).

Auf derartigen Wechselwirkungen beruhen u.a. auch die intrazelluläre Sortierung von Glykoproteinen (z.B. anhand von Mannose-6-phosphat-Rezeptoren, Gabel, 1986), Parasit-Wirt-Interaktionen (Suzuki, 2000), Leukozytenmigration in entzündete Gewebe (Bevilacqua, 1993) und Metastasierung von Tumorzellen (Moisan, 2003; Riss, 2003). Häufig ist in Tumorzellen das Glykosylierungsmuster aufgrund von Stoffwechsellumstellungen und unvollständiger Synthese der Glykokonjugate gegenüber nicht-transformierten Zellen verändert, was in vielen Fällen mit erhöhtem Invasions- und Metastasierungspotential in Verbindung gebracht wird (Riss, 2003).

Aus den zahlreichen Funktionen der Glykanstrukturen, von denen hier nur einige dargestellt sind, ist zweifellos erkennbar, dass Störungen in ihrem Syntheseweg schwerwiegende Folgen für die Zelle bzw. den Organismus haben können.

Am Aufbau der Glykokalix sind Glykoproteine, Proteoglykane sowie Glykolipide beteiligt. Als Glykoproteine bezeichnet man Proteine, die kovalent an Aminosäureseitenketten gebundene Kohlenhydratreste tragen. Nach der Art der Verknüpfung werden sie unterteilt in:

- N-Glykane: das reduzierende Ende des Zuckers ist an die  $\gamma$ -Aminogruppe eines Asparaginrestes gebunden
- O-Glykane: die Bindung liegt zwischen reduzierendem Ende des Zuckers und der Hydroxygruppe von Serin-, Threonin-, Hydroxylysin- oder Hydroxyprolinresten

Fast alle Plasmaproteine (Immunglobuline, zahlreiche Hypophysenhormone; eine wichtige Ausnahme ist Albumin) sind Glykoproteine. Sie besitzen einen Kohlenhydratanteil von 15 bis 20% und tragen meist wenige, komplexe Oligosaccharide aus 10 bis 15 Kohlenhydrat-einheiten. Mucine sind Bestandteil der Schleime. Sie bestehen aus langen Polypeptidketten mit zahlreichen kurzen Oligosaccharidketten, die Wasser binden. Es ist diese Eigenschaft, die den zähen schleimigen Charakter der Sekrete erklärt (Karlson, 1994).

Der Begriff Proteoglykan beschreibt Proteine mit unverzweigten Polysaccharidketten, den Glykosaminoglykanen, die O-glykosidisch über ein Linkertetrasaccharid bestehend aus GlcA( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Xyl( $\beta$ 1-O)Ser an spezifische Serinreste gebunden sind. Glykosaminoglykane sind aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut: Heparansulfat besteht aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin, Chondroitinsulfat aus Glukuronsäure und N-Acetylgalaktosamin, Keratansulfat aus Galaktose und N-Acetylglukosamin jeweils in unterschiedlichen Sulfatierungsgraden. Man findet Proteoglykane in der extrazellulären Matrix – als Bestandteil von Knorpel, Bindegewebe und Basalmembranen – und auf den Zelloberflächen von Epithelien (Selleck, 2000).

Glykolipide bestehen aus einem membranverankerten hydrophoben Aglykon und daran kovalent gebundenen Kohlenhydratresten. Nach Art der Lipidkomponente werden sie unterteilt in Glykoglycerolipide und die in Plasmamembranen tierischer Organismen am häufigsten anzutreffenden Glykosphingolipide, die sich von Ceramid ableiten.

## **3.2 Synthese von Glykokonjugaten**

### **3.2.1 Synthese von N-Glykanen**

Die Synthese von N-Glykanen beginnt an der zytosolischen Seite des rauen Endoplasmatischen Retikulums mit der Addition von Zuckern an Dolichol-Phosphat bis zum  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Dol-P}$ . Dieser Vorläufer wird ins Lumen des ER transloziert, und weitere vier Mannosereste und drei Glukosereste werden addiert. Als aktivierte Vorstufen dienen Dolicholphosphat-gebundene Zucker. Das präformierte Oligosaccharid wird durch die Oligosaccharyltransferase auf das Erkennungsmotiv Asn-Xaa-Ser naszierender Proteinketten übertragen. Dabei ist die  $\gamma$ -Aminogruppe des Asparaginrestes die Akzeptorstelle für das Glykan. Während des Transportes vom ER zum Golgi-Apparat erfährt das Glykan erste Prozessierungsschritte. Noch im ER werden die drei Glukosereste und ein Mannoserest abgespalten. Im frühen Golgi-Apparat werden weitere Mannosereste entfernt und anschließend die Protein-spezifischen Glykane aufgebaut. Hier dienen Zucker, die mit dem Phosphatrest eines Nukleosidmono- oder -diphosphats verestert sind (Nukleotidzucker), als Substrate der Glykosyltransferasen.

Da die Glykosyltransferasen nach einer strengen Ordnung über ER und Golgi-Zisternen verteilt sind, hängt die Gestalt der Glykane wesentlich von den im Protein enthaltenen Transportsignalen ab. Die weitere Prozessierung ist nicht einheitlich: Verschiedene

Zuckerreste werden angefügt, wobei eine unterschiedliche Anzahl von Verzweigungen entstehen kann (Wittmann, 2001; Helenius, 2001).

Im ER ist die N-Glykosylierung zusätzlich Teil eines Qualitätskontrollmechanismus. Die monoglukosylierte Kernstruktur wird von den Chaperonen Calnexin und Calretikulin erkannt. Über einen Glukosylierungs-Deglukosylierungs-Zyklus wird das Protein so lange im ER gehalten, bis die native Faltung hergestellt ist (Abb. 2).

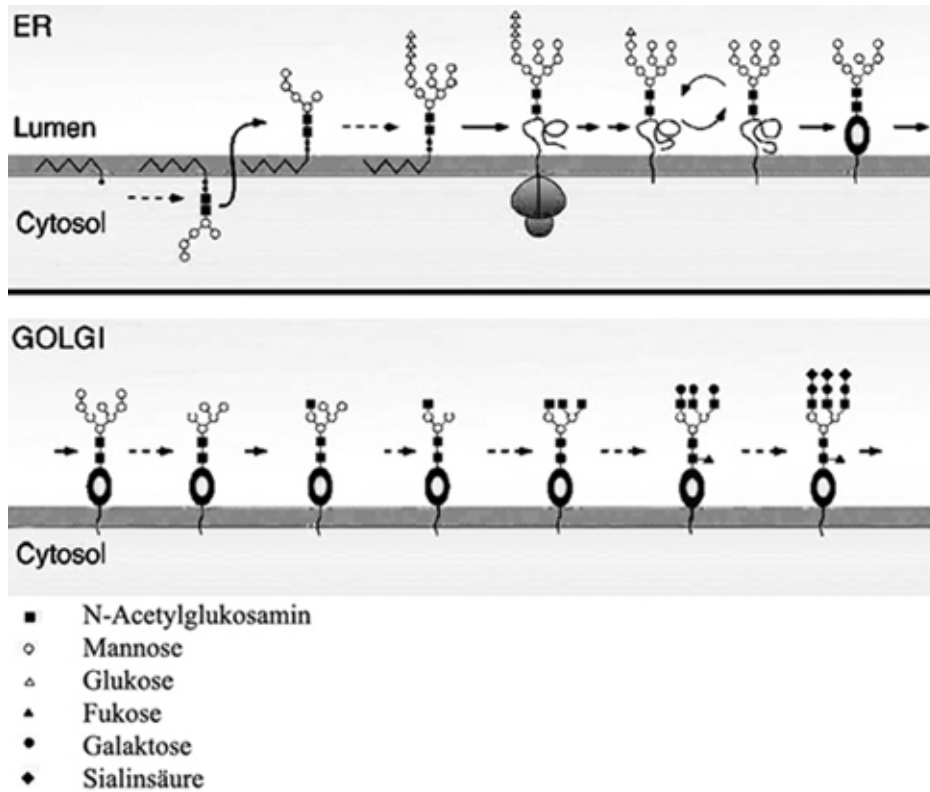


Abb. 2 N-Glykosylierung: Die Synthese der N-Glykane beginnt im ER mit dem Transfer eines Vorläufer-Oligosaccharids, das noch im ER weiter prozessiert wird. Im Golgi-Apparat folgen weitere Modifikationen (modifiziert nach Helenius, 2001).

### 3.2.2 Synthese von O-Glykanen

Im Gegensatz zur N-Glykosylierung findet die O-Glykosylierung komplett posttranslational und nach vollendeter Faltung an exponierten Stellen des Proteins statt. Eine Konsensussequenz wie bei N-Glykanen ist nicht bekannt. Die Monosaccharide werden schrittweise von den entsprechenden Glykosyltransferasen addiert, weshalb es keine einheitliche Kernstruktur gibt. Als aktivierte Vorstufen dienen ausschließlich Zuckernukleotide. Wiederum abhängig von der Ausstattung der Zelle mit Glykosyltransferasen entstehen verschiedene Strukturen. Eine Reihe verschiedener Verknüpfungen zwischen Protein und Kohlenhydratseitenkette sind bekannt: Am häufigsten anzutreffen sind O-Glykane vom Mucintyp, charakterisiert durch GalNAc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr-gebundene Glykane. EGF (*epidermal growth factor-like*)-Domänen verschiedener Blutgerinnungsfaktoren sowie von Notch sind mit zwei seltenen Zuckerstrukturen modifiziert, Fuc( $\alpha$ 1-O)Ser/Thr bzw. Glc( $\beta$ 1-O)Ser.

Kollagene können außerdem Glc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ -O)-Hydroxylysin enthalten. Eine ausführliche Liste von Strukturbeispielen und Referenzen findet sich unter Wittmann, 2001.

Die Synthese der Glykosaminoglykan-Seitenketten (Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatan-sulfat) der Proteoglykane beginnt mit der Addition eines Xyloserestes an spezifische Serinreste des Proteins. In Vertebraten existieren für diese Reaktion zwei Golgi-ständige Enzyme, Xylosyltransferase I (XT-I) und II (XT-II), die ein unterschiedliches gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen (Götting, 2007; Pönighaus, 2006; Schön, 2006). Es folgt die Addition zweier Galaktosereste und eines Glukuronsäurerestes.

Einen Sonderfall stellt Keratansulfat dar: Es ist nicht über den Tetrasaccharid-Linker an das Protein gebunden, sondern über N- oder O-Glykoside (Wittmann, 2001).

Die Glykosaminoglykane können durch Deacetylierung und Sulfatierung weiter modifiziert werden (Selleck, 2000; Rosenberg, 1997).

### 3.2.3 Synthese von Glykolipiden

Nukleotidzucker dienen ebenfalls als Substrate für die Glykosylierung von Lipiden. Nach Art des an das Ceramid gebundenen Monosaccharids werden zwei Arten Glykosphingolipide unterschieden: Galaktosylceramid, das nur mit Sulfat oder einem weiteren Galaktoserest modifiziert vorkommt und Glukosylceramid, das eine große Bandbreite an Modifikationen aufweisen kann.

## 3.3 Nukleotidzucker-Transporter

Da die Glykosylierung von Proteinen wie beschrieben im Lumen des ER und des Golgi-Apparates stattfindet, die Substrate der Glykosyltransferasen jedoch mit wenigen Ausnahmen im Zytosol synthetisiert werden, ist ein aktiver Transport der Nukleotidzucker ins Innere dieser Kompartimente notwendig. Diese Aufgabe wird von sogenannten Nukleotidzucker-Transportern (NST) realisiert, die in der ER- oder Golgimembran liegen (Hirschberg, 1998).

Durch Komplementationsstudien in Zelllinien mit Defekten im Transportsystem des jeweiligen Nukleotidzuckers wurden die cDNAs einiger Nukleotidzucker-Transporter identifiziert, darunter der UDP-Galaktose-Transporter aus *Homo sapiens* (Miura, 1996) und *Schizosaccharomyces pombe* (Tabuchi, 1997), der CMP-Sialinsäure-Transporter aus *Homo sapiens* (Ishida, 1998) und *Mus musculus* (Eckhardt, 1996) und der UDP-N-Acetylglukosamin-Transporter aus *Kluyveromyces lactis* (Abeijon, 1996).

Die Nukleotidzucker-Transporter werden der SLC35-Familie (*solute carrier family 35*) zugeordnet. Die bisher identifizierten Vertreter zeigen ähnliche Strukturmerkmale: Es handelt sich um stark hydrophobe Proteine mit meist zehn Transmembrandomänen (Gerardy-Schahn, 2001). Aufgrund der Ähnlichkeit untereinander konnten weitere potentielle Vertreter dieser Familie vorhergesagt werden, die dann in *in vitro* Transportassays (Perez, 1985) auf ihre Substratspezifität untersucht wurden (Tabelle 1). In der Regel scheinen NSTs nur ein

bestimmtes Zuckernukleotid zu transportieren, es sind aber inzwischen einige Transporter mit mehrfacher Substratspezifität beschrieben (Tabelle 1, 2).

In Abb. 3 sind die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der SLC35-Familie wiedergegeben; daraus ergibt sich die Einteilung in sechs Unterfamilien.

Bezeichnung	Transportspezifität	Referenz
SLC35A1	CMP-Sia	Eckhardt, 1996
SLC35A2	UDP-Gal, UDP-GalNAc	Miura, 1996; Segawa, 2002
SLC35A3	UDP-GlcNAc	Guillen, 1998
SLC35A4	n.b.	
SLC35A5	n.b.	
SLC35B1	n.b.	
SLC35B2	PAPS	Kamiyama, 2003; Luders, 2003
SLC35B3	n.b.	
SLC35B4	UDP-Xyl, UDP-GlcNAc	Ashikov, 2005
SLC35C1	GDP-Fuc	Lühn, 2001; Lübke, 2001
SLC35C2	n.b.	
SLC35D1	UDP-GlcA, UDP-GalNAc	Muraoka, 2001
SLC35D2	UDP-GlcNAc, UDP-Glc, GDP-Man	Ishida, 2005; Suda, 2004
SLC35D3	n.b.	
SLC35E1	n.b.	
SLC35E2	n.b.	
SLC35E3	n.b.	
SLC35E4	n.b.	
SLC35F1	n.b.	
SLC35F2	n.b.	
SLC35F3	n.b.	
SLC35F4	n.b.	
SLC35F5	n.b.	
SLC35F6	n.b.	

Tabelle 1 Die SLC35-Familie: Neben den bereits charakterisierten Nukleotidzucker-Transportern enthält die SLC35-Familie auch den PAPS-Transporter und zahlreiche Gene bisher unbekannter Funktion (n.b.= nicht bekannt)

NST (Organismus)	Transportspezifität	Referenz
SQV-7 ( <i>C. elegans</i> )	UDP-GlcA, UDP-GlcNAc, UDP-Gal	Berninsone, 2001
FRC ( <i>D. melanogaster</i> )	UDP-GlcA, UDP-GlcNAc	Selva, 2001
UDP-Gal-Transporter ( <i>H. sapiens</i> , <i>D. melanogaster</i> )	UDP-Gal, UDP-GalNAc	Segawa, 2002
SLC35B4 ( <i>H. sapiens</i> )	UDP-Xyl, UDP-GlcNAc	Ashikov, 2005
LPG2 ( <i>L. donovani</i> )	GDP-Man, GDP-Fuc, GDP-Ara	Hong, 2000

Tabelle 2 NSTs mit multipler Substratspezifität

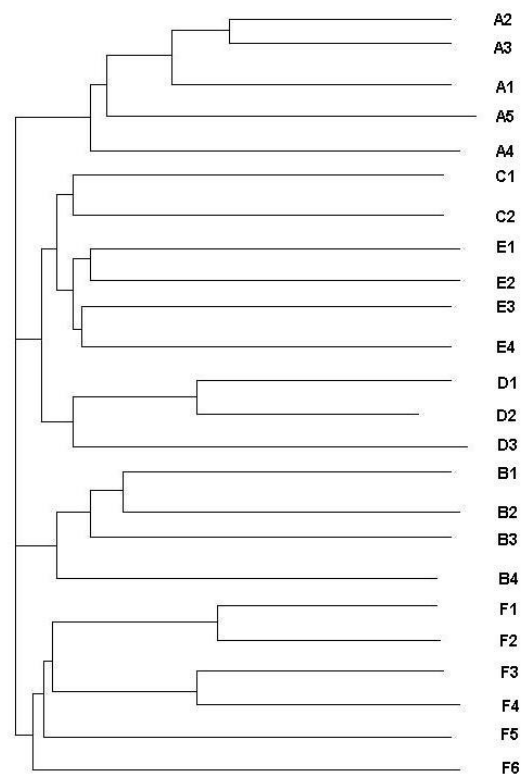


Abb. 3 Phylogenetischer Stammbaum der SCL35-Familie: Die Vertreter werden in sechs Unterfamilien eingeteilt (modifiziert nach Ashikov, 2005)

Die Transporter arbeiten als Antiporter (Abb. 4). Als treibende Kraft für den Import der Zuckernukleotide dient der Export der entsprechenden Nukleosidmonophosphate. Bei der Übertragung des Zuckers auf ein Protein durch eine spezifische Glykosyltransferase wird das Nukleosiddiphosphat (NDP) freigesetzt, das von einer Nukleosiddiphosphatase in Nukleosidmonophosphat (NMP) und Phosphat gespalten wird (Hirschberg, 1998; Kawakita, 1998).

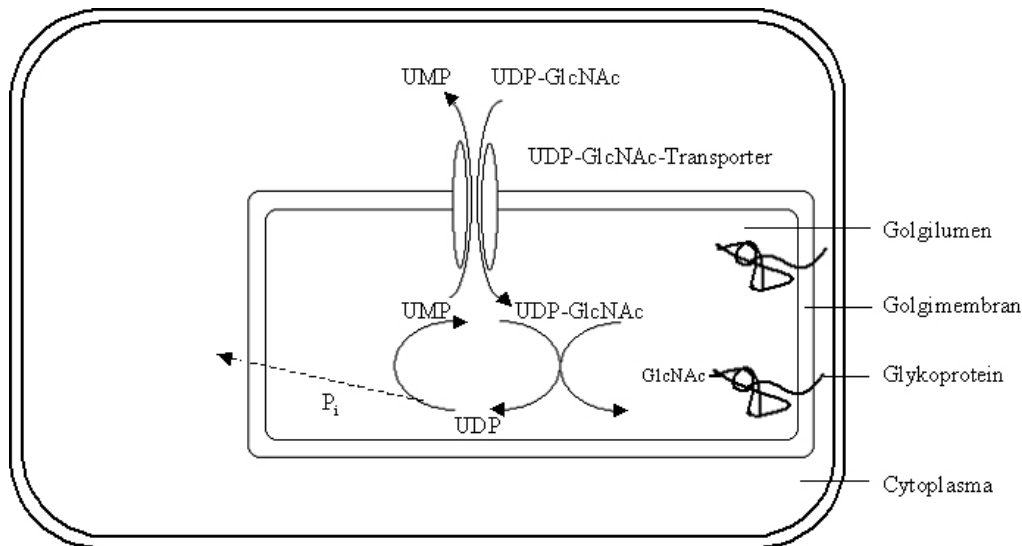


Abb. 4 Mechanismus der Nukleotidzucker-Transporter am Beispiel des UDP-N-Acetylglukosamin-Transporters (Kawakita, 1998).

Die Verteilung der NSTs innerhalb der Zelle wurde anfangs *in vitro* durch die Messung der Transportaktivität in differentiell zentrifugierten Mikrosomenfraktionen (ER-Fraktion: 10000 g bzw. Golgi-Fraktion: 100000 g) bestimmt. Man nimmt an, dass die NSTs entsprechend der Verteilung der entsprechenden Glykosyltransferasen in der Zelle angeordnet sind. So sollte beispielsweise ein CMP-Sialinsäure-Transporter im *trans*-Golgi lokalisiert sein, da Sialinsäure als einer der letzten Zucker in Glykokonjugate eingebaut wird. Die Identifizierung und Klonierung der NST-Gene ermöglichte darüber hinaus die Expression Epitop-markierter Proteine, so dass die Verteilung der NSTs auch durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden konnte.

### 3.3.1 SLC35B4

Das humane SLC35B4-Protein ist ein Golgi-ständiger bifunktionaler Nukleotidzucker-Transporter, der *in vitro* Transportaktivität für UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) und UDP-Xylose (UDP-Xyl) zeigt (Ashikov, 2005). Aufgrund dieser Spezifität war der Transporter von besonderem Interesse: Zum einen sind bereits mindestens zwei weitere UDP-GlcNAc-Transporter bekannt, die ebenfalls Golgi-Lokalisation aufweisen (Tabelle 1). Zum zweiten handelt es sich um den bisher einzigen identifizierten Transporter für UDP-Xyl. Auf die Besonderheiten dieses Zuckernukleotids wird in Abschnitt 3.5 eingegangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das homologe murine Gen (hier ebenfalls als *slc35b4* bezeichnet) untersucht. Der *slc35b4*-Lokus befindet sich auf Chromosom 6 des Mausgenoms und umfasst 28 kbp, bestehend aus zehn Exons (Abb. 5).

Die mRNA von 3,6 kb Länge enthält ein Leseraster von 996 Basen, der für ein stark hydrophobes, zehnfach die Membran durchspannendes Protein mit 331 Aminosäuren kodiert. Dabei entsprechen die Exons ungefähr den einzelnen Transmembrandomänen.



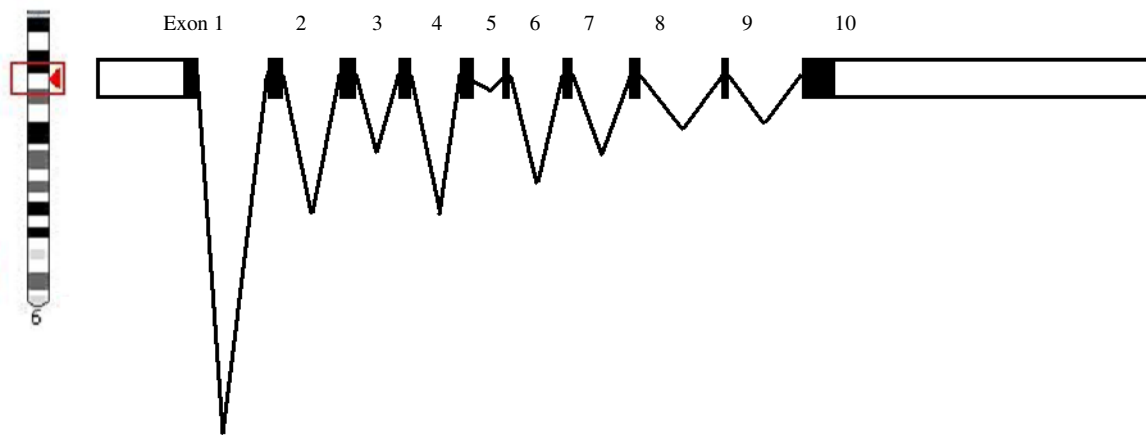


Abb. 5 Genomische Organisation des *slc35b4*-Lokus: Der Genlokus befindet sich auf Chromosom 6. Die kodierende Sequenz wird von neun Introns unterbrochen.

### 3.4 Defekte im Glykosylierungsweg – *congenital disorders of glycosylation* (CDGs)

Beim Menschen werden Krankheitsbilder, die auf fehlerhafte Glykosylierung zurückzuführen sind, unter *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG) zusammengefasst. Die derzeitige Nomenklatur erfasst in erster Linie Defekte im N-Glykosylierungsweg. Danach werden die CDGs in zwei Gruppen unterteilt (Freeze, 2001):

- CDG I umfasst Defekte in der Synthese und Übertragung des Dolicholpyrophosphat-gebundenen Oligosaccharids im ER
- CDG II betrifft die Prozessierungsschritte in ER und Golgi-Apparat.

Seit 1980 wurden 18 CDGs beschrieben: zwölf betreffen den N-Glykan-Aufbau, sechs die Prozessierung der proteingebundenen Oligosaccharide. Bis heute ist nur eine geringe Anzahl von CDG-Patienten bekannt. Die identifizierten Krankheitsbilder konnten sich ausbilden, da in allen Fällen noch eine Restaktivität des geschädigten Enzyms zu detektieren ist. Eine vollständige Inaktivierung von Faktoren, die in die Glykosylierung involviert sind, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits embryonal letal und entzieht sich damit der klinischen Beobachtung.

Diagnostisch fallen CDG-Patienten häufig durch ein verändertes Bandenmuster für das Transferrin in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) auf. Transferrin ist ein Serumprotein, das am Eisentransport beteiligt ist. Transferrin besitzt zwei biantennäre N-Glykane, die im Normalfall in allen Antennen Sialinsäurereste tragen. Da die Vollständigkeit der terminalen Sialylierung von der Integrität der Kernstrukturen abhängt, ist die Erkennung von Glykosylierungsdefekten anhand des Fehlens dieser Ladungsträger möglich. Mit dem Verlust der Ladung verändert sich der isoelektrische Punkt, was durch verändertes Laufverhalten in der IEF nachweisbar ist (Freeze, 2001).

Die Symptomatik der CDGs ist komplex. In fast allen Fällen sind jedoch psychomotorische Defekte zu beobachten (Jaeken, 2001). Etwa 20% der Patienten mit abnormen Transferrin-IEF-Mustern können nicht in dieses System eingeordnet werden (Freeze, 2001): Ein Mangel an Galaktosyltransferase I (wird auch als progressive Form des Ehlers-Danlos-Syndroms bezeichnet) führt zu fehlerhafter Synthese des Linkertetrasaccharids in Proteoglykanen; Defekte der Heparansulfat-Kopolymerase verursachen multiple Exostosen, benigne Knochentumoren (Jaeken, 2001).

### 3.4.1 Auf Defekten in NSTs beruhende Krankheitsbilder

Nukleotidzucker-Transporter versorgen Glykosyltransferasen mit Substraten. Daher können Mutationen in diesen Transportern eine Reihe von Glykosyltransferasen in ihrer Funktion beeinflussen. Die erste Fehlfunktion dieser Art wurde für *squashed vulva (sqv)*-Mutanten in *C. elegans* beschrieben. Acht *sqv*-Mutanten sind bekannt; sie alle sind aufgrund von Defekten in der Proteoglykansynthese während der Larvenentwicklung letal. Eins der Gene (*sqv-7*) wurde als Multisubstrat-NST identifiziert, der UDP-GlcA, UDP-GlcNAc und UDP-Gal transportiert (Berninsone, 2001; Tabelle 2).

Mutationen im *fringe connection (frc)*-Gen von *Drosophila melanogaster*, ebenfalls ein NST mit Spezifität für UDP-GlcA und UDP-GlcNAc, haben eine fehlerhafte Glykosylierung von Notch zur Folge und damit negative Auswirkungen auf die Notch-vermittelte Signaltransduktion (Goto, 2001).

Ein bei Rindern verbreiteter Defekt, CVM (*complex vertebral malformation*), der häufig zu prä- oder perinatalem Tod führt, konnte auf eine Mutation des UDP-GlcNAc-Transporters SLC35A3 zurückgeführt werden (Thomsen, 2006).

Das in die CDGs einzuordnende LAD-II (*leukocyte adhesion deficiency type II*) Syndrom bzw. CDG IIc beim Menschen beruht auf einem Defekt im GDP-Fukose-Transporter. Durch reduzierten Transport von GDP-Fukose können fukosylierte Glykokonjugate nur in eingeschränktem Maß synthetisiert werden. Patienten fallen durch psychomotorische und mentale Retardierung sowie Wachstumsstörungen und Immundefizienz auf (Lübke, 2001; Lühn, 2001).

Diese durch Mutationen in NSTs verursachten Schädigungen machen deutlich, wie wichtig NSTs für die Entwicklung höherer Organismen sind.

## 3.5 Xylosehaltige Strukturen in Mammaliern

### 3.5.1 Synthese von UDP-Xylose

In Mammaliern ist UDP-Xylose eins der wenigen Zuckernukleotide, die nicht im Zytoplasma synthetisiert werden. Ausgangssubstanz für die Synthese ist UDP-Glukose (UDP-Glc), die zunächst zu UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcA) oxidiert wird, welche dann ins Lumen des ER bzw. Golgi transportiert wird (Nuwayhid, 1986). Dort wird UDP-GlcA von der UDP-Xylose-Synthase (UXS) zu UDP-Xyl decarboxyliert (Abb. 6).

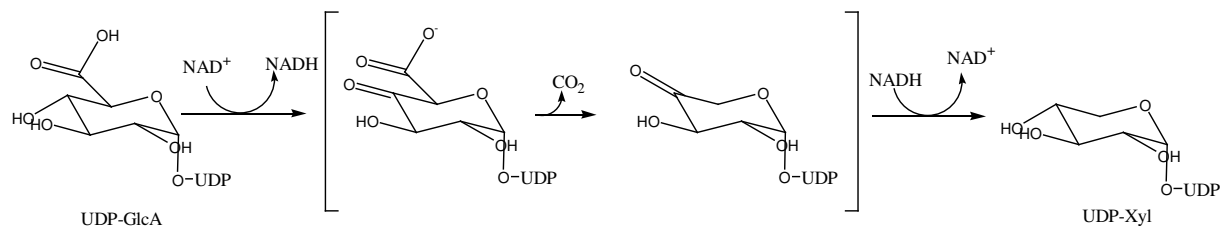


Abb. 6 Synthese von UDP-Xyl: UDP-GlcA wird von der UDP-Xylose-Synthase zu UDP-Xyl decarboxyliert

In Pflanzen existiert neben der membrangebundenen UXS auch eine zytosolische Form (Harper, 2002). Für tierische Zellen ist eine solche lösliche UXS jedoch bisher nicht bekannt. Dennoch wurde der Transport von UDP-Xyl in Golgi-Mikrosomenfraktionen beobachtet (Milla, 1992; Ashikov, 2005).

### 3.5.2 Vorkommen von Xylose

Während in Pflanzen xylosehaltige Zuckerstrukturen als Bestandteile der Zellwand weit verbreitet sind (Xylane, Xyloglukan), sind in Mammaliern lediglich zwei Strukturen bekannt: Xylose ist der erste Zuckerrest des Tetrasaccharidlinkers der Proteoglykane (Abb. 7A) und wird von den Golgi-ständigen Xylosyltransferasen XT-I (Schön, 2006) und XT-II (Götting, 2007) transferiert. Die zweite bekannte Xylose enthaltende Struktur ist ein Trisaccharid aus O-gebundener Glukose und zwei Xyloseresten (Abb. 7B), die auf bestimmten EGF-Domänen von Notch (Moloney, 1999) und auf mehreren Blutgerinnungsfaktoren (Hase, 1988) nachgewiesen wurden. Die korrespondierenden Xylosyltransferasen sind bisher nicht kloniert. Jedoch konnte die  $\alpha$ -1,3-Xylosyltransferase, die die Addition des ersten Xyloserestes katalysiert, aus Rinderleber aufgereinigt und deren Substratspezifität bestimmt werden (Ishimizu, 2007).

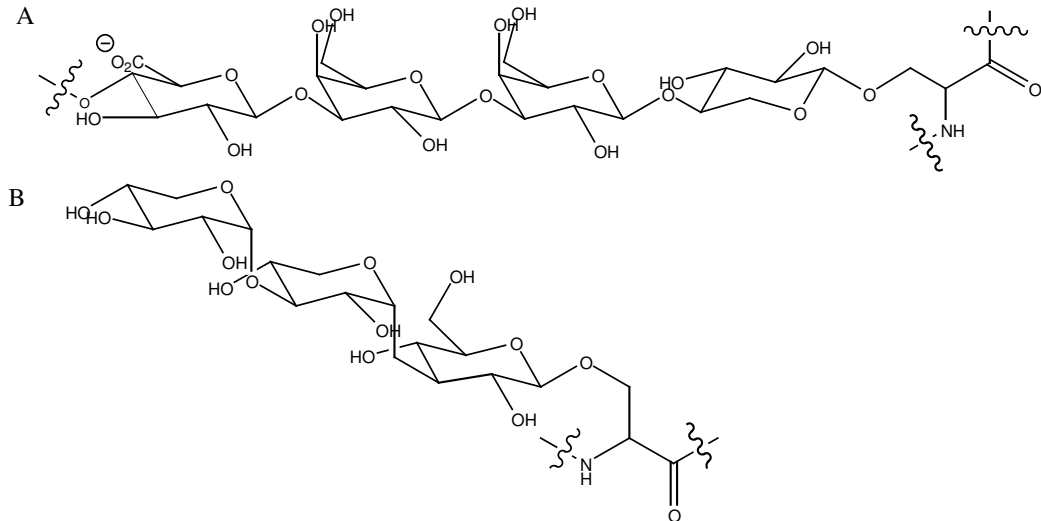


Abb. 7 Xylosehaltige Strukturen in Mammaliern: (A) Der Tetrasaccharidlinker der Proteoglykane besteht aus GlcA( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Xyl( $\beta$ 1-O)Ser. (B) Das Trisaccharid Xyl( $\alpha$ 1-3)Xyl( $\alpha$ 1-3)Glc( $\beta$ 1-O)Ser wurde als Modifikation auf EGF-Domänen von Notch sowie verschiedener Blutkoagulationsfaktoren nachgewiesen.

