

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin **Nastassja Himmelreich**

geboren in Fulda, Deutschland.

Tag der mündlichen Prüfung: _____

**Analyse der Signaltransduktion während der
frühen Embryogenese
in einem *Xenopus laevis*- Modell
zu ‚PMM2-CDG‘**

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Christian Körner

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Sabine Strahl

Für meine Oma,

meine Familie

und mich

**„Wahre Wissenschaft zeichnet sich aus durch Demut vor den Grenzen des Endlichen
und durch Neugier auf das Unendliche hinter diesen Grenzen.“ Lisz Hirn (*1984)**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den

Nastassja Himmelreich

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
I. Zusammenfassung	1
Summary	2
II. Ziel der Dissertation	3
1. Einleitung	5
1.1 Glykosylierung von Proteinen	5
1.1.1 Biologische Relevanz der Glykokonjugation	5
1.1.2 Grundlagen der Biosynthese von Glykoproteinen	5
1.1.2.1 O-Glykosylierung	6
1.1.2.2 N-Glykosylierung	6
1.2 Glykosylierungsdefekte - Congenital Disorder of Glycosylation	10
1.2.1 PMM2-CDG (CDG-Ia) – Der häufigste CDG-Defekt	14
1.2.1.1 Biochemische und genetische Charakterisierung von PMM2-CDG	14
1.2.1.2 Klinische Symptome von PMM2-CDG	15
1.3 <i>Xenopus laevis</i>	17
1.3.1 <i>Xenopus laevis</i> Embryonalentwicklung	17
1.4 Morphogenese der <i>Xenopus</i> Gastrulation	19
1.5 Morphogenesebewegungen	22
1.5.1 Konvergente Extension	24
1.5.2 Molekulare Faktoren der Gastrulation	25
1.5.3 Koordination der konvergenten Extension und Gewebeseparation	26

1.6 Wnt-Signaling	26
1.6.1 Wnt-Signaltransduktion und Morphogenese	26
1.6.2 Wnt5a/ ror2 induzieren Paraxiales Protocadherine (PAPC)	31
2. Ergebnisse	33
2.1 Charakterisierung der Phosphomannomutase2 in <i>Xenopus laevis</i> ...	33
2.1.1 Kyte-Doolittle-Analyse der Phosphomannomutase2	35
2.1.2 Heterologe Phosphomannomutase-Expression in COS-7	36
2.1.2.1 Phosphomannomutase-Aktivität von XPmm1 und XPmm2 in COS-7	36
2.1.2.2 Phosphomannomutase-Immunodetektion definiert Pmm2 in <i>Xenopus</i>	37
2.2 Phosphomannomutase2 (Pmm2) in der <i>Xenopus</i> Embryogenese	39
2.2.1 <i>Pmm2</i> Expression im Verlauf der <i>Xenopus laevis</i> Entwicklung.....	39
2.2.2 <i>Pmm2</i> Expressionsprofil im frühen Gastrulastadium 10,5	41
2.3 Pmm2 Knockdown in <i>Xenopus</i> durch Antisense-Morpholinos	42
2.3.1 Nachweis der reduzierten Pmm2-Aktivität mittels 2[³ H] Mannose-6P-Assay	42
2.3.2 Vergleich spezifischer Pmm2 Morpholinos durch eine Kaplan-Meier Statistik	45
2.3.3 Photometrischer Nachweis der Pmm2-Aktivität mit spezifischem Rescue	46
2.4 Hypoglykosylierung durch Pmm2-Morpholino-Knockdown	47
2.5 Inhibition der Morphogenese durch defiziente N-Glykosylierung	51
2.5.1 Der Tunicamycin-Effekt	51
2.5.2 Der Pmm2-Morpholino-Effekt	54
2.6 Pmm2-Defizienz provoziert eine Hypoglykosylierung von Wnt5a	55
2.6.1 Nachweis der Wnt5a Hypoglykosylierung durch 2D-Gelelektrophorese	55

2.7 Pmm2 siRNA in Wnt5a-V5 L-Zellen inhibiert Wnt5a Sekretion	59
2.8 Konsequenz einer Pmm2-abhängigen Wnt5a Hypoglykosylierung	64
2.8.1 Pmm2-Aktivität beeinflusst <i>Paraxial Protocadherine</i> Expression	65
2.8.1.1 <i>In situ</i> Hybridisierung	65
2.8.1.2 Quantifizierung der PAPC-Expression	66
2.8.2 Induktion eines spezifischen Wnt5a/ Ror2 ‚Gain of function‘	67
2.9 Pmm2-abhängige Morphogenesebewegungen	
(Konvergente Extension)	70
2.10 Pmm2-abhängige Signalkaskaden	72
3. Diskussion	75
3.1 Phosphomannomutase2 (Pmm2) in <i>Xenopus laevis</i>	76
3.1.1 Identifizierung der Pmm2	76
3.1.2 Expression von Pmm2 während der Embryonalentwicklung	77
3.2 Pmm2 Knockdown durch Antisense-Morpholinos	78
3.3 Hypoglykosylierung durch Tunicamycin und Pmm2 Morpholino	79
3.4 Pmm2-abhängige Morphogenese in <i>Xenopus laevis</i>	81
3.5 Pmm2-Knockdown induziert eine Hypoglykosylierung von Wnt5a	82
3.6 Pmm2 RNAi-Knockdown von Wnt5a-V5 in L-Zellen	84
3.7 N-Glykosylierungsabhängige Sekretion von Wnt5a in L-Zellen	84
3.8 Wnt5a -Pmm2-abhängiger ‚Loss of function‘	86
3.9 Wnt5a/Ror2 induzierter ‚Gain of function‘ in animalen Kappen	87
3.10 Pmm2-Defizienz beeinträchtigt die Konvergente Extension	88
3.11 Pmm2-abhängige Zielgenexpression	88
4. Ausblick: Pmm2-abhängige Signaltransduktionskaskaden	91

5. Methoden	95
5.1 Molekularbiologische Methoden.	95
5.1.1 Der Vektor (pCI-neo)	95
5.1.2 Extraktion von Nukleinsäuren.	95
5.1.2.1 Isolierung der DNA.	95
5.1.2.2 Isolierung von RNA.	96
5.1.2.3 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion.	96
5.1.2.4 Präzipitation von Nukleinsäuren.	96
5.1.2.5 Qualitätsanalyse und Quantifizierung von Nukleinsäuren.	97
5.1.3 Restriktion der DNA.	97
5.1.4 Agarose Gelelektrophorese.	98
5.1.5 Klonierung der Plasmid-Konstrukte	98
5.1.5.1 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende.	98
5.1.5.2 Ligation von DNA Fragmenten	99
5.1.6 Transformation kompetenter Bakterien	99
5.1.6.1 Sequenzanalyse.	100
5.1.7 cDNA-Synthese	100
5.1.7.1 DNaseI-Verdau.	100
5.1.7.2 Reverse Transkription	100
5.1.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)	101
5.1.8.1 Klonierung eines PCR-Fragmentes.....	101
5.1.8.2 Site-directed Mutagenese (SDM)	103
5.1.8.3 RT-PCR und qRT-PCR	104
5.1.9 <i>In-vitro</i> Transkription von RNA	105
5.2 Embryologie	107
5.2.1 <i>Xenopus laevis</i> Embryonen Kultivierung und Mikromanipulation	107
5.2.2 Whole mount <i>In situ</i> Hybridisierung	107
5.2.3 Animal Cap Assay	109

5.2.4 Dorsal Marginal Zonen-Explantate	110
5.2.5 Lektin Histochemie und Immunofluoreszenz	110
5.3 Proteinbiochemische Methoden	111
5.3.1 Phosphomannomutase2 (PMM2) Aktivität.....	111
5.3.1.1 Radioaktiver Pmm2-[³ H] Mannose-6-Phosphat-Assay	111
5.3.1.2 Substratherstellung von [³ H] Mannose-6-Phosphat.	112
5.3.1.3 Gekoppelt photometrischer PMM2-Assay	112
5.3.2 SDS Page und Western Blot Analysen.....	113
5.3.3 Immunopräzipitation	114
5.3.4 2D-Gelelektrophorese.....	115
5.4 Zellkultur.....	115
5.4.1. Kultivierung der Zelllinien.....	115
5.4.2. Transfektion von Zellen.....	116
5.5 Mikroskopie	116
5.6 Statistik	116
6. Material.....	117
6.1 Chemikalien.....	117
6.2 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	120
6.2.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze	124
6.3 Geräte	124
6.4 Verbrauchsmaterialien	127
6.5 Reaktionssysteme (Kits)	128
6.6 Enzyme, Marker, Proteine und Reagenzien	129
6.6.1 Antikörper	130
6.6.2 Lektine und Streptavidin-Konjugate	130
6.7 Oligonukleotide.....	131
6.8 Radioaktive Substanzen.....	133
6.9 Plasmide	133
6.10 Bakterien.....	133

Inhaltsverzeichnis _____

6.11 Stabil transfizierte Zelllinien 133

6.12 Tiere 134

6.13 EDV 134

6.14 Online Datenbanken 134

6.15 Sterilisationen von Lösungen und Arbeitsgeräten..... 134

7. Referenzen 135

8. Danksagung 161

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Haupttypen der N-verknüpften Glykokonjugate.	7
Abbildung 1.2: Glykoproteinbiosynthese	8
Abbildung 1.3: Angeborene Defekte der N-Glykoproteinprozessierung ,Congenital Disorders of Glycosylation' (CDG).	13
Abbildung 1.4: Multisystemische Symptome bei PMM2-CDG Patienten.	16
Abbildung 1.5: Entwicklungszyklus von <i>Xenopus laevis</i>	18
Abbildung 1.6: Zellschicksalskarte der Blastula (NF Est. 8-9) und der frühen Gastrula (NF Est. 10) in <i>Xenopus laevis</i>	20
Abbildung 1.7: Zellschicksalskarte der Gastrula (NF Est. 11) und der späten Gastrula (NF Est.12) in <i>Xenopus laevis</i>	21
Abbildung 1.8: ‚Brachet’s Cleft‘ Formation in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.	23
Abbildung 1.9: Konvergente Extension der involutierenden mesodermalen Zellen.	24
Abbildung 1.10: Morphogenetische Ausprägung der Chordaten-Körperachse. ...	25
Abbildung 1.11: Wnt-Signaltransduktion in der <i>Xenopus</i> Embryogenese.	27
Abbildung 2.1: Identifikation der Pmm2 in <i>Xenopus laevis</i>	34
Abbildung 2.2: Vergleichende Hydrophilizität der Pmm2.	34
Abbildung 2.3: Kyte-Doolittle Analyse der Pmm2.	35
Abbildung 2.4: Phosphomannomutase2 Aktivitätsmessungen durch 2^3H Mannose-6-Phosphat Assay	37
Abbildung 2.5: Western Blot Analysen der Pmm2 in COS7-Zellen.	38
Abbildung 2.6: Expression der Pmm2 im Verlauf der Embryonalentwicklung. ...	39
Abbildung 2.7: Quantifizierung der Pmm2-Expression im Verlauf der Embryogenese.	40
Abbildung 2.8: Pmm2 In situ Hybridisierung in <i>Xenopus laevis</i> Est. 10,5	41
Abbildung 2.9: Pmm2-Aktivität von Wildtyp und Pmm2 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5.	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.10: Pmm2 Aktivität von Wildtyp und Pmm1 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5.	43
Abbildung 2.11: Pmm2-Aktivität von Wildtyp und Pmm1+Pmm2 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5.	44
Abbildung 2.12: Kaplan-Meier-Statistik der Morpholino-Effekte.	45
Abbildung 2.13: Pmm2 Aktivität mittels gekoppelt photometrischen NADP-Assays.	47
Abbildung 2.14: Detektion des Glykosylierungsprofils von <i>Xenopus laevis</i>	48
Abbildung 2.15: Lektin Blot Analysen ganzer <i>Xenopus</i> Embryonen.	49
Abbildung 2.16: Quantitative Analysen des Lektin-bindenden Glykanprofils.	50
Abbildung 2.17: <i>Xenopus laevis</i> Morphogenese.	52
Abbildung 2.18: Kaplan-Meier-Statistik einer N-Glykosylierungs-defizienten <i>Xenopus laevis</i> Embryogenese.	53
Abbildung 2.19: Morphologischer Pmm2-CDG Phänotyp.....	54
Abbildung 2.20: Analyse des immunopräzipitierten Wnt5a-flag mittels 2D-Gelelektrophorese.	56
Abbildung 2.21: Quantifizierung des durch 2D-Gelelektrophorese separierten, immunopräzipitierten Wnt5a-flag-Proteins.	57
Abbildung 2.22: Quantifizierung der ConA-Detektion.	58
Abbildung 2.23: Western Blot Analysen der Wnt5a-V5-L-Zellen.	59
Abbildung 2.24: Quantifizierung der Western Blot Analysen.	60
Abbildung 2.25: Pmm2-Aktivität der siRNA-behandelten Wnt5a-V5-L-Zellen.	61
Abbildung 2.26: Sekretions-Analysen für Wnt5a-V5.	61
Abbildung 2.27: Quantifizierung des Wnt5a-V5 Profils.	62
Abbildung 2.28: Quantifizierung des Pmm2-abhängigen Wnt5a Sekretionsprofils.	64
Abbildung 2.29: <i>PAPC In situ</i> Hybridisierungen.	65
Abbildung 2.30: Quantitative RT-PCR von <i>PAPC</i> der <i>Xenopus laevis</i> DMZ 10,25.	66

Abbildung 2.31: Quantitative RT-PCR für <i>PAPC</i>	68
Abbildung 2.32: Schematische Darstellung der konvergenten Extension.	70
Abbildung 2.33: DorsalMarginalZone (DMZ) -Explantate	70
Abbildung 2.34: Quantifizierung der konvergenten Extension der DMZ.....	71
Abbildung 2.35: In situ Hybridisierungen detektieren definierte Zielgene in Est.10,5.	72
Abbildung 4.1: N-Glykosylierungsabhängige Signaltransduktion	91
Abbildung 5.1: Aufbau des pCI-neo Vektors	95
Abbildung 5.2: Dorsal Marginal Zonen Explantate	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der bisher beschriebenen Defekte der N-Glykosylierung ..	12
Tabelle 2: PCR Programm der Amplifikation.....	101
Tabelle 3: PCR Programm der SDM-Mutagenese	103
Tabelle 4: PCR Programm der RT-PCR	104
Tabelle 5: PCR Programm der qRT-PCR	105

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Animale Kappe
ALG	Asparagin-linked glycan
AP	Anterior-posterior
APC	Adenomatous-polyposis-coli
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaN	Calcineurin
Cdc	Cell division cycle
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytosindiphosphat
CK	Casein Kinase
Ci	Cubitus interruptus
cm	Zentimeter
CMP	Cytosinmonophosphat
Cp	Crossing Point
CRD	Cystein-rich domain
CTP	Cytidintriphosphat

d	Tag(e)
Da	Dalton
DAAM	Dishevelled-assoziiertes Aktivator der Morphogenese
DAN	deadenylating nuclease
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEP	Dishevelled, Egl-10 und Pleckstrin Domäne
d.h.	das heißt
DIX	Dishevelled und Axin
Dkk	Dickkopf
DMZ	Dorsale Marginalzone
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
Dol	Dolichol
DTT	Dithiotreitol
DV	Dorsal-ventral
DVL	Dishevelled
E	Embryonaltag
Est	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Est.	Embryonalstadium
et al.	et alii (lat. und andere)
Ets	E26 transformation-specific transcription factors
EZM	extrazelluläre Matrix
f.c.	final concentration
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor

Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FzR	Frizzled Rezeptor
g	Gramm
G	Guanin
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
Golgi	Golgi-Apparat
GPBS	Glykoproteinbiosynthese
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Hh	Hedgehog
HPLC	high performance liquid chromatography
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
<i>In vitro</i>	lat. Im Glas
<i>In vivo</i>	lat. Im Lebendigen
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
KD	Knockdown
KO	Knockout
l	Liter
LLO	lipid linked oligosaccharides

L/R	Links/Rechts
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
M	molar
mA	Milliampère
Man	Mannose
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
Mo	Morpholino
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
myf	myogenic factor
n	Anzahl
NANA	Sialinsäure
neo	Neomycin
NF	Nieuwkoop Faber
NFAT	nuclear factor of activated T cells
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OMIM	online Mendelian inheritance in man
OST	Oligosaccharyltransferase
p	Signifikanz
P	Phosphat
p.a.	pro analysi (lat. zur Analyse)
PAPC	Paraxiales Protocadherine
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCP	Planare Cell Polarity

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMM	Phosphomannomutase im Menschen
Pmm	Phosphomannomutase in <i>Xenopus laevis</i>
Ptc	Patched
q	quantitative
Rac	Ras-related C3 botulinum substrate
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROCK	Rho-assozierte Protein Kinase
Ror	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
Ser	Serin
SD	standard deviation = Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
smo	smoothened
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
Tcf	Transcriptionfactor
TGF	Transforming Growth Factor
Thr	Threonin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoacetat
u	Unit
U	Uridin
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
Vol.	Volumen
vs.	versus
w	Wochen
w/v	Gewicht zu Volumen
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family Growth Factors
WT	Wildtyp
XBra	<i>Xenopus</i> Brachyury
X g	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
®	eingetragene Marke
™	Trademark

Verwendete Vorsilben für Potenzen der Zahl Zehn:

p	Pico (1×10^{-12})
n	Nano (1×10^{-9})
μ	Mikro (1×10^{-6})
m	Milli (1×10^{-3})
k	Kilo (1×10^3)
M	Mega (1×10^6)

Alle chemischen Elemente wurden mit den handelsüblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Ein- oder Drei-Buchstabencode angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini angewandt, da ebenfalls in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung diese Begriffe nicht gebräuchlich und ungenügend ist.