### 3.6 Notch

Die auf Notch basierende Signaltransduktionskaskade ist ein evolutionär konservierter Mechanismus der Zell-Zellinteraktion, der eine entscheidende Rolle in der Entwicklung mehrzelliger Organismen spielt. Zwischen benachbarten Zellen über Notchrezeptoren ausgetauschte Signale regulieren Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Artavanis-Tsakonas, 1999). Mammalier besitzen vier Varianten des Rezeptors, die als Notch1 bis Notch4 benannt sind. Die Notch-Gene codieren ca. 300 kDa große, einfach die Plasmamembran durchspannende Transmembranrezeptoren mit einer großen extrazellulären Region bestehend aus drei cysteinreichen Notch/Lin-12-Repeats und 36 EGF-Domänen. Die EGF-Domänen bestehen aus etwa 40 Aminosäuren; ihre Struktur wird wesentlich von sechs konservierten Cysteinresten bestimmt, die drei konservierte Disulfidbrücken ausbilden.

Einige der EGF-Domänen können an spezifischen Stellen mit O-Glykanen modifiziert werden (Abb. 8). Für die O-Glukosylierung wurde die Konsensussequenz  $C^1$ -X-S-X-P- $C^2$  beschrieben, wobei  $C^1$  der erste und  $C^2$  der zweite konservierte Cysteinrest ist, X eine beliebige Aminosäure und S der glukosylierte Serinrest. Für die O-Fukose-Modifikation scheint es keine strenge Konsensussequenz zu geben – beschrieben wurde  $C^2$ -X-X-X-(A/G/S)-(S/T)- $C^3$  als mögliche Konsensussequenz (Haines, 2003). O-Glukose und O-Fukose wurden zuerst auf EGF-Domänen von Faktoren der Blutgerinnungskaskade und Fibrinolyse identifiziert, später auch auf EGF-Domänen von Notch1 (Moloney, 2000b). Diese Monosaccharide können weiter verlängert werden zu Xyl( $\alpha$ 1-3)Xyl( $\alpha$ 1-3)Glc bzw. Sia( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Fuc.

O-Fukose ist eine essentielle Modifikation der Notchrezeptoren: Mäuse mit inaktiver O-Fukosyltransferase 1 (O-FucT-1) sterben in einem frühen embryonalen Stadium mit Defekten

in der Somitogenese, Kardiogenese, Vaskulogenese und Neurogenese (Shi, 2003). Die Elongation des O-Fukoserestes beeinflusst ebenfalls die Notch-Signaltransduktionskaskade: In Mammaliern wird beispielsweise durch die Elongation des Zuckers der Delta-Signalweg positiv (Brückner, 2000), der Jagged-Signalweg hingegen negativ reguliert (Moloney, 2002a). Der Einfluss der O-Glukosylierung ist bisher nicht untersucht. Bekannt hingegen ist, dass das Fehlen von O-Glukosylierungsstellen in Blutgerinnungsfaktoren nach einem bisher unbekanntem Mechanismus zu einer geringeren Koagulationsfähigkeit führt (Bjoern, 1991).



Abb. 8 Die extrazelluläre Region des murinen Notch1-Rezeptors (modifiziert nach Moloney, 2000b, Xu, 2005) setzt sich zusammen aus drei Notch/Lin-12-Domänen sowie 36 EGF-Domänen, die Konsensussequenzen für O-Fucosylierung, O-Glukosylierung oder beide Modifikationen enthalten können.

### 3.7 Proteoglykane und extrazelluläre Matrix

Proteoglykane sind Bestandteile der EZM sowie des Knorpels, der Basalmembranen und des Bindegewebes. Es handelt sich dabei um Proteine mit einer oder mehreren langen unverzweigten Glykosaminoglykan-Seitenketten, die mit Ausnahme von Keratansulfat über einen Tetrasaccharidlinker mit spezifischen Serinresten des Proteins O-glykosidisch verknüpft sind (Abb. 7). Die Größe des Kernproteins kann zwischen 10 und 400 kDa liegen, die des gesamten Proteoglykans zwischen 80 und 3500 kDa (Neuberger, 1997).

Nahezu alle tierischen Zellen exprimieren Proteoglykane, die entweder an die EZM abgegeben oder in die Plasmamembran eingebaut werden. Die Hauptkomponenten der EZM sind Proteine, die Stabilität und Elastizität verleihen (verschiedene Kollagen-Typen, Elastin), adhäsive Glykoproteine (Fibronektin, Laminin) und Proteoglykane, die eine Hydragelmatrix bilden und damit widerstandsfähig gegen Kompression sind (Varki, 1999). Die EZM bestimmt die physikalischen Eigenschaften von Geweben und viele der biologischen Eigenschaften der darin eingebetteten Zellen. So kann die EZM kalzifiziert werden, um

Strukturen wie Knochen oder Zahnschmelz zu bilden. Auch transparente Strukturen wie die Kornea werden von der EZM ausgebildet, ebenso sehr reißfeste wie beispielsweise Sehnen (Alberts, 2002).

Im Wesentlichen bestimmen die Glykosaminoglykane die Eigenschaften und Funktionen der Proteoglykane. So sind sie an der Musterbildung beteiligt und regulieren als Korezeptoren die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren wie die des *fibroblast growth factor* (FGF) (Olwin, 1992). Defekte im Syntheseweg der Glykosaminoglykane haben aufgrund der vielfältigen Funktionen weitreichende Folgen. Bekannt sind Mutationen in den Genen EXT1 und EXT2, die die Heparansulfat-Kopolymerase kodieren und die progressive Form des Ehlers-Danlos-Syndroms, bei dem die Synthese des Tetrasaccharidlinkers gestört ist (Jaeken, 2001).

### 3.8 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Weg der zellulären Abwehr gegen Viren und Transposons, sowie eine Form der posttranskriptionalen Genregulation (PTGS = *post-transcriptional gene silencing*) (Caplen, 2001; Tuschl, 1999).

Die Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Zellen führt zu spezifischer Degradation der komplementären Ziel-mRNA. Dieser Mechanismus wurde zuerst für *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire, 1999): Dicer, eine Endonuklease des RNase III-Typs, schneidet längere dsRNA in 19-mer RNA-Duplexe, die *small interfering RNAs* (siRNAs). Nach dem Entwinden der Duplex wird ein Strang in den *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut, während der andere abgebaut wird. Welcher Strang in den RISC gelangt, ist von der Stabilität der überhängenden Enden siRNA-Duplex abhängig (Tomari, 2004). Dieser Komplex ist in der Lage, an komplementäre mRNA zu binden und diese spezifisch zu degradieren (Abb. 9).

Im Gegensatz dazu führt das Einbringen langer dsRNA (> 30 Nukleotide) in somatische Zellen höherer Organismen zu einer Interferonantwort und damit zu einer allgemeinen Inhibition der Proteinbiosynthese und letztlich zum Zelltod (Tuschl, 1999). Jedoch wurde festgestellt, dass kurze synthetische dsRNAs, die den natürlich auftretenden siRNAs nachempfunden sind, sequenzspezifische Degradation der mRNA katalysieren können (Caplen, 2001).

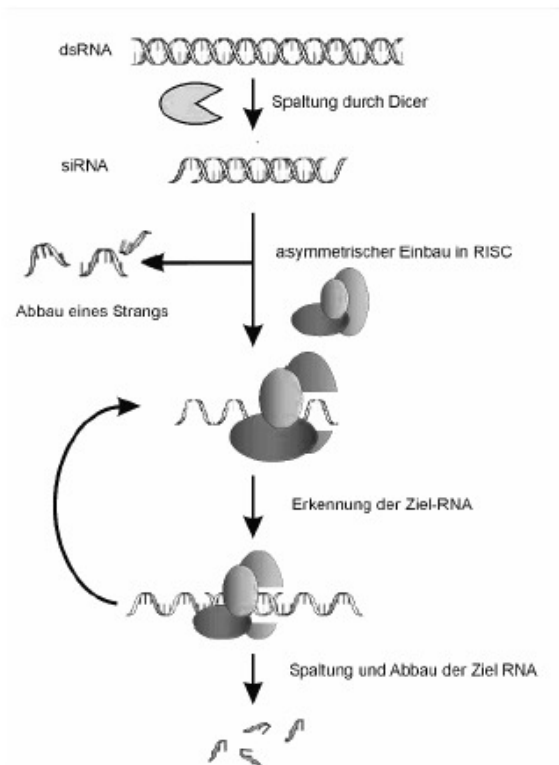


Abb. 9 Mechanismus der RNA-Interferenz: Doppelsträngige RNA wird von Dicer in kurze RNA-Stränge gespalten, die dann in den RNA-induzierten Silencing-Komplex RISC eingebaut werden. Mit Hilfe dieses Komplexes wird die Ziel-RNA erkannt und degradiert. (modifiziert nach Novina, 2004)

Neben der Möglichkeit, die siRNA-Moleküle direkt in die Zellen einzubringen, was aber durch Verdünnung bei der Zellteilung zu einem raschen Abflauen des Effektes führt, existiert die Variante der DNA-induzierten RNA-Interferenz. Dazu wird ein Vektor, der für sogenannte *short inhibitory RNA* (shRNA) unter einem U6- oder H1-Promotor codiert, transient oder stabil transfiziert. Diese Promotoren kontrollieren die RNA-Polymerase III, die kurze RNAs ohne Cap-Strukturen und PolyA-Schwanz synthetisiert (z.B. tRNA). Die endogen transkribierte shRNA faltet sich dann aufgrund ihrer Loop-Struktur zu einem dsRNA-Duplex, der von Dicer zu siRNA prozessiert wird.

In beiden Fällen wird jedoch kein vollständiger Knockout erzielt, sondern lediglich eine Reduktion der Expression – zum Teil allerdings um bis zu 95%. Die Effizienz des Knockdown kann abhängig von der Zielsequenz, der Insertionsstelle im Genom, aber auch vom untersuchten Gewebe stark variieren (Seibler, 2005).

Der Vorteil gegenüber dem klassischen Knockout ist die Dominanz des Effektes, ohne dass homozygote *loss-of-function* Mutanten erzeugt werden müssen.

### 3.8.1 Funktionstest der shRNAs

Da nicht alle siRNAs bzw. shRNAs gleichermaßen RNA-Interferenz induzieren, ist es nötig, die Reduktion der Expression des Zielgens zu überprüfen. Dazu kann man den Effekt auf mRNA-Ebene oder Proteinebene direkt messen. Da aber insbesondere bei transienter Transfektion die Transfektionseffizienz meist deutlich unter 100% liegt, würde die mRNA

bzw. das Protein der nichttransfizierten Zellen den Nachweis erheblich stören. Um dieses Problem zu umgehen, wäre eine Anreicherung der transfizierten Zellen möglich, wenn beispielsweise GFP kotransfiziert würde. Noch unkomplizierter ist jedoch der Einsatz eines kotransfizierten Reportergens. Da Reporter und siRNA bzw. shRNA durch Kotransfektion in die gleichen Zellen aufgenommen werden, stören nichttransfizierte Zellen den reporterbasierten Assay nicht.

### 3.9 Zielsetzung

Zunächst sollten die subzelluläre Lokalisation und die Transportspezifität, die bisher nur für den humanen UDP-Xyl-/UDP-GlcNAc-Transporter bekannt waren, für das homologe Transportprotein der Maus, Slc35b4, bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Generation eines Maus-Deletionsmodells für den bifunktionellen Nukleotidzucker-Transporter Slc35b4, anhand dessen die physiologische Funktion des Transporters aufgeklärt werden sollte. Dazu wurde ein Knockout-Konstrukt erstellt, bei dem das erste Exon durch ein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen ersetzt wurde. Dieses Konstrukt dient gleichzeitig als Reporter, mit dessen Hilfe das Expressionsmuster des *slc35b4* bestimmt werden sollte.

Möglicherweise wäre der komplette Knockout jedoch schon in einem frühen embryonalen Stadium letal, wenn der Transporter für die Glykosylierung und damit für die Funktion von Notch und Bestandteilen der EZM essentiell ist. Daher war ein weiterer Punkt dieser Arbeit die Generation eines konditionellen Allels, mit dessen Hilfe die möglicherweise auftretende embryonale Letalität umgangen wird und Untersuchungen am erwachsenen Tier vorgenommen werden können.

Weiterhin wurde parallel dazu in einem auf RNA-Interferenz basierenden Ansatz auf Zellkulturebene geprüft, inwiefern Slc35b4 an der korrekten Glykosylierung der Proteoglykane und der EGF-Domänen von Notch und verschiedenen Blutgerinnungsfaktoren beteiligt ist. Dazu sollten zunächst möglichst effektive shRNA-Sequenzen identifiziert werden, die anschließend mittels vektorbasierter RNA-Interferenz stabil in eine Zelllinie transfiziert werden sollten. Die erhaltenen Klone sollten sowohl auf mRNA-Ebene als auch anhand der Transportaktivität und auf Produktebene charakterisiert werden.



## 4 Material

### 4.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Labortiere

#### Bakterienstamm

*Escherichia coli* XL1-Blue, CaCl<sub>2</sub>-kompetent (Bullock, 1987)  
*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB lacIqZM15 Tn10* (Tetr)]

#### Zelllinien

E 14-1 embryonale Stammzelllinie aus dem Mausstamm 129/Ola (A<sup>W</sup>, c<sup>ch</sup>, p; H-2<sup>b</sup>, IgH<sup>a</sup>) (Hooper, 1987; Handyside, 1989)  
 NIH/3T3 Mausfibroblastenzelllinie ATCC CRL-1658  
 P19 Mauskarzinomzelllinie (C3H/He) ATCC CRL-1825  
 F9 Mauseratomzelllinie (129) ATCC CRL-1720  
 NIH/3T3-LC2 im Rahmen dieser Arbeit isolierter Klon, stabil mit psiSTRIKE-2-neoGFP transfiziert  
 NIH/3T3-QE10 im Rahmen dieser Arbeit isolierter Klon, stabil mit psiSTRIKE-2-neoGFP transfiziert

*S. cerevisiae* BY4741 Mat a; *his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YEL004w::kanMX4* (EUROSCARF)

#### Labortiere

C57Bl/6J ca. 12 Wochen alte weibliche Tiere (Charles River)  
 C57Bl/6J-Tg(neo) ca. 12 Wochen alte männliche Tiere (Ulrich Rüther)

### 4.2 Plasmide und Oligonukleotide

#### 4.2.1 Plasmide

DTGemBH1 pGEM mit Diphtherietoxin A-Kassette mit PGK-Promotor und Sv40 PolyA, *Bam*HI-Schnittstelle entfernt

pAcGFP1-Golgi Golgi-Marker zur Expression in eukaryotischen Zellen, kodiert ein Fusionsprotein aus *Aequorea coerulea* GFP (AcGFP1) und dem N-Terminus (81 AS) der humanen  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase (Clontech)



Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

pBSneo	PGK-neo-Kassette mit flankierenden <i>loxP</i> -Stellen in pBluescript, <i>XbaI/HindIII</i> -Fragment aus BW1194 in pBluescript
pcSlc35b4MycHis	<i>open reading frame</i> von <i>slc35b4</i> über <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> in pcDNA3.1/myc-His A eingefügt
pcDcnMycHis	<i>open reading frame</i> des murinen Decorin-Gens über <i>BamHI</i> und <i>SpeI</i> in pcDNA3.1/myc-His A <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> eingefügt
prodApBS	3,8 kbp <i>NotI/PstI</i> -Fragment aus pProdA in pBluescript
prodA-DT	Fragment A mit DT-Kassette in pSP72 über die <i>HincII</i> und <i>NsiI</i> -Schnittstellen
prodA-DT-LZ	<i>StuI/SacII</i> Fragment aus prodLZ1 in prodA-DT
prodB-Nco	Fragment B mit <i>NcoI</i> -Schnittstelle hinter dem Startkodon, durch Mutagenese mit JF F8 und JF B9 eingeführt
prodCD	1,2 kbp <i>NheI</i> Fragment aus pProdC in pProdD
prodLZ1	Fragment B mit $\beta$ -Galaktosidase-Gen anstelle des Exon 1, eingefügt in <i>NcoI/KpnI</i> -Schnittstellen
prodLZ2	3,2 kbp <i>BseRI/SacII</i> -Fragment aus prodCD in prodLZ1
prod26	enthält Fragment B mit $\beta$ -Galaktosidase-Gen, neo-Kassette und die Fragmente C und D (in pSP72)
prod27	Targeting-Vektor für konstitutionellen Knockout
pSI-Check-SLC35B4	RNAi-Kontrollvektor mit <i>slc35b4</i> -cDNA, eingefügt in <i>XhoI</i> und <i>NotI</i>
psiSTRIKE-sh1-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh117 A und JFsh118 B als shRNA-Templates
psiSTRIKE-sh2-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh119 A und JFsh120 B als shRNA-Templates
psiSTRIKE-sh3-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh121 A und JFsh122 B als shRNA-Templates

psiSTRIKE-sh4-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh123 A und JFsh124 B als shRNA-Templates
psiSTRIKE-sh5-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh125 A und JFsh126 B als shRNA-Templates
psiSTRIKE-sh6-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh127 A und JFsh128 B als shRNA-Templates
psiSTRIKE-scr-GFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFscrA und JFscrB als <i>scrambled</i> shRNA-Templates
psiSTRIKE-sh2-neo	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh119 A und JFsh120 B als shRNA-Templates und PGK-neo-Kassette
psiSTRIKE-sh2-neoGFP	shRNA-Expressionsvektor mit JFsh119 A und JFsh120 B als shRNA-Templates, neo-Kassette und CMV-GFP; neo-Kassette über <i>ApaI/AccI</i> eingefügt in <i>ApaI</i> -Schnittstelle
pSP72-Sma	pSP72-Vektor ohne <i>SmaI</i> -Schnittstelle; geöffnet mit <i>XmaI</i> , <i>Kleenow-fill-in</i> und Religation

#### 4.2.2 Oligonukleotide

Die Primer wurden von MWG Biotech bezogen und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 100 µM gebracht. Aus dieser Stammlösung wurden die für die Reaktionen verwendeten Verdünnungen von 10 µM angesetzt.

Die shRNA Templates wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl angesetzt. Oligonukleotide mit einer Länge über 60 Basen wurden nach der HyPur-Methode aufgereinigt, alle anderen nach der HPSF-Methode. Die Sequenzen sind in der Richtung 5' → 3' aufgeführt.

#### RT-PCR-Primer

BW F 28	CGT TTG CGC AGT TCT TAT TTA TTG	<i>slc35b4</i>
BW B 29	TGC CCA TTC TTG CCG ACA TC	<i>slc35b4</i>
BW F30	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC	<i>HPRT</i>
BW B31	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T	<i>HPRT</i>
BW B32	TTT TTT TTT TTT TTT	Oligo-dT-Primer
JF F188	GCA GTC CCA GCG TCG TG	<i>HPRT</i>
JF B189	GGC CTC CCA TCT CCT TCA T	<i>HPRT</i>
JF F223	TGT CGT GAC TCA ATA TGT GTG CAT	<i>slc35b4</i> (real-time PCR)
JF B224	AGT GTG ACG GTG AGG GAG GTA	<i>slc35b4</i> (real-time PCR)

JF F225	TCC AGT CAT CGG TGT GAC GAT	<i>slc35b4</i> (real-time PCR)
JF B226	GCA CAC ATA TTG AGT CAC GAC ATT	<i>slc35b4</i> (real-time PCR)
JF F227	TCC ATT CCT ATG ACT GTA GAT TTT ATC AG	<i>hprt</i> (real-time PCR)
JF B228	AAC TTT TAT GTC CCC CGT TGA CT	<i>hprt</i> (real-time PCR)
JF F229	CGT CGT GAT TAG CGA TGA TGA	<i>hprt</i> (real-time PCR)
JF B230	TCC AAA TCC TCG GCA TAA TGA	<i>hprt</i> (real-time PCR)

### Klonierungsprimer

JF F8	CCG GCC ATG <u>GGC CCG</u> GCC T	<i>NcoI</i> Mutagenese, <i>slc35b4</i>
JF B9	AGG CCG <u>GGC CCA</u> TGG CCG G	<i>NcoI</i> Mutagenese, <i>slc35b4</i>
JF F113	GAT TGG GGC GGT CTG AGG AG	Southern Blot Sonde, <i>slc35b4</i>
JF B114	GGG CCC CAA AGT AGG AG	Southern Blot Sonde, <i>slc35b4</i>
JF B222	CTA <u>TTC TAG</u> AGT CCT TCT TGT CAT CCT TTT GC	<i>slc35b4</i> -ORF, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
JF F223	CAT <u>GGA TCC</u> ATG CGC CCG GCC TTC GCG GTG GG	<i>slc35b4</i> -ORF, <i>XbaI</i> - Schnittstelle
JF F233	GCT <u>CGG ATC</u> CAT GAA GGC AAC TCT C	<i>decorin</i> -ORF, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
JF B235	CCC <u>ACT AGT</u> CTT GTA GTT TCC AAG	<i>decorin</i> -ORF, <i>SpeI</i> - Schnittstelle

### Screeningprimer

JF B81	ATC GTT CGG CGT ATC G	LacZ Screening, konst. Knockout
JF F80	TAA GGA AGG AGG GAG GGG TAA	LacZ Screening, konst. Knockout
JF F209	GGC CTA TTT CCC ATG ATT CCT TC	U6/sh2
JF B210	TTA TGC TTC CGG CTC GTA TGT TGT	U6/sh2
JF F211	CCC CCT GCC CTT CGC TTA TG	GFP
JF B212	CTT GGC TTT GTA GGT GGT CTT GAA	GFP

### Sequenzierprimer

BWseqF47	GGA AGA TGA AAA TGA AAA AGA AGT
BWseqF48	ACT GTC GAG CCG TGA AAG
BWseqF49	AAA GTT GCT GGG TTG TT
BWseqB50	ATA CCA GAA AGG CAA TTA GAA CCA
BWseqB51	TGC CCT CGA GAA AAA GAA AAC AAG
BWseqB52	GGT GCC CCA GAA GAA AT
JF F28	ACC TCC CCC TGA ACC TGA AAC ATA
JF B29	CTG GAT GCT AAC GAA TGG AGG AG
JF F61	TTG AAA GAA GGG ATG GTT GAG C

JF F62 TAG ACT AGA GTT ATC AGA GGA C  
 JF F63 TTG ATG CAT ATT TTC TTA CTG A  
 JF B64 CTA AAG ATG TCC CAG GTG AGC A  
 JF B65 GTA AGA GGC AAG GAA GAC AAC A  
 JF B66 AAA ATG GAG ACA GTA TGA GTG C  
 JF F67 AGT TGT GAT GGA GAT AAG TGT A  
 JF F68 CCC CTG CTG GCT AAA CTG TCT C  
 JF F69 TGT TTA TTT TTA CTC TTG ATT G  
 JF B70 ACG CTG ACA GTG AAG AAC  
 JF B71 TGG CCA GAG TCT TTG TCA TTT C

### GATC-Standardprimer

BGH-Reverse TAGAAGGCACAGTCGAGG  
 T3 ATTAACCCTCACTAAAGGGA  
 T7 TAATACGACTCACTATAGGG

### shRNA-Templates

Die shRNA-Zielsequenzen sind unterstrichen.

JFsh117 A ACC GTA AGG TAC TAT GCC ATC ATT TAA GTC CTC TAA ATG  
ATG GCA TAG TAC CTT ATT TTT C  
 JFsh118 B TGC AGA AAA ATA AGG TAG TAT GCC ATC ATT TAG AGG ACT  
 TAA ATG ATG GCA TAG TAC CTT A  
 JFsh119 A ACC GCA TGA TTC TAG GAA TTA TCT TAA GTC CTC TAA GAT  
ATT TCC TAG AAT CAT GTT TTT C  
 JFsh120 B TGC AGA AAA ACA TGA TTC TAG GAA TTA TCT TAG AGG ACT  
 TAA GAT AAT TCC TAG AAT CAT G  
 JFsh121 A ACC GGA TAC AGT ATG TTC AAG TAT TAA GTC CTC TAA TAC  
TTG AAC ATA CTG TAT CTT TTT C  
 JFsh122 B TGC AGA AAA AGA TAC AGT ATG TTC AAG TAT TAG AGG ACT  
 TAA TAC TTG AAC ATA CTG TAT C  
 JFsh123 A ACC GTA AGT CTG AAC TCT ATC AAT TAA GTC CTC TAA TTG  
ATA GAG TTC AGA CTT ATT TTT C  
 JFsh124 B TGC AGA AAA ATA AGT CTG AAC TCT ATC AAT TAG AGG ACT  
 TAA TTG ATA GAG TTC AGA CTT A  
 JFsh125 A ACC GGC CAC CAG CTA TCC CAA TAT TAA GTC CTC TAA TAT  
TGG GAT AGC TGG TGG CTT TTT C  
 JFsh126 B TGC AGA AAA AGC CAC CAG CTA TCC CAA TAT TAG AGG ACT  
 TAA TAT TGG GAT AGC TGG TGG C  
 JFsh127 A ACC GGG TAC TAT GCC ATC ATG GTT TAA GTC CTC TAA ACC  
ATG ATG GCA TAG TAC CTT TTT C  
 JFsh128 B TGC AGA AAA AGG TAC TAT GCC ATC ATG GTT TAG AGG ACT  
 TAA ACC ATG ATG GCA TAG TAC C  
 JFsh\_scrA ACC GTC TAA TCG TTA ACG TGA TAT TAA GTT CTC TAA TAT  
 (scrambled) CAC GTT AAC GAT TAG ATT TTT C  
 JFsh\_scrB TGC AGA AAA ATC TAA TCG TTA ACG TGA TAT TAG AGA ACT  
 (scrambled) TAA TAT CAC GTT AAC GAT TAG A

## 4.3 Antikörper

### 4.3.1 Primäre Antikörper

Maus anti-Flag M5	monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) gegen das Flag-Epitop (MDYKDDDDK) gerichtet (Sigma)
Maus anti-Myc 9E10	monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) gegen das Myc-Epitop gerichtet (EQLLISEELDL) (Roche)
Maus anti-Hexa-His	monoklonaler Antikörper (Maus IgG) gegen das Hexahistidin-Epitop gerichtet (Qiagen)
P869	monoklonaler Antikörper mit VSV-Tag gegen Heparansulfat gerichtet (van Kuppevelt)
Maus anti-VSV	monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) gegen das VSV-Epitop gerichtet (Sigma)
Ratte anti-Decorin	monoklonaler Antikörper (Ratte IgG2) gegen rekombinantes murines Decorin gerichtet (R&D Systems)

### 4.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche
Anti-Maus-IgG-Cy3 Konjugat	Sigma
Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Dianova
Anti-Ratte-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Dianova
Anti-Maus-IgG-Alexa674-Konjugat	Invitrogen
IRDye800 Esel-anti-Maus	Li-Cor
IRDye800 Ziege-anti-Ratte	Li-Cor

## 4.4 Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Desoxyribonuklease I, RNase-frei	Promega
Expand High Fidelity <sup>PLUS</sup> PCR System	Roche
MMuLV Reverse Transkriptase	New England Biolabs
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen

Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Fermentas
Ribonuklease A	Roche
RNAse Inhibitor	Fermentas
SP6-RNA-Polymerase	Roche
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T3-RNA-Polymerase	Roche
T4-Ligase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	Roche
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs, Promega
Zymolyase	ICN Biomedicals, Inc.

## 4.5 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Sigma, Fluka oder Merck bezogen und sind nicht extra aufgeführt.

Acrylamid 40%	Applichem
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
BM Purple AP Substrat	Roche
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat)	Applichem
Blockierungsreagenz	Roche
Bromphenolblau	Applichem
BSA ( <i>bovine serum albumine</i> )	Applichem
Chloroform	J.T.Baker
CSPD, ready to use (0,25mM)	Roche
DIG-Ribonukleotide	Roche
dNTPs (je 100 mM ATP, CTP, GTP, TTP)	Pharmacia
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Formamid	Applichem
Hepes	Applichem
IPTG	Applichem
Ketanest (Ketaminhydrochlorid, 10%ig)	WDT
Leucin	Sigma
Lysin	Sigma
Magermilchpulver	Applichem
Methionin	Sigma
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Applichem
Mowiol	Calbiochem
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Superflow	Qiagen



Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Applichem
Nonidet P-40	Roche
Orange G	Fluka
<sup>32</sup> P- $\alpha$ -dCTP	Amersham
Paraformaldehyd (PFA)	J.T.Baker
PEG-3350	Fluka
Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche
Ponçeau S	Sigma
Rompun (Xylazinhydrochlorid, 2%ig)	Bayer
ROX	Invitrogen
Sorbitol	Sigma
SyBrGreen	Invitrogen
Szintillator Filtersafe	Zinsser Analytic
N, N, N', N'-Tetraethylendiamin (TEMED)	Serva
X-Gal	Roth

## 4.6 Nährmedien, Puffer und Zusätze

### 4.6.1 Nährmedien

Ampicillin, Natriumsalz	Serva
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bactotrypton	Becton Dickinson
Bacto-Yeast Stickstoffe Base	Becton Dickinson
Carbenicillin, Dinatriumsalz	Fluka
DMEM (High glucose)	Biochrom
ESGRO (LIF)	Chemicon
FCS	Biochrom
Glutamin (200 mM)	Seromed
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Kanamycin	Sigma
Penicillin (5000 U/ml)/	
Streptomycin (5000 $\mu$ g/ml)	Biochrom
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,53 mM)	GibcoBRL
1x LiAc	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5
1x LiAc/0,5x TE	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5 5 mM Tris/HCl, pH 7,5 0,5 mM EDTA

1x LiAc/40% PEG-3350/1xTE	100 mM Lithiumacetat, pH 7,5 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 40% PEG-3350
20x Aminosäure-Mix (500ml)	0,5 g Histidin 1 g Leucin 1 g Lysin 0,5 g Methionin
Beschichtung der Zellkulturgefäße	0,2% Gelatine in PBS, pH 7,2
Einfriermedium für ES und MEF	45% ES-Medium 45% FCS 10% DMSO
Einfriermedium für NIH/3T3, F9, P19	Zellkulturmedium mit 5% DMSO
ES-Medium	DMEM mit 2 mM Glutamin 0,1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 15% FCS
Färbelösung (X-Gal-Färbung)	1 mg/ml X-Gal 5 mM Kaliumcyanoferrat(II)/(III) 4 mM $MgCl_2$ in PBS
LB-(Luria-Bertani)-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar
LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl, pH 7,5
PBS für Zellkultur	10 mM Natriumphosphat, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM KCl

SC-Platten für Hefekultur	0,67% Bacto-Yeast Stickstoffe Base 1x Aminosäuremix 2% Glukose 2% Agar
SD-Flüssigmedium (Hefe)	0,67% Bacto-Yeast Stickstoffe Base 1 x Aminosäure-Mix 2% Glukose
X-Gal-Stocklösung	40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid
Zellkulturmedium für NIH/3T3, F9, P19	DMEM mit 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 10% FCS

#### 4.6.2 Puffer

##### DNA-Aufreinigung

Lysispuffer	200 mM NaOH 1% SDS
Lysispuffer (genomische DNA, ES-Zellen)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS
Neutralisationspuffer	3 M KAc, pH 5,5
Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A

##### PCR

10x PCR-Puffer 15 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mM Tris/HCl, pH 8,3 500 mM KCl, pH 8,3 15 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01% Gelatine
dNTP-Mix	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10mM dGTP, 10 mM dTTP

**Agarose-Gelelektrophorese**

1x FA-Puffer	20 mM MOPS 5 mM NaAc 1 mM EDTA pH 7,0
1x TAE	40 mM Tris-Acetat 2 mM EDTA pH 8,5
1x TBE	100 mM Tris/HCl 100 mM Borsäure 2,5 mM EDTA, pH 8,0
Agarose-Auftragspuffer	50% 10x TBE 50% Glycerol Farbstoff Orange G
RNA-Auftragspuffer	20% Glycerol 50% Formamid 10 mM EDTA, pH 8,0 2,2 M Formaldehyd 0,2% Bromphenolblau

**Northern und Southern Blot**

10x Blockierungslösung	10% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaAc pH 7,0
Church-Puffer (Southern Blot)	300 mM NaPi, pH 6,7 7% SDS 5 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Detektionspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl

High SDS-Puffer	7% SDS 50% Formamid 5x SSC 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0 0,1% N-Lauroylsarcosin 2% Blockierungslösung
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5
NaPi-Stocklösung, pH 6,7	0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6,7 eingestellt
STE-Puffer	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
Waschpuffer A	2x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer B	0,1x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer C	Maleinsäurepuffer 0,3 % Tween 20
Waschpuffer (Southern Blot)	40 mM NaPi, pH 6,7 1% SDS
<b>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese</b>	
2x Probenpuffer für NST	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 7 M Harnstoff 1% SDS 10% Glycerol 0,1% Bromphenolblau
5x Laemmli	600 mM Tris/HCl, pH 6,8 10% SDS 40% Glycerol 0,4% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol

SDS-Page-Elektrophoresepuffer  
50 mM Tris  
380 mM Glycin  
0,1% SDS

### **Silberfärbung**

Entwickler (100ml)  
6 g NaCO<sub>3</sub>  
50 µl 37% Formaldehyd  
2 ml Natriumthiosulfatlösung