I. Zusammenfassung

Angeborene Defekte der Proteinglykosylierung im Menschen führen zu ‚Congenital Disorder of Glycosylation‘ (CDG), wobei die Erkrankung PMM2-CDG mit Abstand die häufigste Form der CDG darstellt. Obwohl weltweit bereits über 1000 PMM2-CDG Patienten identifiziert wurden, ist die komplexe Pathophysiologie dieser Erkrankung, insbesondere im Hinblick auf entwicklungsbiologische Vorgänge, noch weitgehend unverstanden.

Zum Studium der Regulation Pmm2-abhängiger Signaltransduktionswege in der frühen Embryogenese wurden Untersuchungen im südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt. Mittels Morpholino induzierten Knockdowns konnte die Pmm2-Aktivität in *Xenopus laevis* erfolgreich reduziert werden, wodurch eine generelle Hypoglykosylierung von Proteinen induziert wurde.

Dies führte zu einem schweren morphogenetischen Phänotyp, der vor allem durch kraniofaziale Dysmorphien, frühe Achsendefekte, ein reduziertes Notochord sowie kardiale und intestinale Malformationen charakterisiert war. Da sich der biochemische und morphologische Effekt durch Einbringen von Wildtyp-Pmm2-cDNA aufheben ließ, konnte die Funktionalität dieses neuartigen Froschmodells zur PMM2-CDG nachgewiesen werden.

Die Analyse des nicht-kanonischen Wnt5a/ror2 Wnt-Signalweges ergab eine durch Pmm2-Verlust bedingte Hypoglykosylierung von Wnt5a. Weitere Experimente zeigten, dass die Sezernierung von Wnt5a durch den Verlust von N-Glykanen gehemmt wurde und dadurch die Transduktionseffizienz dieses wichtigen entwicklungsbiologischen Signalwegs stark vermindert wurde.

In dieser Dissertation konnte anhand eines neuartigen Froschmodells zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden, dass ein Pmm2-abhängiger Glykosylierungsdefekt direkten Einfluss auf Wnt-Signalprozesse in der frühen Embryogenese nimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen damit maßgeblich zu einem besseren pathogenetischen Verständnis des komplexen Phänotyps der PMM2-CDG bei.

Summary

Inborn errors of proteinglycosylation in humans lead to 'Congenital Disorders of Glycosylation'(CDG). PMM2-CDG is by far the most common form within this group of severe disorders. Although over 1000 patient's suffering from PMM2-CDG have been identified worldwide, its complex pathophysiology is yet to be understood, especially in regard to developmental processes.

To study the regulation of Pmm2-dependent signalling pathways in early embryogenesis, investigations in the South African clawed frog, *Xenopus laevis* were carried out. By a morpholino-induced knockdown the Pmm2 activity in *Xenopus laevis* was successfully reduced, resulting in a general protein hypoglycosylation.

This induced a severe morphogenetic phenotype, mainly characterized by craniofacial dysmorphisms, early axial defects, a reduced notochord as well as malformations of the heart and digestive tract. Since the biochemical and morphological effects could both be neutralized by introducing the wildtype-Pmm2-cDNA, the functionality of this novel frog model of PMM2-CDG was confirmed.

The analysis of non-canonical Wnt5a/ror2 Wnt-signalling pathway demonstrated, that loss of Pmm2 leads to hypoglycosylation of Wnt5a. Further experiments showed that Wnt5a secretion was greatly inhibited by loss of N-glycans, relevantly reducing the transduction efficiency of this important developmental signalling pathway.

In this dissertation it could be shown, on the basis of a novel frog model, for the first time *in vivo*, that a Pmm2-dependent glycosylation deficiency takes direct effect on Wnt-signalling processes in early embryogenesis. The results of this research will thus further improve the understanding of origin and pathogenesis beyond the complex phenotype of PMM2-CDG.

II. Ziel der Dissertation

Die durch monogenetische Defekte hervorgerufenen Verluste oder Verkürzungen von N-Glykanen führen bei CDG-Patienten zumeist zu schweren multisystemischen Erkrankungen, die oftmals mit psychomotorischer und mentaler Retardierung einhergehen.

Obwohl weltweit bereits mehr als 1000 PMM2-CDG Patienten bekannt sind, ist die komplexe Pathophysiologie dieser Erkrankung insbesondere für die Organentwicklung ungeklärt.

Um die Auswirkungen einer Pmm2-Defizienz und der daraus resultierenden Hypoglykosylierung für die Embryonalentwicklung zu untersuchen, wird ein Pmm2-Knockdown in *Xenopus laevis* durchgeführt. Mit Hilfe dieses Froschmodells soll der Einfluss der N-Glykosylierung auf die Funktion von Signaltransduktionswegen wie den ‚Wingless/ Wnt‘-Signalweg und der ‚Fibroblast growth factor‘-Signalweg analysiert werden, welche für die embryonale Musterbildung und Morphogenese entscheidend sind. Es wird erwartet, dass die verminderte Pmm2-Aktivität eine generelle Hypoglykosylierung von Signalmolekülen in *Xenopus laevis* hervorruft, was die Entwicklung des Frosches negativ beeinflussen sollte. Weiterführende histologische, histochemische und proteinbiochemische Untersuchungen dieses Tiermodells sollen helfen, den Ursprung der Erkrankungssymptome von PMM-CDG-Patienten besser zu verstehen.

1. Einleitung

1.1 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine in allen Lebensformen vertretene posttranslationale Modifikation, die für die Funktionalität von Proteinen eine entscheidende Rolle spielt (Spiro, 1973; Moreman *et al.*, 2012; Defaus *et al.*, 2014).

1.1.1 Biologische Relevanz der Glykokonjugation

Glykokonjugate beeinflussen physiologische Prozesse wie die Faltung von Proteinen und deren Löslichkeit, gewährleisten Zell-Matrix- und Zell-Zellinteraktionen und bieten Schutz vor Degradation. Sie sind wichtig für die Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum (ER) und sind vor allem wesentliche Schlüsselkomponenten für den gerichteten Transport in Signaltransduktionsprozessen (Varki *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 2002; Shental-Bechor und Levy, 2008).

Grundlegende entwicklungsbiologische Prozesse wie die Fertilisation weisen darauf hin, dass der Glykosylierungsstatus der Proteine von großer Bedeutung ist und während der Embryogenese eine entscheidende Funktion in Wachstum, Differenzierung, Organogenese und Morphogenese ausübt (Podbilewicz 2004; Ohtsubo und Marth, 2006). Zudem sind Glykoproteine an Prozessen wie Inflammation und Malignität beteiligt (Oppenheimer *et al.*, 2008; Tan und Hhang, 2008).

1.1.2 Grundlagen der Biosynthese von Glykoproteinen

Die Glykoproteinbiosynthese ist ein phylogenetisch hoch konservierter, komplexer Mechanismus. Das kovalente Anheften von Glykanen ist eine ko- und posttranslationale Modifikation, die zur Gewährleistung der Funktionalität vor allem membrangebundener und sezernierter Proteine beiträgt.

Die Synthese der Glykane umfasst viele aufeinanderfolgende Schritte, an der Glykosidasen, Glykosyltransferasen und Transportproteine beteiligt sind.

Einleitung

Die Glykokonjugation lässt sich aufgrund der spezifischen Bindungsart und Struktur in verschiedene Gruppen einteilen, die O- und die N- verknüpften Glykoproteine sowie Glykolipide und C-Glykosylierung (Spiro, 2002; Dell *et al.*, 2010).

1.1.2.1 O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung findet meist im Golgi-Apparat statt und wird abhängig von der Verknüpfung zwischen Zucker- und Aminosäurereste ebenfalls in drei Untergruppen geteilt.

In tierischen Zellen stellt die häufigste Form der O-Glykane der Muzin-Typ, wobei ein N-Acetylgalaktosaminrest α -glykosidisch mit der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes verbunden ist. Dieser Muzin-Typ bewirkt beispielsweise die viskose Beschaffenheit des mukosen Schleims als Schutz epithelialer Oberflächen und ist zudem für die Ausbildung einer Barriere zwischen Epithelgewebe und Körperflüssigkeiten verantwortlich.

Des Weiteren sind der O-GlcNAc-Typ, bei dem ein N-Acetylglucosaminrest ebenfalls über den Hydroxylrest eines Serin- oder Threoninrestes verknüpft ist, sowie der Xylulose-Typ mit der Verknüpfung über diesen spezifischen Zucker in Proteoglykanen bekannt (van den Steen *et al.*, 1998; Spiro, 2002; Tran und Ten Hagen, 2013).

1.1.2.2 N-Glykosylierung

Die häufigste Glykanmodifikation bei eukaryotischen Zellen wird durch den Mechanismus der N-Glykosylierung koordiniert. Die Zuckerstrukturen werden über definierte Asparaginsäurereste des Glykosylierungsmotivs Asn-X-Ser/Thr an die neu entstehenden Glykoproteine gebunden (Medzihradzky, 2008), wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin darstellen kann. Es werden jedoch nur ein Drittel der potentiellen Erkennungssequenzen durch Glykosylierung modifiziert (Kornfeld *et al.*, 1985).

Bei der Biosynthese N-glykosidisch verknüpfter Glykoproteine ist ein N-Acetylglucosaminrest β -glykosidisch mit der Amidgruppe der Seitenkette eines Asparaginrestes (Asn) verbunden.

N-Glykane werden in drei verschiedene Typen klassifiziert, wobei man zwischen einem Mannosereichen-, einem Komplex- oder einem Hybrid-Polysaccharid-Typ unterscheidet. In Abb.1.1 werden die drei Hauptglykantypen dargestellt.

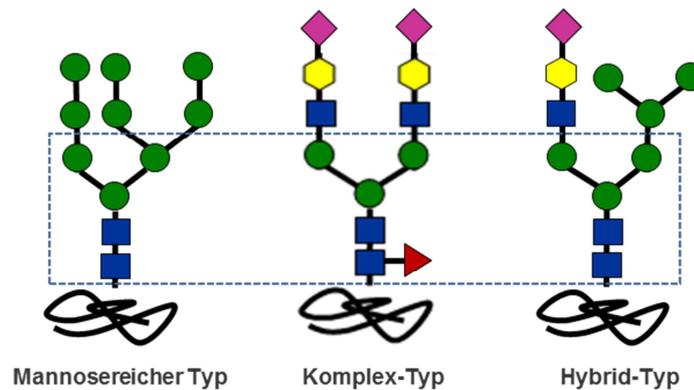


Abbildung 1.1: Haupttypen der N-verbundenen Glykokonjugate. Dargestellt sind der Mannosereiche-, der Komplex- und der Hybridtyp. Die für N-Glykane charakteristische Pentasaccharid-Kernstruktur befindet sich innerhalb der gestrichelten Markierung, bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin(■)- und drei Mannoseresten(●). Der Hybrid-/Komplextyp weist zudem noch weitere Monosaccharide wie die Fucose (▶), Galaktose- (●) und terminale Sialinsäurereste (◆) auf.

Mannosereiche Glykokonjugate tragen terminal unsubstituierte Mannosereste. In Vertebraten ist der am häufigsten bei extrazellulären N-Glykanen vorkommende Typ der Komplextyp (Trombetta, 2003).

Die Synthese des Komplextyps erfolgt an der N-Acetylglucosamin- und Mannose-Kernregion und findet überwiegend im medialen und trans-Golgi-Kompartiment statt. Glykokonjugate des Komplextyps tragen auf der Kernstruktur aufbauend weitere N-Acetylglucosamin-, Fucose-, Galaktose- und Sialinsäurereste. Der Komplextyp besitzt eine hohe Variabilität der Ausbildung von mono- bis pentaantennären Strukturen, wodurch diese Gruppe vielfältig in verschiedenen Kombinationen vertreten ist (Lowe und Marth, 2003).

Hybridglykan-Typen sind durch N-Acetylglucosamin-substituierende Enden komplexer Glykane und paralleler Enden unsubstituierter Mannosereste gekennzeichnet. Diese Glykantypen werden signalabhängig gebildet, wodurch das Glykoprotein im Anschluss zielorientiert aus dem Golgi entlassen wird (Yamamoto *et al.*, 2013).

In Abb.1.2 wird die Glykoproteinbiosynthese in ihren einzelnen Schritten veranschaulicht, welche die Komplex-Typ Prozessierung dargestellt.