Fixierer  
100 ml Stopplösung  
50 µl 37% Formaldehyd

Natriumthiosulfatlösung  
0,2 mg/ml NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Silbernitratlösung (100ml)  
2 ml 10% Silbernitrat  
75 µl 37% Formaldehyd

Stopplösung  
30% Ethanol  
10% Essigsäure

### **Western Blot**

Alkalische-Phosphatase-Puffer  
100 mM Tris/HCl, pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

BCIP  
25 mg/ml BCIP in 100% DMF

Blotpuffer  
48 mM Tris  
39 mM Glycin

Magermilch  
2% (w/v) in PBS

NBT  
50 mg/ml NBT in 70% (v/v) DMF

PBS  
10 mM Natriumphosphat, pH 7,4  
150 mM NaCl

PBST  
0,1% Tween20 in PBS

Ponçeau S-Lösung  
0,2% Ponçeau S in 3 % TCA

## Sphäroblastenpräparation und Transportassay

Assay-Puffer	10 mM Tris/HCl 0,8 M Sorbitol 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 µM nichtradioaktiver Nukleotidzucker
Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,8 M Sorbitol 1 mM EDTA 1 mM pAPMSF Proteaseinhibitoren Mini complete (Roche), 1 Tablette/10 ml
Zymolyase-Puffer	50 mM KPO <sub>4</sub> , pH 7,5 1,4 M Sorbitol 10 mM NaN <sub>3</sub> 0,3% (40 mM) β-Mercaptoethanol

## Aufreinigung von Proteinen über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose

Waschpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
-------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------

## 4.7 Geräte

Blotkammer Fast-Blot B44	Biometra
Elektrophoresekammern für Agarosegele	
HE 99X für Gelvolumen 200ml	Amersham
40-0911 für Gelvolumen 50 ml	Peqlab
Elektrophoresekammern für SDS-Page	Amersham
FACSAria	Becton Dickinson
Filmentwicklung	
Hyper Processor	Amersham
Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Zeiss
Geldokumentation	
AlphaImager	Biozym
Genepulser	Biorad
Glasgeräte	Schott

Heizblock	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Amersham
Imagingplatten	Fuji
Kühlzentrifugen	
Beckmann Coulter Avanti J 30I	Beckmann
Centrifuge 5804	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Kühlschrank	Liebherr
Luminometer	Berthold
Reinstwasseranlage	Barnstead
Mikropipetten	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Odyssey Infrarot Imaging System	Li-Cor
Phasenkontrastmikroskop Labovert FS	Leitz
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Phosphoimager	Fuji
Photometer Ultraspec	Pharmacia
Real-Time PCR-System 7500	Applied Biosystems
Rotoren	
JA 25.50	Beckmann
JLA 10.500	Beckmann
SW 32Ti	Beckmann
Software	
WindowsXP home edition	Microsoft
MS Word 2000	Microsoft
MS Excel	Microsoft
Photoshop CS	Adobe
ChemDraw Ultra 5.0	Cambridge Soft
EditSeq	DNA Star
MapDraw	DNA Star
Clone	Sci Ed Software
PrimerSelect	DNA Star
Spannungsquelle Power Pack P25	Biometra
Speedvac RVC 2-18	Christ
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus
Szintillationszähler LS6500	Beckman Coulter
Thermocycler	
T1	Biometra
T Gradient	Biometra
T3000	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf



Tischzentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf
Biofuge fresco	Heraeus
Ultra-Mikro-Quarzküvette 105.202-QS	Hellma
Ultra Turrax	Ika-Werk
Ultrazentrifuge Optima L-90 K	Beckman Coulter
UV-Stratalinker	Stratagene
Vakuumpumpe	Ilmvac
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage CP 3202 und CP 224S	Sartorius
Zentrifugenbecher	Beckmann

## 4.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (12 mm)	Jürgens
Einmal-Injektionskanülen	Braun
Elektroporationsküvetten 0,4 cm	
Elektrodenpalt	Biorad
Filterpapier 3MM	Whatman
Hybond XL	Amersham
Kryoröhrchen	Corning
LumiFilm Chemilumineszenz Detection Film	Roche
Nitrocellulosefilter (MF-Membran)	Millipore
NucTrap Probe Aufreinigungssäulen	Stratagene
PCR-Tubes	Sarstedt
PCR-Platten (MicroAmp 96-Loch-Platten)	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polypropylen-Röhrchen 14 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner
Protran Nylonmembran	Schleicher & Schuell
PVDF-Membran, Immobilon-FL	Millipore
Quarzglasküvette	Hellma
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt
Sterilfilter	Corning
Szintillationsröhrchen	Sarstedt
Zellkulturflaschen, 50 ml	Greiner

## Kits zur Nukleinsäure-Aufreinigung

NucleoSpin RNA II	Macherey & Nagel
NucleTrap mRNA Mini Kit	Macherey & Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey & Nagel
Plasmid Mini und Midi Kit	Macherey & Nagel
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen

## Sonstige Kits

BCA Kit	Pierce
DIG RNA Labeling Kit	Roche
Prime It II random labelling Kit	Stratagene
Rapid Ligation Kit	Roche
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen

## Molekulargewichtsmarker:

1 kb DNA ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Marker	Biorad
SDS-PAGE Molecular weight standards, low range	Biorad
Odyssey prestained Marker	Li-Cor

## **5 Methoden**

### **5.1 Zellbiologische Methoden**

#### **5.1.1 Beschichten von Zellkulturflaschen**

Zellkulturflaschen und -schalen für die Kultur von embryonalen Stammzellen und embryonalen Fibroblasten wurden mit Gelatine beschichtet, um besseres Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Dazu wurden die Flaschen 2 h bis über Nacht mit 0,2% Gelatine in PBS bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Verwendung der beschichteten Flaschen wurde die Gelatinelösung abgesaugt und die Flasche mit PBS gewaschen.

#### **5.1.2 Gewinnung embryonaler Maus-Fibroblasten (MEF)**

Für die Gewinnung embryonaler Fibroblasten wurden Embryonen vom Tag 12,5 pc (*post coitum*) benötigt. Dazu wurden C57Bl/6J-Weibchen mit C57Bl/6J-Tg(neo)-Männchen verpaart. Die tragenden Weibchen wurden am Tag 12,5 mit Rompun (0,02 mg/kg Körpergewicht) und Ketanest (0,9 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und durch Genickbruch getötet.

Die Embryonen wurden entnommen, in PBS gewaschen und anschließend homogenisiert. Das Zellhomogenisat wurde mit 50 ml PBS gewaschen und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 50 ml MEF-Medium resuspendiert und erneut 10 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml MEF-Medium aufgenommen, in eine mit Gelatine beschichtete Petrischale überführt und o/n bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 1:5 auf 250 ml-Zellkulturflaschen aufgeteilt (=Passage 1, P1). Diese wurden wiederum bis zur Konfluenz kultiviert und erneut 1:5 gesplittet (=Passage 2, P2). Anschließend wurden die Zellen als P3 eingefroren.

#### **5.1.3 Kultivierung von Zellen**

Embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) wurden in MEF-Medium bei 37°C in Gegenwart von 7,5% CO<sub>2</sub> bis maximal zur Passage 5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Mitomycin: die Zellen wurden 2 ½ Stunden mit 10 mg/ml Mitomycin in ES-Medium inkubiert, um die weitere Zellteilung zu inhibieren. Die so erhaltenen Feederzellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in einer Zelldichte von 1,4x10<sup>6</sup> pro 250 ml-Flasche, 7x10<sup>5</sup> pro 50 ml-Flasche, 10<sup>6</sup> pro 10 cm-Petrischale bzw. 2x10<sup>4</sup> pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät und in ES-Medium weiter kultiviert.

Die embryonalen Stammzellen (ES) E 14-1 wurden in mit Gelatine beschichteten 50 ml-Zellkulturflaschen mit 5 ml ES-Medium mit 10<sup>3</sup> U/ml LIF bei 37°C in Gegenwart von 7,5% CO<sub>2</sub> bei täglichem Mediumwechsel auf Feederzellen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (alle zwei bis drei Tage) wurden die Zellen auf Feederzellen passagiert. Dazu

wurden die adhären wachsenden Zellen durch zweiminütige Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst.

NIH/3T3, P19 und F9-Zellen wurden mit 10 ml Zellkulturmedium in 250 ml-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA abgelöst und in eine frische Zellkulturflasche verdünnt.

#### **5.1.4 Auftauen von Zellen**

Nach Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und in das zehnfache Volumen Zellkulturmedium überführt. Nach Zentrifugation (300 g, 10 min, RT) und Resuspension in Zellkulturmedium wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

#### **5.1.5 Einfrieren von Zellen**

Zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, sedimentiert (300 g, 10 min, RT), anschließend in 1 ml Einfriermedium (EF-Medium) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C vorgefroren. Nach mindestens 48 h wurden sie dann in den Stickstofftank überführt.

#### **5.1.6 Elektroporation embryonaler Stammzellen**

Für die Elektroporation wurden  $5 \times 10^6$  Zellen für den Targeting-Vektor (25 µg steril aufgereinigtes Konstrukt ohne Vektor),  $5 \times 10^5$  Zellen für die Kontrollelektroporation mit dem neo-Konstrukt (5 µg steril gefälltes linearisiertes Plasmid pBSneo) und  $5 \times 10^5$  Zellen für die Kontrollelektroporation ohne DNA verwendet. Dazu wurden die Zellen und die DNA in 800 µl PBS aufgenommen und bei 500 µF und 220 V elektroporiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Kontrollen in je eine 10-cm-Petrischale mit am Vortag ausgesäten Feederzellen überführt und die mit dem Targeting-Vektor elektroporierten Zellen auf zehn 10 cm-Petrischalen verteilt. Nach 48 h wurde dem ES-Medium 0,35 mg/ml G418 zugesetzt und die Zellen unter diesen Selektionsbedingungen weiterkultiviert, bis in der Negativkontrolle keine ES-Klone mehr vorhanden waren. Zum Picken der Klone wurden am Vortag Feederzellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Loch in 96-Loch Platten eingesät. Die ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, die Klone anschließend in PBS gepickt, in 40 µl Trypsin/EDTA resuspendiert und in 160 µl ES-Medium (+ 0,35 mg/ml G418) auf die vorbereiteten Feederzellen überführt.

Nach Erreichen der Konfluenz (nach etwa drei Tagen) wurden die Zellen mit 40 µl Trypsin/EDTA abgelöst und in 60 µl ES-Medium resuspendiert. Davon wurden je 50 µl in neue 96-Loch Feeder-Platten (=Duplikate) überführt, der Rest verblieb auf den ursprünglichen Platten (=Masterplatten). Die Masterplatten wurden anschließend mit 50 µl 2x EF-Medium versetzt und bei -80°C eingefroren.

Die Duplikate wurden zur Analyse der Klone in ES-Medium mit G418 auf 24-Loch-Platten expandiert und bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Anschließend wurden die Klone trypsiniert, in PBS resuspendiert und die Zellen sedimentiert. Die Zellpellets wurden bis zur DNA-Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

## 5.1.7 Transfektion von NIH/3T3-Zellen mit Superfect

### Transiente Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am folgenden Tag 70 bis 80% konfluent waren. Die zur Transfektion benötigten Mengen sind Tabelle 3 zu entnehmen. DNA und DMEM ohne FCS wurden gemischt, Superfect wurde hinzugefügt und dieser Ansatz zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit komplettem Zellkulturmedium auf das angegebene Endvolumen aufgefüllt und auf die zuvor trockengesaugten Zellen pipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurden die Komplexe abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Zellkulturmedium weiterkultiviert.

	Zellen/Loch	[µg] DNA	ad x µl DMEM	[µl] Superfect	[µl] DMEM + FCS
10 cm Schale	4x10 <sup>5</sup>	4	160	16	3000
6-Loch	1x10 <sup>5</sup>	1,0	40	4	600
12-Loch	5x10 <sup>4</sup>	0,5	20	2	300

Tabelle 3 Transfektion: Zellzahlen und DNA-Mengen für die Transfektion

### Stabile Transfektion

Um Zellen zu erhalten, die das Plasmid psiSTRIKE-2-neoGFP stabil exprimieren, wurden die transfizierten NIH/3T3-Zellen 48 h nach der Transfektion durchflusszytometrisch auf GFP-positive Zellen selektiert und in 96-Loch-Platten vereinzelt. Anschließend wurden sie in DMEM mit 1 mg/ml G418 weiterkultiviert und expandiert.

## 5.1.8 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Sortierung (FACS – *fluorescence activated cell sort*) von Zellen wurde im Labor von Dr. Matthias Ballmaier durchgeführt.

Mithilfe dieser Technik ist es möglich, Zellen anhand bestimmter Fluoreszenzsignale zu identifizieren und zu sortieren. Die Zellen können dabei fluoreszierende Proteine exprimieren oder Oberflächenmerkmale tragen, die von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern erkannt werden.

Die in Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen emittieren dabei Streulicht und, wenn Antikörper gebunden sind oder fluoreszierende Proteine exprimiert werden, Fluoreszenzimpulse. Das Streulicht wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Anhand dessen können die Zellen in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Für die Vereinzelung von Zellen zur Klonierung einer shRNA-exprimierenden Zelllinie wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit 100 mM EDTA aufgenommen. GFP-positive Zellen wurden in 96-Loch Platten, in denen Zellkulturmedium mit doppelter Antibiotikakonzentration und 1 mg/ml G418 vorgelegt war, vereinzel.

Für die Analyse der Oberflächenproteoglykane in NIH/3T3 sowie shRNA gegen SLC35B4 exprimierenden Klonen wurden die Zellen zunächst in PBS/2 mM EDTA abgelöst. Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in 1 ml 1% BSA in PBS resuspendiert und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert (50 µl 1:20 P869 in 1% BSA/PBS). Nach Zugabe von 350 µl BSA/PBS und 1 min bei 1500 g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 50 µl einer 1:500 Verdünnung des zweiten Antikörpers (Maus-antiVSV) 15 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden 350 µl BSA/PBS zugegeben und die Zellen erneut pelletiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem dritten Antikörper (anti-MausAlexa647) 15 min bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen in 1 ml BSA/PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

### **5.1.9 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde pCMV-LacZ (ko)transfiziert und eine  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 bzw. 48 h nach der Transfektion zunächst mit PBS gewaschen, mit 0,625% Glutardialdehyd 10 min bei RT fixiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS mit der Färbelösung 30 min bis 4 h bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die blau gefärbten Zellen haben das Plasmid aufgenommen; deren prozentualer Anteil repräsentiert die Transfektionseffizienz.

### **5.1.10 Dualer Luciferase-Reporterassay**

Zur Untersuchung der Effizienz der shRNA-Zielsequenzen wurde ein genetischer Reporterassay basierend auf simultaner Expression zweier unabhängiger Reporterenzyme durchgeführt. Der experimentelle Reporter korreliert mit dem Effekt der experimentellen Bedingungen; der kotransfizierte Reporter dient als interne Kontrolle. Die Luciferasen von *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) und *Renilla reniformis* (Gemeine Seefeder) haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft verschiedene Strukturen und nutzen

unterschiedliche Substrate. Daher ist es möglich, selektiv zwischen den Biolumineszenzreaktionen zu unterscheiden.

Der experimentelle Reporter besteht aus einer Fusions-mRNA aus Renilla-Luciferase und der 3' davon lokalisierten mRNA des zu untersuchenden Gens. Kommt der RNAi-Effekt zum Tragen, wird die Fusions-mRNA degradiert. Damit verringert sich die Aktivität der Renilla-Luciferase im Vergleich zur internen Kontrolle, der Glühwürmchen-Luciferase.

Die mit den entsprechenden siStrike-Vektoren und psiCheck-SLC35B4 kotransfizierten und 48 h weiter kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 15 min bei RT in 1x *Passive Lysis Buffer* auf dem Schüttler inkubiert. Das Lysat wurde in Mikroreaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Die Messung des Assay erfolgte in Doppelbestimmungen im Luminometer: zu 20 µl Lysat wurden über der Injektor des Luminometers 100 µl LARII (*Luciferase Assay Reagent II*) pipettiert. Nach einer Verzögerung von 10 s wurde für 5 s gemessen; anschließend erfolgte die Injektion von 100 µl Stop&Glo-Reagenz. Die Lumineszenz wurde ebenfalls für 5 s nach einer 10 s Verzögerung gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf die Kontrollwerte (Glühwürmchen-Luciferase) normalisiert.

### 5.1.11 Immunzytochemie

Zur subzellulären Lokalisation von Proteinen *in situ* wurde die Immundetektion an Einzelzellen verwendet. Dazu wurden NIH/3T3-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und transfiziert. 24 bis 48 h nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen in PBS gewaschen und für 20 min in 0,625% Glutaraldehyd in PBS bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2% TritonX-100 für 10 min bei RT permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (anti-myc mAB 9E10, 1:1000 in PBS/0,1%Tween20/0,1%BSA) 90 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-Cy3, 1:300) inkubiert. Als Referenz für den Golgi-Apparat diente der kotransfizierte pAcGFP1-Golgi-Vektor, der ein Fusionsprotein aus 81 Aminosäuren des N-Terminus der humanen  $\beta$ 1-4-Galaktosyltransferase und dem *green fluorescent protein* aus *Aequorea coerulea* (AcGFP1) kodiert. Nach drei weiteren Waschrufen mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 (500 ng/ml in PBS) für 4 min bei RT gefärbt. Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf Objektträgern fixiert und unter dem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 5.1.12 Transformation und Kultivierung von *S. cerevisiae*

Für den Transportassay in Hefe wurde ein Cu<sup>2+</sup>-induzierbarer Expressionsvektor verwendet. Aus dem DMSO-Stock wurden Zellen auf eine SD-Agarplatte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren. 10 ml SD-Flüssigmedium wurden mit einer dieser Kolonien angeimpft und o/n bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde dann auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 in 50 ml eingestellt und weitere 2 h inkubiert. Die Zellen wurden bei 1500 g pelletiert und in 40 ml 1x TE resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen noch einmal bei

1500 g pelletiert und in 2 ml 1x LiAc/0,5x TE resuspendiert. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurden zu 100 µl der Hefezellsuspension 1 µg Plasmid-DNA und 100 µg Träger-DNA (denaturierte gescherte Heringssperma-DNA) gegeben, die Mischung mit 700 µl 1x LiAc/40% PEG-3350/1x TE versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 88 µl DMSO zugegeben und 7 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend pelletiert, in 1 ml 1x TE aufgenommen, nochmals pelletiert, in 100 µl 1x TE resuspendiert und auf eine Selektionsplatte ohne Uracil ausgestrichen. Das im Vektor enthaltene *ura3*-Gen komplementiert dabei die Uracil-Auxotrophie der Hefezellen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, bis Einzelklone sichtbar wurden.

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie in 10 ml SD-Flüssigmedium überführt und o/n bei 30°C im Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde dann eine 1 l-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,03 eingestellt, so dass nach etwa 12 h eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht wurde, bei der dann mit 1 ml 0,5 M CuSO<sub>4</sub> induziert werden konnte. Nach 3 h wurden aus diesen Hefezellen Golgi-Vesikel gewonnen (siehe 5.3.3).

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Isolierung von DNA

#### DNA-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen

Von ausreichend dicht bewachsenen Kulturen in 24-Loch Platten wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 0,5 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurde Trypsin/EDTA zugesetzt. Nach 2 min wurden die Zellen in 0,5 ml PBS resuspendiert und anschließend 10 min bei 600 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 375 µl Lysispuffer (genomische DNA, ES-Zellen) resuspendiert, mit 10 µl Proteinase K versetzt und o/n bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 125 µl 5 M NaCl und 10 min Inkubation bei RT wurde 10 min bei 18000 g zentrifugiert, um Proteine und andere Verunreinigungen abzutrennen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde dann mit 80% Ethanol gewaschen, in 40 bis 60 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei 4°C gelagert.

#### Präparation von Plasmid-DNA

##### Analytische Minipräparation

Zur Amplifikation der in *E. coli* XL1-Blue transformierten Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden einzelne Kolonien in je 2 ml LB-Medium (+100 µg/ml Ampicillin) abgeimpft und o/n bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml davon wurden zur Gewinnung der Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA-Präparation folgte dem Prinzip der alkalischen Lyse (Lottspeich, 1998).



Die pelletierten Bakterien (1 min 15000 g) wurden in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Dann wurden 100 µl Lysispuffer zugesetzt, die Lösung durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer führte zur Bildung schwerlöslicher Komplexe von Kaliumdodecylsulfat mit denaturierten Proteinen, RNA, chromosomaler DNA und Zelltrümmern, welche durch Zentrifugation (10 min, 15000 g) abgetrennt wurden. Plasmide dagegen renaturierten unter diesen Bedingungen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **Präparative Minipräparation**

Die Präparation von DNA in kleinem Maßstab für Sequenzierungen und andere empfindliche Methoden erfolgte mit dem Nucleospin Plasmid II Kit von Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers.

### **Midipräparation**

DNA Präparationen im Midimaßstab wurden mit dem QIAprep<sup>®</sup> Midi Kit der Firma Qiagen nach deren Protokoll durchgeführt.

## **5.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen**

Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA II-Kits (Macherey & Nagel) bzw. Trizol (Invitrogen) nach Angaben der Hersteller gewonnen.

## **5.2.3 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA**

Zur Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das Nucleotrap Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet.

## **5.2.4 Nukleinsäurepräzipitation**

Um Nukleinsäurepräparationen zu entsalzen und/oder zu konzentrieren, wird DNA mit 100%igem Isopropanol in Anwesenheit von monovalenten Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) gefällt.

Die DNA-Lösung wurde mit einem zehntel Volumen 7,5 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung (pH 5,2) und dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt. Der Fällungsansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 15000 g, RT) wurde das Nukleinsäurepräzipitat zum Entfernen des mitgefällten Salzes mit 80%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in einem angemessenen Volumen ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 5.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden auf horizontalen Agarosegelen anhand ihrer Größe aufgetrennt. Für Fragmentlängen zwischen 500 und 12000 bp wurden 0,8 bis 1,0%ige (w/v in 1x TBE) Gele benutzt. Sollten DNA-Fragmente anschließend aus dem Gel extrahiert werden, wurde TAE als Gel- und Laufpuffer verwendet. Zur Detektion der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid (50 µg/100 ml) zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die Doppelhelix und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge zwischen 260 und 360 nm. Es wurde eine konstante Spannung von 8 bis 10 V/cm angelegt. Die Detektion erfolgte im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm. Die Gele wurden mit Hilfe des Gerätes und der integrierten Software fotografiert.

Die Elektrophorese von RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 1%ige Agarosegele (w/v in 1x FA-Puffer) mit 2,2 M Formaldehyd verwendet.

### 5.2.6 Gelextraktion

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach dem Protokoll des Macherey & Nagel Gelextraction Kits. Die entsprechenden Banden wurden unter UV-Licht mit dem Skalpell mit einem möglichst kleinen Stück Agarose ausgeschnitten und mit dem doppeltem Volumen Puffer NT bei 50°C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Diese Lösung wurde auf eine Silica-Säule geladen, an welche die DNA gebunden wurde. Die DNA wurde gewaschen und schließlich in 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 5.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Präparation wurde UV-photometrisch bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm bestimmt.

### 5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, wozu ein kurzer doppelsträngiger Abschnitt mit freiem 3'-OH nötig ist, an dem die Polymerisation stattfindet. Dieser wird durch synthetische Oligonukleotide (Primer) bereitgestellt. Die Primer können auch verwendet werden, um Mutationen (*site directed mutagenesis*) oder Restriktionsstellen in die DNA einzuführen.

Bei den meisten Anwendungen kam die Taq-Polymerase zum Einsatz. Sie ist stabil bei 95°C und besitzt bei 72°C eine hohe Prozessivität. Für PCR-Klonierungen, bei denen eine hohe Genauigkeit erforderlich ist, wurde eine Polymerase mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proof reading*-Aktivität) eingesetzt, die falsch eingebaute Nukleotide erkennen und entfernen kann. Ein typischer PCR-Zyklus bestand aus Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C, Primerannealing bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und Primerextension bei 72°C (bzw. der vom Hersteller angegebenen Temperatur).

Nach einer initialen Denaturierungsphase von 5 min folgten etwa 30 Zyklen wie beschrieben und eine abschließende Elongationsphase von 7 min.

Die zur späteren Klonierung bestimmten DNA-Fragmente wurden mit der Expand High Fidelity<sup>Plus</sup>-Polymerase nach Empfehlung des Herstellers amplifiziert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch getrennt und aufgereinigt.

Für eine Mutagenese mittels PCR mit Pfu-Polymerase wurden entsprechende Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, in einer Konzentration von 440 nM eingesetzt. Auf 30 s Anfangsdenaturierung bei 95°C folgten 12 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°C, 30 s bei 60°C und 2 min pro 1 kbp bei 68°C. Danach folgte eine abschließende Elongationsphase von 12 min bei 68°C. Um die ursprüngliche DNA zu degradieren, wurde der PCR-Ansatz mit *DpnI* (5 U) 1 h bei 37°C inkubiert; *DpnI* erkennt und schneidet methylierte DNA. Ein Zehntel Volumen des Ansatzes wurden dann in *E. coli* XL1-Blue transformiert und die erhaltenen Kolonien auf Vorhandensein der Mutation analysiert.

### 5.2.9 Reverse Transkription

Reverse Transkription mit anschließender PCR wurde durchgeführt, um auch geringe Expressionsstärken von Transkripten des untersuchten Gens in Gesamt-RNA-Präparationen unterschiedlicher Gewebe nachzuweisen.

Der erste Schritt bestand darin, mit Hilfe der MMuLV-Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, den zur mRNA komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Das Enzym benötigt ein freies 3'-OH, das durch einen oligo(dT)-Primer bereitgestellt wurde, der an den poly(A)-Schwanz der mRNA bindet.

Als Ausgangsmaterial wurde pro Reaktionsansatz 1 µg Gesamt-RNA verwendet. Die RNA wurde mit 1 µl oligo(dT)-Primer (10 µM) und 1 µl 10 mM dNTPs versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 17 µl aufgefüllt. Nach 15 min bei 65°C und Abkühlen auf Eis wurde eine Mischung aus 2 µl 10x Reaktionspuffer, und 1 µl (200 U) MMuLV Reverse Transkriptase zugegeben. Die Ansätze wurden 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch die Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 72°C.

In einem zweiten Schritt wurde mit 10% des Ansatzes eine PCR mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Diese waren so gewählt, dass eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen oder zumindest anhand der Größe unterschieden werden konnte, indem sie in zwei verschiedenen Exons lokalisiert waren, die durch ein ausreichend großes Intron voneinander getrennt waren.

Nach einer Anfangsdenaturierung von 5 min bei 95°C folgten 20 bis 35 Zyklen mit 30 s bei 95°C, 30 s bei der für das jeweilige Primerpaar optimalen Annealingtemperatur und 1 min pro kbp Fragmentlänge bei 72°C. Darauf folgte eine abschließende Elongationsphase von 7 min bei 72°C.

### 5.2.10 cDNA-Synthese für die *real-time*-PCR

Um sicherzustellen, dass im Reaktionsansatz keine Kontamination durch genomische DNA enthalten ist, wurde zunächst ein Verdau mit DNaseI durchgeführt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA mit H<sub>2</sub>O auf 7,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl 10x DNase-Puffer und 1µl DNaseI (1 U) versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde 1 µl Stopplösung und 1 µl oligo(dT)-Primer (10 µM) zugegeben und der Ansatz zum Denaturieren für 10 min auf 70°C erhitzt.

Anschließend wurden 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 0,5 µl (20 U) RNAsin zugesetzt und für 10 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe der reversen Transkriptase (1 µl, 200 U) wurde der Reaktionsansatz 50 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 15 min. Die Analyse der Expression erfolgte in einer anschließenden *real-time*-PCR.

### 5.2.11 Quantitative *real-time*-PCR (SyBrGreen-Assay)

Soll über die reverse Transkription mit anschließender PCR die Menge der mRNA und damit die Expressionsstärke bestimmt werden, muss sichergestellt sein, dass die Menge der amplifizierten DNA proportional zur Menge der ursprünglich in der Probe enthaltenen RNA ist. Solange sich die PCR noch nicht in der Plateauphase befindet, ist dies der Fall (Abb. 10).

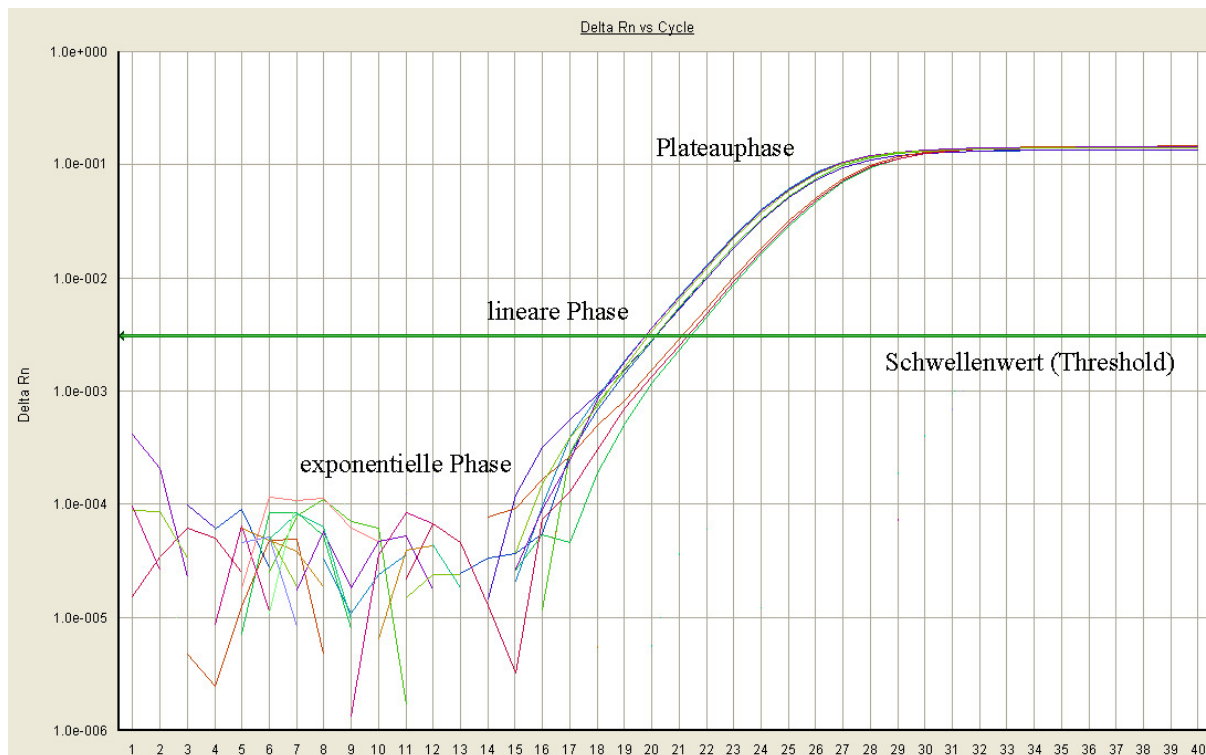


Abb. 10 Phasen einer PCR: In der linearen Phase findet im Idealfall pro Zyklus eine Verdopplung des Templates statt.

In einer *real-time* PCR erfolgt die Messung der Konzentration in Echtzeit während des Laufs. Hier wurde ein unspezifisches Detektionssystem genutzt, das auf der Markierung des

Amplifikationsproduktes durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (SyBrGreen) beruht. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Zur Normalisierung PCR-unabhängiger Fluoreszenzvariationen wurde dem Reaktionsansatz der Fluoreszenzfarbstoff ROX als passive Referenz zugefügt. Die Messung der beiden Farbstoffe kann unabhängig voneinander stattfinden, da SyBrGreen bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt wird und bei 520 nm emittiert, wohingegen die Anregung von ROX bei 584 nm und dessen Emission bei 612 nm erfolgt.

Der Schwellenwert oder Threshold ist definiert als der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich aus dem Hintergrund hervortritt. Dieser Wert wird als  $C_T$ -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Er steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Ist der  $C_T$ -Wert niedrig, ist die eingesetzte Menge DNA groß. Ist der  $C_T$ -Wert hoch, so ist die Ausgangsmenge an DNA klein. Der  $C_T$ -Wert ist daher Grundlage für die Quantifizierung einer Reaktion.

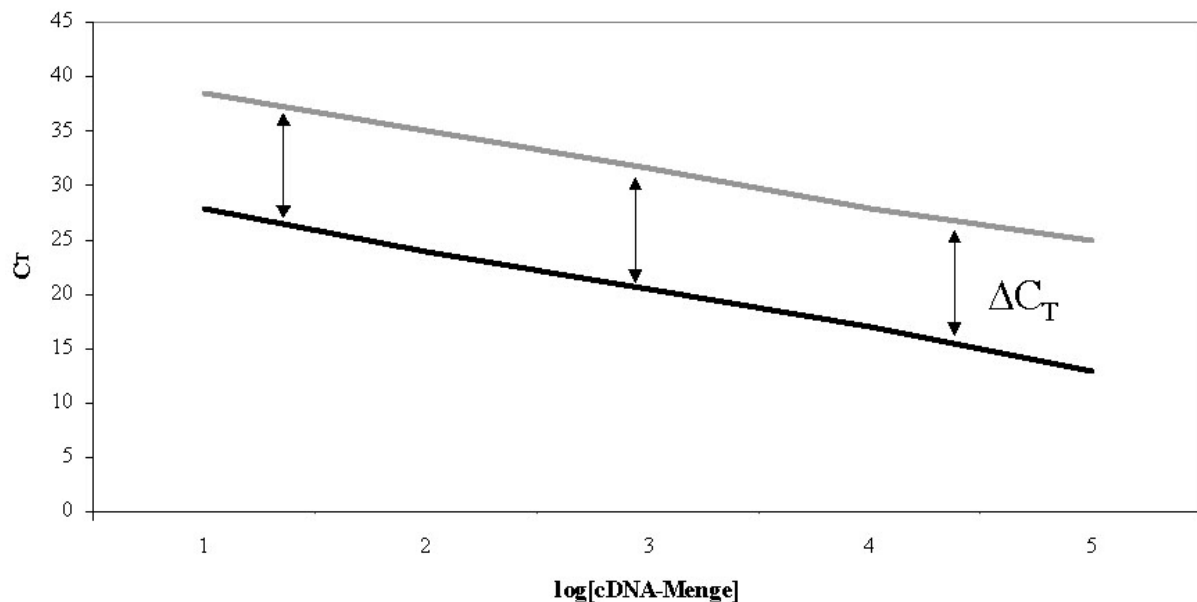


Abb. 11 Standardkurve einer *real-time* PCR: Nur bei ähnlicher Steigung der Standardkurven von endogener Kontrolle und Zielgen und damit ähnlich effizienten PCRs ist  $\Delta C_T$  konstant. Nur dann ist eine relative Quantifizierung anhand der  $\Delta C_T$ -Werte möglich.

Folgender Ansatz wurde für die *real-time* PCR verwendet:

- 5  $\mu$ l Template (1:5 Verdünnung)
- 12,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- 2,5  $\mu$ l 10x PCR Puffer
- 0,5  $\mu$ l dNTPs
- 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>
- 0,6  $\mu$ l Primermix
- 0,25  $\mu$ l ROX
- 2,0  $\mu$ l SyBrGreen (1:10<sup>4</sup> Verdünnung)
- 0,125  $\mu$ l Taq (5 U/ $\mu$ l)

Das folgende Programm wurde verwendet:

50°C 10 s  
 95°C 5 min  
 95°C 15 s }  
 60°C 1 min } 40 x

Als Referenzgen wurde hier *hprt* (Hypoxanthin:Guanin-Phosphoribosyltransferase) verwendet. Zunächst wurde die Effizienz verschiedener Primerpaare für das Referenzgen und *slc35b4* getestet. Nur wenn die so bestimmten Standardkurven eine ähnliche Steigung und damit die Primer eine ähnliche Effizienz aufweisen, ist eine verlässliche Aussage anhand der  $\Delta C_T$ -Werte möglich (Abb. 11), da nur dann für einen großen Konzentrationsbereich  $\Delta C_T$  konstant ist. Dafür wurden fünf Werte einer Zehnfachverdünnungsreihe eingesetzt. Pro Wert wurden Dreifachbestimmungen gemessen. Die Effizienz (E) der Primer wurde anhand der Steigung der Standardkurve bestimmt.

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$$

Eine Steigung der Standardkurve von -3,32 ist daher gleichbedeutend mit einer PCR-Effizienz von 1, was heißt, dass pro Zyklus eine Verdopplung des PCR-Produktes stattfindet. Steiler verlaufende Kurven bedeuten eine weniger effiziente PCR, flacher verlaufende deuten auf zu wenig Ausgangsmaterial bei geringen Konzentrationen oder Inhibierung bei höheren Konzentrationen.

$$N = N_0 (1 + E)^n$$

N = Produktmenge

$N_0$  = Startkopienzahl

E = Effizienz,  $0 \leq E \leq 1$

n = Anzahl der PCR-Zyklen

Die  $C_T$ -Werte wurden auf die endogene Kontrolle normalisiert, um  $\Delta C_T$  zu erhalten:

$$C_T \text{ slc35b4} - C_T \text{ hprt} = \Delta C_T$$

Die  $\Delta C_T$ -Werte wurden dann auf den Kalibrator – der auf *hprt* normalisierte Wert der NIH/3T3-Wildtyp-Zellen – normalisiert:

$$\Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ NIH/3T3 (Wildtyp)} = \Delta \Delta C_T$$

Anhand dieser Werte waren Berechnungen der mRNA-Menge relativ zum Kalibrator möglich.

### 5.2.12 Restriktionsanalyse

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Die Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen an für diese Enzyme spezifischen Sequenzen geschnitten.

Für analytische Verdau wurde der folgende Ansatz verwendet:

- 1 µg Plasmid-DNA
- 2 U Restriktionsenzym
- 1 µl des entsprechenden 10xPuffers
- ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Der für einen präparativen Verdau verwendete Ansatz war dieser:

- 5 µg Plasmid-DNA
- 10 U Restriktionsenzym
- 10 µl 10x Restriktionspuffer
- ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz gelelektrophoretisch getrennt und im Fall eines präparativen Verdau aufgereinigt. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit dem 1 kbp-Marker abgeschätzt.

### 5.2.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation des Vektors zu erschweren, wurden dessen Enden mit CIP (*calf intestinal phosphatase*) dephosphoryliert. Zum Restriktionsansatz wurden 5 U der CIP zugegeben, 30 min bei 37°C inkubiert und der Ansatz zur Inaktivierung der CIP 20 min auf 65°C erhitzt.

### 5.2.14 Ligation

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ist in der Lage, durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe desselben Moleküls oder zweier verschiedener Moleküle sowohl überhängende als auch glatte DNA-Enden miteinander zu verknüpfen.

Die zu ligierenden Fragmente wurden zunächst gemeinsam gefällt, um das Volumen des Ligationsansatzes bei größtmöglichen DNA-Konzentrationen gering zu halten. Es wurden 50 bis 100 ng Vektor mit dem 3 bis 5fachen molaren Überschuss des Inserts gefällt.

Die gefällte und mit 80%igem EtOH gewaschene DNA wurde in 4 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und nach folgendem Ansatz ligiert:

- + 0,5 µl 10x Ligasepuffer
- + 0,5 µl T4-Ligase (5 U)

Nach 1 h Inkubation bei RT wurden chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue mit dem halben Ligationsansatz transformiert.

### 5.2.15 TOPO-TA Klonierung

Um PCR-Fragmente in einen Vektor einzufügen, wurde das TOPO-TA Cloning-Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die Reaktion geschah nach den Angaben des Herstellers. 3 µl des Ansatzes wurden anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

### 5.2.16 Klonierung des Targeting-Vektors für den konstitutionellen Knockout

Die genomischen Fragmente des SLC35B4, die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ)-, DT- und neo-Kassette wurden wie folgt zusammengefügt: Zunächst wurde das Startkodon des *slc35b4*-Gens zu einer *NcoI*-Restriktionsschnittstelle (CCATGG) mutiert. In die *NcoI*- und *XmaI*-Schnittstelle wurde dann das *NcoI/XmaI*-Fragment des LacZ-Konstruktes eingefügt (prodLZ1). Die Fragmente C und D wurden über die *NheI*-Schnittstelle zusammengefügt und anschließend das *BseRI/SacII*-Fragment in prodLZ1 kloniert zu prodLZ2. Da bei den nachfolgenden Klonierungsschritten in allen zur Verfügung stehenden Bakterienstämmen Rekombination zwischen dem eukaryotischen  $\beta$ -Galaktosidase-Gen und dem  $\beta$ -Galaktosidase-Gen des pBluescript-Vektors auftrat, wurde prodLZ2 zunächst in pSP72, der kein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen enthält, subkloniert. Anschließend wurde die neo-Kassette *blunt end* in die *SmaI*-Restriktionsstelle eingefügt (prod26). Fragment A und die DT-Kassette wurden über *HincII* und *NsiI* ligiert zu prodA-DT. Das 2,5 kbp-*StuI/SacI*-Fragment aus *prodLZ1* wurde in prodA-DT eingesetzt (prodA-DT-LZ), um abschließend das *KpnI/AatII*-Fragment daraus in *prod26* einzufügen und mit prod27 den Targeting-Vektor zu erhalten. Für die Elektroporation in ES-Zellen wurde der Targeting-Vektor mit *Eam1105* geschnitten und das 11 kbp-Fragment steril aufgereinigt (Abb. 12).



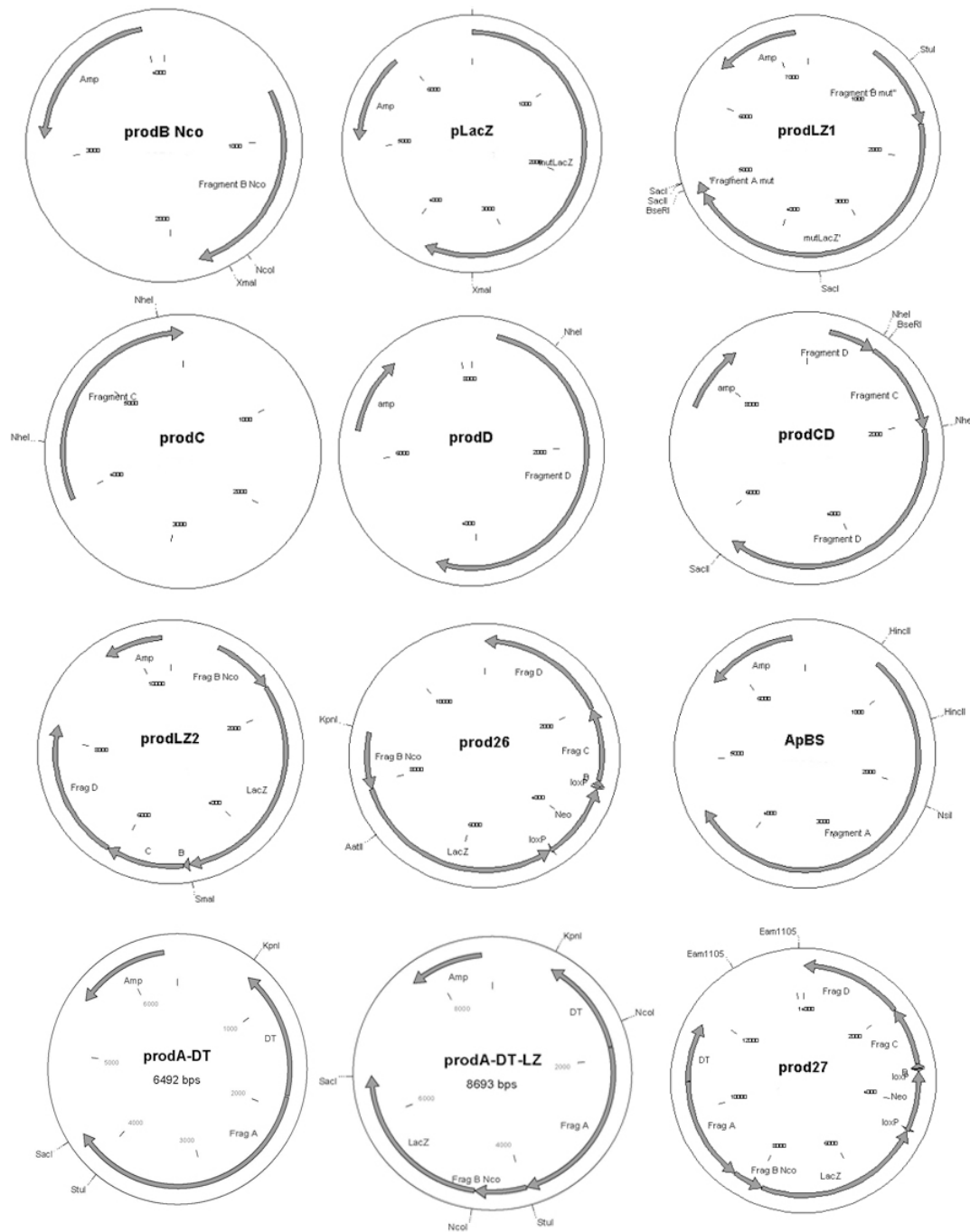


Abb. 12 Klonierung des Targeting-Vektors für die konstitutionelle Inaktivierung des *slc35b4*-Gens: Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert.

### 5.2.17 Klonierung des Targeting-Vektors für den konditionellen Knockout

Der Targeting-Vektor wurde wie folgt kloniert: Das Plasmid D208, das die Exons 2, 3 und 4 enthielt, wurde mit *NheI* geschnitten und zu 6114-1 religiert (1), was mit *SalI* und *Bsu36I* geschnitten und nach einem Kleenow-fill-in zu 6114-2 religiert wurde (2). In die *MscI*-Schnittstelle (3) von 6114-2 wurde das *SacI/KpnI*-Fragment aus pbs1801 *blunt-end* eingefügt (4). Das 3,3 kbp *NheI/SalI*-Fragment aus D208 wurde in D221 subkloniert (5); man erhielt

6114-5. In die *EcoRV*-Schnittstelle von 6114-5 wurde ein *loxP*-Oligo eingefügt (6), um 6114-6 zu erhalten. Das *Sall*/*NheI*-Fragment aus 6114-6 (7) wurde mit dem 10,5 kbp *NotI*/*Sall*-Fragment aus D208 (8) und dem *NheI*/*NotI*-Fragment aus 6114-4 (9) zum Targeting-Vektor 6114-TV ligiert (Abb. 13).

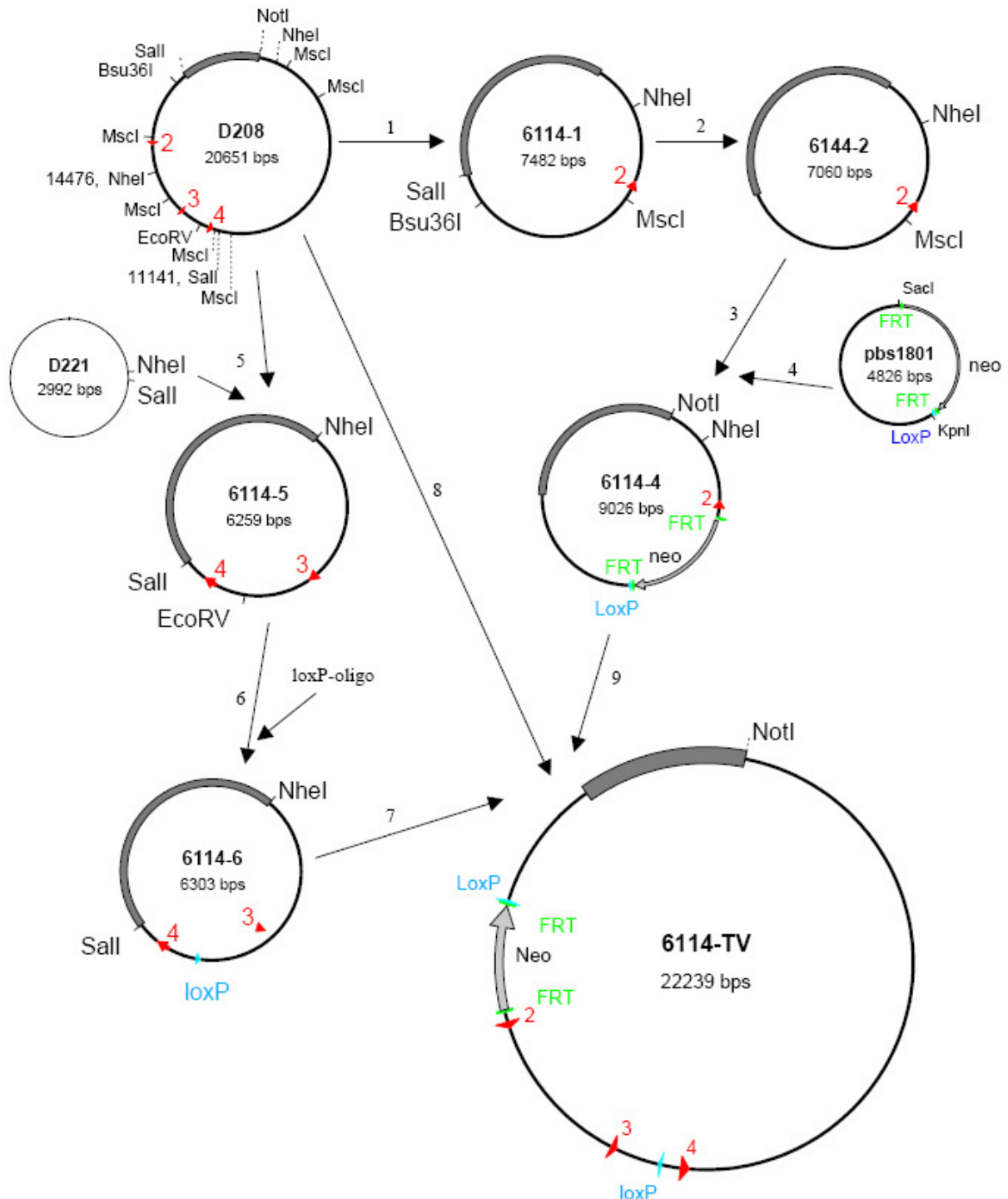


Abb. 13 Klonierungsstrategie des konditionell inaktivierbaren Allels: Erläuterung der einzelnen Schritte im Text.

### 5.2.18 Vektorbasierte RNA-Interferenz

Die Auswahl der Zielsequenzen und der Hairpinstrukturen erfolgte mit dem Ambion siRNA Target Finder ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)).

Die von MWG bezogenen Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 100 µg/µl eingestellt und nach Angaben des Herstellers in den siSTRIKE-Vektor eingefügt.

Die Effizienz der jeweiligen Sequenz wurde mit Hilfe eines dualen Luciferase-Reporterassays in NIH/3T3-Zellen bestimmt.

### 5.2.19 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* XL1-Blue

Alle verwendeten Gefäße und Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. 100 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* XL1-Blue angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 5 min auf Eis gekühlt, 10 min bei 4°C und 6000 g zentrifugiert und die Bakterien in 40 ml eiskalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einem Waschschrift mit 50 mM CaCl<sub>2</sub> und erneuter Zentrifugation bei 6000 g wurden die Bakterien in 40 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und pelletiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, nach 20 min auf Eis mit 400 µl Glycerol versetzt und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 5.2.20 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* XL1-Blue

Die Plasmid-DNA wurde zur Amplifikation in chemokompetente *E. coli* XL1-Blue eingeschleust. 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit der Hälfte des Ligationsansatzes versetzt und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz 45 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock), anschließend mit 400 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden dann 50 µl und 450 µl auf je eine LB-Agar-Platte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 5.2.21 Herstellung von DMSO-Stocks von *E. coli*

Zur langfristigen Lagerung wurden DMSO-Stocks hergestellt: 930 µl Bakteriensuspension wurden mit 70 µl DMSO (Endkonzentration 7%) versetzt und bei -80°C gelagert.

### 5.2.22 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde in Auftragsarbeit von GATC-Biotech durchgeführt.

## 5.2.23 Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter RNA- und DNA-Sonden

### RNA-Sonden

Um in Gesamt-RNA-Präparationen verschiedener Organe Transkripte eines Gens qualitativ und quantitativ nachzuweisen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Die dazu benötigten *antisense* RNA-Sonden wurden durch Transkription mit einer RNA-Polymerase aus der cDNA des untersuchten Gens hergestellt.

10 µg der Plasmid-DNA wurden am 5'-Ende durch ein geeignetes Restriktionsenzym linearisiert und über ein 0,8%iges Agarosegel aufgereinigt.

2 µg davon wurden für die Transkription verwendet:

2 µg linearisierte DNA

2 µl 10x Transkriptionspuffer

2 µl 10x NTP-Labeling Mix (mit DIG-UTP)

2 µl T3, T7 oder SP6 RNA-Polymerase (abhängig vom Promotor)

ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert, anschließend mit 2 µl DNase I (RNase-frei, 10 U/µl) versetzt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde dann 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) zugesetzt. Die RNA wurde mit 2,5 µl 3 M NaCl und 80 µl EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 50 µl DMPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA-Sonde wurden 5 µl davon auf ein RNA-Gel geladen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Dot Blot. Dazu wurde je 1 µl der DIG-markierten Sonde in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 und einer DIG-markierten RNA Kontrolle in den Konzentrationen 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl auf ein Stück Nylonmembran aufgetragen, getrocknet und im UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden. Für die Verdünnungsreihen wurde RNA-Verdünnungspuffer verwendet (50% DMPC-H<sub>2</sub>O, 30% 20x SSC, 20% Formaldehyd). Die Entwicklung des Dot Blots erfolgte wie unter 4.2.20 beschrieben.

### DNA-Sonden

Mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden wurden in einer PCR hergestellt, der statt dTTP Dig-dUTP zugesetzt wurde. Die Überprüfung des Einbaus erfolgte ebenfalls per Dot Blot.

## 5.2.24 Northern Blot

### Blotten des RNA-Gels

Die Proben (je 20 µg Gesamt-RNA pro Spur) wurden auf ein 1,0%iges RNA-Gel aufgetragen und bei maximal 100 V aufgetrennt. Das Gel wurde kurz mit Wasser gespült, anschließend unter Schwenken zweimal 20 min in 20x SSC äquilibriert. Das Blotten auf eine Nylon-

Membran erfolgte in 20x SSC bei RT. Dazu wurde auf eine Glasplatte ein in 20x SSC getränktes 3MM Whatman-Papier (als Reservoir) gelegt, darauf zwei Blatt Filterpapier, ebenfalls in 20x SSC getränkt, darauf das Gel, die Membran, zwei weitere Lagen in 20x SSC getränktes Filterpapier, zwei trockene Lagen Filterpapier und ca. 4 cm hoch trockenes saugfähiges Papier. Das Ganze wurde mit einer Glasplatte bedeckt, mit einem Gewicht beschwert und o/n geblottet (Abb. 11).

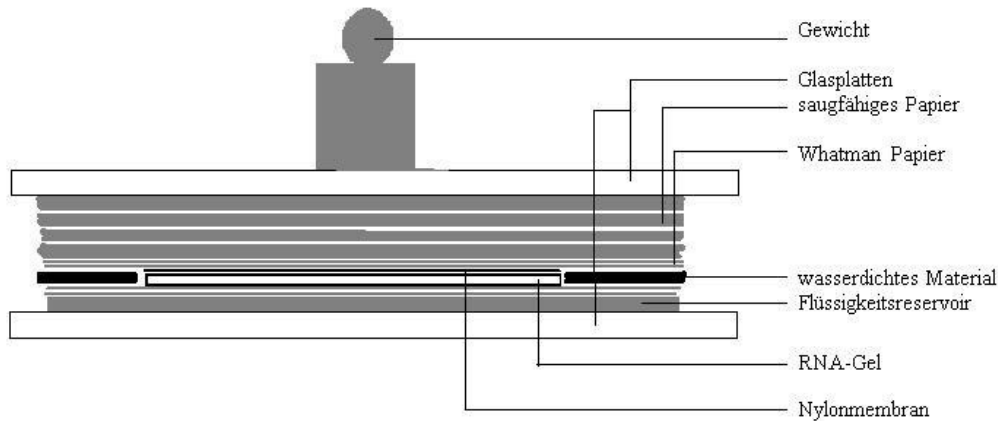


Abb. 14 Aufbau des Northern Blot

Die Membran wurde danach getrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung im Stratalinker kovalent an die Membran gebunden. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Entfernung der hohen Salzkonzentration kurz in 5x SSC gespült.

### Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mit der RNA-Sonde wurde die Membran eine Stunde bei 68°C in 10 ml High-SDS-Puffer inkubiert (Prähybridisierung).

1 µg der DIG-markierten Sonde wurde 10 min zur Denaturierung erhitzt, sofort auf Eis gestellt und dann zu 10 ml High-SDS-Puffer gegeben, in dem dann die Hybridisierung bei 68°C o/n stattfand. Die Membran wurde dann 2x 5 min in Waschpuffer A bei Raumtemperatur und anschließend 2x 20 min in Waschpuffer B bei 65°C gewaschen.

### Detektion

Zur Detektion wurde die Membran zunächst in Waschpuffer C äquilibriert, dann 30 min bei Raumtemperatur in 1x Blockierungslösung geblockt und anschließend 30 min in 1x Blockierungslösung mit einem Anti-DIG Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt war (Anti-DIG-AP), in einer Verdünnung von 1:10000 bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal je 15 min in Waschpuffer C gewaschen, 2 min in Detektionspuffer äquilibriert, in Folie eingeschweißt, mit 1 ml der CSPD-Gebrauchslösung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurde anschließend noch 15 min bei 37°C inkubiert. Die überschüssige CSPD-Lösung wurde abgenommen und die Membran 5 min bis 1 h auf Chemilumineszenz-Detektions-Filmen exponiert. Die Filme wurden maschinell entwickelt.

### 5.2.25 Herstellung <sup>32</sup>P-markierter DNA-Sonden

Für die Analyse von ES-DNA auf homolog rekombinierte Klone wurden Southern Blots mit radioaktiv markierten Sonden verwendet. Das Template für die Markierung wurde aus einer PCR oder einem Restriktionsverdau gewonnen und entsprechend aufgearbeitet.

Für die Markierungen wurde folgender Ansatz verwendet:

100 ng Template DNA

10 µl 5x random-Primer-Mix

ad 25 µl ddH<sub>2</sub>O

10 min bei 95°C denaturieren

10 µl 5x dCTP-Puffer (enthält dATP, dGTP, dTTP)

5 µl <sup>32</sup>P-α-dCTP (50 µCi)

1 µl Kleenow-Polymerase (5 U)

Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend über NucTrap-Probe-Säulen aufgereinigt: Dazu wurden die Säulen mit 80 µl STE-Puffer äquilibriert, die mit STE auf 80 µl aufgefüllte Probe geladen und anschließend mit 80 µl STE-Puffer gewaschen. Das Eluat und der Puffer des Waschschrittes wurden vereinigt. Dann wurde 1 µl der Lösung im Szintillationszähler gemessen (1 min, Programm für <sup>32</sup>P).

### 5.2.26 Southern Blot

#### Blotten des DNA-Gels

Nach Auftrennung der DNA über ein 0,8%iges TAE Agarose-Gel wurde das Gel kurz in Wasser gespült, zur Depurinierung 10 min in 0,125 M HCl inkubiert und anschließend 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt. Der Blotaufbau erfolgte wie für Northern Blot beschrieben, jedoch wurde o/n in Denaturierungslösung geblottet. Danach wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung im Stratalinker kovalent an die Membran gebunden.

#### Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran zunächst mindestens 1 h bei 65°C in Church-Puffer prähybridisiert. Dann wurden 1-3x10<sup>6</sup> dpm/10 ml der markierten Sonde zugesetzt und über Nacht hybridisiert. Anschließend wurde die hybridisierte Membran einmal kurz in Waschpuffer gespült und dann 45 min bei 65°C gewaschen.

## Detektion

Die Membranen wurden auf Imagingplatten o/n exponiert und diese dann im Phosphorimager ausgelesen.

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 Aufreinigung von Proteinen mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose

48 h nach Transfektion mit pSecTagNotchEGF1-5 bzw. pcDcnMycHis in NIH/3T3-Zellen wurden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Dazu wurde das Medium 1 h bei 4°C mit 60 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Beads inkubiert und anschließend auf eine PolyPrep-Säule geladen. Die Agarosebeads wurden fünfmal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS) gewaschen und in 100 µl 100 mM EDTA eluiert. Die Expression der Proteine wurde im Silbergel und im Westernblot überprüft.

### 5.3.2 Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird der Analyt ionisiert. In diesen Fall erfolgte die Ionisation durch ESI (Elektrospray Ionisation), eine besonders für große Moleküle (z.B. Proteine) geeignete Variante. Im Analysator werden die Ionen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Der Detektor ist meist ein Sekundärelektronenvervielfacher.

Die massenspektrometrische Analyse der enthaltenen Zuckerstrukturen wurde von Nadia Rana im Labor von Dr. Robert Haltiwanger durchgeführt. Die über die Nickelsäule angereicherten Notch-EGF-Fragmente wurden zunächst über ein präparatives SDS-Gel gereinigt und mit Trypsin verdaut, um definierte Peptide zu erhalten, die dann weiter analysiert werden konnten. Das tryptische Peptid der EGF4 (137SCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYICR165) wurde zur Analyse in einer mit Tandem-MS gekoppelten Flüssigchromatographie verwendet. In der Flüssigchromatographie wurde das Peptid ankonzentriert, um anhand der Retentionszeit der LC und der Fragmentierungsmuster der MS/MS analysiert zu werden.

### 5.3.3 Golgipräparation

2 h nach der Induktion mit 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 g bei 4°C geerntet. Das Pellet wurde in dem doppelten Volumen kaltem 10 mM NaN<sub>3</sub> resuspendiert und in vorher gewogene 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets gewogen und ein zweites Mal mit NaN<sub>3</sub> gewaschen. Zum Abbau der Zellwand wurde das Pellet dann im dreifachen

Volumen Zymolyasepuffer resuspendiert, mit 2 mg Zymolyase pro Gramm Zellen versetzt und 20 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Sphäroblasten wurden anschließend 5 min bei 1000 g pelletiert. Diese wurden im fünffachen Volumen Lysispuffer resuspendiert und durch zehn Hübe im Dounce homogenisiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 1500 g abgetrennt. Der Überstand wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert, um die ER-Fraktion abzutrennen. Das ER-Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der 10000 g-Überstand wurde in ein Ultrazentrifugengefäß überführt und 1 h bei 100000 g zentrifugiert. Das Golgi-Pellet wurde dann in 1 ml Lysispuffer aufgenommen, in 105 µl-Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Golgivesikel bei -80°C gelagert. Ein abgewandeltes Protokoll wurde für die Präparation von Golgivesikeln aus NIH/3T3-Zellen verwendet: Zellen aus drei 500 ml-Zellkulturflaschen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Abschaben in PBS abgelöst. Die Zellen wurden dann sedimentiert und das Pellet auf Eis in Lysispuffer nach obenstehendem Protokoll weiterverarbeitet.

### **5.3.4 Transportassay**

Für den Transportassay wurden 50 µl der Golgivesikel-Suspension zunächst für 30 s bei 30°C im Schüttler vorinkubiert. Dann wurden 50 µl Assaypuffer (mit 1 µM radioaktivem Nukleotidzucker in der Endkonzentration) zugesetzt und der Ansatz weitere 30 s bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Assaypuffer (ohne radioaktiven Nukleotidzucker, aber mit 2 µM des entsprechenden nicht-radioaktiven Nukleotidzuckers) gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine zuvor mit Assaypuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran pipettiert und dreimal mit 2 ml eiskaltem Assaypuffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in ein Szintillationsröhrchen überführt, mit 1,5 ml Szintillator versetzt und im Falle der <sup>3</sup>H-markierten Zucker nach 1 h im Szintillationszähler gemessen (5 min); <sup>14</sup>C-markierte Zucker wurden nach 10 min gemessen (1 min).

### **5.3.5 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Assay. Die Gebrauchslösung wurde aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B gemischt. Für die Standardreihe wurde BSA in den Konzentrationen 200, 150, 100, 50 und 25 mg/ml in 0,9% NaCl eingesetzt. Von den Proben wurden Doppelbestimmungen, von der Standardreihe Vierfachbestimmungen durchgeführt. Je 10 µl der Standards bzw. Proben wurden in Elisaplaten mit 200 µl Gebrauchslösung versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Messung erfolgte am KC4-Elisa-Reader.



### 5.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter reduzierenden Bedingungen wurden über die SDS-PAGE Proteingemische nach der Größe der enthaltenen Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem mit 3%igem Sammelgel und 12%igem Trenngel verwendet. Dabei wurden 8,5 cm breite Gele mit 6,5 cm Trennstrecke eingesetzt.

12%iges Trenngel      30% (v/v) Acrylamidlösung  
                                  375 mM Tris/HCl, pH 8,8  
                                  0,1% (w/v) SDS  
                                  0,1% (w/v) APS  
                                  0,1% (v/v) TEMED

3%iges Sammelgel      7,5% (v/v) Acrylamidlösung  
                                  125 mM Tris/HCl, pH 6,8  
                                  0,1% (w/v) SDS  
                                  0,1% (w/v) APS  
                                  0,1% (v/v) TEMED

Die Proben wurden in Laemmli-Puffer 10 min bei 95°C bzw. in Probenpuffer für Nukleotidzucker-Transporter 20 min bei RT denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 25 mA im Trenngel.

### 5.3.7 Silberfärbung

Zum Nachweis von Proteinen im Gel wurde die Methode der Silberfärbung verwendet. Diese erreicht Nachweisgrenzen von Subnanogramm-Mengen von Protein. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch deren funktionelle Gruppen und Peptidbindungen in Silberkeime umgewandelt. In einem der Fotografie ähnlichen Prozess werden alle Silberionen im Gel reduziert; dies geschieht in der Nähe der Silberkeime wesentlich schneller als im übrigen Gel, daher färben sich die Proteinbanden schneller dunkelbraun bis schwarz. Um eine komplette Reduktion im gesamten Gel zu verhindern, wird die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Intensität durch starke Änderung des pH-Wertes mit verdünnter Essigsäure gestoppt.