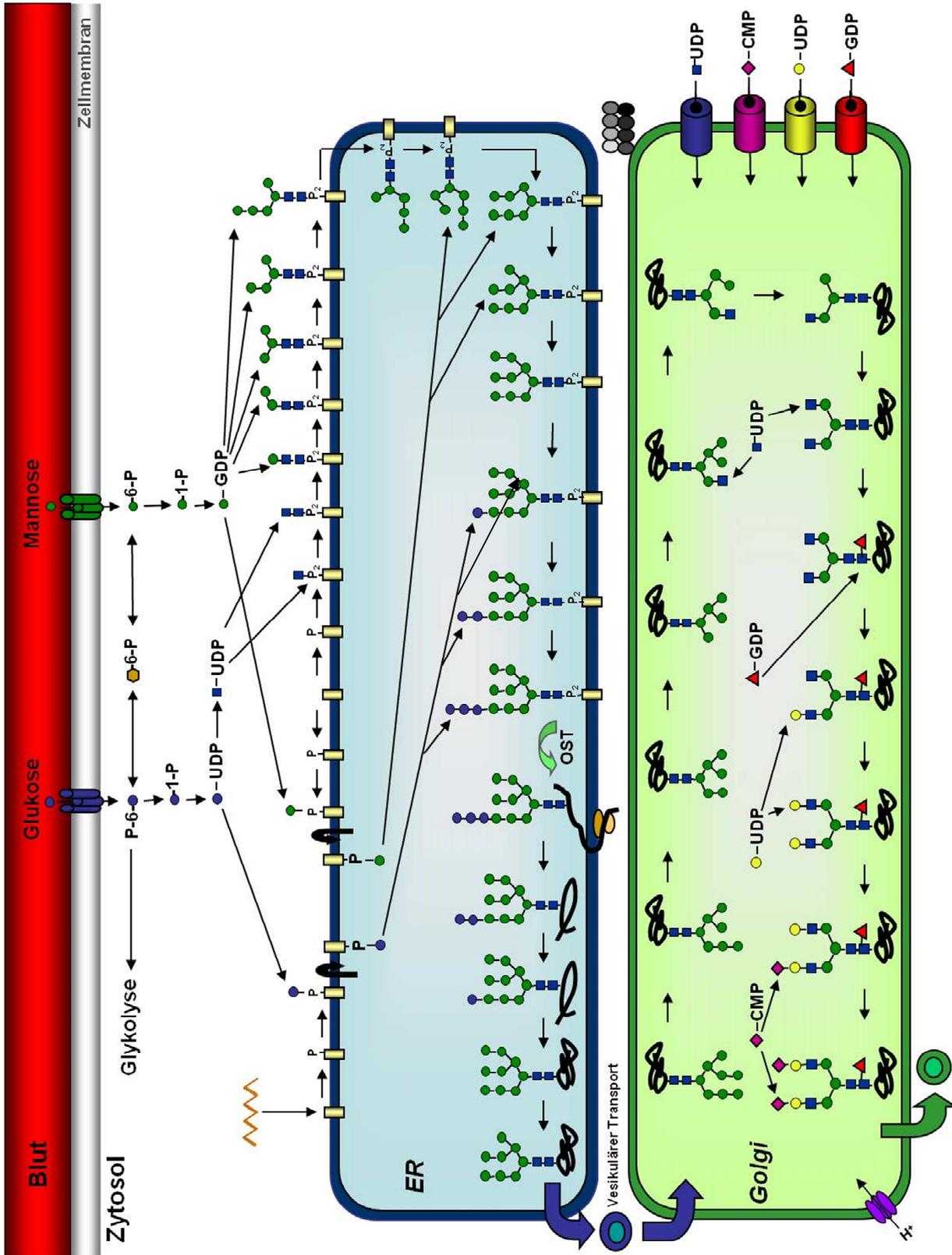


Abbildung 1.2: Glykoproteinbiosynthese. Die N-Glykosylierung beginnt auf der zytoplasmatischen Oberfläche des Endoplasmatischen Reticulums (ER) mit der Anheftung der Nucleotid-aktivierten Zucker. Nach der Translokation der lipid-verknüpften Oligosaccharide in das ER-Lumen erfolgt der Transfer auf das naszierende Protein durch die Oligosaccharyltransferase (OST). Die weitere Prozessierung und Modifikation der N-verknüpften Zuckerstrukturen erfolgt nach dem vesikulären Transport in den Golgi-Apparat (Golgi). ● Glucose; ■ N-Acetylglucosamin; ● Mannose; ► Fucose; ◆ Galaktose; ◆ Sialinsäure; □ Dolichol; P- Phosphat

Die initialen Schritte der Glykoproteinbiosynthese erfolgen im Zytosol der Zelle. Dort werden zum einen die benötigten Zucker nach ihrem Import in nukleotid-aktivierte Zucker modifiziert (Freeze und Elbein, 2009), zum anderen wird Dolichol bereitgestellt. Mit der Phosphorylierung des auf der zytosolischen Seite des ER gebundenen Dolichols und dem Anheften des ersten phosphorylierten N-Acetylglucosaminrests startet die Prozessierung der Lipid verknüpften Oligosaccharide (LLO). Es werden ein weiterer N-Acetylglucosamin- sowie fünf Mannosereste durch enzymatische Übertragung zu einer Zuckerkette verknüpft.

Anschließend erfolgt die Translokation dieser Zuckerstruktur durch eine Flippase ins ER-Lumen (Häuptle *et al.*, 2008). Die enzymatische Elongation durch weitere vier Mannose- und drei Glucosereste (Hirschberg *et al.*, 1998) ergibt die vollständige Struktur Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃. Dieses Vorläufer-Oligosaccharid wird durch die Oligosaccharyltransferase (OST) auf naszierende Proteine übertragen (Knauer und Lehle, 1999).

Anschließend werden drei Glucose- und ein Mannoserest abgespalten, das Protein durchläuft die Qualitätskontrolle und wird durch vesikulären Transport zum Golgi transportiert (Tatu und Helenius, 1997).

Die Glykanstruktur wird im Golgi zunächst weiter getrimmt und anschließend durch GlcNAc-, Galaktose-, Fucosereste sowie Sialinsäurereste wieder aufgebaut.

- Die Reduktion um drei Mannose-Oligosaccharide im cis-Kompartiment betrifft die Modifizierung von Glykoproteinen, die für sekretorische Vesikel oder für eine Lokalisation in der Plasmamembran bestimmt sind.
- Im medialen Golgi-Kompartiment können weitere Mannosereste abgebaut werden und durch Fucose- und Galaktosemonosaccharide ersetzt werden.
- Im trans Golgi-Kompartiment erfolgt die terminale Modifikation mit Sialinsäuren.

Abschließend entscheidet die Aminosäuresequenz des jeweiligen Glykoproteins über die Variante der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide (Hubbard und Ivatt, 1981).

1.2 Glykosylierungsdefekte - Congenital Disorder of Glycosylation

Defekte in der N-Glykosylierung des Menschen, die die Synthese oder die Prozessierung der neusynthetisierten Zuckerkonjugate beeinträchtigen, führen zu einem oftmals stark multisystemischen Erkrankungsbild und werden als ‚Congenital Disorder of Glycosylation‘ (CDG) bezeichnet.

CDG sind eine erblich bedingte Erkrankungsgruppe mit einem variablen klinischen Profil und einer Inzidenz von 1:200.000 für PMM2-CDG.

Klinisch wurde die Gruppe monogenetischer Stoffwechseldefekte mit autosomal-rezessivem Erbgang erstmalig 1980 beschrieben (Jaeken *et al.*). Anhand des Glykosylierungsmusters des Serum-Transferrins, ein Markerprotein in der CDG-Diagnostik, werden die CDG-Erkrankungen in die Kategorien CDG-I und CDG-II unterteilt.

CDG-I ist gekennzeichnet durch genetische Defekte verschiedener Proteine der N-Glykansynthese, die im Zytosol und im Endoplasmatischen Retikulum, bis einschließlich des Transfers des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids auf das naszierende Protein durch die Oligosaccharyltransferase (OST) auftreten.

Unter dem CDG II-Typ werden die Defekte der nachfolgenden Prozessierung, des Trimmings und der Elongation im ER und Golgi definiert.

In Tabelle 1 werden die in Abb.1.3 dargestellten, bisher publizierten CDG-Defekte zusammengefasst aufgeführt. Für jeden Defekt wurden die alte sowie die neue Nomenklatur, das betroffene Protein sowie die Referenzen der Erstbeschreibung aufgelistet. (OMIM*-Nummer = online Mendelian inheritance in man (www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

CDGTyp neu	CDGTyp alt	Betroffenes Protein	Referenz	OMIM*
PMM2-CDG	CDG-ia	Phosphomannomutase 2	Jaeken und van Schaftingen, 1995	212065
PMI-CDG	CDG-ib	Phosphomannoseisomerase	Niehues et al., 1998	602579
ALG6-CDG	CDG-ic	Dol-P-Glc: Man9GlcNAc2-PP-Dol-a-1,3-Glucosyltransferase	Burda et al., 1998; Körner et al., 1998; Imbach et al., 1999	603147
hALG3-CDG	CDG-ld	Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol-a-1,3-Mannosyltransferase	Körner et al., 1999	601110
DPM1-CDG	CDG-le	Dol-P-Man-Synthase I	Kim et al., 2000; Imbach et al., 2000	608799
MPDU1-CDG	CDG-if	Dolicholphosphat-Mannose-Synthase-1	Kranz et al., 2001; Schenk et al., 2001	609180
hALG12-CDG	CDG-ig	Dol-P-Man: Man7GlcNAc2-PP-Dol-a-6-Mannosyltransferase	Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann et al., 2002	607143
hALG8-CDG	CDG-ih	Dol-P-Glc: Gic1Man9GlcNAc2-PP-Dol-a-3-Glucosyltransferase	Chantret et al., 2003	608104
hALG2-CDG	CDG-ij	GDP-Man: Man1GlcNAc2-PP-Dol-Mannosyltransferase	Thiel et al., 2003	607906
DPAGT1-CDG	CDG-ij	UDP-GlcNAc: Dolichyl-Phosphat-N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase	Wu et al., 2003	608093
hALG1-CDG	CDG-ik	GDP-Man: GlcNAc2-PP-Dol-Mannosyltransferase	Kranz et al., 2004; Grubenmann et al., 2004; Schwarz et al., 2004	608540
hALG9-CDG	CDG-il	Dol-P-Man: Man6/8GlcNAc2-PP-Dol-a1,6-Mannosyl-transferase	Frank et al., 2004	608776
DOLK-CDG	CDG-im	Dolichol-Kinase	Kranz et al., 2007	610768
RFT1-CDG	CDG-in	RFT1-Protein	Häuptle et al., 2008	611908
DPM3-CDG	CDG-io	Dol-P-Man-Synthase III	Lefeber et al., 2009	612937
ALG11-CDG	CDG-ip	GDP-Man:Man3-4GlcNAc2-PP-Dolichol-Mannosyltransferase	Rind et al., 2010	613661
SRD5A3 -CDG	CDG-iq	Steroid 5 α -Reduktase Typ 3	Cantagrel et al., 2010; Morava et al., 2010	611715
DDOST-CDG	CDG-ir	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein-Glykosyltransferase 48kDa Untereinheit	Jones et al., 2012	614507
ALG13-CDG	CDG-is	UDP-N-Acetylglucosamintransferase Untereinheit ALG13 homolog	Timal et al., 2012	300884
ALG14-CDG	CDG	UDP-N-Acetylglucosamintransferase Untereinheit ALG14 homolog	Timal et al., 2012	612866

PGM1-CDG	CDG-It	Phosphoglucomutase-1	Timal et al., 2012; Stojkovic et al., 2009	614921
DPM2-CDG	CDG-lu	Dolichol-Phosphat- Mannose Biosynthese regulatorisches Protein	Barone et al., 2012	615042
NGLY-CDG	CDG-lv	Peptid-N(4)-(N-Acetyl-beta-Glucosaminyll)-Asparagin-Amidase	Need et al., 2012; Enns et al., 2014	615273
STT3A-CDG	CDG-lw	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein -Glykosyltransferase STT3A-Untereinheit	Shrimal et al., 2013	615596
STT3B-CDG	CDG-lx	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein -Glykosyltransferase STT3B-Untereinheit	Shrimal et al., 2013	615597
MGAT2-CDG	CDG-lla	GlcNAc-Transferase 2	Jaeken et al., 1994; Tan et al., 1996	212066
GCS1-CDG	CDG-llb	a-1,2-Glucosidase I	de Praeter et al., 2000	606056
SLC35C1-CDG	CDG-llc	GDP-Fucose-Transporter	Lübke et al., 1999; Lübke et al., 2001; Lühn et al., 2001	266265
B4GALT1-CDG	CDG-lld	UDP-Gal:GlcNAc-b-1,4-Galactosyltransferase I	Peters et al., 2002; Hansske et al. 2002	607091
COG7-CDG	CDG-lle	Untereinheit 7 des COG-Komplexes	Wu et al., 2004	608779
SLC35A1-CDG	CDG-llf	CMP-MANA Transporter	Martinez-Duncker et al., 2005	605634
COG1-CDG	CDG-llg	Untereinheit 1 des COG-Komplexes	Foulquier et al., 2006	606973
COG8-CDG	CDG-llh	Untereinheit 8 des COG-Komplexes	Foulquier et al., 2007; Kranz et al., 2007	606979
COG5-CDG	CDG-lli	Untereinheit 5 des COG-Komplexes	Paesold-Burda et al., 2009	606821
COG4 -CDG	CDG-llj	Untereinheit 4 des COG-Komplexes	Reynders et al., 2009	606976
TMEM165-CDG	CDG-llk	Transmembran Protein 165	Foulquier et al., 2012	614727
COG6-CDG	CDG-lll	Untereinheit 6 des COG-Komplexes	Lübbehusen et al., 2010	606977
SLC35-A2	CDG-llm	UDP-Galactose-Transporter	Kodera et al., 2013	300896
GMPPA-CDG		GDP-Mannose Pyrophosphorylase A	Koehler et al., 2013	612713
SSR4-CDG		Signalsequenz-Receptor 4 Protein des TRAP-Komplex	Losfeld et al., 2013	n.a.
DHDDS-CDG		Dehydrodichol-Diphosphat-Synthase	Willer et al., 2012	613861
MAN1B1-CDG		a-1,2-Mannosidase/ Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	Rafiq et al., 2011	614202
TUSC3		Oligosaccharyltransferase Untereinheit TUSC3	Garshasbi M, 2011	601385
MAGT1/IAP-CDG		Magnesium transporter protein 1/ Oligosaccharyltransferase subunit IAP	Molinari et al., 2008	300715
ATPV0A2-CDG		Untereinheit der A2 der H+-ATPase	Kornak et al., 2008	611716