Das Gel wurde 1 h in Fixierer geschwenkt, anschließend dreimal 20 min in 50% EtOH und 1 min in Natriumthiosulfatlösung. Nach dreimaligem Waschen (je 20 s) mit Wasser wurde das Gel 20 min in Silbernitratlösung inkubiert und erneut mit Wasser gewaschen (zweimal 20 s). Dann wurde das Gel so lange in Entwickler inkubiert, bis Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde es zweimal 2 min mit Wasser gespült, 10 min in Stopplösung, 30 min in 30% EtOH und 30 min in 3% Glycerol inkubiert. Danach wurde das Gel auf Filterpapier bei 80°C auf dem Vakuumtrockner getrocknet.

### 5.3.8 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit Epitop-*tags* wurden die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines senkrecht zur Gelfläche orientierten elektrischen Feldes bei einer Stromstärke von  $2 \text{ mA/cm}^2$  Gel für 1 h im Western Blot im *semi-dry* Verfahren in einer Fast-Blot B44 Blotkammer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel und eine weitere Lage Filterpapier wurden in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei gestapelt. Zur Überprüfung des Transfers und Kennzeichnung der Banden des Molekulargewichtsmarkers wurde die Membran für 2 min in Ponçeau S-Lösung reversibel angefärbt und anschließend durch Schwenken in PBS wieder vollständig entfärbt.

Danach folgte die Detektion der *tag*-markierten Proteine durch eine Immunfärbung. Dazu wurde die Membran zunächst für 30 min in 2% Magermilch in PBS abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit einem *tag*-spezifischen Antikörper (Maus-anti-FLAG 1:1000, Maus-anti-Myc 1:1000 bzw. Ratte-anti-Decorin 1:500 in 2% Magermilch) 1,5 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-AP 1:5000 bzw. Anti-Ratte-AP 1:5000 in 2% Magermilch) für 1 h. Die Membran wurde dann zweimal mit PBS gewaschen, in AP-Puffer äquilibriert und mit BCIP/NBT (je  $66 \mu\text{l}$  in 10 ml AP-Puffer) gefärbt, bis Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch Spülen in Wasser gestoppt.

Alternativ erfolgte die Detektion mit dem Odyssey Infrarot Imaging System. Dazu wurden die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet (1 h,  $3 \text{ mA/cm}^2$  Gel). Die Membran wurde für 1 h in Odyssey Blocking Puffer/PBST 1:2 abgesättigt und anschließend 1,5 h mit dem primären Antikörper (Ratte-anti-Decorin 1:500, Maus-anti-Myc 1:1000 in Odyssey Blocking Puffer/PBST 1:2) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (IRDye800 Ziege-anti-Ratte bzw. IRDye800 Esel-anti-Maus 1:20000 in Odyssey Blocking Puffer/PBST 1:2) für 1 h unter Lichtausschluss. Danach wurde die Membran viermal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzsignale wurden im 800 nm-Kanal des Odyssey Infrarot Imaging Systems detektiert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Subzelluläre Lokalisierung des Slc35b4

Da Glykosylierungsreaktionen in erster Linie im Lumen des ER und des Golgi-Apprates stattfinden und die Aktivierung der Zucker überwiegend im Zytoplasma erfolgt, sind Transportsysteme nötig, die die Substrate der Glykosyltransferasen vom Zytoplasma ins Innere der Organellen transportieren. Nukleotidzucker-Transporter befinden sich in der Membran des ER oder Golgi-Apprates. Dabei korreliert in der Regel die Lokalisierung der Transporter mit der der entsprechenden Glykosyltransferasen.

Bisher waren nur die Daten des humanen UDP-Xylose-Transporters Slc35b4 verfügbar, nicht aber die des orthologen Transporters in der Maus. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation des murinen Proteins wurde Slc35b4 in Mauszellen (NIH/3T3) als rekombinantes Protein mit einem N-terminalen Myc/His-Tag unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalovirus)-Promotors exprimiert (pcSlc35b4MycHis). Zusätzlich wurden die NIH/3T3-Zellen transient mit einem Golgi-Marker (pAcGFP1-Golgi) kotransfiziert. Die Zellen tolerierten jedoch die Überexpression des Slc35b4-Proteins nur in geringem Ausmaß: Ein erheblicher Teil der Zellen starb bzw. war in vielen Zellen der Golgi-Apparat mit den angewandeten Methoden nicht darstellbar.

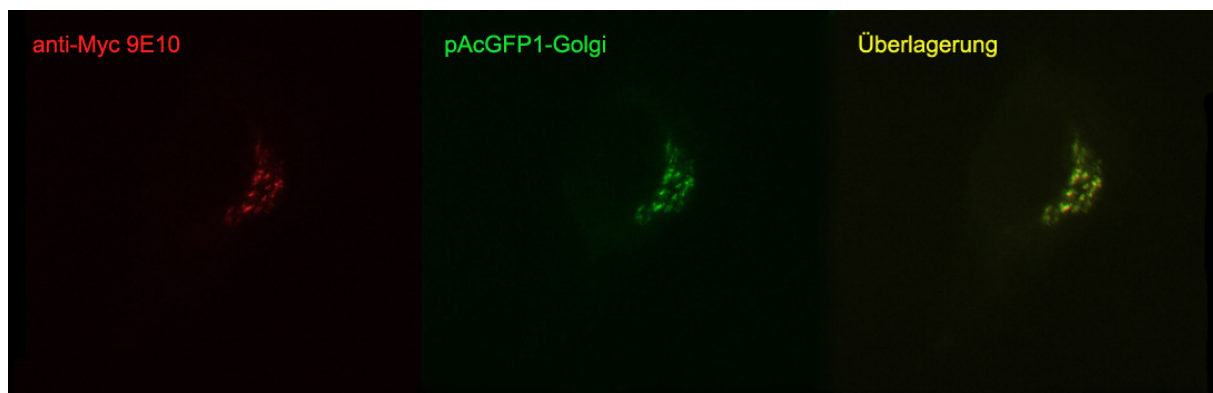


Abb. 14 Subzelluläre Lokalisierung des Slc35b4: NIH/3T3-Zellen wurden transient mit pcSlc35b4MycHis und pAcGFP1-Golgi kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Detektion durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie mit dem anti-Myc-9E10-Antikörper als primärem und anti-Maus-Cy3 als sekundärem Antikörper. Der Myc-markierte Transporter (rot) kolokalisiert mit dem Golgi-Marker (pAcGFP1-Golgi, grün).

Der murine Transporter Slc35b4 zeigt die gleiche Lokalisation wie der Golgi-Marker und ist demnach ein Golgi-ständiges Protein (Abb. 14).

## 6.2 Untersuchung der Transportspezifität des Slc35b4

Die Transportspezifität des murinen Slc35b4 wurde durch heterologe Expression des Gens in *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt. Die Studien wurden in Hefe durchgeführt, da in diesem Organismus im Vergleich zu Mammalierzellen nur für wenige Nukleotidzucker endogener Transport zu beobachten ist. Da gleichzeitig auch der Transport von UDP-GlcNAc untersucht werden sollte, wurde ein mutierter Hefestamm verwendet (BY4741-YEL004w::kanMX4), der einen ausgeschalteten UDP-GlcNAc-Transporter (YEA4) enthält und daher eine reduzierte Transportaktivität für UDP-N-Acetylglukosamin aufweist.

Der Transport radioaktiv markierter Zuckernukleotide wurde *in vitro* mit Golgi-reichen Mikrosomenfraktionen aus mit pYesSlc35b4 transformierten Hefezellen gemessen. Nach Induktion mit CuSO<sub>4</sub> wurden daraus Golgivesikel gewonnen und für die Bestimmung der Transportaktivität für verschiedene radioaktiv markierte Nukleotidzucker ([<sup>3</sup>H]-UDP-Glc, [<sup>3</sup>H]-UDP-GlcNAc, [<sup>3</sup>H]-UDP-Gal, [<sup>3</sup>H]-UDP-GalNAc, [<sup>14</sup>C]-UDP-Xyl und [<sup>14</sup>C]-UDP-GlcA) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nicht mit CuSO<sub>4</sub> induziert wurde. UDP-Glukose (UDP-Glc) diente als Qualitätskontrolle der Golgivesikelpräparation.

Für UDP-Galaktose (UDP-Gal), UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) und UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcA) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Negativkontrolle und Zellen mit Slc35b4-Expression beobachtet.

Die Golgifraktion der Slc35b4 exprimierenden Zellen zeigte eine etwa doppelt so hohe Transportaktivität (9,2 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) für UDP-GlcNAc wie die Negativkontrolle (4,1 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Die UDP-Xyl-Transportaktivität betrug 1,8 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> für die Negativkontrolle und 6,4 pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> für die Zellen, die Slc35b4 exprimierten (Abb. 15). Der murine Transporter weist damit die gleiche Substratspezifität auf wie das humane Homolog (Ashikov, 2005).

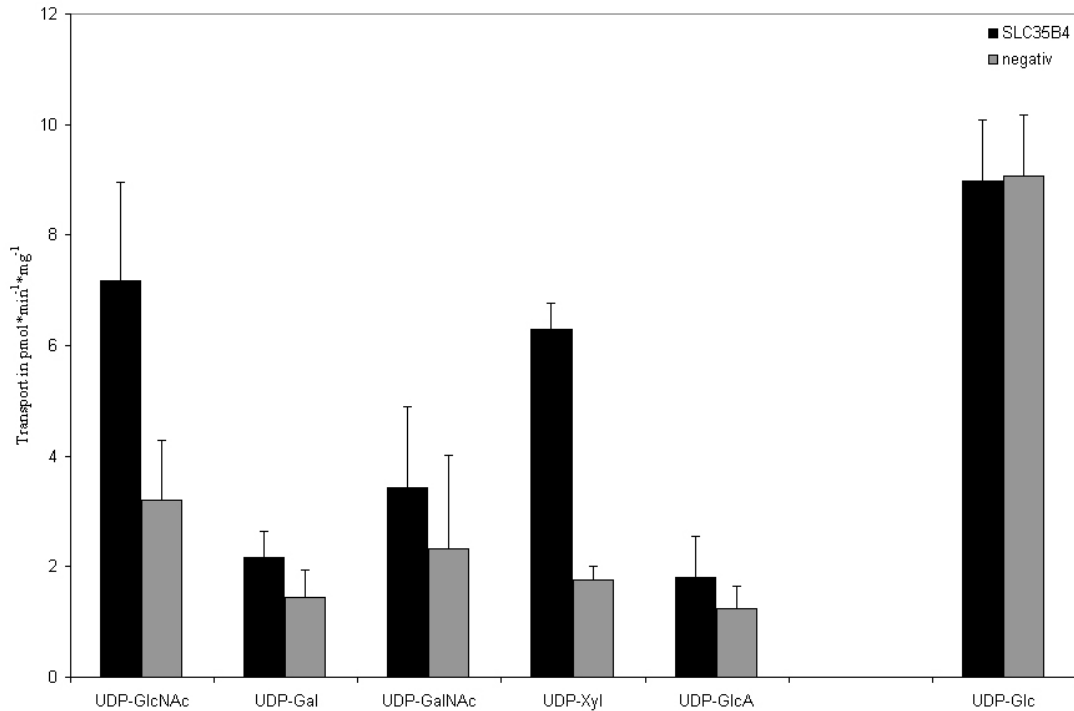


Abb. 15 Transportspezifität des SLC35b4: graue Balken geben die Aktivität des Transporters in transfizierten Hefezellen ohne Induktion an (Negativkontrolle), schwarze Balken zeigen die Transportaktivität nach Induktion. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

### 6.3 Gewebsspezifische Expression des SLC35b4

Mittels RT-PCR wurde bereits gezeigt, dass *slc35b4* in der Maus ubiquitär exprimiert wird (Fuhlrott, Diplomarbeit). Dies sollte im Northern Blot überprüft und quantifiziert werden. Weiterhin sollte im Northern Blot das Auftreten unterschiedlicher Transkripte, wie sie beispielsweise durch alternatives Spleißen auftreten können, untersucht werden.

Eine Hybridisierung mit der DIG-markierten *slc35b4*-Sonde ergab auch nach 16stündiger Exposition nicht das erwartete Signal von 3,6 kb. Eine Normalisierung mit der DIG-markierten *gadh*-Sonde zeigte bereits nach 45minütiger Exposition die erwartete Bande von 1,4 kb (Abb. 16) mit annähernd gleicher Expressionsstärke in allen Spuren. Die geladene RNA war demnach intakt und in ausreichender Quantität geladen. Um die Sensitivität des Testsystems zu erhöhen, wurde ein weiterer Northern Blot mit aufgereinigter mRNA (2 µg/Spur) aus NIH/3T3-Zellen und Leber mit <sup>32</sup>P-dCTP-markierter *gadh*- bzw. *slc35b4*-Sonde hybridisiert (Abb. 17) und über Nacht exponiert. Jedoch konnte auch mit mRNA und radioaktiv markierter Sonde kein Signal für die Transkripte des *slc35b4* nachgewiesen werden, was auf eine sehr geringe Expressionsstärke des Transporters schließen lässt.

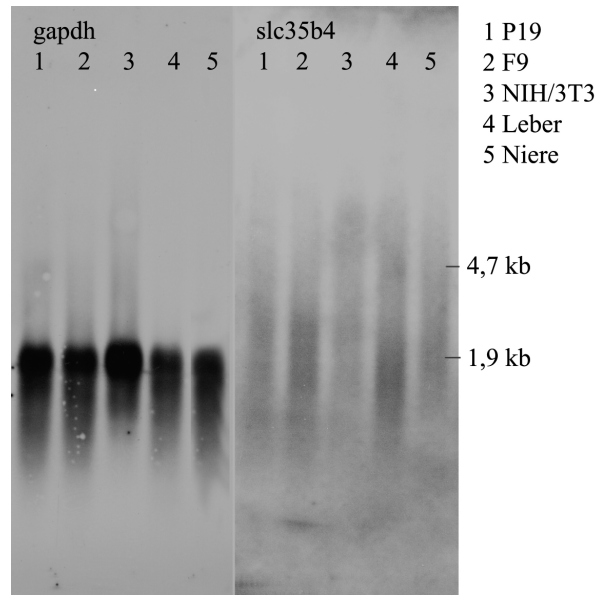


Abb. 16 Northern Blot mit Gesamt-RNA aus P19, F9, NIH/3T3-Zellen, muriner Leber und Niere. Hybridisierung mit *gapdh*- (Spur 1-5 links) bzw. *slc35b4*-Sonde (Spur 1-5 rechts). Der *gapdh*-Blot wurde 45 min exponiert und lieferte ein Signal von 1,4 kb; der *slc35b4*-Blot wurde 16 h exponiert, zeigte jedoch kein spezifisches Signal.

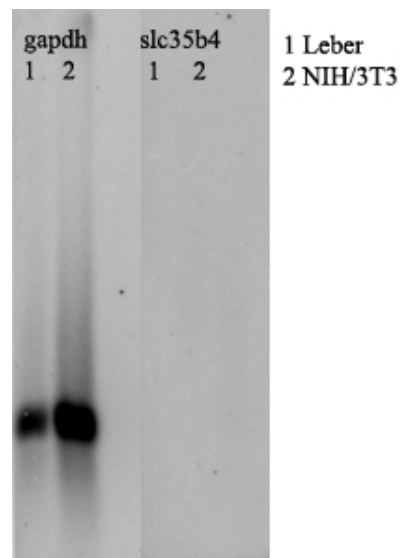


Abb. 17 Northern Blot mit mRNA aus muriner Leber und aus NIH/3T3-Zellen. Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -markierter *gapdh*- bzw. *slc35b4*-Sonde und Exposition über Nacht.

## 6.4 Knockout-Modelle

Für die funktionelle Charakterisierung von Genen bzw. Genprodukten stehen zahlreiche zellbiologische und molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Jedoch abstrahieren *in vitro*-Systeme häufig die Situation und sind daher nicht für alle Untersuchungen gleichermaßen geeignet. Insbesondere wenn Interaktionen zwischen Zellen oder Geweben in einem multizellulären Organismus untersucht werden sollen, werden *in vivo*-Systeme benötigt. Daher wird häufig auf die Knockout-Technologie zurückgegriffen, die eine wertvolle Methode der Untersuchung unbekannter Genfunktionen im Kontext des Gesamtorganismus darstellt.

### 6.4.1 Konstitutioneller Knockout

Das murine *slc35b4*-Gen befindet sich auf Chromosom 6 und erstreckt sich über ca. 28 kbp. Die kodierende Sequenz wird von neun Introns unterbrochen. Das Slc35b4-Protein enthält zehn Transmembrandomänen (TMD). Bis zur fünften TMD entsprechen die Exongrenzen denen der TMDs, das heißt, das erste Exon enthält die erste TMD, das zweite Exon die zweite TMD usw. Ab der sechsten TMD sind diese Grenzen jedoch gegeneinander verschoben.

Es wurde eine vollständige Inaktivierung des Gens angestrebt, die die Expression von verkürzten Transkripten und damit die Entstehung von Proteinfragmenten des Slc35b4 verhindern sollte. Dies erschien notwendig, da NSTs als Oligomere in der Membran vorliegen (Puglielli, 1999; Hong, 2000; Gao, 2001), und einzelne Bruchstücke des Slc35b4 möglicherweise die Spezifität anderer Transporter modulieren könnten.

Daher war die Deletion des ersten Exons Ziel der Knockout-Strategie (Abb. 18). Um gleichzeitig die endogene Expression des *slc35b4* untersuchen zu können, sollte das erste Exon nicht nur deletiert, sondern durch einen Reporter ( $\beta$ -Galaktosidase) ersetzt werden, der unter Kontrolle des *slc35b4*-Promotors steht und damit eine Analyse der endogenen Expression des Transporters erlaubt. Auf das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen folgte ein Stop-Kodon und ein eigener polyA-Schwanz, um das Spleißen und die Translation der darauf folgenden Exons des *slc35b4* zu verhindern. Eine mit *loxP*-Stellen flankierte Neomycinphosphotransferase-Kassette (neo-Kassette) diente der Selektion in ES-Zellen. Durch Cre-vermittelte Deletion kann diese neo-Kassette später problemlos wieder aus dem Genom entfernt werden. Zur Erhöhung der Frequenz homologer Rekombination wurde am 5'-Ende des Targeting-Vektors eine Diphtherietoxin A (DT)-Kassette eingefügt: Bei zufälliger Integration ins Genom bleibt die DT-Kassette in der Regel erhalten; das Protein wird exprimiert und zerstört die Zelle. Bei homologer Rekombination hingegen wird die DT-Kassette nicht in den Locus eingebaut.

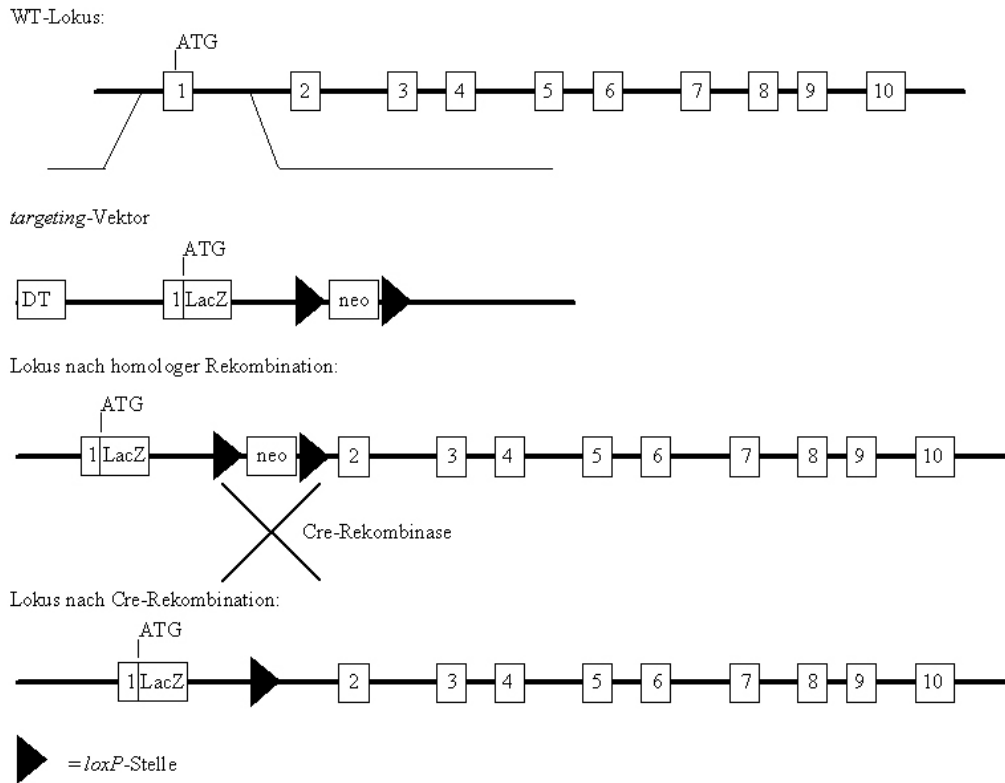


Abb. 18 Strategie zur konstitutionellen Inaktivierung des *slc35b4*: Exon 1 wurde durch das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*LacZ*) ersetzt, das so als Reporter für die Expression des *slc35b4* dient. Gleichzeitig wird durch Entfernen des ersten Exons die Expression des Zielgens verhindert. Eine von *loxP*-Stellen flankierte *neo*-Kassette diente als Selektionsmarker in ES-Zellen, die DT-Kassette wurde zur Negativselektion eingesetzt.

Der Targeting-Vektor setzte sich zusammen aus der DT-Kassette, einer 2,7 kbp umfassenden 5'-Flanke mit Teilen des Promotors und der 5' untranslatierten Region des ersten Exons, dem direkt auf das endogene ATG folgenden  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*LacZ*), einer *loxP*-flankierten *neo*-Kassette und einer 3'-Flanke von 3,3 kbp mit einem Teil des ersten Introns (Abb. 19).

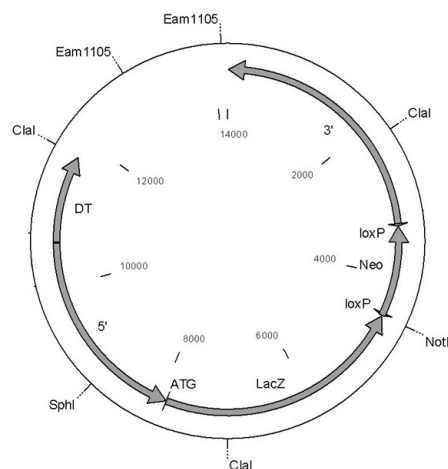


Abb. 19 Targeting-Vektor für den konstitutionellen Knockout des *Slc35b4* bestehend aus Diphtherietoxin-Kassette (DT), 5'-homologem Sequenzbereich (5'),  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*LacZ*), gefloxter *neo*-Kassette (*loxP*, *neo*, *loxP*) und 3'-homologem Sequenzbereich (3').



Insgesamt wurden  $1,5 \times 10^7$  ES-Zellen elektroporiert. davon überlebten 768 Klone die neo-Selektion. Zunächst wurden die erhaltenen Klone mittels PCR auf homologe Rekombination untersucht. Dafür wurden die in Abb. 20 dargestellten Primer (JF F80 und JF B81) verwendet.

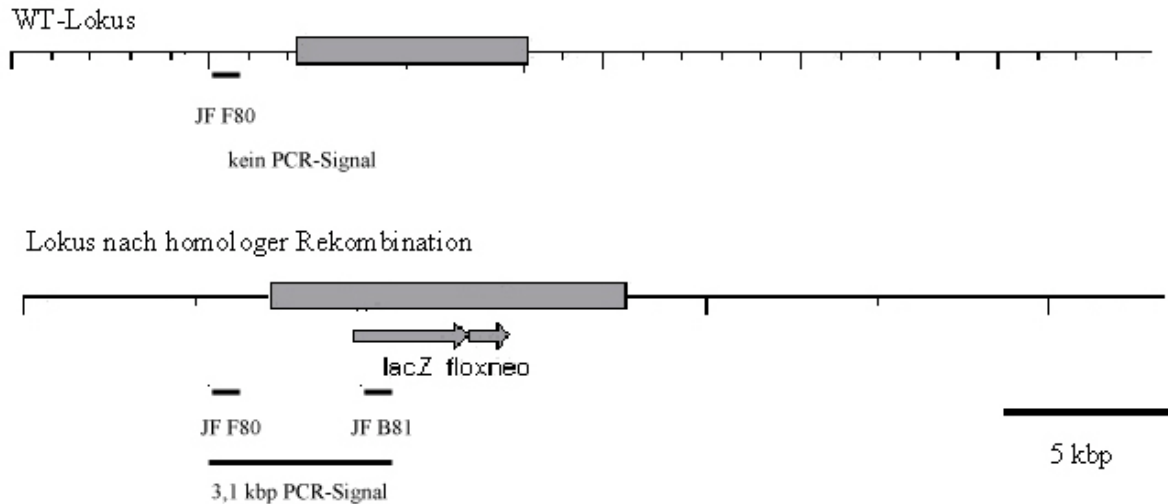


Abb. 20 Übersicht der Screening PCR: Mit den Primern JF F80 und JF B81 kann nur der Locus nach homologer Rekombination detektiert werden, nicht aber der Wildtyp-Lokus oder zufällige Insertion des Targeting-Vektors. Die erwartete Fragmentlänge betrug 3,1 kbp.

Da JF F80 außerhalb des im Targeting-Vektors enthaltenen homologen Sequenzbereiches bindet und JF B81 im  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (LacZ), sollten mit dieser PCR ausschließlich Klone mit korrekt rekombiniertem Targeting-Vektor identifiziert werden. Die erwartete Fragmentlänge betrug 3,1 kbp. Weder der Wildtyp-Lokus noch zufällig eingebaute Targeting-Konstrukte sollten ein Signal ergeben. In etwa 500 Klonen zeigte in der PCR jedoch kein Klon die erwartete Bande von 3,1 kbp. Da keine Positivkontrolle vorhanden war, war nicht sicher, ob die PCR ausreichend sensitiv war oder ob unter den analysierten Klonen keiner mit homologer Rekombination enthalten war. Daher wurde diese Analyseverfahren verworfen und die Klone mittels Southern Blot auf homologe Rekombination überprüft. Zur Detektion wurde eine mit  $^{32}\text{P}$  markierte 5'-outside Sonde verwendet, die nicht mit dem Targeting-Vektor hybridisieren konnte. Die erwarteten Fragmentlängen waren 8 kbp für den Wildtyplokus und 4 kbp für den mutierten Locus (Abb. 21).

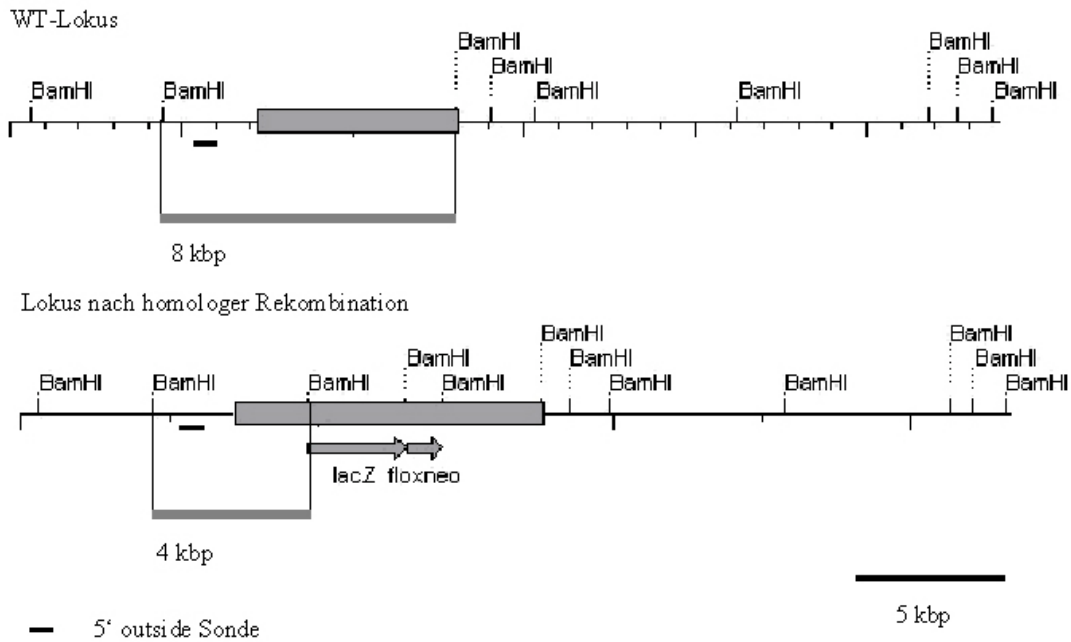


Abb. 21 Southern Blot: Die erwarteten Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI betragen für den Wildtyplokus 8 kbp und für den Lokus nach homologer Rekombination 4 kbp. Zur Detektion wurde die eingezeichnete 5'-outside Sonde verwendet. Grau dargestellt ist der im Targeting-Vektor enthaltene Bereich.

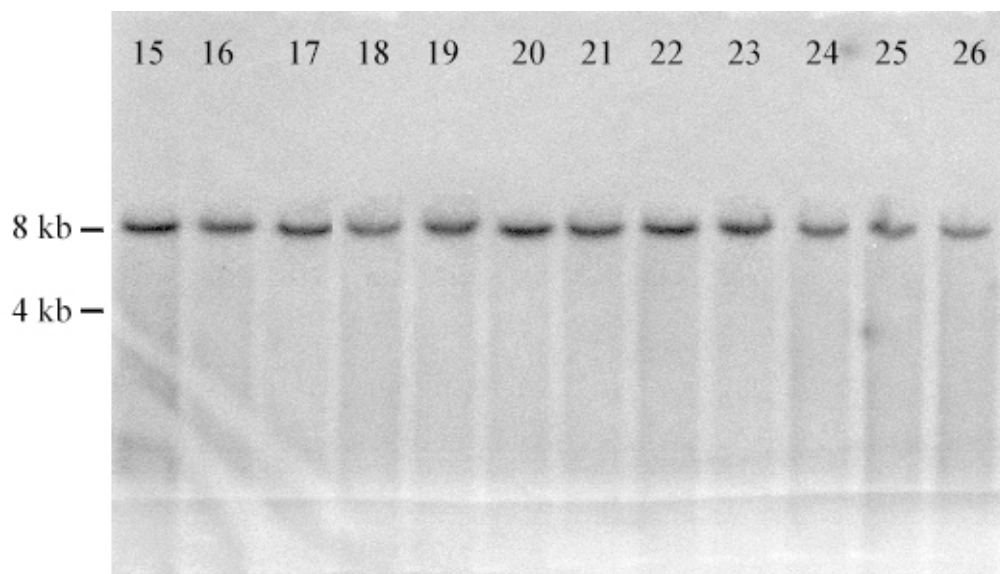


Abb. 22 Southern Blot: Nach *Bam*HI-Verdau und Hybridisierung mit der in Abb. 20 gezeigten 5'-outside Sonde war in allen untersuchten Klonen ein Signal von 8 kbp zu detektieren.

Abb. 22 zeigt beispielhaft einen Southern Blot: In diesem wie auch in allen anderen Blots wurde ausschließlich ein Signal von 8 kbp detektiert, was der erwarteten Fragmentlänge des Wildtyplokus entspricht. Damit konnte in 768 Klonen kein Klon mit homologer Rekombination nachgewiesen werden.

## 6.4.2 Konditioneller Knockout

Bisherige Befunde ließen vermuten, dass Slc35b4 entweder direkt durch Bereitstellung der Substrate oder indirekt durch regulatorische Einflüsse in die korrekte Glykosylierung und Funktion von Notch und die Synthese der Glykosaminoglykanketten von Proteoglykanen involviert ist. Ein konventioneller Knockout des Transporters könnte diese essentiellen Funktionen bereits in der Embryogenese stören und möglicherweise einen embryonal letalen Phänotyp hervorrufen. Beispielsweise ist ein Knockout der O-Fukosyl-Transferase, die essentiell für die Aktivierung von Notch ist, an Tag 8,5 der Embryogenese letal (Shi, 2003).

Um eine mögliche frühe Letalität des konventionellen Slc35b4-Knockout zu umgehen, sollte zusätzlich ein konditionelles Allel generiert werden. Mit diesem System kann der Knockout zeit- und gewebsspezifisch induziert werden. Die konditionelle Ausschaltung des Zielgens erfolgt erst nach Verpaarung mit einer Cre-exprimierenden Maus und Induktion der Cre-Rekombinase. In Abwesenheit von Cre bleibt hingegen das mit *loxP*-Stellen versehene Gen funktionell intakt. Mit Hilfe dieser Technik kann die frühe Letalität vermieden werden und ontogenetisch später auftretende Funktionen des Zielgens können untersucht werden (Plück, 1996).

Dazu sollte durch die Deletion eines oder mehrerer Exons durch Einfügung eines vorzeitigen Stopkodons eine Verschiebung des Leserasters erzeugt werden. Dies sollte zum Abbruch der Translation und zur Verhinderung der Expression unvollständiger aber möglicherweise funktioneller Proteinfragmente führen.

```

ATG CGC CCG GCC TTC GCG GTG GGC CTG GTG TTC GCA GGC TGC TGC AGT AAT GTG ATC TTC
M  R  P  A  F  A  V  G  L  V  F  A  G  C  C  S  N  V  I  F

CTA GAG CTG CTG GCC CGG GCT CTC TGA TTG CCA ACA TGA TTC TAG GAA TTA TCA TTT TGA
L  E  L  L  A  R  A  L  .  L  P  T  .  F  .  E  L  S  F  .