Tabelle 1: Übersicht der bisher beschriebenen Defekte der N-Glykosylierung

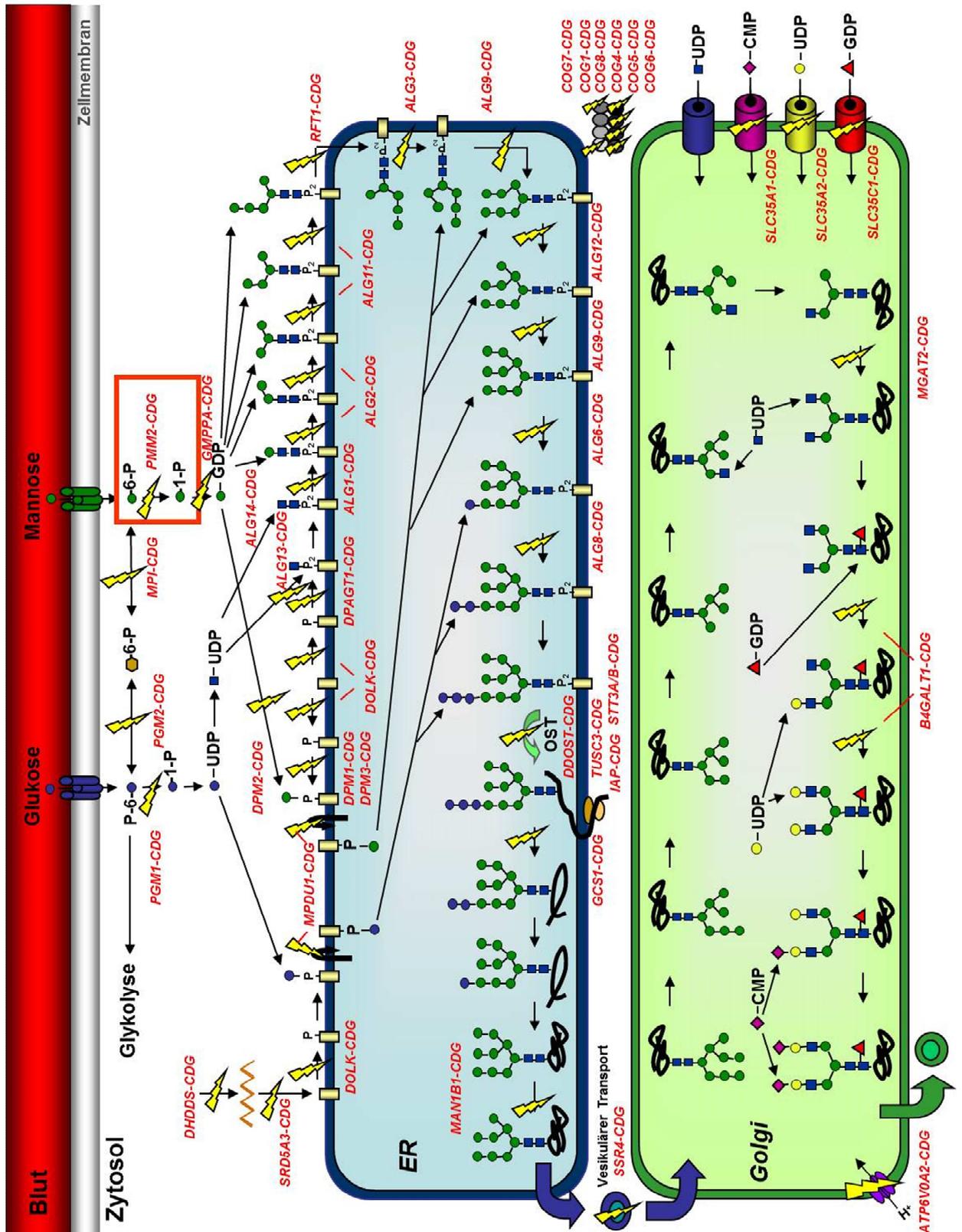


Abbildung 1.3: Angeborene Defekte der N-Glykoproteinprozessierung ‚Congenital Disorders of Glycosylation‘ (CDG). Die gelben Blitze verdeutlichen die bisher beschriebenen Defekte der N-Glykosylierung, welche in Tabelle 1 aufgeführt sind. ● Glucose; ■ N-Acetylglucosamin; ● Mannose; ▲ Fucose; ◆ Galaktose; ◆ Sialinsäure; ⚡ Dolichol; P- Phosphat

1.2.1 PMM2-CDG (CDG-Ia) – Der häufigste CDG-Defekt

Phosphomannomutase2 (PMM2)-CDG ist mit fast 80% der häufigste und zugleich der klinisch am längsten bekannte Defekt dieser schnell wachsenden Erkrankungsgruppe (Hauptle und Hennot 2009).

Weltweit sind bis heute mehr als 1000 PMM2-Patienten bekannt, wobei davon auszugehen ist, dass die Dunkelziffer deutlich höher ist (Ohno *et al.*, 1992; Imtiaz *et al.*, 2000; De Lonlay *et al.*, 2001; Erlandson *et al.*, 2001; Briones *et al.*, 2002; Enns *et al.*, 2002; Kjaergaard *et al.*, 2004).

1.2.1.1 Biochemische und genetische Charakterisierung von PMM2-CDG

Die Phosphomannomutase2 ist ein zytosolisches Enzym, welches die Reaktion von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat katalysiert und umgekehrt. Das gebildete Mannose-1-Phosphat ist ein wichtiger Vorläufer für die Synthese von GDP-Mannose, Dolichol-P-Mannose und GDP-Fucose, die essentielle Zuckerdonore für die Glykoproteinbiosynthese darstellen (Kepes und Schekman, 1988; Hansen *et al.*, 1997).

Die genetische Ursache von PMM2-CDG liegt in Mutationen im Gen der Phosphomannomutase2 (PMM2) begründet, wodurch eine verminderte Enzymaktivität hervorgerufen wird (Matthijs *et al.*, 1997). Die verminderte Aktivität führt zu einer stark reduzierten Bereitstellung von vollständig synthetisierten lipid-verknüpften Oligosacchariden so dass es zu einem teilweise kompletten Verlust von N-glykosidischen Glykoproteinen kommt (Jaeken und van Schaftingen, 1995).

Aktuell sind über 80 Mutationen im PMM2-Gen beschrieben, welches auf dem Chromosom 16p13 lokalisiert ist und für ein Protein von 28kDa kodiert (Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2006).

Die betroffenen Patienten weisen keinen totalen Verlust, sondern eine geringe, von der Mutation abhängige, PMM2-Restaktivität bis zu 20% auf.

1.2.1.2 Klinische Symptome von PMM2-CDG

PMM2-CDG-charakteristische Leitsymptome umfassen unter anderem Entwicklungsverzögerungen, subkutane Fettpolster, Strabismus und invertierte Mammilen (Kristianson *et al.*, 1989), die sich trotz unauffälliger Schwangerschaft oftmals bereits in der neonatalen Phase manifestieren (Vuillaumier-Barrot *et al.*, 2012).

Hinzu kommen neurologische Auffälligkeiten, die aufgrund einer Beeinträchtigung des zentralen und peripheren Nervensystems, hauptsächlich durch psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Hypotonie und Kleinhirnatrophie (Kjaergaard *et al.*, 2001; Mader *et al.*, 2002), gekennzeichnet sind. In Einzelfällen wurden jedoch auch die Ausprägungen eines Hydrocephalus sowie Epilepsien beschrieben (Miossec-Chauvet *et al.*, 2003).

Ebenfalls werden pathologische Veränderungen der Augen, des endokrinen Systems und im Aufbau des Skelettsystems beschrieben, welche beispielsweise in Form eines Strabismus (Schielen), einer Retinitis pigmentosa (Stromland *et al.*, 1990; Fiumara *et al.*, 1994), eines Hypogonadismus (Miller *et al.*, 2003) sowie einer Blutgerinnungsstörung (De Lonlay *et al.*, 2001) und einer Verkrümmung des Rückgrats (Schade van Westrum *et al.*, 2006) detektiert werden.

Zudem werden hypotrophe und dilatative Kardiomyopathien, Myokardinfarkte oder perikardiale Ergüsse (Clayton *et al.*, 1992; Garcia-Silva *et al.*, 1996; Marquardt *et al.*, 2002; Gehrman *et al.*, 2003) beschrieben.

Es kann auch zu Störungen des Gastrointestinaltrakts und der Leber in PMM2-CDG Patienten kommen, welche sich in Form von Ernährungsstörungen und Hepatomegalie darstellen. In einigen Fällen wird das Auftreten einer Leberfibrose sowie eine Leberverfettung berichtet (Damen *et al.*, 2004).

Zudem werden Auffälligkeiten wie vergrößerte Nieren (Petersen *et al.*, 1993) oder auch renale Zysten (Strom *et al.*, 1993) beobachtet. Etwa 20% der PMM2-CDG Patienten versterben in den ersten drei Jahren (DeLonlay *et al.*, 2001). Mit

Einleitung

zunehmendem Alter stabilisiert sich der Gesundheitszustand der Patienten (Jaeken und Carchon, 1993, Grünewald 2009).

Post mortem konnte ein Verlust an Purkinje-Zellen sowie ein partieller Verlust der Granula-Zellen im zerebellaren Kortex nachgewiesen werden, was die progressive Degeneration in PMM2-CDG-Patienten widerspiegelt (Stromme *et al.*, 1991).

In Abb.1.4 wird die multisystemische Symptomatik bei PMM2-CDG-Patienten dargestellt.

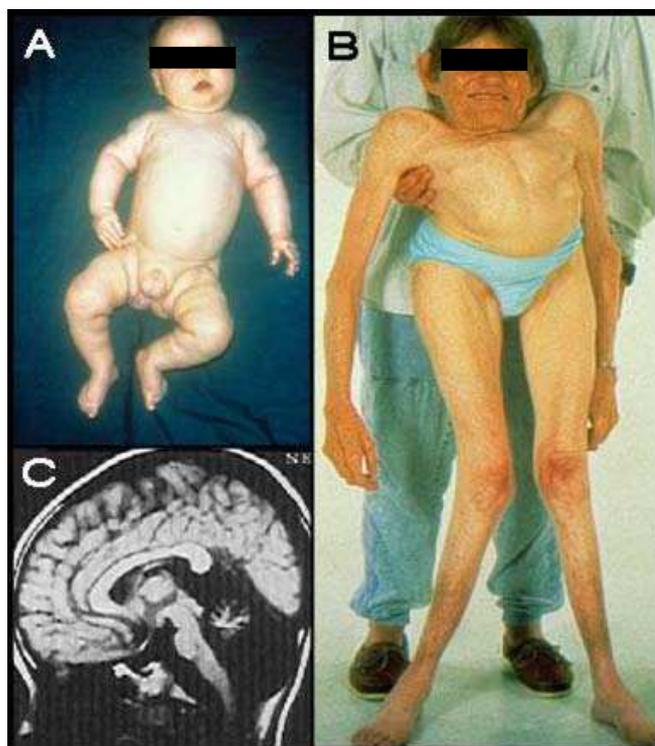


Abbildung 1.4: Multisystemische Symptome bei PMM2-CDG Patienten. Am Beispiel der aufgeführten Pmm2-CDG-Patienten werden die Symptome dieser Erkrankung verdeutlicht. (A) Aufnahme eines PMM2-CDG-Patienten mit invertierten Brustwarzen, subkutanen Fettpolstern und Strabismus (Schielen). (B) Aufnahme einer PMM2-CDG-Patientin mit pathologischen Veränderungen des Skeletts in Form einer Skoliose. (C) Die Magnetresonanztomographie (MRT) eines PMM2-CDG-Patienten veranschaulicht eine deutliche Retardierung der zerebellaren Substanz als Folge einer Kleinhirnatrophie.

Obwohl seit Mitte der 90er Jahre die molekulare Ursache von PMM2-CDG bekannt ist, ist die Pathophysiologie dieser Erkrankung trotz generierter Tiermodelle in Maus und Zebrafisch bis heute noch weitgehend unbekannt. Vor allem im Hinblick auf die grundsätzliche Analyse beeinträchtigter zell- und entwicklungsbiologischer Vorgänge ist ein funktionales Pmm2-CDG-Tiermodell essentiell, weswegen diese Arbeit an *Xenopus laevis* durchgeführt wurde.

1.3 *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein etablierter und zur Analyse der Embryogenese besonders geeigneter Modellorganismus, da die ex-utero Entwicklung eine gute Möglichkeit zur exakten Analyse von Signaltransduktionswegen in definierten Entwicklungsstadien bietet (Gurdon und Hopwood 2000; Baldessari *et al.*, 2005; Koide *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2009; Blum *et al.*, 2009; Tadros und Lipshitz, 2009).

Ein großer Vorteil besteht darin, dass die Fertilisation induzierbar und ganzjährig durchführbar ist. Durch die Injektion von humanem Choriongonadotropin in den dorsalen „Lymphsack“ des Weibchens wird eine Eiablage innerhalb von 24 bis 48 Stunden induziert. Die Fertilisation erfolgt *in vitro* durch die Zugabe eines kleinen mazerierten Hodenstückes (Sive *et al.*, 2007).

Weitere Vorzüge bestehen darin, dass die Handhabung leicht zu erlernen ist und die Embryonen resistent gegenüber Infektionen nach Mikromanipulationen sind. Der Entwicklungszyklus verläuft sehr schnell, und mit einer höheren Anzahl an Embryonen pro Befruchtung wird eine kostengünstige Daten-Reproduktionsrate ermöglicht (Sive *et al.*, 2000).

Zudem besitzen Amphibienembryos bis kurz vor der Gastrulation eine starke maternale regulatorische Komponente, die es im Vergleich zu Säugern ermöglicht, zygotisch exprimierte Defekte, die zu einer Letalität führen, auszugleichen (Heasman 2002).

1.3.1 *Xenopus laevis* Embryonalentwicklung

Im Verlauf der Vertebratenentwicklung ist die Embryogenese ein fundamentaler Prozess, in dem verschiedene zelluläre Mechanismen wie Proliferation, Zellteilung, Zellschicksalsdetermination, Bewegung und interaktive Zellkommunikation sowie Apoptose reguliert werden.

In Abb.1.5 wird der Entwicklungszyklus von *Xenopus laevis* dargestellt. Die Klassifizierung der Embryonalstadien erfolgte 1967 durch Nieuwkoop und Faber (NF).

Einleitung

Das unbefruchtete Ei von *Xenopus laevis* ist zwischen 1 bis 1,5mm groß und hat eine typisch auffällige Polarisierung. Durch eine Melanin-Pigmentierung am animalen Pol wird der vegetale dotterreiche untere Pol deutlich abgrenzt.

Die Achse verläuft vom animalen Pol zum vegetalen Pol und wird als animal-vegetative Achse definiert.

Nachdem das Spermium das Ei befruchtet hat, die Akrosomreaktion sowie die Corticalreaktion abgeschlossen sind und eine Fusion der mütterlichen und väterlichen Vorkerne stattgefunden hat, beginnen die ersten Furchungsteilungen. Die ersten zwölf Zellteilungen bis zur Blastulation erfolgen als mitotische Zellteilungen, in denen die Zellen nicht wachsen, sondern bei jeder Teilung kleiner werden. Diese Zellen, bei denen zwischen den synchronen Zellteilungen das Zellwachstum ausbleibt, werden als Blastomere bezeichnet (Heasman 2006; Skirkanich *et al.*, 2011).

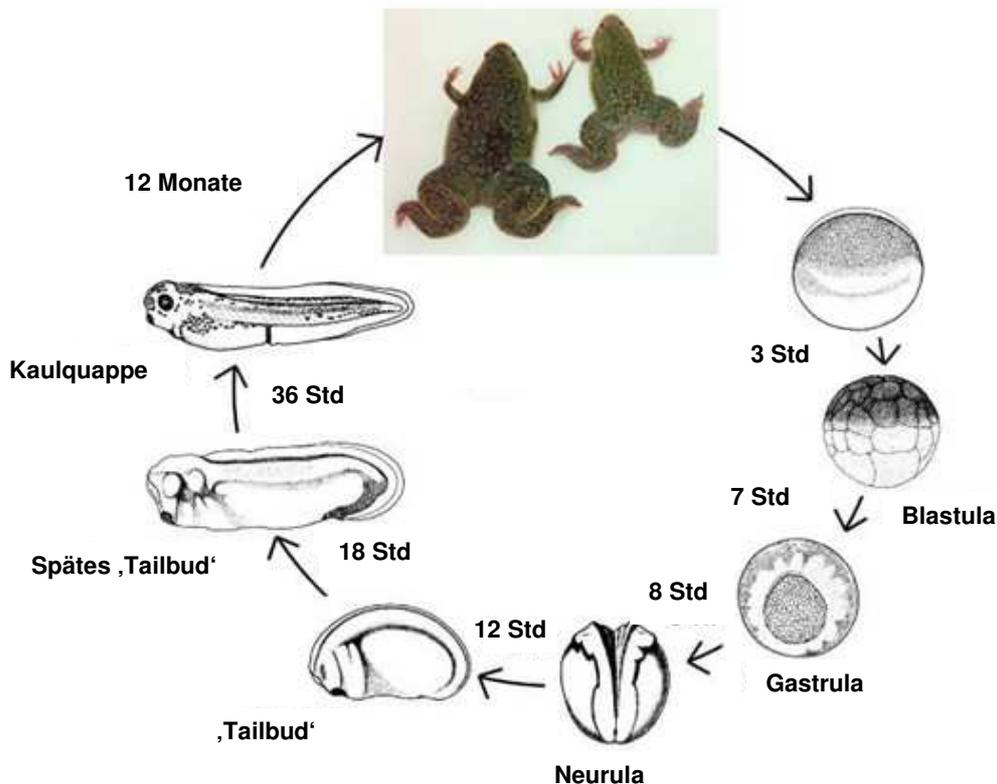


Abbildung 1.5: Entwicklungszyklus von *Xenopus laevis*. Nach der Eiablage und der Befruchtung erfolgen mitotische Furchungsteilungen bis zur Blastula. Im Verlauf der anschließenden Gastrulation werden die Gewebe-Vorläufer sowie der Urdarm angelegt. Die anterior-posterior Achse ist determiniert, wodurch folgend die Ausprägung der Neuralleite und des Neuralrohrs ermöglicht wird (Neurulation). Der Embryo elongiert und durchläuft in den folgenden Stunden Morphogenese und Organogenese-Prozesse. Nach wenigen Tagen ist das Kaulquappenstadium erreicht, die Metamorphose zum adulten, geschlechtsreifen Frosch dauert bis zu 12 Monaten. Modifiziert nach Nieuwkoop und Faber (1994).

Nach etwa 7 Stunden ist der Embryo im Blastulastadium und durchläuft in den folgenden zwei Stunden die MidBlastulaTransition (MBT), bei der die zygotische Komponente die Regulation des Körperbauplans im Embryo übernimmt und die maternale Kontrolle herab gesenkt wird. Die nun folgenden Prozesse werden rein zygotisch reguliert. Nachdem der Embryo die MBT überwunden hat, kommt es zu einem kritischen Prozess in der Vertebratenentwicklung, der Gastrulation.

Dieser Schlüsselprozess beruht auf einer komplexen Neuorganisation des Embryonenbauplans durch die Ausprägung der Organ-Vorläufer-Gewebe: Endoderm, Ektoderm und Mesoderm (Elinson, 2011).

Da auf die frühe Gastrulation ein Hauptaugenmerk in dieser Arbeit gerichtet ist, wird dieser Prozess im nächsten Abschnitt detailliert aufgeführt.

Nachdem sich der Embryo während der Gastrulation orientiert und eine grundlegende morphogenetische Strukturierung stattgefunden hat, beginnt nach etwa 8 bis 10 Stunden die Neurulation mit der Ausprägung der Neuralleiste. Im Folgenden elongiert der Embryo, bildet die ersten Organanlagen, durchläuft somit die Organogenese sowie anschließend eine Metamorphose. Die morphologischen Kriterien einer Kaulquappe sind schon nach 2 Tagen ausgeprägt. Nach etwa einem Jahr gilt der sich entwickelnde *Xenopus laevis* als adult und geschlechtsreif (Jones und Smith, 2008).

1.4 Morphogenese der *Xenopus* Gastrulation

Die Gastrulation ist ein kritischer Prozess im Verlauf der Vertebratenentwicklung (Solnica-Krezel, 2005). Eine systematische Koordination von Zellbewegungen führt zu einer Organisation des Embryos, welche aus der Blastula einen multisystemischen Organismus entstehen lässt (Von Dassow und Davidson 2009). Neben der Ausprägung der drei Keimblätter wird ebenfalls ein grundlegender Körperbauplan durch Anlage der primären Achse determiniert (Capdevila *et al.*, 2000). Es erfolgt eine neue Ausrichtung der Zellen, wodurch neue Zellkontakte entstehen und die Varianz der induktiven Interaktionen für anstehende Neurulations- und Organogeneseprozesse ermöglichen.

Einleitung

Zum Ende der Blastulation entsteht eine Blastula (Hohlkugel), deren Kavität, ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, das Blastocoel definiert (Abb.1.6 links; modifiziert nach Gilbert, 2006). Zu diesem Zeitpunkt sind grundlegende organisatorische Körperbaupläne angelegt und das Schicksal jeder Zelle determiniert (Kumano und Smith 2002).

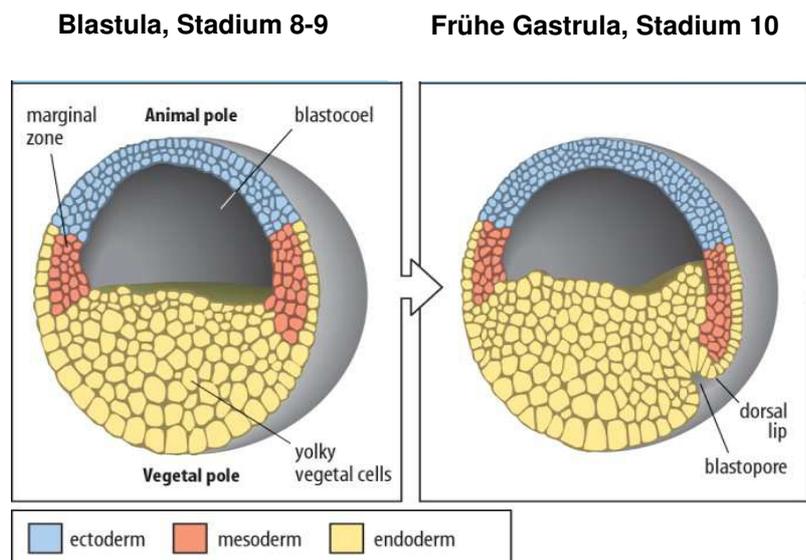


Abbildung 1.6: Zellschicksalskarte der Blastula (NF Est. 8-9) und der frühen Gastrula (NF Est. 10) in *Xenopus laevis*. (links) Blastula-Embryo. Ektodermale Zellen bilden den animalen Pol, endodermale Zellen die vegetative Hemisphäre. (rechts) Gastrula-Embryo. In der dorsalen Marginalzone startet die Gastrulation durch die vegetale Rotation des Endoderms und der Ausprägung der Flaschenzellen.

Die abgrenzende Marginalzone rund um den Äquator und der vegetale Pol bilden in der weiteren Entwicklung Mesoderm und Endoderm, wogegen der animale Pol des Embryos im Verlauf durch die Ausprägung des Ektoderms bedeckt wird.

Diese Ausprägung der Dreikeimblättrigkeit ist ein wesentlicher Bestandteil des Gastrulationsprozesses. Die Gastrulation wird mit der Bildung des Blastoporus, dem Urmund, einer vegetalen Öffnung in der Blastula eingeleitet (Abb.1.6 rechts). Die morphogenetischen Gastrulationsbewegungen werden dorsal initiiert, breiten sich lateral ventral des Embryos aus und bilden eine ringförmige Struktur, den Blastoporus.

Die axiale Seite des Blastoporus ist durch den Organisator gekennzeichnet, der als Signalzentrum die Keimblattbildung steuert und Zellbewegungen im Verlauf der Gastrulation reguliert (DeRobertis, 2009). Endodermale und mesodermale

Zellen wandern während der Internalisierung unterhalb des Ektoderms (Abb.1.7). Währenddessen werden ektodermale Zellen einer Epibolie, einer Wachstumsbewegung über den Dotter, ausgesetzt.

Durch die radiale Zellinterkalation bedeckt das Ektoderm letztlich vegetal den kompletten Embryo, verengt den Blastoporus, bis dieser am animalen Pol konvergiert und sich schließt (Keller *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2002; Keller, 2005).

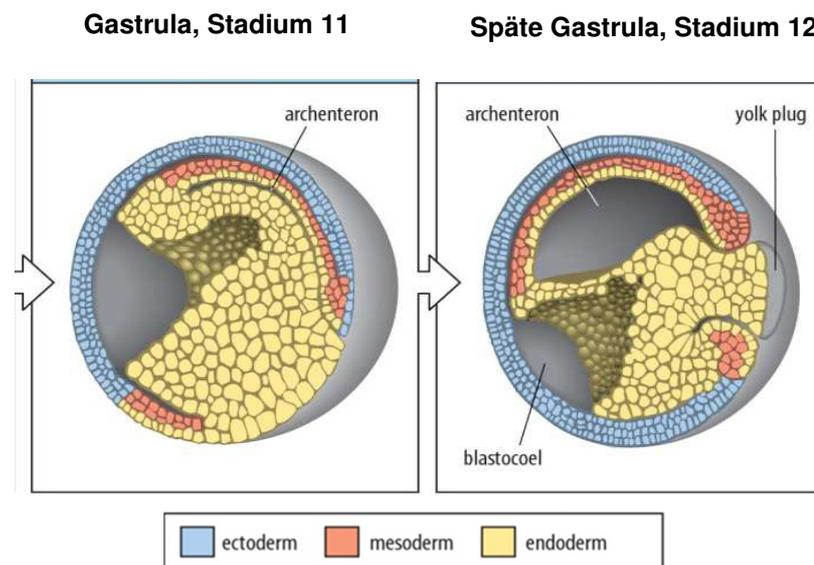


Abbildung 1.7: Zellschicksalskarte der Gastrula (NF Est. 11) und der späten Gastrula (NF Est.12) in *Xenopus laevis*. (links) Die endodermale Zellbewegung verläuft in anteriorer Ausrichtung entlang des Blastocoeldaches (rechts). Die Epibolie des Ektoderms breitet sich über den kompletten Embryo aus und führt zum Schließen des Blastoporus. Modifiziert nach Gilbert, 2006.

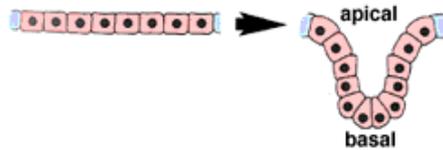
Epibolie Bewegungen verbreitern die entstehenden Keimblätter und dünnen sie aus. Konvergente Bewegungen verengen die Keimblätter von lateral zu medial, während Extensionsbewegungen diese von anterior zu posterior verlängern.

Die Ausprägung der drei Keimblätter ist ein wichtiger Schritt, da nun die Funktion einer gewebespezifischen Organisation im Embryo angelegt wird. Das Ektoderm als äußerstes Keimblatt entwickelt die Haut, das Gehirn und das Nervensystem. Das Mesoderm als mittleres Keimblatt bildet das Skelett, die Muskeln und das zirkulatorische System. Das Endoderm formiert im weiteren Verlauf der Embryogenese den Darm und weitere interne Organe. Diese musterbildenden Gastrulationsprozesse setzen eine deutlich flexible Veränderung der Zellmotilität, der formgebenden Funktionalität und der Zelladhäsion voraus.

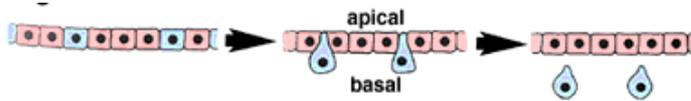
1.5 Morphogenesebewegungen

Im Verlauf der Gastrulation werden verschiedene Zellbewegungen vorgefunden (Hardin und Walston, 2004; Modifiziert nach worms.zoology.wisc.edu):

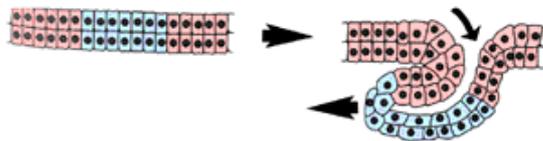
Invagination: Einstülpen einer Zellschicht



Ingression: Zellen aus der Epithelschicht differenzieren zu Mesenchymzellen



Involution: Einwandern des Epithels zur Ausprägung einer neuen Zellschicht



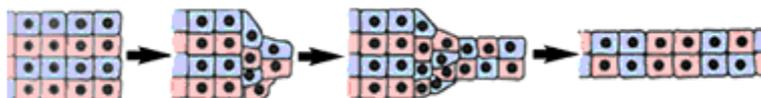
Epibolie: Ausdehnung der Zellen durch eine Verdünnung



Interkaltation: Einlagern zweier Zellschichten ineinander



Konvergente Extension: Zellen interkalieren und dehnen sich aus



Gewebeseparation: Apikale Konstriktion zur Formation von ‚bottle cells‘ in der Dorsal Marginal Zone. Mesodermale gefolgt von endodermalen Zellen involutieren in den Embryo und prägen frühe Anlagen des Archenterons (Urdarm). Die Involution wird durch eine vegetale Rotationsbewegung als treibende Kraft der endodermalen Masse gesteuert (Winklbauer und Schurfeld, 1999).

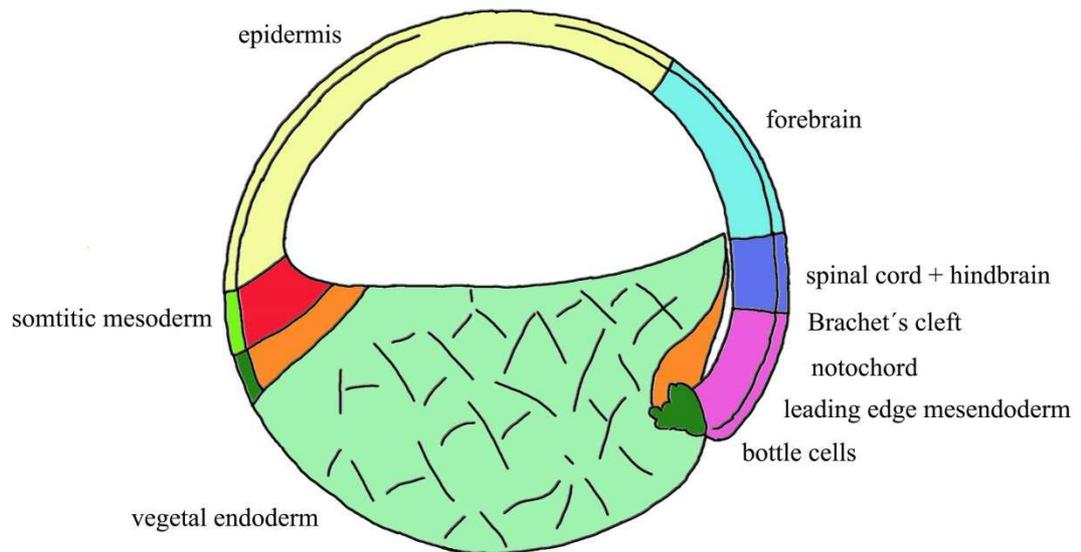


Abbildung 1.8: ‚Brachet’s Cleft‘ Formation in *Xenopus laevis* Embryonen. Der schematische Querschnitt des *Xenopus laevis* Est. (Stage) 10 zeigt die Brachet Cleft-Formation der Gewebeseparation. Während der Gastrulation involutieren mesodermale Zellen unterhalb des Blastocoel-Ektoderms durch die ‚Brachet cleft‘ (Modifiziert nach Gorny und Steinbeisser, 2012).

Ein wesentliches Kriterium in der frühen Gastrula ist die Ausprägung der dorsalen Blastoporen-Lippe. An dieser Stelle involutieren die ersten Zellen des anterioren Mesoderms, welche in der folgenden Entwicklung die Kopfstrukturen entstehen lassen. Den mesodermalen Zellen folgen chordamesodermale Zellen zur Ausprägung des Notochords und der Somiten (Abb.1.8).