```

Abb. 23 Aus Deletion der Exons 2 und 3 resultierendes Slc35b4-Fragment: Die Markierung kennzeichnet die deletierten Exons 2 und 3.

Die Deletion der Exons 2 und 3 sollte zu einem aus 28 Aminosäuren bestehenden Proteinfragment der Sequenz MRPAFAVGLVFAGCCSNVIFLELLARAL führen (Abb. 23). Dieses umfasst die erste Transmembrandomäne des UDP-Xyl-Transporters und sollte somit keine Transportaktivität aufweisen.

Für den konditionellen Knockout wurde die *Cre/loxP*-Technologie verwendet (Sauer, 1989). Dazu wurden die Exons 2 und 3 mit *loxP*-Stellen flankiert, die mit Hilfe von Cre rekombinieren können und damit den zwischen ihnen liegenden Bereich ausschneiden. Damit die zur Selektion in ES-Zellen benötigte neo-Kassette, die die Expression des zu untersuchenden Gens beeinflussen kann und daher nach der Selektion noch in den Zellen deletiert werden sollte, unabhängig von den Exons entfernt werden kann, wurde diese von zwei FRT-Stellen umschlossen, die von der Flp-Rekombinase erkannt und rekombiniert

werden (Abb. 24). Die Flp- und die Cre-Rekombinase arbeiten streng sequenzspezifisch und beeinflussen sich gegenseitig nicht.

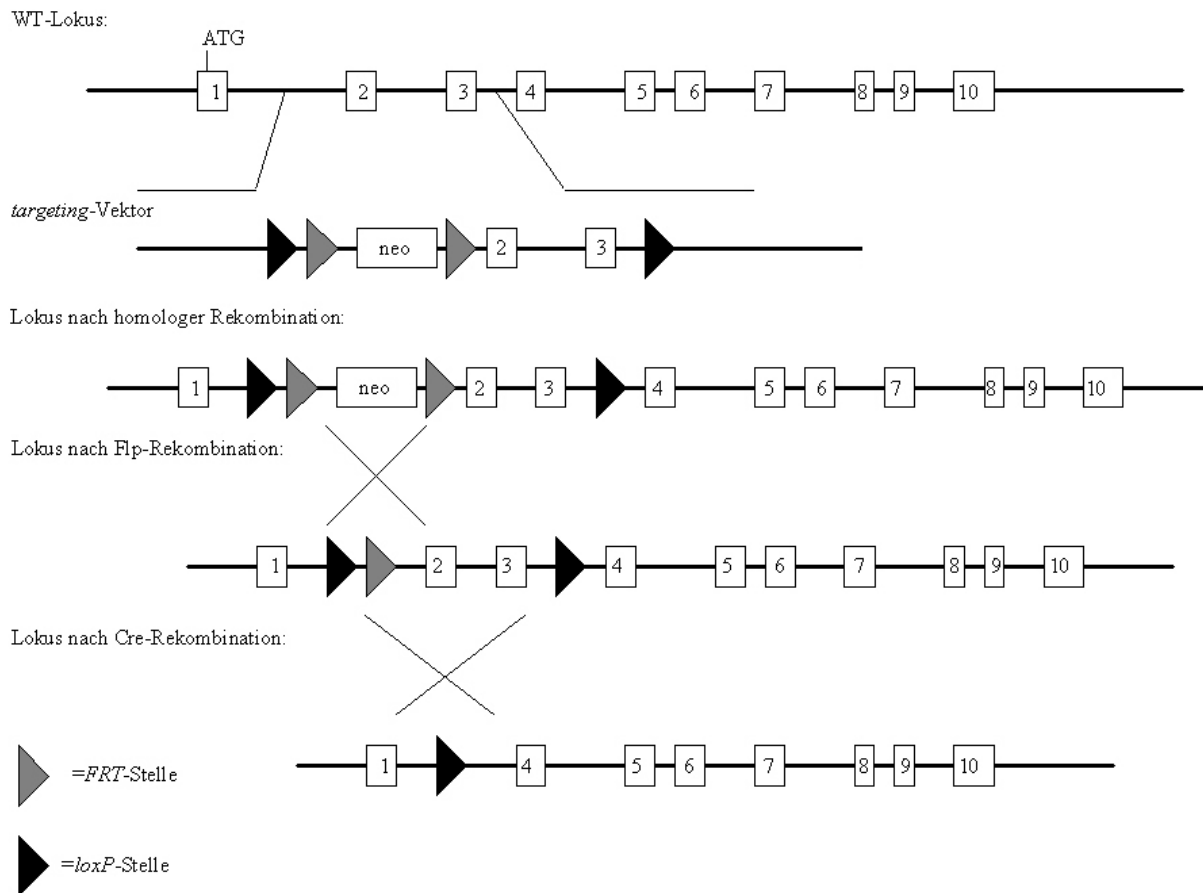


Abb. 24 Konditioneller Knockout: Die Exons 2 und 3 werden von *loxP*-Stellen flankiert. Eine von *FRT*-Stellen umschlossene neo-Kassette dient als Selektionsmarker, der unabhängig von den beiden Exons in ES-Zellen deletiert werden kann.

Die Klonierung des Targeting-Vektors wurde in Auftragsarbeit von Polygene (Rümlang, Schweiz) durchgeführt, ebenso die Elektroporation, Selektion und Analyse der ES-Zellen. Die für die Klonierung benötigten genomischen Fragmente wurden aus dem BAC Klon BMQ-116J20 gewonnen. Der Targeting-Vektor enthält die von *loxP*-Stellen flankierten Exons 2 und 3, eine kurze homologe Region von 2,3 kbp 5' der neo-Kassette und einen langen homologen Arm von etwa 15 kbp (Abb. 25).

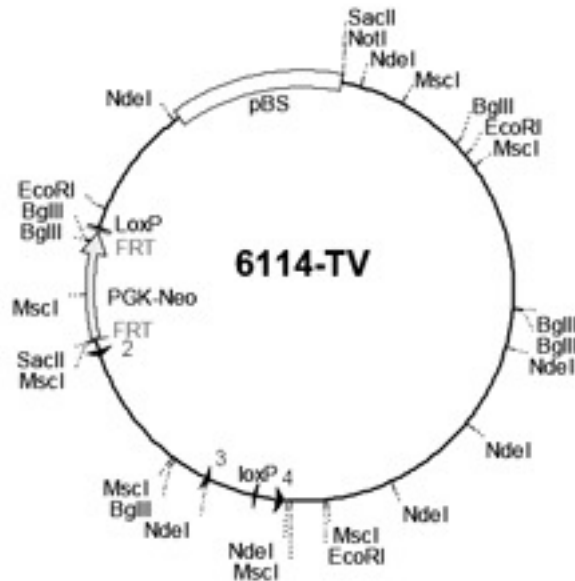


Abb. 25 Targeting-Vektor für den konditionellen Knockout.

In diesem Targeting-Vektor ist eine neo-Kassette (PGK-Neo) enthalten, die für die Neomycin-Phosphotransferase II (NPTII) kodiert. Im Vergleich zur Neomycin-Phosphotransferase I ist das Kodon 182 von GAG nach GAT mutiert, was eine Substitution von Glutamat durch Aspartat bewirkt. NPTII ist empfindlicher auf G418 als die WT-Neomycin-Phosphotransferase. Mit Hilfe der NPTII ist es möglich, durch Erhöhung der G418-Konzentration einen Selektionsdruck auf die ES-Zellen auszuüben, so dass homozygote Zellen erhalten werden können, die neben der Knockout-Maus ebenfalls ein wertvolles Werkzeug zur Analyse des *Slc35b4* darstellen auf zellulärer Ebene werden (Yenofsky, 1990).

## 6.5 Zelluläres Knockdown-Modell

### 6.5.1 RNA-Interferenz - Auswahl der Zielsequenz

Da der Zeitrahmen dieser Arbeit eine Funktionsanalyse des Transporters in der Maus nicht mehr ermöglichte, wurde ein auf RNA-Interferenz basierender Ansatz auf Zellkulturebene gewählt. Dabei wurde die Bedeutung des *Slc35b4* bei der Synthese der Glykosaminoglykane und der Glykanstrukturen der EGF-Domänen von Notch adressiert.

In Gegensatz zum Knockout-Modell wird mit RNA-Interferenz meist keine vollständige Inaktivierung des Zielgens erreicht; die Restaktivität bewegt sich je nach Gewebe und Ziel-mRNA zwischen 5 und 40% (Seibler, 2005).

Vorab wurde in den im Labor verfügbaren Maus-Zelllinien P19, F9 und NIH/3T3 die Expression des *slc35b4*-Gens untersucht. Da eine Detektion des Transkripts in den Zellen mittels Northern Blot Analyse nicht möglich war (Abb. 16, Seite 64), wurde die Expression durch eine sensitivere Methode, die RT-PCR nachgewiesen. Dabei zeigten sowohl P19- als auch F9- und NIH/3T3-Zellen ein PCR-Produkt von 420 Basenpaaren, was der erwarteten Fragmentlänge in der RT-PCR entsprach (Abb. 26).

Da sich NIH/3T3-Zellen am effektivsten transfizieren ließen, wurden diese für die Generation einer shRNA(*short hairpin RNA*)-exprimierenden Zelllinie ausgewählt.

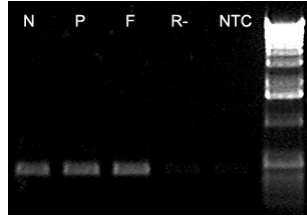


Abb. 26 RT PCR zur Bestimmung der endogene Expression des *slc35b4* in verschiedenen Maus-Zelllinien (N = NIH/3T3, P = P19, F = F9, R- = RT-Kontrolle ohne RNA, NTC = *no template control*).

Um eine möglichst hohe Effizienz der Repression des *slc35b4*-Transkripts zu erlangen, war es nötig, mehrere shRNA-Sequenzen zu testen. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte mit Hilfe eines Programms (*Ambion siRNA Target Finder*), das sich auf empirische Beobachtungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Sequenz und Effizienz stützt. Anschließend wurden die vom *siRNA Target Finder* ermittelten Sequenzen mittels BLAST überprüft und nur solche zur Analyse ausgewählt, die keine Homologie zu anderen Genen als dem Zielgen *slc35b4* aufwiesen. Die untersuchten Zielsequenzen sind in Abb. 27 dargestellt. Die Loop-Struktur wurde nach Empfehlung vom Hersteller des verwendeten shRNA-Vektors ausgewählt. Die angegebenen Sequenzen wurden in pSiSTRIKE-hm-GFP eingefügt und deren Effizienz, RNA-Interferenz zu induzieren, in einem Reporterassay bestimmt.



	Zielsequenz	Loop	Reverse Zielsequenz
sh1	TAAGGTACTATGCCATCATT	AAGTTCTCT	AAATGATGGCATAGTACCTTA
sh2	CATGATTCTAGGAATTATCTT	AAGTTCTCT	AAGATATTTCTCCTAGAATCATG
sh3	GATACAGTATGTTCAAGTATT	AAGTTCTCT	AATACTTGAACATACTGTATC
sh4	TAAGTCTGAACTCTATCAATT	AAGTTCTCT	AATTGATAGAGTTCAGACTTA
sh5	GCCACCAGCTATCCCAATATT	AAGTTCTCT	AATATTGGGATAGCTGGTGGC
sh6	GGTACTATGCCATCATGGTTT	AAGTTCTCT	AAACCATGATGGCATAGTACC
<i>scrambled</i>	TCTAATCGTTAACGTGATATT	AAGTTCTCT	AATATCACGTTAACGATTAGA

Abb. 27 shRNA-Zielsequenzen und deren Position im Leseraster der *slc35b4*-mRNA.

Die Effizienz einer bestimmten shRNA, die Expression der Zielsequenz zu inhibieren, kann mittels RT-PCR getestet werden. In Zellen, die nur transient mit shRNA transfiziert sind, liegt jedoch die Transfektionseffizienz oft deutlich unter 100%, das heißt, dass in nicht transfizierten Zellen keine Inhibierung der Zielsequenz stattfindet und so ein quantitativer

Nachweis erschwert wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein dualer Luciferase-Reporterassay zur Bestimmung der shRNA-Effizienz genutzt, der eine indirekte Quantifizierung über die Aktivität eines Reporterproduktes ermöglichte. Als Reporterogene fungierten die Luciferasen aus *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) und *Renilla reniformis* (Seefeder). Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität und damit verbundenen Unterschieden in den Lumineszenzeigenschaften konnte die Lumineszenz beider Reporter sequentiell in einem Ansatz gemessen werden.

Beide Luciferasegene befanden sich auf demselben Vektor (pSiCheck-2). Die *Photinus*-Luciferase diente als endogene Kontrolle. Im 3'-Bereich des *Renilla*-Luciferasegens und dessen Translationsstop wurde die cDNA des *slc35b4* eingefügt, so dass eine Fusions-mRNA transkribiert wurde. Zusammen mit diesem Vektor (pSiCheck-slc35b4) wurde ein Vektor transfiziert, der die zu untersuchende shRNA kodiert. Bindet eine spezifische shRNA an die Ziel-mRNA und wird dadurch RNA-Interferenz induziert, wird die Fusions-mRNA degradiert, was eine Verringerung des *Renilla*-Luciferase-Signals im Verhältnis zu dem der *Photinus*-Luciferase zur Folge hat.

Dazu wurden die entsprechenden pSiSTRIKE-Vektoren und pSiCheck-slc35b4 in NIH/3T3-Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden GFP-positive Zellen per FACS (*fluorescence activated cell sort*) angereichert und in daraus gewonnenen Zelllysaten die Luciferase-Aktivität in Doppelbestimmungen gemessen. Als Bezugspunkt dienten Zellen, die nur mit pSiCheck-slc35b4 transfiziert wurden, also keine Reduktion in der Expression aufweisen. Eine shRNA-Kontrolle (*scrambled* shRNA) mit gleicher Nukleotidzusammensetzung wie Zielsequenz sh2, aber einer Sequenz, die maximal 12 Basen Homologie zu Genen des Mausgenoms aufweist, wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Hier sollte ähnlich wie in der Kontrolle ohne shRNA kein Effekt zu beobachten sein. So sollten unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden.

In Abb. 28 ist die relative Lumineszenz der Proben normalisiert auf den internen Standard (*Photinus pyralis*-Luciferase) dargestellt. Der Wert der Kontrolle ohne shRNA wurde auf 100% gesetzt. Die Werte bewegen sich zwischen 10,22% (sh2) und 33,4% (sh1) Restaktivität. Die Lumineszenz der mit der *scrambled* shRNA transfizierten Zellen unterscheidet sich nicht von der Kontrolle ohne shRNA. Die beobachtete Reduktion der Chemilumineszenz ist demnach spezifisch für die jeweilige shRNA und nicht auf globale Effekte der RNA-Interferenz zurückzuführen.

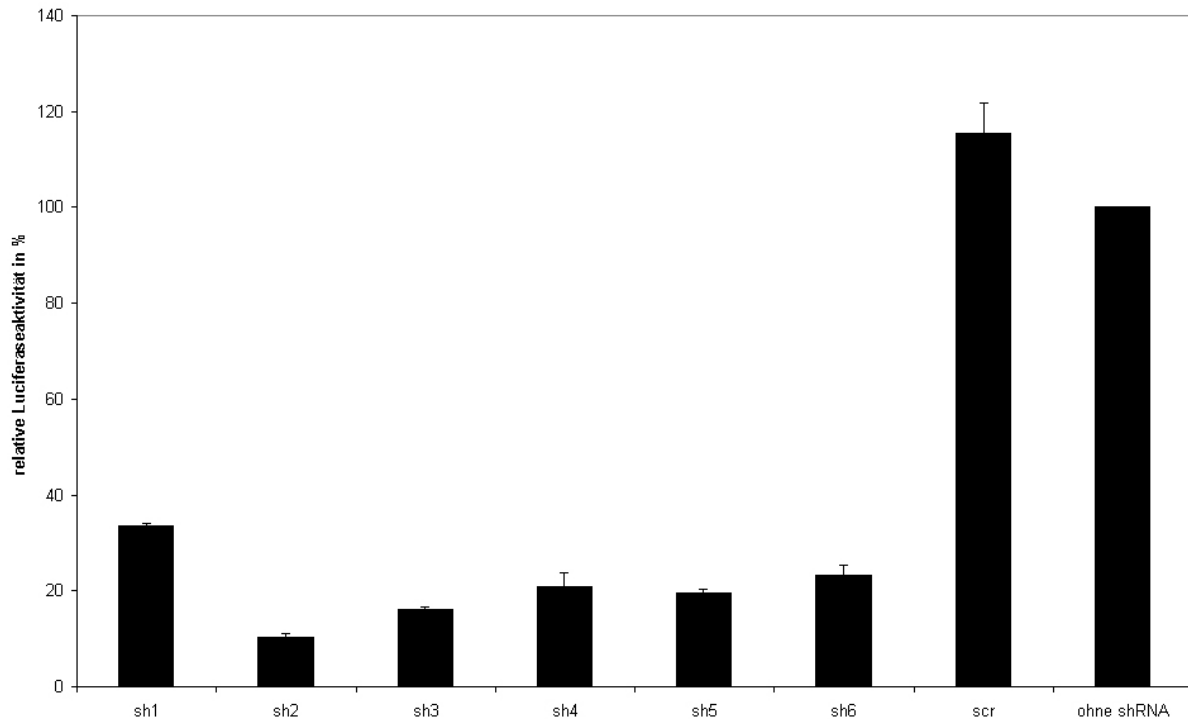


Abb. 28 Dualer Luciferase-Assay: Alle Werte sind auf die Lumineszenz der *Photinus*-Luciferase normalisiert. Der Wert des Bezugspunktes (ohne shRNA-Vektor) wurde auf 100% festgelegt. Alle anderen Werte sind relativ dazu angegeben. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmungen gewonnen.

Für die Generation einer Zelllinie, die eine gegen die *slc35b4*-mRNA gerichtete shRNA exprimiert, wurde aufgrund der geringsten Restaktivität im Luciferase-Assay und damit der höchsten Effizienz psiStrike-sh2-GFP ausgewählt. In diesen Vektor wurde zunächst eine neo-Kassette eingefügt (psiStrike-sh2-neoGFP), um eine Möglichkeit zur Selektion zu haben. Mit psiStrike-sh2-neoGFP transfizierte NIH/3T3-Zellen wurden vereinzelt. Etwa 40 Klone überlebten die Selektion mit G418.

### 6.5.2 Bestimmung der mRNA-Level in shRNA-exprimierenden Klonen

Für die Untersuchung der Funktion des SLC35B4 auf zellulärer Ebene anhand eines RNA-Interferenz-basierten Ansatzes wurde eine Zelllinie mit möglichst geringer Expression des UDP-Xylose-Transporters benötigt. Um unter den stabil transfizierten Klonen diejenigen mit der stärksten Repression der *slc35b4*-mRNA zu identifizieren, wurde, nachdem eine PCR das Vorhandensein der shRNA-Kassette bestätigt hatte, eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst verschiedene Primerpaare auf ihre Effizienz untersucht. Die Primerpaare JF F225/JF B226 für *slc35b4* und JF F227/JF B228 für *hprt* ergaben eine Steigung der Standardkurve von 3,5 bzw. 3,35, was einer Effizienz von 0,88 bzw. 0,98 entsprach. Diese Primerpaare wurden für die relative Quantifizierung des *slc35b4*-Transkriptes anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Als Kalibrator diente der auf *hprt* normalisierte Wert der NIH/3T3-Wildtyp-Zellen.



Normalisierung auf die endogene Kontrolle:

$$C_T \text{ slc35b4} - C_T \text{ hprt} = \Delta C_T$$

Normalisierung auf den Kalibrator:

$$\Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ NIH/3T3} = \Delta \Delta C_T$$

Anhand der  $\Delta \Delta C_T$ -Werte konnte die relative Expression des *slc35b4* in den Klonen LC2, QB9, QE5, QE10, QF5, QG11, RA7, RC7 und RG7 im Vergleich zum Wildtyp (NIH/3T3) bestimmt werden.

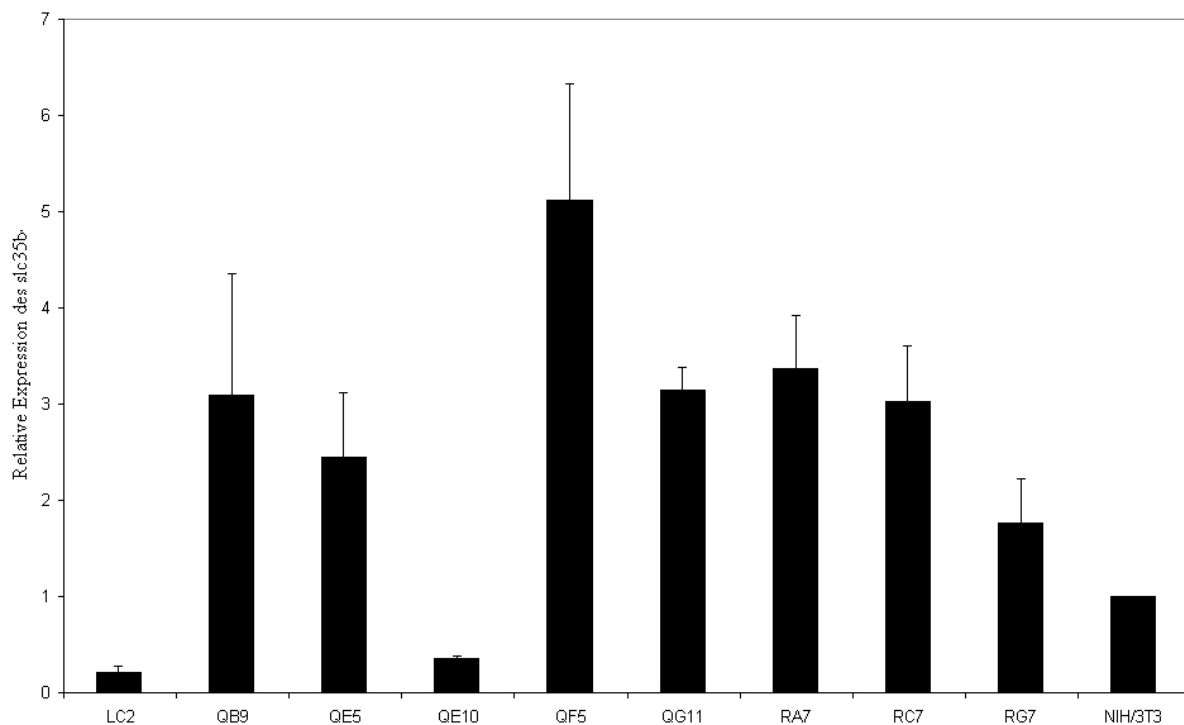


Abb. 29 Relative Expression des *slc35b4*: Die Expression des *slc35b4* in NIH/3T3 wurde auf 1 gesetzt, die Werte der Klone LC2, QB9, QE5, QE10, QF5, QG11, RA7, RC7 und RG7 wurden relativ dazu berechnet. Die Daten wurden aus Dreifachbestimmungen gewonnen.

Auf diese Weise konnten zwei Klone identifiziert werden, die eine deutliche Reduktion der *slc35b4*-mRNA aufwiesen: Im Klon NIH/3T3-LC2 wurden 19%, im zweiten Klon NIH/3T3-QE10 34% der mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp gemessen. (Abb. 29). Alle anderen untersuchten Klone zeigten keine Reduktion der *slc35b4*-mRNA.

### 6.5.3 Transportassay

Aus den Klonen NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 wurden Golgivesikel gewonnen. In den Vesikeln wurde die Transportaktivität für  $[^{14}\text{C}]$ -UDP-Xylose,  $[^3\text{H}]$ -UDP-N-Acetylglukosamin und UDP-Galaktose bestimmt. Als Vergleich diente die entsprechende Transportaktivität von Golgivesikeln aus Wildtyp-NIH/3T3-Zellen und aus transient mit dem Transporter transfizierten NIH/3T3-Zellen. Die Transportaktivität für  $[^3\text{H}]$ -UDP-Galaktose diente in allen Ansätzen als Kontrolle für die Qualität der Vesikelpräparation. Alle Messungen wurden mit zwei unabhängigen Vesikelpräparationen jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt (Abb. 30).

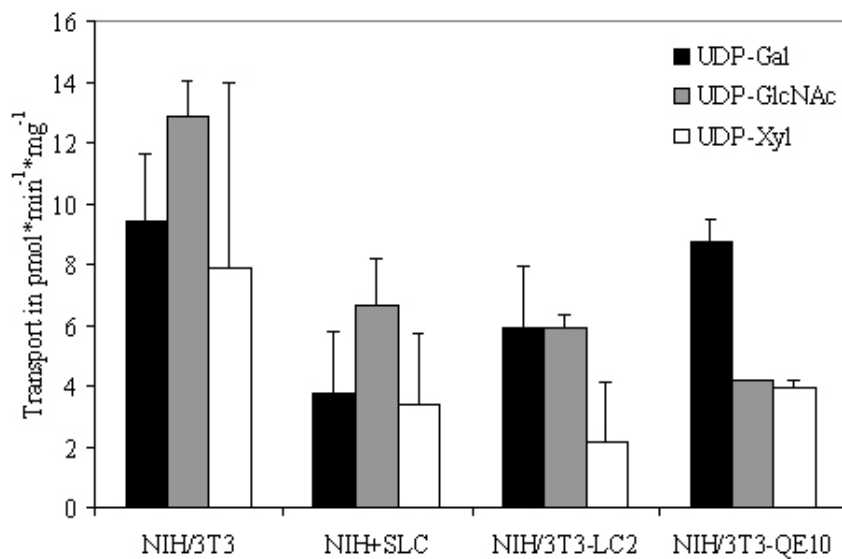


Abb. 30 Transportaktivität von WT-NIH/3T3-Zellen, Slc35b4-überexprimierenden Zellen (NIH+SLC), und den Klonen NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10.

Anhand dieser Rohdaten konnte zunächst die Qualität der Vesikel beurteilt werden: Die Golgivesikel aus Slc35b4-überexprimierende Zellen (NIH+SLC) wiesen mit  $3,79 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  einen deutlich niedrigeren Wert für den UDP-Gal-Transport auf als die anderen Vesikelpräparationen (NIH/3T3:  $9,43 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; NIH/3T3-LC2:  $5,9 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; NIH/3T3-QE10:  $8,8 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Da dies in mehreren Präparationen aus NIH+SLC der Fall war, lag die Ursache wahrscheinlich wie auch bei der Immunzytochemie beobachtet in der generellen Problematik bei der Überexpression solcher Membranproteine. Dadurch war die Qualität der Vesikelpräparationen schlechter und so auch der gemessene UDP-Gal-Transport.

Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden die im Transportassay erhaltenen Daten auf die Werte des UDP-Gal-Transportes normalisiert, d.h. die Werte für UDP-Gal wurden auf 1 gesetzt und UDP-GlcNAc und UDP-Xyl relativ dazu berechnet (Abb. 31).

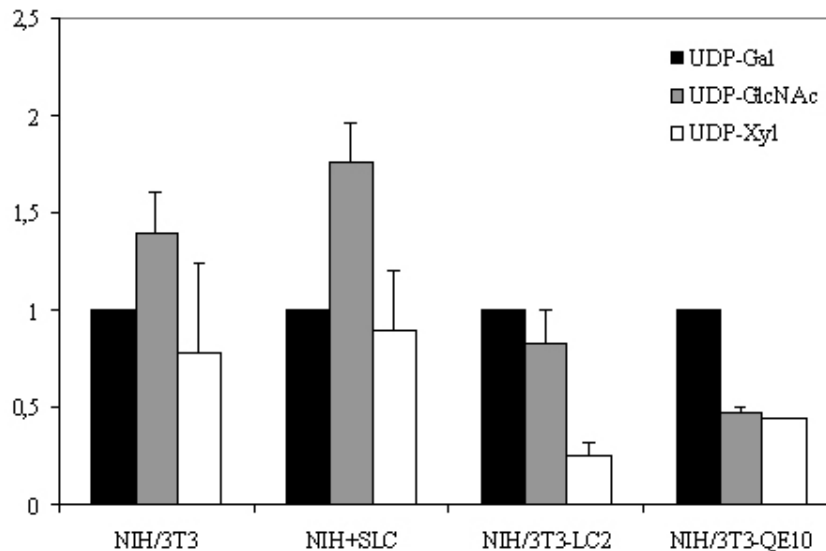


Abb. 31 Transportaktivität relativ zu UDP-Gal: Die in Abb. 30 dargestellten Werte wurden auf den UDP-Gal-Transport normalisiert.

Die Slc35b4 überexprimierenden Zellen (NIH+SLC) zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Transportaktivitäten für UDP-GlcNAc (1,7) und UDP-Xyl (0,9) im Vergleich zum Wildtyp (1,4 für UDP-GlcNAc bzw. 0,8 für UDP-Xyl).

Sowohl in NIH/3T3-LC2 als auch in NIH/3T3-QE10 war eine deutliche Reduktion des UDP-Xyl-Transportes zu beobachten; die sich beim Klon NIH/3T3-LC2 auf 33% (0,26) und beim Klon NIH/3T3-QE10 auf 57,6% (0,45) der Transportaktivität des Wildtyps (0,78) belief. Der UDP-GlcNAc-Transport war in NIH/3T3-LC2 auf 59,2% (0,83), in NIH/3T3-QE10 auf 34% (0,48) des Wildtyps (1,4) reduziert.

#### 6.5.4 Glykosylierung von Notch

Anhand der beiden Klone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10, die eine reduzierte Transportaktivität für UDP-Xylose aufwiesen, sollte die Relevanz des Slc35b4 für die Xylosylierung von Notch untersucht werden. Dazu wurde ein Fragment des Notch-Gesamtproteins, bestehend aus den ersten fünf EGF-Domänen verwendet, das zur Aufreinigung und Detektion mit einem N-terminalen Myc/His-Tag versehen wurde (Abb. 32). Davon enthalten die zweite und vierte EGF-Domäne jeweils eine O-Glukosylierungsstelle, die das Xyl-Xyl-Glc-Glykan trägt (Information von Robert Haltiwanger). Dieses Konstrukt wurde sowohl in NIH/3T3-Zellen als auch in NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 überexprimiert und aus dem Zellkulturüberstand über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads angereichert (Abb. 33).

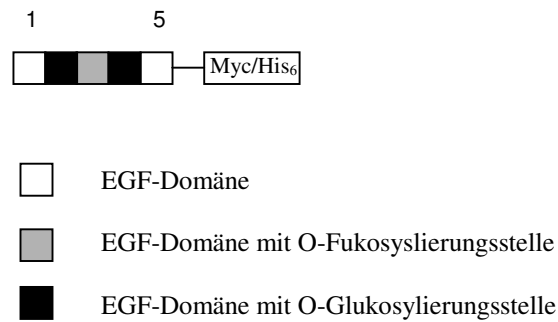


Abb. 32 Schematische Darstellung des Notch-Peptids, das in NIH/3T3, NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 exprimiert und massenspektrometrisch analysiert wurde.

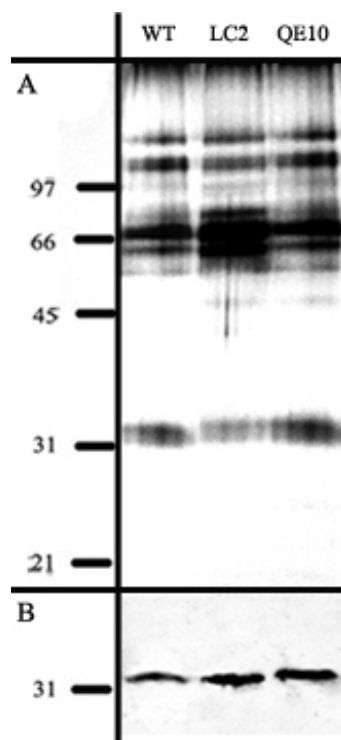


Abb. 33 Silbergel (A) und Western Blot (B) des aus NIH/3T3 (WT), NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 isolierten Notch-EGF1-5-Fragmentes. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit anti-Myc 9E10 und IRDye800-anti-Maus.

Das Notch-EGF1-5-Fragment wurde anschließend im Labor von Dr. Robert Haltiwanger von Nadia Rana analysiert. Mit Hilfe der Massenspektrometrie sollte untersucht werden, ob das Xyl-Xyl-Glc-Glykan in Zellen mit reduziertem UDP-Xylose-Transport synthetisiert wird.

Dazu wurden die aus NIH/3T3, NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 gewonnenen Notch-EGF1-5-Fragmente über ein präparatives SDS-Gel aufgetrennt, mit Trypsin verdaut und die aufgereinigten Peptide der LC-MS/MS zugeführt.