Da in der vorliegenden Arbeit vor allem die Konvergente Extension eine essentielle Rolle einnimmt, wird diese im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.5.1 Konvergente Extension

Die Zellbewegung der konvergenten Extension spielt eine wesentliche Rolle im Verlauf der Chordaten-Embryonalentwicklung. Sie erweist sich als treibende Kraft in der Gastrulationsprozessierung (Kuhl *et al.* 2001) und führt zu einer schnellen Gewebeausprägung.

Im Verlauf der *Xenopus laevis* Gastrulation involutieren mesodermale Zellen, welche nach der Internalisierung des Gewebes eine konvergente Extension aufweisen, wodurch die anterior-posterior Achse gestreckt wird.

Die ursprünglich multipolaren, zufällig orientierten Zellen werden wie in Abb.1.9 dargestellt bipolar, aggregieren und richten sich mediolateral, senkrecht ihrer anterior-posterior Achse, aus.

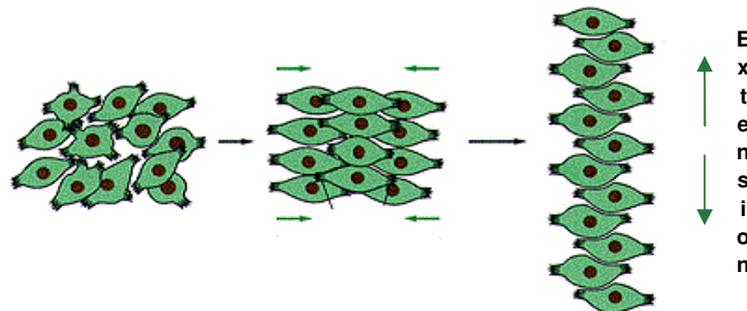


Abbildung 1.9: Konvergente Extension der involutierenden mesodermalen Zellen. Die ursprünglich multipolaren Zellen bekommen eine bipolare Gestalt. Es erfolgt die Konvergenz an der dorsalen Mittellinie und die anschließende Zellinterkalation, wodurch das Gewebe in anterior-posterior Ausrichtung elongiert. Modifiziert nach Keller *et al.*, 2000.

Die bipolare Ausrichtung dieser Zellen wird von verschiedenen Signalen der Nachbarzellen initiiert, wodurch eine Zell-Interkalation stattfindet und eine Gewebe-Elongation in anterior-posterior Ausrichtung erfolgt (Keller *et al.*, 2008).

Einzelne Zellen legen kurze Strecken zurück und erzielen einen starken Extensionseffekt des Gewebes (Keller *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 2000; Wallingfort und Harland, 2001; Keller *et al.*, 2002; Wallingfort *et al.*, 2002).

Diese morphogenetische Koordination ermöglicht die Basis der Ausprägung einer intakten Körperachse bei Nematoden, Ascidien, Amphibien, Vögeln und Säugern, wie in Abb.10 dargestellt (Schönwolf und Alvarez, 1989; Sausedo und Schönwolf, 1994; Keller *et al.*, 2000; Munro und Odell, 2002; Glickman *et al.*, 2003).

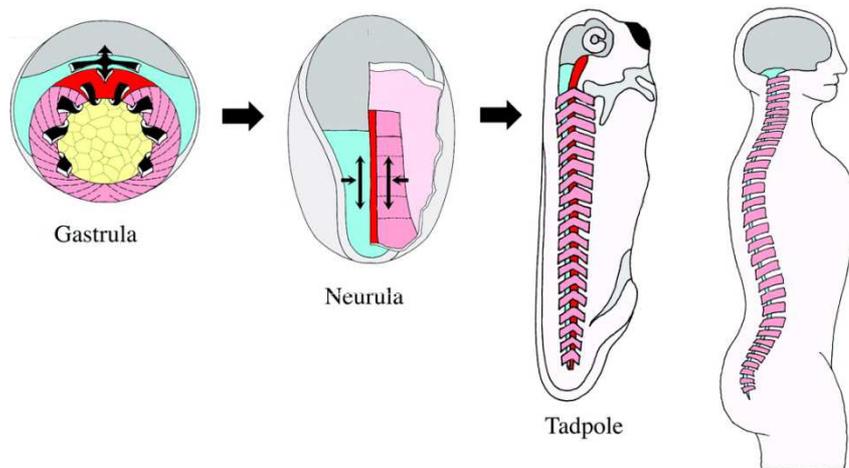


Abbildung 1.10: Morphogenetische Ausprägung der Chordaten-Körperachse. Im Verlauf der Gastrulation und Neurulation wird der Körperbauplan determiniert. Durch Zellbewegungen mediolateraler Strukturen wird die anterior-posterior Ausrichtung der Achse bestimmt, wodurch ein schematischer Vergleich zwischen Frosch und Menschen verdeutlicht werden kann. Modifiziert nach Keller, 2002.

Mediolaterale Strukturen werden eingeeengt und elongieren nach der Anterior-posterior Ausrichtung des Embryos, wodurch eine morphologische und funktionale Polarität, mit Kopf und Schwanz, in allen Chordaten definiert angelegt werden kann (Keller 2002).

1.5.2 Molekulare Faktoren der Gastrulation

Die Zellbewegungen der Gastrulation in Vertebraten werden durch eine Variabilität an Molekülen verschiedener Kategorien und Signaltransduktionkaskaden reguliert. Diese beinhalten die klassischen Signalwege wie Wnt, BMP/TGF β sowie Nodal und FGF, als auch Transkriptionsfaktoren, wie Brachyury, Zelladhäsionsmoleküle wie Catenin, Cadherine und Protocadherine. Weitere Komponenten sind Bestandteile der extrazellulären Matrix (Bsp. Fibronectin) oder Proteine mit Regulationsfunktion für den Aufbau des Cytoskeletts (Rho, JNK), Axon leitende Moleküle (Ephrin) sowie endozytotische Proteine (Dynamamin).

Die Vielzahl der beteiligten Komponenten verdeutlicht die Komplexität der Gastrulation und beansprucht die strikte Einhaltung einer korrekten Prozessierung.

1.5.2.1 Koordination der konvergenten Extension und Gewebeseparation

Die morphogenetischen Bewegungen der konvergenten Extension und Gewebeseparation werden durch eine ganze Reihe intrazellulärer Signaltransduktionswege reguliert.

Es konnte gezeigt werden, dass die konvergente Extension zum einen durch den BMP-Signalweg kontrolliert wird (Myers *et al.*, 2002), zum anderen, dass auch der kanonische Wnt- (Kühl *et al.*, 2001) sowie der nicht-kanonische Wnt-Signalweg an der Koordination beteiligt sind (Torres *et al.*, 1996; Wallington und Harland, 2002; Veeman *et al.*, 2003).

Im Verlauf der *Xenopus* Gastrulation spielen zudem bei der Regulation der konvergenten Extension und Gewebeseparation das Paraxiale Protocadherin (PAPC) und der Frizzled-7 (xFz7) Rezeptor eine wichtige Rolle (Kim *et al.*, 1998; Djiane *et al.* 2000, Medina *et al.*, 2000; Medina und Steinbeisser, 2000; Sumanas und Ekker, 2001; Unterseher *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2004).

Da vor allem die Wnt-Signalkaskade in frühe Morphogenese-Prozesse involviert ist und den Schlüsselmechanismus dieser Arbeit darstellt, wird diese im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.6 Wnt-Signaling

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist in Eukaryoten ein hoch konservierter Mechanismus. Er ist aufgrund der Regulation verschiedener Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung, -polarität und -migration essentiell für die Entwicklung. Eine Fehlregulation des Wnt-Signalweges wird mit einer Bandbreite pathologischer Prozesse in Verbindung gebracht (Logan und Nusse, 2004).

1.6.1 Wnt-Signaltransduktion und Morphogenese

Der Wnt-Signalweg stellt eine wichtige Transduktionskaskade bei der Regulation morphogenetischer Bewegungen im Verlauf der *Xenopus laevis* Gastrulation dar. Abhängig von den verfügbaren Rezeptoren und intrazellulären Mediatoren können verschiedene Zellantworten durch die Vielzahl der Wnt-Liganden variieren, wodurch unterschiedliche Zweige der Wnt-Signaltransduktion reguliert werden (Abb.1.11).

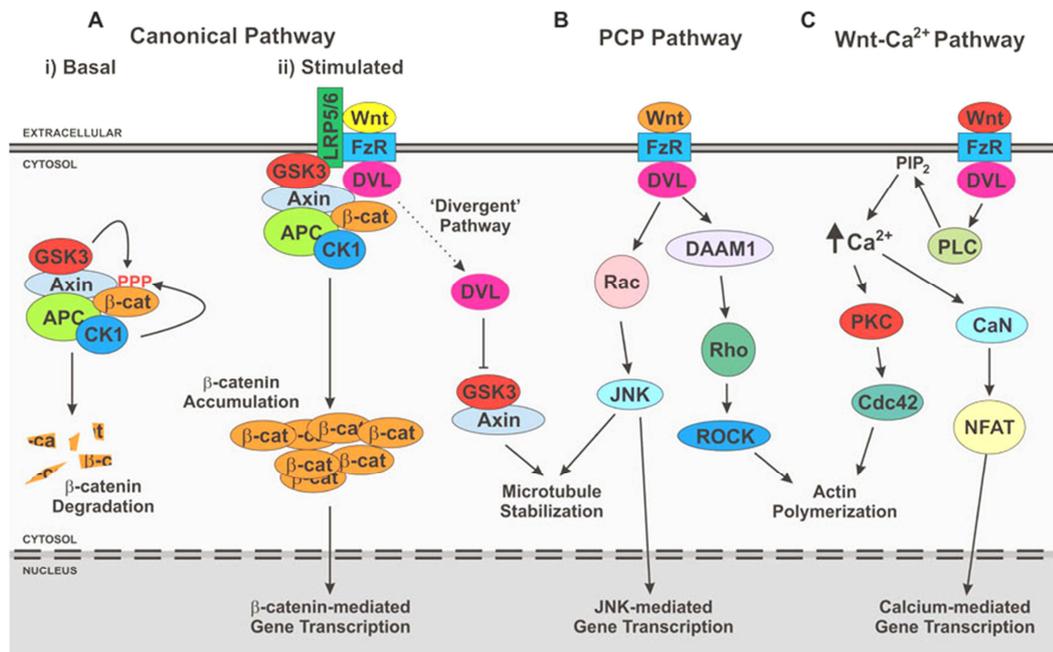


Abbildung 1.11: Wnt-Signaltransduktion in der *Xenopus* Embryogenese. (A) Der kanonische β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg zeigt in i) Basal eine β -Catenin Degradation aufgrund fehlender Wnt-Interaktion. Erfolgt ein Wnt-Stimulus ii) akkumuliert β -Catenin und veranlasst eine β -Catenin- vermittelte Zielgenexpression im Zellkern. (B) Der planare Zellpolarität-Signalweg und das (C) Calcium-abhängige Wnt-Signaling beschreiben die nicht-kanonische β -Catenin unabhängige Signaltransduktionregulation. APC, Adenomatous-polyposis-coli; CaN, Calcineurin; CK1, Casein Kinase 1; DAAM, Dishevelled-assoziiertes Aktivator der Morphogenese; DVL, Dishevelled (dsh); FzR, Frizzled Rezeptor; GSK3, Glycogen Synthase Kinase 3; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; LRP5/6, ‚low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6‘; NFAT, ‚nuclear factor of activated T cells‘; PKC, Protein Kinase C; PLC, Phospholipase C; ROCK, Rho-assoziierte Protein Kinase (Modifiziert nach Berwick und Harvey, 2013).

Bei der **kanonischen Wnt/ β -Catenin** Signalkaskade (Abb.1.11A) bindet ein Wnt-Ligand an den Transmembranrezeptor der Frizzled (Frz) -Familie (Logan und Nusse, 2007), welcher mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt ist. Als Korezeptoren für Wnt-Liganden wurden Mitglieder der ‚lipoprotein receptor-related protein (LRP)‘ Familie identifiziert.

Verschiedene sekretorische Faktoren wie cerberus und FrzB können binden, wodurch die Interaktion mit dem Frz-Rezeptor (FzR) verhindert wird.

Ein weiterer Wnt-Antagonist ist Dickkopf, der den Zugang zum LRP Ko-Rezeptor blockiert und dadurch die LRP Endozytose in Kooperation mit Kremen induziert. Durch die Interaktion von Wnt mit Frizzled wird das intrazelluläre dishevelled (DVL) aktiviert, wodurch die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3) inhibiert wird.

Einleitung

Die stimulierte Wnt-Kaskade führt aufgrund der inaktivierten GSK-3 zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytosol. Das stabilisierte β -catenin gelangt in den Nukleus, bindet die Transkriptionsfaktoren der ‚T-cell factor-lymphoid enhancer-binding factor‘ (Tcf/Lef) -Familie und ermöglicht eine Regulation der Zielgenexpression in der Expression (Miller, 2002; Huelsken und Behrens, 2002).

In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β -Catenin durch die Casein-Kinase I (CK1) am Ser45 phosphoryliert, wodurch es der GSK-3 ermöglicht wird, die Ser/Thr Reste 41, 37 und 33 ebenfalls zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung der Ser/Thr Reste löst eine Ubiquitylinierung von β -Catenin durch ‚ β -transducin repeats containing protein‘ (bTrCP) aus und führt zu einer Degradation in Proteasomen.

Die Phosphorylierung erfolgt durch einen Multienzymkomplex, der das ‚Scaffold Protein‘ Axin, das Tumorsuppressorgen ‚Adenomatous-polyposis-coli‘ (APC) und Diversin beinhaltet. Wenn Wnt anwesend ist, blockiert Dvl die β -Catenin Degradation durch Anschalten des GBP/Frat-1 Komplexes, wodurch GSK3 β vom Axin getrennt wird. Moduliert wird die Dvl-Aktivität durch die PAR1 Kinase, welches die Wnt Aktivität im β -Catenin Signalweg steigert und gleichzeitig den JNK Signalweg blockiert. Weitere Dvl interagierende Moleküle sind frado und β -arrestin.

Die Wnt-Liganden, die diesen Signalweg aktivieren, gehören der Wnt-1 Klasse an.

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist an vielen Prozessen im Verlauf der frühen Embryogenese beteiligt. Zu ihnen zählen die Ausprägung der anterior-posterior Körperachse, die Anlage des Nervensystems und die Induktion der Neuralleiste.

Eine der wichtigsten Funktionen dieses Signalweges ist die frühe Anlage der Achsen-Symmetrie des Embryos und die Ausprägung des Nieuwkoop-Zentrums durch eine dorsal angelagerte β -Catenin-Akkumulation nach der Kortikalrotation (Huelsenken und Birchmeier, 2001; Darken und Wilson, 2001; Geng *et al.*, 2003).

Eine Überaktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges ventral des Embryos führt zu einer Ausprägung von zwei Körperachsen.

Neben dem kanonischen Wnt-Signalweg existieren verschiedene **β -Catenin unabhängige nicht-kanonische Wnt-Signalwege**, welche in morphogenetischen Prozessen von Vertebraten eine essentielle Rolle spielen (Kühl *et al.*, 2000; Kühl, 2002; Tada *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Kestler und Kühl, 2008). Im Allgemeinen wird dieser nicht-kanonische Signalweg durch Wnt-Liganden der Klasse Wnt-5A aktiviert.

Einer dieser β -Catenin unabhängigen Signalwege stellt der **Planare Zell-Polaritäts (PCP)-Signalweg**, wie in Abb.1.11B aufgeführt, dar. Dieser wurde zum ersten Mal in *Drosophila* beschrieben.

In *Drosophila* reguliert der PCP-Signalweg die Organisation der Ommatidia im Fliegenauge oder die Polarität der Epithelzellen der *Drosophila* Flügelhaare (Klein und Mlodzik, 2005; Jenny und Mlodzik, 2006).

Der PCP-Signalweg ist auch durch die Aktivierung von Dishevelled durch den Frizzled Rezeptor reguliert, benötigt jedoch eine unterschiedliche Zusammensetzung der intrazellulären Signalempfänger wie Strabismus (stbm) und Prickle (pk).

Dishevelled ist unterhalb von Frizzled an der Zellmembran lokalisiert, wo die GTPasen RhoA und Rac1 sowie die c-jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert werden. Dies führt zu einer zytoskeletalen Neugestaltung der Zelle. Dishevelled funktioniert als molekularer Schalter zwischen der kanonischen Wnt und der Wnt/PCP-Signaltransduktion, wobei die unterschiedlichen Proteindomänen abhängig der verschiedenen Signalwege aktiv involviert sind.

Die DIX-Domäne hat Ähnlichkeiten mit Axin, welches aktiv in der Wnt/ β -catenin Signaltransduktion vorliegt. Die DEP-Domäne reguliert die Aktivität der GTPase unter Beteiligung der PCP-Signaltransduktion. Der PCP-Signalweg ist vor allem durch die Verstärkung von Dvl an der Zellmembran charakterisiert (Axelrod *et al.*, 1998). Während in *Drosophila* kein Wnt für das aktive PCP-Signaling beschrieben

Einleitung

wurde, konnte in Vertebraten gezeigt werden, dass Wnt5 und Wnt11 an der Aktivierung beteiligt sind (Kühl, 2002; Veeman *et al.*, 2003).

Der PCP-Signalweg ist unerlässlich für morphogenetische Bewegungen wie die konvergente Extension und reguliert die mediolaterale Zellpolarität im Verlauf der Prozessierung (Wallingford *et al.*, 2000).

Eine Beeinträchtigung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges würde in einem Verlust der konvergenten Extensionsbewegungen resultieren. Auch die Aktivierung von RhoA scheint einen wesentlichen Bestandteil der Gewebeseparation darzustellen (Medina *et al.*, 2004).

Der dritte Wnt-Signalweg in Vertebraten wird als der **Wnt/Ca²⁺-Signalweg** bezeichnet und wird in Abb.1.11C dargestellt.

Durch Aktivierung von Wnt5a ermöglicht ein G-Protein gekoppelter Mechanismus die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen des ER, wodurch Calcium-sensitive Proteine wie PKC und ‚Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II‘ (CamKII) aktiviert werden (Kühl *et al.*, 2000; Sheldahl *et al.*, 2003). Die Aktivierung dieses Signalwegs blockiert die konvergente Extension und antagonisiert die kanonische Wnt-Signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen (Kühl *et al.*, 2000). Der PKC ist es möglich, die dishevelled Funktion zu inhibieren, wogegen CamK II auf der Ebene der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren agiert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PKC durch xFz7 aktiviert wird, wodurch die Prozesse der Gewebeseparation in der *Xenopus* Gastrulation in einen Kontext gebracht werden können (Winklbauer *et al.*, 2001).

Die Regulation der Morphogenese erfordert präzises Feinabstimmen der Signale und interagierend-vernetzte Kommunikation der Wnt-Signalkaskade.

Die kanonische β -Catenin abhängige Wnt-Signalkaskade wird für die Ausprägung anterior-posterior Ausrichtung der Körperachse benötigt. Der PCP-Signalweg ist an der mediolateralen Zellpolarität sowie an der Ausbildung der Gewebe durch separierende konvergente Extension beteiligt. Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg inhibiert

den kanonischen Wnt-Signalweg und antagonisiert die ventrale Seite. Nur ein sensibles ausgewogenes Gleichgewicht aller drei Signalwege ermöglicht morphogenetische Bewegungen in der frühen Embryonalentwicklung.

1.6.2 Wnt5a/ Ror2 induzieren Paraxiales Protocadherine (PAPC)

Das Paraxiale Protocadherin (PAPC) ist ein Zielgen des non-kanonischen Signalwegs Wnt5a/Ror2 und ist an der Ausprägung der planaren Zellpolarität im Embryo beteiligt (Shambony und Wedlich, 2007). Die Expression wird ausschließlich durch die Interaktion von dem N-glykosylierten Liganden Wnt5a mit dem Ror2 Rezeptor induziert. Im Embryonalstadium 10,25 (Nieuwkoop und Faber, 1967) ist die *PAPC* Expression an der dorsalen Urmundlippe (Dorsal Marginal Zone- DMZ) und am entstehenden Mesoderm lokalisiert und ist aufgrund der konvergenten Extension und Interkalation an der Invagination des Urdarms beteiligt (Unterseher *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Köster *et al.* 2010, Kietzman *et al.*, 2012).

2. Ergebnisse

PMM2-CDG im Menschen führt zu einer schweren multisystemischen Erkrankung, die vor allem durch einen Strabismus und faziale Dismorphien, invertierte Mamillen, psychomotorische und neurologische Retardierungen aufgrund einer zerebellaren Hypoplasie sowie durch Kardiomyopathie in der frühen Kindheit und Skoliose im höheren Alter geprägt sein kann. Trotz intensiver Untersuchungen in der Zellkultur sowie anhand von Mausmodellen ist die Pathophysiologie bis heute nur wenig verstanden. Die frühe Letalität des Pmm2-Knockout-Mausmodells belegt zum einen die essentielle Rolle der Glykosylierung für die Embryonalentwicklung. Zum anderen zeigt sie, dass es notwendig ist, in einem anderen Tiermodell als in der Maus zu arbeiten, um frühe Schritte der Embryogenese zu untersuchen.

Das in dieser Arbeit etablierte Pmm2 Knockdown *Xenopus laevis*-Modell ermöglicht aufgrund maternaler Komponenten die Analyse einer frühen Pmm2-reduzierten Embryogenese. Durch standardisierte molekularbiologische Untersuchungsmethoden sollte überprüft werden, ob ein Pmm2-Aktivitätsverlust durch Pmm2-Morpholinos (Pmm2 Mo) im Froschmodell eine Hypoglykosylierung induziert und nachfolgend N-glykosylierungsabhängige Signalwege in der Embryonalentwicklung beeinträchtigt.

2.1 Charakterisierung der Phosphomannomutase2 in *Xenopus laevis*

Die cDNA der Phosphomannomutase2 im Menschen (Gene ID: 5373) kodiert das PMM2-Protein mit 246 Aminosäuren, welches einer Größe von 28kDa entspricht. Die PMM2-Expression konnte in jedem Gewebe nachgewiesen werden, zeigte jedoch vor allem im Gehirn und Herzen ein deutlich geringeres Expressionslevel. In diesen Geweben wurde anstelle der PMM2 das Phosphomannomutase1-Schwesterprotein detektiert. Die PMM1 im Menschen (Gene ID: 5372) wird durch eine Größe von 262 Aminosäuren und einer Größe von 32kDa charakterisiert. Das PMM1-Protein katalysiert dieselbe Reaktion wie PMM2, wird jedoch nur im Gehirn, Herz, Leber und Pankreas nachgewiesen (Schollen *et al.*, 1997; Matthijs *et al.*, 1997 ; Pirard *et al.*, 1999).

Ergebnisse

Die Phosphomannomutase ist ein in der Evolution stark konserviertes Enzym, welches auch in *Xenopus laevis* durch zwei Schwestergene *Phosphomannomutase1* (*Pmm1*; NM_001094315.1) und *Phosphomannomutase2* (*Pmm2*; NM_001092472.1) kodiert werden kann.

Aufgrund der hohen Sequenz-Homologie und dem klar definierten Expressionsmuster der *Pmm2* im Vergleich zur *Pmm1* in den verschiedenen Geweben ist es von großer Bedeutung, die funktionale Vielfalt der Phosphomannomutase Gene in *Xenopus laevis* differenziert darzustellen. Das ‚National Center for Biotechnical Information‘ (www.ncbi.com) definiert in seiner Datenbank die Phosphomannomutase1 und Phosphomannomutase2 wie folgt:

1. [NM_001092472.1](#) → [NP_001085941.1](#) *Xenopus laevis* Phosphomannomutase 2 (X472) ID: 444370
2. [NM_001094315.1](#) → [NP_001087784.1](#) *Xenopus laevis* Phosphomannomutase 1 (X315) ID: 447608

Abbildung 2.1: Identifikation der Pmm2 in *Xenopus laevis*. Definition der Phosphomannomutase in *Xenopus laevis* des ‚National Center for Biotechnical Information‘.

Da die *Pmm1* und *Pmm2* in *Xenopus laevis* bisher nicht in ihrer Funktionalität untersucht wurden, erfolgte eine Charakterisierung dieser Enzyme, um die *Pmm1* und *Pmm2* in *Xenopus laevis* zu identifizieren.

Vergleicht man die Proteinsequenzen der PMM2 und PMM1 des Menschen mit der *Pmm2* und *Pmm1* der Maus und der des Frosches in Bezug auf die prozentuale Korrelation der Identität so wird deutlich, dass *Pmm1* und *Pmm2* im Frosch zu 68% identisch sind. Das humane PMM2 entspricht zu 65% dem humanen PMM1 Protein. Das murine *Pmm2* stimmt zu 66% dem murinen *Pmm2* überein (analysiert durch MegAline, DNASar, Lasergene Software; Abb.2.2).

		Identität [%]					
		hPMM2	hPMM1	mPmm2	mPmm1	xPmm1- NM_00194315	xPmm2- NM_001092472
Divergenz [%]	hPMM2		65,4	90,5	65,4	75,2	66,3
	hPMM1	41,8		66,1	95	65,4	75,4
	mPmm2	9,2	39,9		66,1	74,4	66,1
	mPmm1	41,8	5,1	40,6		65,9	77,3
	xPmm1- NM_00194315	28,5	42,5	30,1	42,5		68,3
	xPmm2- NM_001092472	38,8	28,2	41,3	26	38,6	

Abbildung 2.2: Vergleichende Hydrophilizität der Pmm2. Phosphomannomutase Divergenz-/ Identitätsanalyse in Mensch (h), Maus (m) und Frosch (x).

Der Vergleich der humanen PMM2 mit der Pmm2 der Maus ergibt eine 91%-ige Homologie, die Analyse der PMM1 des Menschen mit der murinen Pmm1 sogar eine 95%-ige Identität. Bei dem *Xenopus* Pmm2 wird jedoch nur eine 66%-ige Sequenzhomologie im Vergleich zur humanen PMM2 und murinen Pmm2 errechnet, wobei eine 75%-ige Identität dem Pmm1 des Frosches analog zum Verhältnis der humanen PMM2 oder Maus Pmm2 bestimmt werden kann. Dagegen entspricht die postulierte Pmm2 in *Xenopus* zu 77% der murinen Pmm1 sowie zu 75% der humanen PMM1.

Diese prozentuale Sequenzanalyse von Divergenz und Identität zeigte einen ersten Hinweis auf einen Datenbankfehler, was im Folgenden näher erläutert wird.

2.1.1 Kyte-Doolittle-Analyse der Phosphomannomutase2

Zur weiteren Analyse wurden Hydrophilizitätsprofile der Pmm2-Proteine von Mensch, Maus und Frosch sowie Pmm1 im Frosch erstellt.

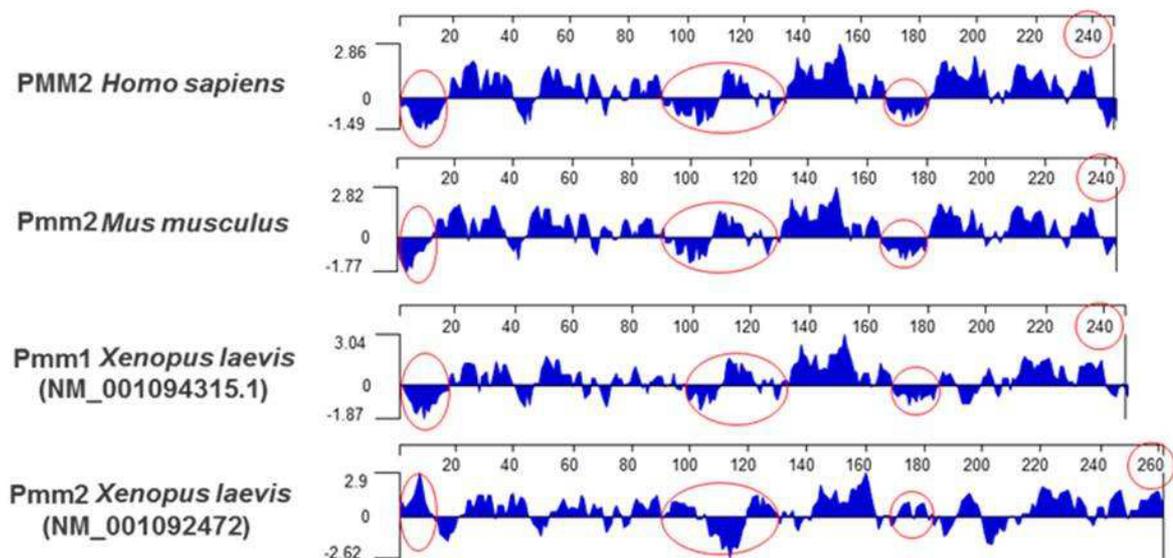


Abbildung 2.3: Kyte-Doolittle Analyse der Pmm2. Hydrophilizitätsanalyse der Pmm2 in Mensch und Maus, sowie Pmm1 und Pmm2 im Frosch (Protean, DNASStar, Lasergene Software). Die roten Kreise weisen auf Unterschiede in der Hydrophilizität hin.

Ergebnisse

Die in Abb.2.3 dargestellte Hydrophilizität zeigt, dass die *Xenopus* Phosphomannomutase1 (NM_001094315.1 = X315) zu Beginn des Profils, zwischen den Aminosäuren 90-130 und im Bereich der Aminosäure 180 des Sequenzvergleichs mehr den biochemischen Eigenschaften der Pmm2 aus Mensch und Maus entspricht. Auch die Größe des X315-Proteins entspricht mit einer Länge von 246 Aminosäuren eher der PMM2 aus Mensch und Maus.

Die *Xenopus laevis* Pmm2 (NM_001092472.1 = X472) weicht in der Hydrophilizitätsanalyse deutlich von der humanen und murinen Pmm2 ab, die in der Abb.2.3 durch rote Markierungen hervorgehoben werden. Mit einer Größe von 260 Aminosäuren ist die Sequenz von X472 auch eher der Sequenz von Pmm1 in Mensch und Maus zuzuordnen.

2.1.2 Heterologe Phosphomannomutase-Expression in COS-7

Zur weiteren Analyse der biochemischen Eigenschaften wurden die kodierenden Regionen beider *Xenopus*-Phosphomannomutasen in den Expressionsvektor pCI-neo mit CMV-Promotor kloniert. Die Phosphomannomutase-Konstrukte und der Leervektor wurden stabil in eine COS-7 Zelllinie transfiziert und heterolog exprimiert.

2.1.2.1 Phosphomannomutase-Aktivität von XPmm1 und XPmm2 in COS-7

Die biochemische Charakterisierung der *Xenopus laevis* Pmm1 (NM_001094315.1 = X315) und Pmm2 (NM_001092472.1 = X472) erfolgte durch Flux-Aktivitätsmessungen der heterolog exprimierenden COS-7 Zellen. In Abb.2.4 wird die Messung der Pmm2-Aktivität durch den radioaktiven 2[³H]Mannose-6-Phosphat Assay, der zu analysierenden Enzyme für *Xenopus* Pmm1 und *Xenopus* Pmm2 dargestellt.