Das tryptische Peptid der zweiten EGF-Domäne (EGF2) ist 57CQDSNPCLSTPCK69 (die errechnete Masse des einfach geladenen Ions beträgt 1566,6 m/z), das der vierten EGF-Domäne (EGF4) 137SCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYICR165 (3336,6 m/z). In

Wildtypzellen sind beide O-Glukosylierungsstellen mit dem Trisaccharid modifiziert. Für die Analyse wurde jedoch das aus EGF4 resultierende Peptid verwendet, da dieses leichter ionisiert wird (Information von Robert Haltiwanger). Dieses Peptid liegt als dreifach positiv geladenes Ion vor. Tabelle 4 zeigt die molaren Massen und die Masse-Ladungsverhältnisse der erwarteten Ionen.

Molekül	molare Masse [Da]	m/z für +3 Zustand
Glukose	162	54
Xylose	132,3	44,1
EGF4-Peptid	3336,6	1112,8
EGF4-Peptid + Glc	3498,6	1166,6
EGF4-Peptid + Glc, Xyl	3630,9	1210,7
EGF4-Peptid + Glc, Xyl, Xyl	3763,2	1255,2

Tabelle 4 Übersicht über die erwarteten Signale der LC-MS/MS.

Das Flüssigchromatogramm des in NIH/3T3 exprimierten Notch-Fragments zeigte ein Signal bei 53,7 min (Abb. 34). Dieses Peptid wies im Massenspektrum Signale von 1112,6 m/z, 1166,6 m/z, 1210,5 m/z und 1255,2 m/z auf. Das erste Signal bei 1112,6 m/z entspricht der erwarteten Masse des dreifach geladenen unglykosylierten Peptids der EGF4 ( $(3336,6 + 2)/3$ ). Der Massenunterschied des zweiten Peaks (1166,6 m/z) zum ersten Signal von 54 m/z entspricht dreifach geladener Glukose ( $54 \times 3 = 162$ ). Also steht dieses Signal für das EGF4-Peptid mit einem Glukoserest. Das folgende Signal (1210,5 m/z) und das Ausgangsion (1255,2 m/z) wiesen einen Massenunterschied von jeweils 44,1 m/z zum vorangegangenen Ion auf, was jeweils dreifach geladener Xylose (132,2 Da) entspricht. Somit war das Ausgangsion das mit Xyl-Xyl-Glc modifizierte EGF4-Peptid.

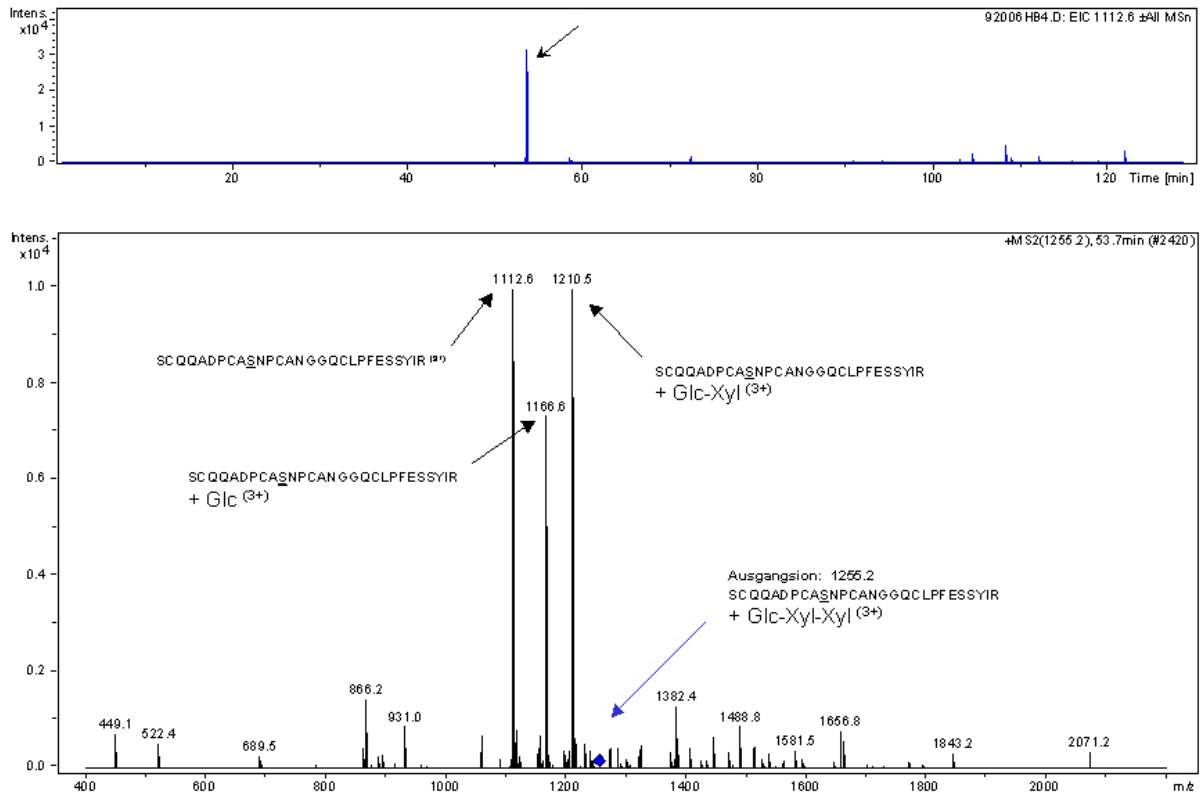


Abb. 34 Flüssigchromatogramm (oben) und Massenspektrogramm (unten) des aus NIH/3T3-Zellen gewonnenen EGF4-Peptids. Das bei 53,7 min eluierte Peptid wurde massenspektrometrisch analysiert.

In NIH/3T3-LC2-Zellen hingegen waren im Flüssigchromatogramm drei Signale erkennbar (Abb. 35A, B, C). Jeder dieser Peaks wurde massenspektrometrisch analysiert: Das bei 53,3 min eluierte Peptid wurde aufgrund seines Fragmentierungsmusters von 1112,9 m/z, 1167,0 m/z, 1210,8 m/z und 1255,2 m/z als EGF4-Peptid mit vollständigem Xyl-Xyl-Glc-Glykan identifiziert (Abb. 35A). Der zweite Peak, der bei 53,7 min erschien, wies im Massenspektrum Ionen von 1112,7 m/z, 1166,6 m/z und 1211,2 m/z auf (Abb. 35B) und repräsentierte damit das mit Xyl-Glc modifizierte EGF4-Peptid. Das letzte Signal (53,9 min) zeigte im Fragmentierungsmuster Signale von 1112,5 m/z und 1167,1 m/z (Abb. 35C), was gleichbedeutend mit der Monosaccharidform des EGF4-Peptids ist, die nur einen Glukoserest trägt (Vgl. Tabelle 4, Seite 79).

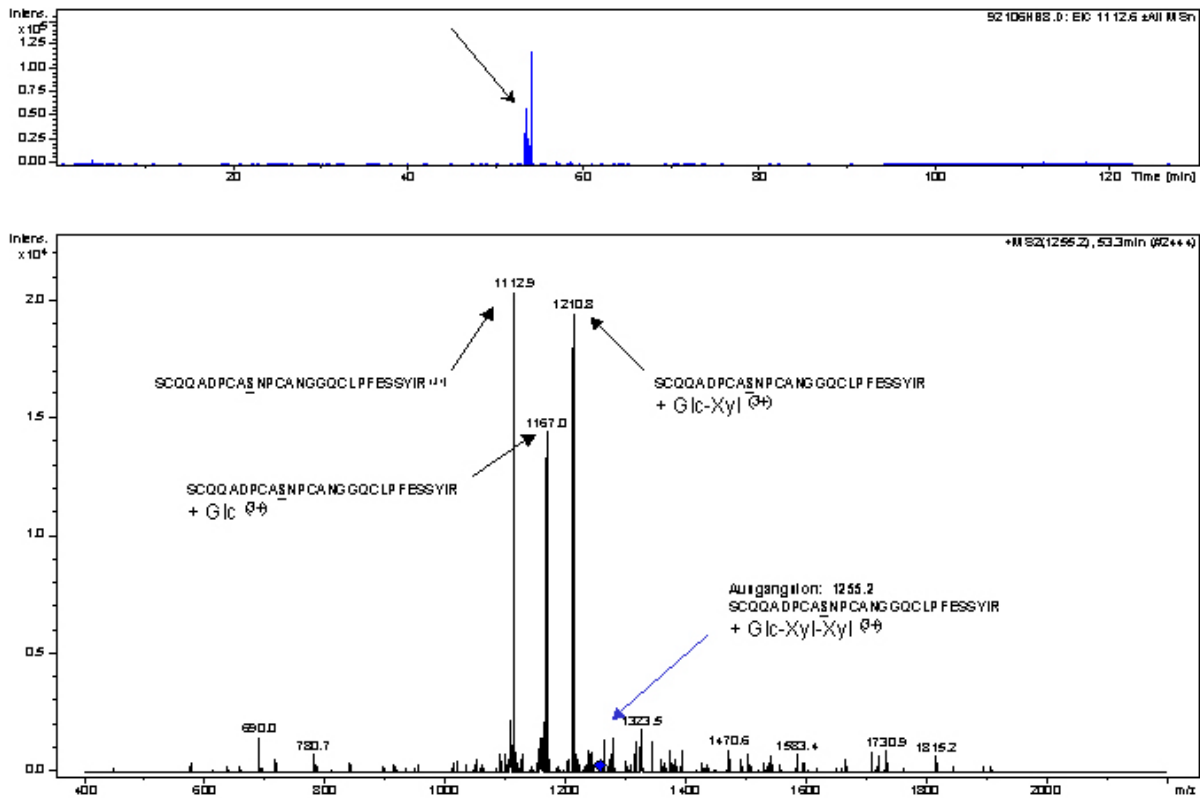


Abb. 35A Flüssigchromatogramm (oben) und Massenspektrogramm (unten) des aus NIH/3T3-LC2-Zellen gewonnenen EGF4-Peptids: Analyse des bei 53,3 min eluierten Peptids

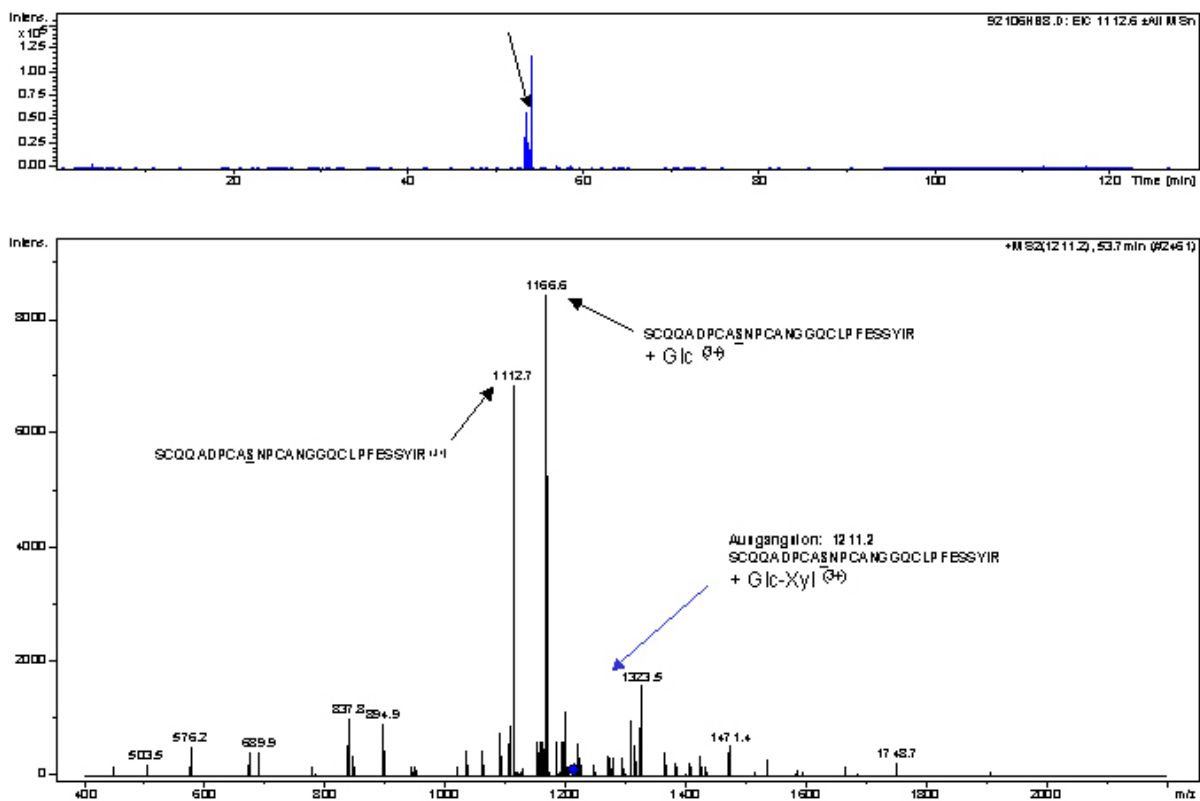


Abb. 35B Massenspektrometrische Analyse des zweiten Peaks mit einer Elutionszeit von 53,7 min

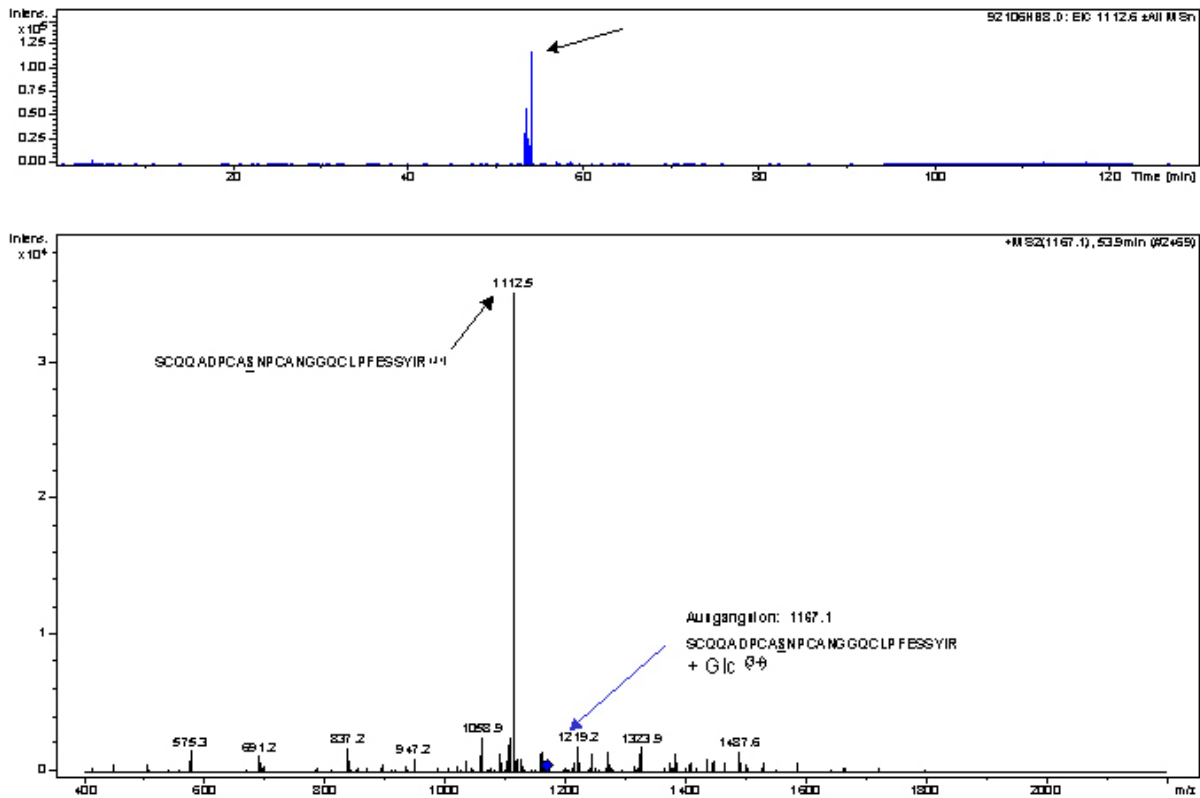


Abb. 35C Das dritte Signal des aus NIH/3T3-LC2-Zellen gewonnenen EGF4-Peptids, eluiert bei 53,9 min.

Die Daten für das aus NIH/3T3-QE10 gewonnene Notch-EGF1-5-Fragment lagen zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht vor.

## 6.5.5 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteoglykane

Da Xylose nicht nur in dem Trisaccharid, das auf den EGF-Domänen von Notch und verschiedener Blutgerinnungsfaktoren zu finden ist, vorkommt, sondern auch in der Linkerregion der Proteoglykane enthalten ist, sollte ebenfalls der Einfluss der reduzierten Expression des Slc35b4 auf die Synthese der Glykosaminoglykane untersucht werden. Dazu wurden NIH/3T3-Zellen sowie die Klone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 mit Hilfe des P869-Antikörpers, der spezifisch Heparansulfat erkennt, durchflusszytometrisch analysiert. Zur Detektion wurden ein gegen das in P869 enthaltene VSV-Epitop gerichteter Maus-anti-VSV-Antikörper und ein anti-Maus-IgG-Alexa647-Konjugat verwendet. Als Negativkontrolle diente ein identischer Ansatz ohne P869 als primären Antikörper (Abb. 36). Gemessen wurde die Fluoreszenz des Alexa647-konjugierten tertiären Antikörpers. Die Anzahl der detektierten Zellen wurde nach ihrer Fluoreszenzintensität aufgetragen. Pro Ansatz wurden ca.  $10^5$  Zellen verwendet.



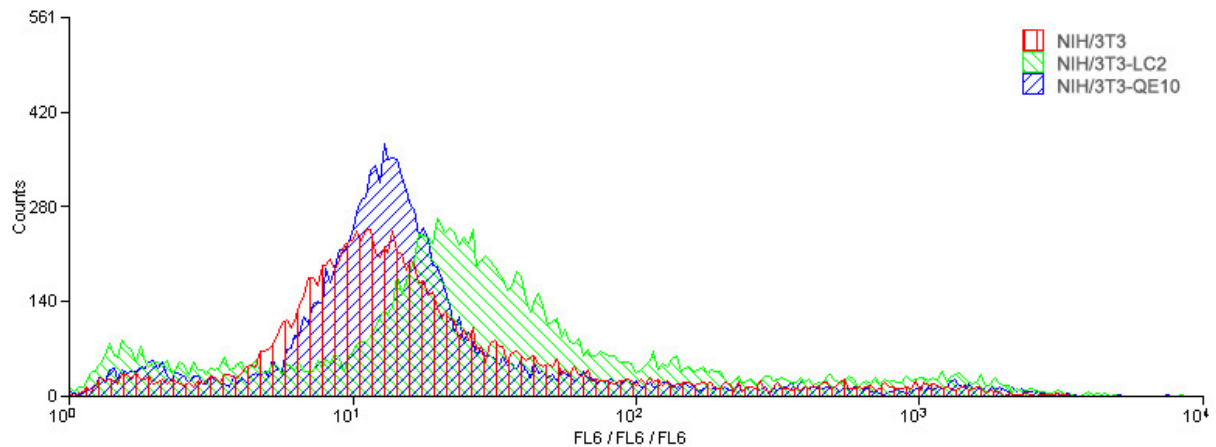


Abb. 36 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteoglykane von NIH/3T3-Zellen und der Klone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10. Negativkontrolle ohne primären Antikörper.

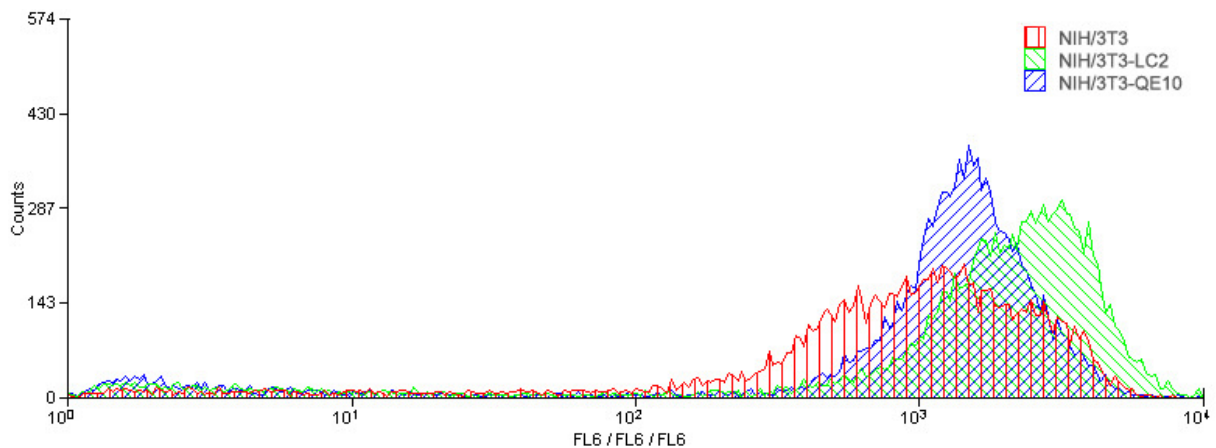


Abb. 37 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteoglykane von NIH/3T3-Zellen und der Klone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 mit P869 als primärem Antikörper.

Die Verteilung der Fluoreszenzintensität der Knockdown-Klone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 unterschied sich nicht wesentlich von der des Wildtyps, d.h. die Menge der Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche von NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 entsprach der des Wildtyps (Abb. 37).

Da die Daten für die Xylosylierung des Notch-Fragmentes aus einem System stammten, an das durch die Überexpression der Akzeptorstruktur hohe Anforderungen gestellt waren, die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteoglykane jedoch im nativen System stattfand, waren die Ergebnisse die Proteoglykane betreffend zunächst nur bedingt aussagekräftig. Daher wurde ebenfalls eine Akzeptorstruktur für die Synthese der Glykosaminoglykane überexprimiert, um besser vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Decorin wurde als Akzeptorstruktur gewählt, da dieses Proteoglykan nur eine Glykosaminoglykankette enthält und deren Vorhandensein leicht detektierbar ist. Das Kernprotein von Decorin ohne Glykosaminoglykankette hat ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa, die mit einer Glykosaminoglykankette modifizierte Form ist im Western Blot in einer diffusen Bande um 100 kDa sichtbar (Kresse, 1997).

NIH/3T3-, NIH/3T3-LC2- und NIH/3T3-QE10-Zellen wurden mit pcDcnMycHis transfiziert. Dieser Vektor ermöglichte die Expression von N-terminal Myc/His-markiertem Decorin unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Beads wurde das rekombinante Decorin angereichert und im Western Blot analysiert (Abb. 38).

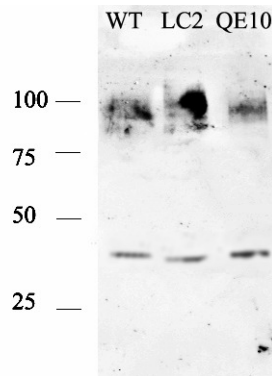


Abb. 38 Western Blot. Detektion des rekombinanten Decorin aus NIH/3T3 (WT), NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 mit anti-Myc 9E10 und IRDye800-anti-Maus. Sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Knockdown-Klonen NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 war eine Bande bei 40 kDa und ein diffuses Signal um 100 kDa sichtbar.

In allen drei Präparationen war eine Bande bei ca. 40 kDa sichtbar, die Glykosaminoglykan-freies Decorin repräsentierte. Das diffuse Signal um 100 kDa war ebenfalls in allen Präparationen sichtbar. Somit bestand auch in einem durch Überexpression des Akzeptors geforderten System kein auf diese Weise detektierbarer Unterschied in der Synthese der Glykosaminoglykane zwischen Wildtyp und Zellen mit reduziertem UDP-Xyl-Transport.

## 7 Diskussion

Etwa 40% aller Proteine in Eukaryoten tragen kovalent gebundene Zucker. Bei Membranproteinen und sezernierten Proteinen liegt dieser Anteil sogar bei 80%. Die Synthese von Glykoproteinen beginnt im Zytoplasma mit der Aktivierung von Zuckern zu Nukleotidzuckern, die die Substrate für vielfältige, aber in der Regel hinsichtlich des Substrates spezifische Glykosyltransferasen darstellen. Glykosyltransferasen sind dagegen im Lumen des ER und des Golgi-Apprates lokalisiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit eines Transportsystems, welches die Nukleotidzucker vom Zytoplasma ins Lumen der Kompartimente befördert. Dieser Transport wird durch die Nukleotidzucker-Transporter geleistet.

Fehlfunktionen in einem solchen Transportsystem können zu schwerwiegenden Störungen führen: Ein Defekt im GDP-Fukose-Transporter ist die molekulare Ursache von LADII (*leukocyte adhesion deficiency type II*), die auch als CDG IIc (*congenital disorder of glycosylation Typ IIc*) bekannt ist. Die Symptomatik von CDG IIc beinhaltet unter anderem psychomotorische und mentale Retardierung (Lübke, 2001; Lühn, 2001). Eine Mutation im bovinen *slc35a3*-Gen, das einen UDP-GlcNAc-Transporter kodiert, wird mit CVM (*complex vertebral malformation*) bei Rindern in Verbindung gebracht (Thomsen, 2006).

Unsere Arbeitsgruppe hat anhand von Sequenzhomologien bisher bekannter Nukleotidzucker-Transporter potentielle Gene für weitere Nukleotidzucker-Transporter im humanen Genom identifiziert, kloniert und die entsprechenden Proteine auf ihre Transportspezifität untersucht. Dabei wurde ein Golgi-ständiger UDP-Xylose-Transporter identifiziert (Ashikov, 2005). In der Ratte wurde der Transport von UDP-Xylose in Golgivesikel beschrieben (Milla, 1992). Dieser Befund wurde durch die Klonierung und Charakterisierung des humanen *slc35b4* durch Ashikov et al. bestätigt. UDP-Xylose wird allerdings nicht, wie die meisten Nukleotidzucker, im Zytosol, sondern im Lumen des Golgi-Apparates synthetisiert (Moriarity, 2002) und befindet sich somit bereits im selben Kompartiment, in dem auch die Xylosyltransferasen lokalisiert sind. Hiermit drängte sich die Frage nach der Notwendigkeit eines UDP-Xylose-Transporters auf.

Diese Studie beschäftigte sich mit der Untersuchung der Funktion des murinen Orthologen des humanen UDP-Xylose-Transporters. Im Vordergrund stand dabei die Frage nach der Relevanz dieses Transporters für die Synthese der Xylose-gebundenen Glykosaminoglykane und des Xyl-Xyl-Glc-Glykans, das z.B. in EGF-Domänen von Notch zu finden ist.

### 7.1 Transportspezifität und subzelluläre Lokalisation des murinen Slc35b4

Zunächst wurde die Transportspezifität und die subzelluläre Lokalisierung des murinen Slc35b4 analysiert. Er besitzt große Ähnlichkeit mit dem humanen Ortholog (76% Identität der Aminosäuren; Fuhlrott, Diplomarbeit) und zeigt die gleiche Lokalisation und Transportspezifität wie das humane Protein. Wie bereits für den humanen SLC35B4 gezeigt

wurde (Ashikov, 2005), ist auch der murine Slc35b4 ein Golgi-ständiger und bifunktionaler Nukleotidzucker-Transporter, der sowohl UDP-Xylose als auch UDP-N-Acetylglukosamin transportieren kann. Sowohl in der Maus als auch im Menschen gibt es daneben zwei weitere Golgi-residente UDP-N-Acetylglukosamin-spezifische Transporter, SLC35A3 (Guillen, 1998) und SLC35D2 (Ishida, 2005; Suda, 2004). Es ist bislang nicht bekannt, ob diese Transporter sich überschneidende temporale oder lokale Expressionsmuster besitzen.

## 7.2 Untersuchung der endogenen Expression des Slc35b4

Die Expression der murinen *slc35b4*-mRNA in verschiedenen adulten Geweben und embryonalen Stadien ließ sich nur mittels RT-PCR nachweisen; für die Northern Blot Analyse lag die Expression des *slc35b4* unterhalb der Nachweisgrenze. Gleiche Befunde ergaben sich auch für die Expression des humanen *slc35b4* (Ashikov, unveröffentlichte Daten). Ebenso wurden sehr geringe Expressionsstärken für *slc35d1* und *slc35d2* nachgewiesen (Suda, 2004). Die geringe Expressionsstärke eines Nukleotidzucker-Transporters ist offenbar ausreichend, da vermutlich nur wenige Moleküle eines Transporters pro Zelle benötigt werden.

## 7.3 Charakterisierung der Zellklone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10

Über einen auf RNA-Interferenz basierenden Ansatz konnten zwei Zellklone isoliert werden, die eine gegenüber dem Wildtyp (NIH/3T3) deutlich reduzierte Expression der *slc35b4*-mRNA aufweisen. NIH/3T3-LC2 zeigte eine Reduktion der *slc35b4*-mRNA um 81%. In NIH/3T3-QE10 war die Menge der *slc35b4*-mRNA im Vergleich zum Wildtyp um 76% reduziert. Diese Reduktion der *slc35b4*-Expression zeigte sich proportional dazu auch in der Transportaktivität: Im Vergleich zum Wildtyp war der Transport von UDP-Xylose in Golgivesikel um 64% (NIH/3T3-LC2) bzw. um 42,4% (NIH/3T3-QE10) reduziert.

Mit diesen beiden Klonen stand ein zellbasiertes Modell zur Untersuchung der Funktion des murinen Slc35b4 zur Verfügung.

Da im verwendeten Zellsystem Redundanz für den Transport von UDP-GlcNAc besteht (in der Maus gibt es mindestens zwei weitere UDP-GlcNAc-Transporter, siehe Tabelle 1, S. 8), wurde mit einem deutlich geringeren Effekt der *slc35b4*-Repression auf den Transport von UDP-GlcNAc gerechnet als für UDP-Xyl beobachtet. In NIH/3T3-LC2 zeigte sich lediglich eine Reduktion des UDP-GlcNAc-Transportes um 40%. In NIH/3T3-QE10 war hingegen ein um 66% reduzierter UDP-GlcNAc-Transport zu messen. Vermutlich beruht letztere Beobachtung auf Messungenauigkeiten. Daher sollten die Messungen noch einmal mit mehr als zwei unabhängigen Vesikelpräparationen wiederholt werden.

## 7.4 Auswirkungen der reduzierten Expression des *Slc35b4* auf die Glykosylierung von Notch und die Synthese der Glykosaminoglykane

In tierischen Organismen ist Xylose in nur zwei Glykanstrukturen enthalten: dem Xyl-Xyl-Glc-Glykan und dem Tetrasaccharidlinker der Proteoglykane, die aber als Modifikation von Notch und einiger Blutkoagulationsfaktoren bzw. Startpunkt der Glykosaminoglykansynthese äußerst wichtige Positionen einnehmen.

Ein Fragment von Notch, das die EGF-Domänen EGF1 bis EGF5 umfasst, wurde aus Wildtyp-NIH/3T3 und NIH/3T3-LC2 aufgereinigt (die Daten aus NIH/3T3-QE10 lagen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor). Das tryptische Peptid der EGF4, das eine O-Glukosylierungsstelle enthält (siehe Abb. 8, S. 15; Abb. 31, S. 77), wurde mittels LC-MS/MS analysiert. In Wildtyp-NIH/3T3-Zellen liegt ausschließlich das aus Xyl-Xyl-Glc bestehende vollständige Glykan vor.

Da in den NIH/3T3-LC2-Zellen noch eine Restaktivität des UDP-Xylose-Transporters von 33% gemessen wurde, war nicht mit dem kompletten Fehlen von Xylose in jenem Glykan zu rechnen. In NIH/3T3-LC2 waren alle drei Glykoformen des EGF4-Peptids von Notch anzutreffen: das Trisaccharid Xyl-Xyl-Glc, das Disaccharid Xyl-Glc und das Monosaccharid Glc. Jedoch war eine Quantifizierung der einzelnen Glykoformen anhand dieser Daten nicht möglich, da die unterschiedliche Hydrophilie der verschieden glykosylierten Peptide zu Unterschieden in deren Ionisierungseffizienz führte (Information von Robert Haltiwanger).

Eine Restaktivität des UDP-Xylose-Transporters von 33% ist demnach nicht ausreichend, um eine vollständige Xylosylierung von O-Glukose zu gewährleisten. Auf zellulärer Ebene konnte damit gezeigt werden, dass der Transport von UDP-Xylose über die Golgimembran mittels *Slc35b4* essentiell ist für den Aufbau des Xyl( $\alpha$ 1-3)Xyl( $\alpha$ 1-3)Glc( $\beta$ 1-O)Ser-Glykans.

Um den Einfluss der reduzierten Expression des *slc35b4* auf die Synthese der Xylose-gebundenen Glykosaminoglykane zu untersuchen, wurden einerseits die Oberflächenproteoglykane von NIH/3T3, NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 mit Hilfe eines Heparansulfat-spezifischen Antikörpers durchflusszytometrisch analysiert. Andererseits wurde mit Decorin ein Akzeptor für Xylose in diesen Zellen überexprimiert: Decorin ist ein Proteoglykan, das mit einer Xylose-gebundenen Heparansulfat-Kette modifiziert werden kann (Kresse, 1997). Sowohl im nativen System als auch in einem System mit überexprimiertem Akzeptor (Decorin) war kein Unterschied zwischen NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 auf der einen Seite und dem Wildtyp NIH/3T3 auf der anderen Seite festzustellen.

Damit war im Gegensatz zur Xylosylierung der EGF-Domänen von Notch die Synthese der Xylose-gebundenen Glykosaminoglykane nicht vom reduzierten UDP-Xyl-Transport beeinflusst.

Die unterschiedliche Auswirkung der reduzierten *slc35b4*-Expression auf die Xylosylierung von O-Glukose in EGF-Domänen einerseits und auf die Synthese der Glykosaminoglykane andererseits kann verschiedene Ursachen haben.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass die beiden Glykanstrukturen in räumlich getrennten Kompartimenten synthetisiert werden. Da Xylose im Xyl-Xyl-Glc-Glykan nicht direkt mit

dem Protein verknüpft, sondern ein terminaler Zucker ist, erfolgt dieser Additionsschritt mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Golgi-Zisternen. Die beteiligten Enzyme sind bisher nicht näher charakterisiert. Offenbar sind sie darauf angewiesen, dass Slc35b4 ihnen UDP-Xylose zur Verfügung stellt. Das ist daraus zu schließen, dass in NIH/3T3-LC2 die Restaktivität des UDP-Xyl-Transportes von 33% nicht ausreicht, um eine vollständige Xylosylierung von O-Glukose zu gewährleisten.

Die UDP-GlcA-Decarboxylase (gleichbedeutend mit UDP-Xyl-Synthase, UXS) befindet sich auf der luminalen Seite des späten ER (Kearns, 1993) oder frühen Golgi-Apparates (Moriarity, 2002) – über den genauen Ort besteht keine endgültige Klarheit. Eindeutig ist jedoch die luminale Orientierung der UXS (Moriarity, 2002). Lösliche zytosolische Formen des Enzyms sind anders als bei Pflanzen in tierischen Zellen bisher nicht bekannt (Harper, 2002). XT-I und XT-II, die die Glykosaminoglykansynthese initiieren, befinden sich einem frühen Golgi-Abschnitt (Götting, 2007; Schön, 2006). Dort könnten sie direkt auf UDP-Xylose, die dort von der UXS synthetisiert wird, zugreifen. Der Transport von UDP-Xyl über die kompartimentelle Membran würde dann von diesen Enzymen nicht benötigt.

Das heißt, beide Glykane werden im Golgi-Apparat synthetisiert. Dennoch schließt das eine räumliche Trennung der jeweiligen Xylosyltransferasen nicht aus, da der Golgi-Apparat ein hochkomplexes Netzwerk aus Zisternen mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung ist.

Ebenso wäre denkbar, dass die unterschiedlichen Effekte nicht auf räumlicher Trennung sondern auf unterschiedlicher Kinetik der beteiligten Enzyme beruhen. Hinge die Synthese beider Glykane vom UDP-Xyl-Transport ab und besäßen XT-I und XT-II eine deutlich höhere Affinität zu UDP-Xylose als die für die Synthese des Xyl-Xyl-Glc-Glykans benötigten Xylosyltransferasen, sähe das Resultat vermutlich ähnlich aus. Kinetische Daten sind jedoch bisher nur für verschiedene Peptid- und Protein-Akzeptoren, nicht aber für Xylose verfügbar (Ishimizu, 2007; Pönighaus, 2007).

Daher sollen die Untersuchungen zur Xylosylierung von O-Glukose und der Proteoglykane an einem Modell, das keinen UDP-Xyl-Transport aufweist, wiederholt werden. Dazu könnten beispielsweise ES-Zellen, die homozygot für den Knockout sind, dienen. Solche Zellen könnten aufgrund der im Targeting-Vektor für den konditionellen Knockout enthaltenen Neomycin-Phosphotransferase II durch Erhöhung der G418-Konzentration und damit Erhöhung des Selektionsdruckes aus den heterozygoten ES-Zellen erhalten werden (siehe Abschnitt 6.4.2, S. 71).

Bleibt auch dann die Synthese der Glykosaminoglykane unbeeinflusst und wird der O-Glc-Akzeptor nicht mehr xylosyliert, kann man daraus schließen, dass die beteiligten Enzyme in unterschiedlichen Kompartimenten agieren und unterschiedliche Quellen für UDP-Xylose nutzen.

## **7.5 Konstitutioneller Knockout – Problematik bei der Generation von ES-Zellen mit homologer Rekombination**

Um die Frage nach der biologischen Funktion des Slc35b4 aufzuklären, sollte sowohl ein konstitutionell als auch ein konditionell deletiertes Allel generiert werden. Der konstitutionelle Ansatz wurde gewählt, um anhand der Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter-Gens Aufschlüsse über die temporale und lokale Expression des Slc35b4 Transporters zu gewinnen.

Da die homologe Rekombination generell ein seltenes Ereignis ist und je nach Genlokus zwischen einmal und 20mal pro  $10^4$  Zellen auftreten kann (Torres, 1997), wurde neben der Positivselektion durch G418 auch eine Negativselektion anhand der im Targeting-Vektor enthaltenen DT-Kassette durchgeführt (siehe Abschnitt 6.4.1, S. 65f). Diese kann die Insertionsfrequenz ca. um den Faktor 17 erhöhen (Information von Birgit Weinhold).

Jedoch konnten für den konstitutionellen Knockout keine homolog rekombinierten Klone identifiziert werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben.

### **7.5.1 Probleme beim Screening**

Die zunächst zur Analyse der Klone verwendete PCR lieferte keine positiven Signale. Da nicht sicher war, ob die PCR nicht sensitiv genug war oder keine Klone mit homologer Rekombination vorhanden waren, wurden die Klone anschließend im Southern Blot überprüft. Aber auch mit dieser Methode wurden keine Klone mit homologer Rekombination des Targeting-Vektors identifiziert. Das Wildtyp-Signal war im Southern Blot hingegen detektierbar, so dass die Probleme wahrscheinlich nicht in der Detektion zu suchen sind, sondern bei der homologen Rekombination.

### **7.5.2 Organisation des Genlokus**

Abhängig von der Beschaffenheit des genomischen Lokus (Chromatinstruktur, DNA-Methylierung, Transkriptionsrate, Lage des Zielgens auf dem Chromosom) variiert die Insertionsfrequenz (Sauer, 1993; Torres, 1997).

Da in ES-Zellen mittels RT-PCR ein Transkript des Gens nachgewiesen wurde, war sichergestellt, dass der genomische Lokus in diesem Stadium transkriptionell aktiv ist. Jedoch befindet sich der Lokus relativ nah am Zentromer, was unter Umständen problematisch sein kann (s. Abb. 5, S. 11; Sauer, 1993). Häufig lassen sich Probleme bei der homologen Rekombination durch die Wahl anderer Homologiebereiche beheben (Sauer, 1993). Mit dem Targeting-Vektor für den konditionellen Knockout wurde diese Option bereits erfüllt, da hier die Exons zwei und drei Ziel der Mutagenese sind statt des ersten Exons, das Ziel des konstitutionellen Knockout war.

### 7.5.3 Länge der homologen Bereiche im Targeting-Vektor

Nach Empfehlung von Torres (1997) sollte ein Targeting-Vektor zum genomischen Lokus homologe Sequenzbereiche von zusammen etwa 4 bis 10 kbp enthalten. Soll die erste Analyse mittels PCR erfolgen, ist es sinnvoll, wenn sich der kürzere der beiden homologen Arme in der Länge zwischen 1 und 2 kbp bewegt. Wenn das Screening jedoch nicht per PCR erfolgen soll, ist es sinnvoller, annähernd gleichlange homologe Regionen zu verwenden, da kurze Arme eher zu zufälliger Integration führen als längere (Thomas, 1992). Generell genügen auch Längen um 3 kbp; Schneider et al. (2004) konnten beispielsweise mit homologen Sequenzbereichen von 3,5 kbp und 1,4 kbp erfolgreich homologe Rekombination erreichen. Eventuell waren die homologen Arme mit 2,7 kbp für den 5'-Bereich und 3,3 kbp für den 3'-Bereich für den Lokus des *slc35b4* nicht ausreichend lang.

Eine Möglichkeit der Verbesserung des Konstruktes und eventuell der Insertionsfrequenz wäre die Verlängerung der homologen Regionen, die jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war. Eine weitere Alternative wäre, eine promotorlose neo-Kassette einzusetzen, von der die Neomycin-Phosphotransferase nur abgelesen werden kann, wenn homologe Rekombination erfolgt ist oder aber ein anderer Promotor getroffen wurde. Bei der geringen Expressionsstärke des *slc35b4* bestünde jedoch die Gefahr, dass die vermittelte neo-Resistenz für eine Selektion nicht mehr ausreichen könnte. Daher kam diese Variante nicht zum Einsatz.

### 7.5.4 Gendosiseffekt

Es besteht die Möglichkeit, dass in den ES-Zellen bereits die Inaktivierung eines Allels zu einem Selektionsnachteil führte, der durch die neo-Selektion nicht kompensiert werden konnte. Jedoch wurden zwei Zellklone (NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10) mit einer um 81% bzw. 66% gegenüber dem Wildtyps reduzierten Expression der *slc35b4*-mRNA generiert. In einer ES-Zelle mit einem inaktivierten Allel sollte sich die Reduktion der mRNA auf nur 50% belaufen. Diese Daten sprechen zunächst gegen einen Gendosiseffekt. Jedoch ist es möglich, dass ES-Zellen auf die Reduktion des UDP-Xyl-Transporters anders reagieren als NIH/3T3-Zellen. Letztere sind ausdifferenzierte Fibroblasten, in denen im Gegensatz zu ES-Zellen nicht mehr die Notwendigkeit besteht, Entwicklungsprozesse ablaufen zu lassen.

Notch und einige seiner Liganden werden in ES-Zellen exprimiert. Da die Notch-Signaltransduktion über proteolytische Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NotchIC) erfolgt, entspricht der Effekt einer Überexpression dieser intrazellulären Domäne dem einer starken Aktivierung von Notch. Lowell et al. zeigten, dass die Überexpression von NotchIC letal ist für murine ES-Zellen (Lowell, 2006).

Eine fehlerhafte Glykosylierung von Notch könnte durchaus ähnliche Effekte zeigen. Sobald ES-Zellklone für den konditionellen Knockout von *slc35b4* zur Verfügung stehen, kann experimentell überprüft werden, ob ein Selektionsnachteil für Zellen mit nur einem intakten *slc35b4*-Allel besteht und worauf dieser beruht. Durch transiente Cre-Expression in den Zellen kann die Rekombination der *loxP*-Stellen ausgelöst werden, so dass man für den



Knockout heterozygote ES-Zellen erhält. Deren Wachstumsverhalten kann dann mit dem von Zellen ohne Cre-Expression verglichen werden.

## 7.6 Ausblick

In weiteren zellbasierten Experimenten soll die Funktion des Xyl-Xyl-Glc-Glykans auf Notch untersucht werden. Bisher gibt es nur Daten über ein zweites ungewöhnliches Glykan, das ebenfalls in EGF-Domänen von Notch anzutreffen ist: O-Fuc und dessen elongierte Form Sia-Gal-GlcNAc-Fuc sind essentiell für die Funktion von Notch. Der Knockout der O-Fukosyl-Transferase, die die EGF-Domänen fukosyliert, ist bereits embryonal letal (Shi, 2003).

Aber auch die Fringe-Proteine L(*lunatic*)-Fringe, M(*manic*)-Fringe und R(*radical*)-Fringe, N-Acetylglucosaminyl-Transferasen, die spezifisch O-Fukose als Akzeptor nutzen, sind essentiell für die Funktion von Notch: Die Addition von GlcNAc beeinflusst die Ligandenbindung und damit die Signaltransduktion. Die Bindung von Jagged in Mammaliern bzw. Serrate in *Drosophila* an Notch wird durch die Anwesenheit von GlcNAc inhibiert (Haines, 2003; Moloney, 2000a), wohingegen die Bindung von Delta durch die Elongation der O-Fukose verstärkt wird (Brückner, 2000). Auf diese Weise ist eine Feinregulierung von Notch möglich. Störungen der Notch-Glykosylierung und damit der Modulation der von Notch abhängigen Signaltransduktion führen zu schwerwiegenden Defekten in der Embryonalentwicklung (Haines, 2003).

Im Unterschied dazu ist die Funktion des Xyl-Xyl-Glc als Modifikation von Notch bisher nicht bekannt. Es ist denkbar, dass das Xyl-Xyl-Glc-Glykan auf Notch eine ähnliche regulatorische Rolle einnimmt wie O-Fukose und dessen elongierte Form (Haines, 2003). Für Faktor VII der Blutgerinnungskaskade wurde gezeigt, dass das Fehlen des Xyl-Xyl-Glc-Glykans zu verminderter Gerinnungsfähigkeit führt. Der Mechanismus hierfür konnte allerdings nicht geklärt werden (Bjoern, 1991).

Für die Bindung der Liganden Delta und Jagged an Notch sind die EGF-Domänen 11 und 12 essentiell (Rebay, 1991). EGF-12 enthält eine potentielle O-Glukosylierungsstelle (Moloney, 1999; Xu, 2005). Mit einem Bindungsassay soll untersucht werden, ob das Fehlen von Xylose einen Einfluss auf die Ligandenbindung und die von Notch abhängige Signaltransduktionskaskade hat. Mit dem derzeit zur Verfügung stehenden Modell – den Knockdown-Klonen NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 – kann diese Frage aufgrund der Restaktivität des UDP-Xyl-Transporters in diesen Zellen vermutlich nicht beantwortet werden. In NIH/3T3-LC2 ist noch Xylose als Modifikation der O-Glukose zu finden; die Daten für NIH/3T3-QE10 liegen noch nicht vor. Für einen Bindungsassay würde ein System gänzlich ohne UDP-Xyl-Transportaktivität und damit ohne Xylose-Modifikation der O-Glukose benötigt. Dies könnte mit ES-Zellen, die homozygot für den Knockout sind, realisiert werden (siehe Abschnitt 6.4.2, S. 71).

Neben diesen weiteren Untersuchungen auf zellulärer Ebene soll die Rolle des SLC35B4 auch in einem Mausmodell untersucht werden. In dem bisher existierenden zellulären System der Knockdown-Zellklone NIH/3T3-LC2 und NIH/3T3-QE10 wurden Strukturen identifiziert, die im Organismus vom Knockout des Slc35b4 betroffen sein könnten. Es stellte sich heraus,

dass die Xylosylierung von in EGF-Domänen von Notch und einiger Blutgerinnungsfaktoren anzutreffender O-Glukose vom UDP-Xyl-Transport mittels Slc35b4 abhängt, nicht aber die Glykosaminoglykansynthese. Daher wird bei der Phänotypisierung des Mausmodells das Hauptaugenmerk zunächst auf der Untersuchung verschiedener von Notch abhängiger Entwicklungsprozesse liegen.

Mit dem noch fertigzustellenden konditionellen Knockout-Modell soll zunächst die totale Inaktivierung durch Einkreuzen einer Maus (ZP3-cre) mit Expression der Cre-Rekombinase in den ersten Tagen der Embryonalentwicklung erreicht werden (Lewandoski, 1997). Anhand dessen wird sich zeigen, ob Slc35b4 bereits in der Embryonalentwicklung essentiell ist. Einzelzellen können in Kultur mit einer Expression des Slc35b4 von 19% im Vergleich zum Wildtyp überleben. Ob eine vollständige Inaktivierung des Slc35b4 von Zellen oder gar dem Gesamtorganismus toleriert wird, bleibt zu untersuchen.

## 8 Literatur

Abeijon C., Robbins P. W., Hirschberg C. B. (1996) Molecular cloning of the Golgi apparatus uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter from *Kluyveromyces lactis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(12)**:5963-5968

Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2002) *Molecular Biology of the Cell*

Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* **284(5415)**:770-776

Ashikov A., Routier F., Fuhlrott J., Helmus Y., Wild M., Gerardy-Schahn R., Bakker H. (2005) The human solute carrier gene SLC35B4 encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* **80(29)**:27230-27235

Barondes S. H. (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.* **13(12)**:480-482

Berninsone P., Hwang H. Y., Zemtseva I., Horvitz H. R., Hirschberg C. B. (2001) SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98 (7)**:3738-3743

Bevilacqua M. P., Nelson R. M. (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemost.* **70(1)**:152-154

Bjoern S., Foster D. C., Thim L., Wiberg F. C., Christensen M., Komiyama Y., Pedersen A. H., Kisiel W. (1991) Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. *J Biol Chem.* **266(17)**:11051-11057

Bossuyt X., Blanckaert N. (1994) Carrier-mediated transport of intact UDP-glucuronic acid into the lumen of endoplasmic-reticulum-derived vesicles from rat liver. *Biochem. J.* **302 (Pt 1)**:261-269

Katja Brückner K., Perez L., Clausen H., Cohen S. (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**: 411-415

Bullock W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5(4)**:376-378

- Caplen N. J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R. A. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(17)**:9742-9747
- Eckhardt M., Mühlhoff M., Bethe A., Gerardy-Schahn R. (1996) Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(15)**:7572-7576
- Fire A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15(9)**: 358-363
- Freeze H. H. (2001). Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology* **11(12)**:129-143
- Freeze HH (2001), Mini Review: Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiol.* **11**, 129-143
- Gabel C. A., Foster S. A. (1986) Mannose 6-phosphate receptor-mediated endocytosis of acid hydrolases: internalization of beta-glucuronidase is accompanied by a limited dephosphorylation. *J Cell Biol.* **103(5)**:1817-1827
- Gao X. D., Nishikawa A., Dean N. (2001) Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J.Biol.Chem.* **276(6)**:4424-4432
- Gerardy-Schahn R., Oelmann S., Bakker H. (2001) Nucleotide sugar transporters: biological and functional aspects. *Biochimie* **83(8)**:775-782
- Götting C., Kuhn J., Kleesiek K. (2007) Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* in press
- Goldstein I. J., Hughes R. C., Monsigny M., Osawa T., Shanon N. (1980) What should be called a lectin?. *Nature* **285**:66
- Goldstein I. J., Winter H. C., Poretz R. D. (1997) Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. In: Montreuil J, Vliegthart J.F.G. Schachter H (Eds.), *Glycoproteins II*, Elsevier Science
- Goto S., Taniguchi M., Muraoka M., Toyoda H., Sado Y., Kawakita M., Hayashi S. (2001) UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat.Cell Biol.* **3(9)**:816-822
- Guillen E., Abeijon C., Hirschberg C. B. (1998) Mammalian Golgi apparatus UDP-N-acetylglucosamine transporter: molecular cloning by phenotypic correction of a yeast mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(14)**:7888-7892

Handyside A, O'Neill GT, Jones M, Hooper M (1989) Use of BRL-conditioned medium in combination with feeder layers to isolate a diploid embryonal stem cell line. *Roux Arch. Dev. Biol.* **198**, 48-56

Harper A. D., Bar-Peled M. (2002) Biosynthesis of UDP-xylose: Cloning and characterization of a novel Arabidopsis gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. *Plant Physiol.* **130(4)**:2188-2198

Hase S., Kawabata S., Nishimura H., Takeya H., Sueyoshi T., Miyata T., Iwanaga S., Takao T., Shimonishi Y., Ikenaka T. (1988) A new trisaccharide sugar chain linked to a serine residue in bovine blood coagulation factors VII and IX. *J Biochem (Tokyo)*. **104(6)**:867-868

Haines N., Irvine K. D. (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4(10)**:786-797

Helenius A., Aebi M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* **291(5512)**:2364-2369

Hirschberg C. B., Robbins P. W., Abeijon C. (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* **67**:49-69

Hong K., Ma D., Beverley S. M., Turco S. J. (2000) The Leishmania GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry* **39 (8)**:2013-2022

Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derives from germline colonization by cultured cell. *Nature* **326**, 292-298

Ishida N., Ito M., Yoshioka S., Sun-Wada G. H., Kawakita M. (1998) Functional expression of human golgi CMP-sialic acid transporter in the Golgi complex of a transporter-deficient Chinese hamster ovary cell mutant. *J Biochem (Tokyo)*. **124(1)**:171-178

Ishimizu T., Sano K., Uchida T., Teshima H., Omichi K., Hojo H., Nakahara Y., Hase S. (2007) Purification and substrate specificity of UDP-D-xylose: $\beta$ -D-glucoside  $\alpha$ -1,3-D-xylosyltransferase involved in the biosynthesis of the Xyl $\alpha$ 1-3Xyl $\alpha$ 1-3Glc $\beta$ 1-O-Ser on epidermal growth factor-like domains. *J. Biochem.* in press

Jaeken J., Carchon H. (2001) Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Curr Opin Neurol.* **14(6)**:811-815

Kamiyama S., Suda T., Ueda R., Suzuki M., Okubo R., Kikuchi N., Chiba Y., Goto S., Toyoda H., Saigo K., Watanabe M., Narimatsu H., Jigami Y., Nishihara S. (2003) Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem.* **278(28)**:25958-25963.

Karlson P., Doenecke D., Koolman J. (1994) Glykoside, Oligosaccharide und Polysaccharide. In: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Karp G. (2005), Molekulare Zellbiologie, 1. Auflage Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag

Kawakita M., Ishida N., Miura N., Sun-Wada G. H., Yoshioka S. (1998) Nucleotide sugar transporters: elucidation of their molecular identity and its implication for future studies. *J Biochem (Tokyo)* **123(5)**:777-785

Kearns A. E., Vertel B. M., Schwartz N. B. (1993) Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *J.Biol.Chem.* **268 (15)**:11097-11104

Kolter T., Sandhoff K. (2001) Glycolipids: Biosynthesis and degradation. In: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J (ed.) *Glycoscience III, Chemistry and chemical biology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag: 2149-2181

Kresse H., Liszio C., Schönherr E., Fisher L.W. (1997) Critical Role of Glutamate in a Central Leucine-rich Repeat of Decorin for Interaction with Type I Collagen *J.Biol.Chem.* **272 (29)**: 18404–18410

Lewandoski M., Wassarman K. M., Martin G. R. (1997) ZP3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr. Biol.* **7(2)**: 148-152

Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.) (1998) Bioanalytik, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag

Lowell S., Benchoua A., Heavey B., Smith A. G. (2006) Notch Promotes Neural Lineage Entry by Pluripotent Embryonic Stem Cells. *PLoS Biol.* **4(5)**: 805-818

Lübke T., Marquardt T., Etzioni A., Hartmann E., von Figura K., Korner C. (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet.* 2001 May;28(1):73-76.

Lühn K., Wild M. K., Eckhardt M., Gerardy-Schahn R., Vestweber D. (2001) The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet.* **28(1)**:69-72

Luders F., Segawa H., Stein D., Selva E. M., Perrimon N., Turco S. J., Hacker U. (2003) Slalom encodes an adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate transporter essential for development in *Drosophila*. *EMBO J.* **22(14)**:3635-3644

Milla M. E., Clairmont C. A., Hirschberg C. B. (1992) Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the Golgi apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose and UDP-glucuronic acid transport activities. *J. Biol. Chem.* **267**:103-107

Miura N., Ishida N., Hoshino M., Yamauchi M., Hara T., Ayusawa D., Kawakita M. (1996) Human UDP-galactose translocator: molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J Biochem (Tokyo)*. **120(2)**:236-241

Moisan S., Demers M., Mercier J., Magnaldo T., Potworowski E. F., St-Pierre Y.. (2003) Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia*. **17(4)**:751-759

Moloney D. J., Haltiwanger R. S. (1999) The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose-beta1,3-glucosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* **9(7)**:679-687

Moloney D. J., Panin V. M., Johnston S. H., Chen J., Shao L., Wilson R., Wang Y., Stanley P., Irvine K. D., Haltiwanger R. S., Vogt T. F. (2000 a) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **40**: 369-375

Moloney D. J., Shair L. H., Lu F. M., Xia J., Locke R., Matta K. L., Haltiwanger R. S. (2000b) Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem.* **275(13)**:9604-9611

Morell A. G., Irvine R. A., Sternlieb I., Scheinberg I. H., Ashwell G. (1968) Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem.* **243(1)**:155-159

Muraoka M., Kawakita M., Ishida N. (2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Lett.* **495(1-2)**:87-93

Neuberger A., van Deenen L.L.M. (1997) Glycoproteins II, *New Comprehensive Biochemistry* **29b**, Elsevier

Novina C. D., Sharp P. A. (2004) The RNAi revolution. *Nature*. **430(6996)**:161-164.

- Nuwayhid N., Glaser J. H., Johnson J. C., Conrad H. E., Hauser S. C., Hirschberg C. B. (1986) Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* **261 (28)**:12936-12941
- Ofek I., Doyle R. J. (1994) Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman and Hall, New York, London
- Perez M., Hirschberg C. B. (1985) Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem.* **260(8)**:4671-8
- Plück A. (1996) Conditional Mutagenesis in Mice: The Cre/loxP Recombination System. *Int. J. Exp. Path.* **77** :269-278
- Pönighaus C., Ambrosius M., Casanova J. C., Prante C., Kuhn J., Esko J. D., Kleesiek K., Götting C. (2006) Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **282(8)**: 5201-5206
- Puglielli L., Hirschberg C. B. (1999) Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *J.Biol.Chem.* **274 (50)**:35596-35600
- Rebay I., Fleming R. J., Fehon R. G., Cherbas L., Cherbas P., Artavanis-Tsakonas S. (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with delta and serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**: 687–699
- Reuter G., Gabius H. J. (1999) Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell Mol Life Sci.* **55(3)**:368-422
- Riss D., Jin L., Qian X., Bayliss J., Scheithauer B. W., Young W. F. Jr, Vidal S., Kovacs K., Raz A., Lloyd R. V. (2003) Differential expression of galectin-3 in pituitary tumors. *Cancer Res.* **63(9)**:2251-2255
- Rosenberg R. D., Shworak N. W., Liu J., Schwartz J. J., Zhang L. (1997) Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest.* **100(11 Suppl)**:67-75
- Roy S. K., Chiba Y., Takeuchi M., Jigami Y. (2000) Characterization of Yeast Yea4p, a uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter localized in the endoplasmic reticulum and required for chitin synthesis, *J. Biol. Chem.* **275** 13580–13587.
- Sauer B., Henderson N. (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res.* **17**, 147-161



Schneider A., Guan Y., Zhang Y., Magnuson M. A., Pettepher C., Loftin C. D., Langenbach R., Breyer R. M., Breyer M. D. (2004) Generation of a Conditional Allele of the Mouse Prostaglandin EP4 Receptor. *Genesis* **40**:7–14

Schön S., Prante C., Bahr C., Kuhn J., Kleesiek K., Götting C. (2006) Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J Biol Chem.* **281**(20):14224-142231

Segawa H., Kawakita M., Ishida N. (2002) Human and Drosophila UDP-galactose transporters transport UDP-N-acetylgalactosamine in addition to UDP-galactose. *Eur J Biochem.* **269**(1):128-138

Seibler J., Kuter-Luks B., Kern H., Streu S., Plum L., Mauer J., Kuhn R., Bruning J. C., Schwenk F. (2005) Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res.* **33**(7):e67

Selleck S. B. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.* **16**(5):206-212

Selva E. M., Hong K., Baeg G. H., Beverley S. M., Turco S. J., Perrimon N., Hacker U. (2001) Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events. *Nat. Cell Biol.* **3** (9):809-815

Shi S., Stanley P. (2003) Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(9):5234-5239

Suda T., Kamiyama S., Suzuki M., Kikuchi N., Nakayama K., Narimatsu H., Jigami Y., Aoki T., Nishihara S. (2004) Molecular cloning and characterization of a human multisubstrate specific nucleotide-sugar transporter homologous to Drosophila fringe connection. *J Biol Chem.* **279**(25):26469-26474

Suzuki Y., Ito T., Suzuki T., Holland R. E. Jr, Chambers T. M., Kiso M., Ishida H., Kawaoka Y. (2000) Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol.* **74**(24):11825-11831

Tabuchi M., Tanaka N., Iwahara S., Takegawa K. (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* *gms1+* gene encodes an UDP-galactose transporter homologue required for protein galactosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* **232**(1):121-125

Thomas K. R., Deng C., Capecchi M. R. (1992) High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors, *Mol Cell Biol* **12**(7) 2919-23

- Thomsen B., Horn P., Panitz F., Bendixen E., Petersen A. H., Holm L. E., Nielsen V. H., Agerholm J. S., Arnbjerg J., Bendixen C. (2006) A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res.* **16 (1)**:97-105
- Tomari Y., Matranga C., Haley B., Martinez N., Zamore P. D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science.* **306(5700)**:1377-1380
- Torres RM, Kühn R (1997) Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press
- Turner W & Botha FC (2002) Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. *Arch Biochem Biophys* **407**, 209–216.
- Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* **13(24)**:3191-3197
- Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* **3(2)**:97-130
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999) Essentials in glycobiology
- Wittmann V. (2001) Glycoproteins: Occurrence and significance. In: Fraser-Reid B., Tatsuta K., Thiem J (ed.) *Glycoscience III, Chemistry and chemical biology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag: 2253-2287
- Xu A., Lei L., Irvine K. D. (2005) Regions of *Drosophila* Notch That Contribute to Ligand Binding and the Modulatory Influence of Fringe. *J Biol Chem.* **280(34)**: 30158–30165
- Yenofsky R. L., Fine M., Pellow J. W. (1990) A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87(9)**:3435-9.
- Zhang Y., Muylers J. P. P., Testa G., Stewart A. F. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **18**, 1314-1317

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungen

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen, wie z.B. DNA, RNA, die Abkürzungen für die Ribonukleosidtriphosphate und Desoxyribonukleosidtriphosphate, der Einbuchstabencode der proteinogenen Aminosäuren und bekannte SI-Einheiten sind nicht aufgeführt.

Ac	Acetat
<i>Amp</i>	mikrobielles $\beta$ -Laktamase-Gen (vermittelt Ampicillinresistenz)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CDG	<i>congenital disorder of glycosylation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalovirus
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]dekan}-4-yl) phenylphosphat
$C_T$	<i>cycle threshold</i>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
Dol-P	Dolichylphosphat
Dol-PP	Dolichylpyrophosphat
DT-A	Diphtherietoxin A
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
ES	embryonale Stammzellen
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell scanner/sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glc	Glukose

GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HPRT	Hypoxanthin:Guanin-Phosphoribosyltransferase
IEF	isoelektrische Fokussierung
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie
M	mol/l
Man	Mannose
MEF	<i>murine embryonic fibroblast</i>
MMuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
neo	Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen (vermittelt Neomycinresistenz)
o/n	über Nacht
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sia	Sialinsäure
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short inhibitory RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
Xyl	Xylose

## 9.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jutta Fuhlrott
Anschrift	Röttgerstraße 23 b 30451 Hannover
E-Mail	j_fuhlrott@web.de
Geburtsdatum und -ort	25. August 1979 in Heiligenstadt

### Schule

1986 – 1988	Grundschule „Karl-Marx“ in Heiligenstadt
1988 – 1991	Grundschule und Orientierungsstufe „Lindenallee“ in Heiligenstadt, Klasse mit erweitertem Fremdsprachenunterricht
1991 – 1998	Staatliches Gymnasium in Heiligenstadt, Abschluss: Abitur

### Hochschulstudium

1998 – 2003	Biochemiestudium an der Universität Hannover, Abschluss: Diplom
11.02.2003 – 11.08.2003	Diplomarbeit „Zielgerichtete Mutagenese des hypothetischen murinen UDP-Xylose/UDP-N-Acetylglucosamin-Transporters“, Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Zelluläre Chemie

### Promotion

September 2003	Beginn der Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Zelluläre Chemie „Studien zur physiologischen Funktion des murinen UDP-Xylose-Transporters Slc35b4“
Juli 2007	Abschluss der Promotion mit dem Hochschulgrad Dr. rer. nat. mit magna cum laude an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibnitz Universität Hannover

### Fortbildungen

17.09.2001 – 12.10.2001	Kurs zur Fachkunde gem. § 30 StrSchV, Fachkundegruppe 4.2, Aktualisierung am 12.06.2006
Oktober 2002	Fortbildungslehrgang nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr.3 GenTSV („gentechnische Sicherheit“)
03.05.2004 – 07.06.2004	Kurs in Versuchstierkunde (Kategorie B - FELASA)

### **9.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen**

Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhlrott J, Kraft T, Grothe C.  
Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. J Biol Chem. 2003 Jan 3; 278(1):479-85

Ashikov A, Routier F, Fuhlrott J, Helmus Y, Wild M, Gerardy-Schahn R, Bakker H.  
The human solute carrier gene SLC35B4 encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. J Biol Chem. 2005 Jul 22; 280(29):27230-5

### **9.4 Posterpräsentationen**

GBM Herbsttagung Berlin 2005

Functional Characterisation of the murine UDP-xylose/UDP-N-acetylglucosamine  
Transporter

DOI:10.1240/sav\_gbm\_2005\_h\_001366

16<sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting 2005, Hannover

Functional Characterisation of the murine UDP-xylose/UDP-N-acetylglucosamine  
Transporter

## **9.5 Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Außerdem versichere ich an Eides statt, dass die zugrundeliegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, 2. Mai 2007

## 9.6 Danksagungen

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Arbeitsvoraussetzungen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin einen herzlichen Dank an Dr. Birgit Weinhold und Dr. Hans Bakker für Betreuung und viele gute Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Labteams RGS für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Vielen Dank auch an PhD Robert Haltiwanger und Nadia Rana für die Analyse der Notch-EGF-Fragmente.

Der DFG und dem Graduiertenkolleg 705 danke ich für die Finanzierung des Projektes.