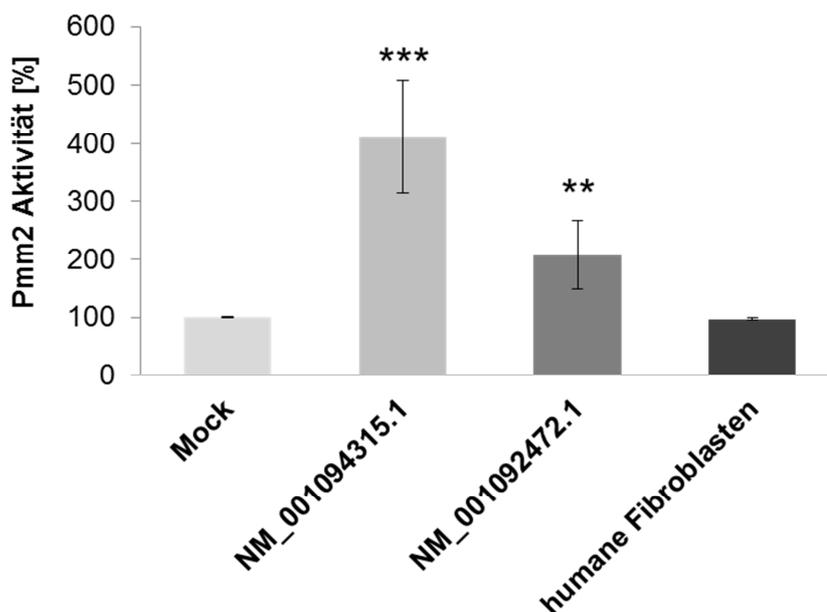


Abbildung 2.4: Phosphomannomutase2 Aktivitätsmessungen durch $2[{}^3\text{H}]$ Mannose-6-Phosphat Assay. Vergleichende Pmm2-Enzymaktivität der heterologen COS-7-Expressionskonstrukte und humanen Fibroblasten (n=3; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$).

Untersucht wurde die Pmm2-Enzymaktivität zytosolischer Extrakte von COS-7 pCI-neo Mock Zellen sowie von XPmm1 und XPmm2 überexprimierenden COS-7 Zellen und humane Fibroblasten als weitere Normalkontrolle.

Die Pmm2-Aktivität der Mockvektor-transfizierten COS-7 Zellen wurde auf 100% $\pm 1,4\%$ normalisiert. Vergleichend weist die Normalkontrolle der humanen Fibroblasten nach Analyse eine entsprechend ähnliche Pmm2-Aktivität (96,9% $\pm 1,2\%$) wie die der COS-7 Zellen auf.

Die Pmm2-Aktivität des pCI-neo NM_001094315.1 (X315) Expressions-Konstruktes ist im Vergleich zu der des Leervektors um das Vierfache erhöht (411,6% $\pm 97,7\%$), wogegen die Expression in COS-7 NM_001092472.1-Zellen (X472) lediglich eine verdoppelte Aktivität (207,5% $\pm 59,2\%$) zeigt.

2.1.2.2 Phosphomannomutase-Immunodetektion definiert Pmm2 in *Xenopus*

Um die Expressionslevel der Phosphomannomutasen in *Xenopus* abschließend zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen der stabil transfizierten COS-7 Zelllysate (COS7-X315/-X472) durchgeführt.

Die Immunodetektion des Pmm2- und des β -Aktin-Antikörpers werden in Abb.2.5 dargestellt.

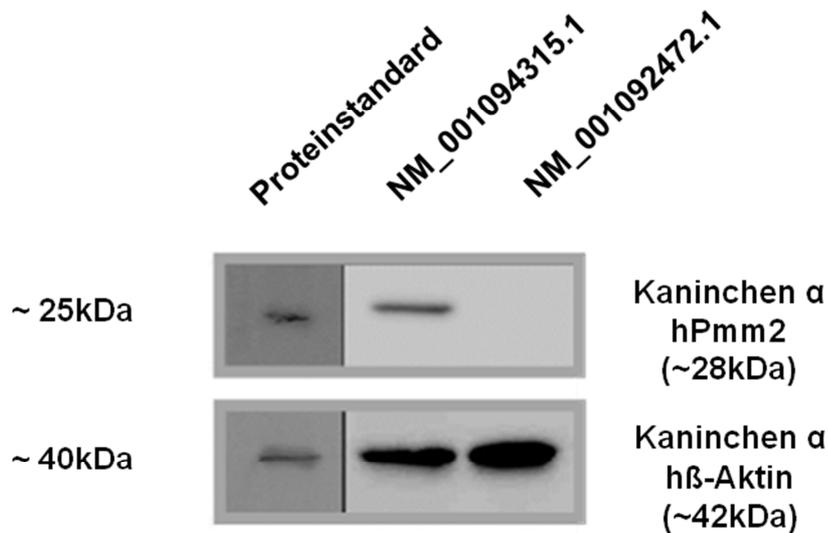


Abbildung 2.5: Western Blot Analysen der Pmm2 in COS7-Zellen. Die COS-7-Zellen mit exprimierenden Leserahmen des NM_001094315.1 und NM_00109472.1 wurden im Western Blot durch Kreuzreaktionen mit einem Antikörper gegen das humane Pmm2 (oben) und durch eine Immunreaktion mit humanen β -Aktin-Antikörper (unten) detektiert.

Der gegen Maus und Mensch gerichtete Pmm2 Antikörper (Proteintech) detektierte das überexprimierte *Xenopus*-Protein der Sequenz NM_001094315.1 bei 28kDa, zeigte jedoch, trotz doppelter Proteinmenge, keine Reaktion des Proteins mit der Sequenz des NM_001092472.1 und ebenfalls keine Affinität gegen die endogene COS-7-Pmm2.

Parallel detektierte ein gegen β -Aktin gerichteter Antikörper das β -Aktin der COS7-X315/-X472 pCI-neo Zellysate durch eine deutliche Immunreaktion bei einer Größe von etwa 40kDa, wodurch der Nachweis einer intakten Proteinexpression erfolgte.

Der Pmm2-Antikörper detektiert ausschließlich die überexprimierte Phosphomannomutase des pCI-neo NM_001094315.1-Konstruktes bei 28kDa, wodurch die Vermutung des Vertauschens der Phosphomannomutase1 (Pmm1) und der Phosphomannomutase2 (Pmm2) Sequenzen von *Xenopus laevis* in der Datenbank untermauert wird. Zudem bestätigen die theoretischen Daten eine 75%-ige Sequenzhomologie mit knapp 10% mehr Sequenzidentität des *Xenopus* Pmm1-Proteins im Vergleich zur humanen PMM2.

Um einer Verwechslung der Phosphomannomutase-Nomenklatur in *Xenopus laevis* (X) entgegenzuwirken, wurde in den folgenden Experimenten nun NM_001092472.1 (X472) als Phosphomannomutase1 (XPmm1) dem humanen Ortholog PMM1 zugeordnet und NM_001094315.1 (X315) als die Phosphomannomutase2 (XPmm2) dem humanen Ortholog PMM2 definiert.

2.2 Phosphomannomutase2 (Pmm2) in der *Xenopus* Embryogenese

2.2.1 Pmm2 Expression im Verlauf der *Xenopus laevis* Entwicklung

Zum Nachweis, dass die Pmm2 bereits in der frühesten Embryonalentwicklung benötigt wird, wurden Expressionsstudien mit einer reversen Transkriptase (RT)-PCR durchgeführt. Die Expression des *Phosphomannomutase2*-Gens wird vergleichend mit dem *Xenopus* Referenzgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC) in Abb.2.6 dargestellt.

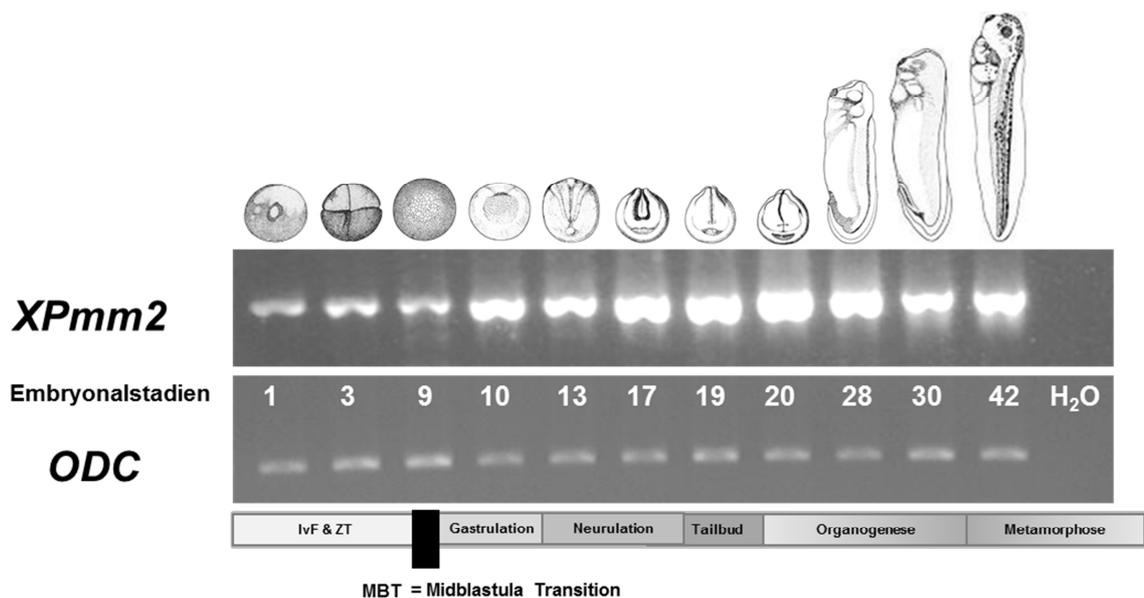


Abbildung 2.6: Expression der Pmm2 im Verlauf der Embryonalentwicklung. Reverse Transkriptase PCR der *Phosphomannomutase2* (XPmm2) und *Ornithin-Decarboxylase* (ODC) zur Analyse des Gen-Expressionsmusters im Verlauf der frühen *Xenopus laevis* Embryogenese; IvF=*In vitro* Fertilisation; ZT=Zellteilungen; schwarzer Balken markiert MBT (Midblastula Transition).

In der Auswertung wurden die RT-PCR Produkte der *ODC*- und der *Pmm2*-Expression verschiedener *Xenopus laevis* Embryonalstadien (Est.) im Gel detektiert. Die Klassifizierung erfolgte nach Nieuwkoop & Faber (NF; 1967).

Ergebnisse

Im Verlauf der *Xenopus* Embryogenese konnte die *Pmm2*-Expression in allen untersuchten Embryonalstadien (1-46) nachgewiesen werden. Diese weist ein deutlich erhöhtes Expressionslevel in Bezug zum standardisierten Referenzgen *ODC* auf, deren Expression im Verlauf der *Xenopus* Embryonalentwicklung konstant bleibt. Pro Stadium wurde 1 µg RNA aus 10 Embryonen analysiert.

Die Quantifizierung des RT-PCR Signals erfolgte mittels ImageJ (Freeware) und wird in Abb. 2.7 dargestellt.

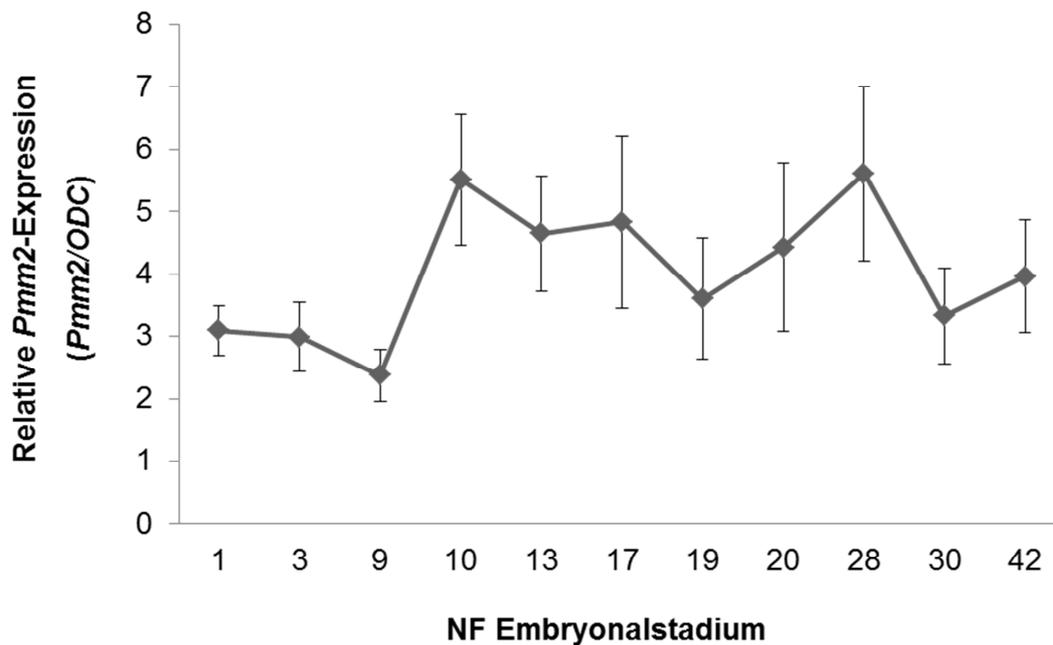


Abbildung 2.7: Quantifizierung der *Pmm2*-Expression im Verlauf der Embryogenese. Das Reverse Transkriptase-Expressionslevel von *Pmm2* im Verhältnis zu *ODC* veranschaulicht eine ubiquitäre Expression in allen untersuchten *Xenopus laevis* Entwicklungsstadien.

Bereits nach der *In vitro*-Fertilisation weist die befruchtete Eizelle in Embryonalstadium 1 (Est.1) *Pmm2*-Transkripte auf, dessen Expression in den frühen Zellteilungen bis inklusive der Blastulation Est.9 konstant maternal reguliert wird.

Eine kurzfristige Reduktion des *Pmm2*-Expressionslevels in Est.9 kann mit der Bewältigung der 'MidBlastulaTransition' (MBT) des Embryo in Verbindung gebracht werden. Nachdem der Embryo jedoch die MBT überwunden hat, erfolgt eine Neuorganisation des Embryonen-Bauplans durch zygotische Regulation, wodurch die stark ansteigende Expression durch ein verstärktes Reverse Transkriptase-PCR Signal zwischen Est.9 und Est.10 erklärt werden kann. Auch während der

Gastrulation (NF Est.10-12,5), der Neurulation (NF Est. 13-17) sowie in der ‚tail bud‘ Phase (NF Est. 18-20) und der Organogenese (NF Est. 20-35) bleibt die *Pmm2*-Expression bis hin zur Metamorphose deutlich höher exprimiert.

Diese Expressionsstudien verdeutlichen, dass *Pmm2* eine essentielle Rolle in der *Xenopus laevis* Embryogenese ausübt.

2.2.2 *Pmm2* Expressionsprofil im frühen Gastrulastadium 10,5

Zur Analyse des Expressionsprofils von *Pmm2* wurde eine spezifische Digoxigenin-Sonde synthetisiert und durch *In situ* Hybridisierung mit anschließender alkalischer Phosphatase-Reaktion visualisiert.

Das *Pmm2*-Expressionsmuster wurde im frühen Gastrulastadium 10,5 detektiert und in Abb.2.8A dargestellt. Der purpurne Farbton weist die Stellen der *Pmm2*-RNA-Hybridisierung auf.

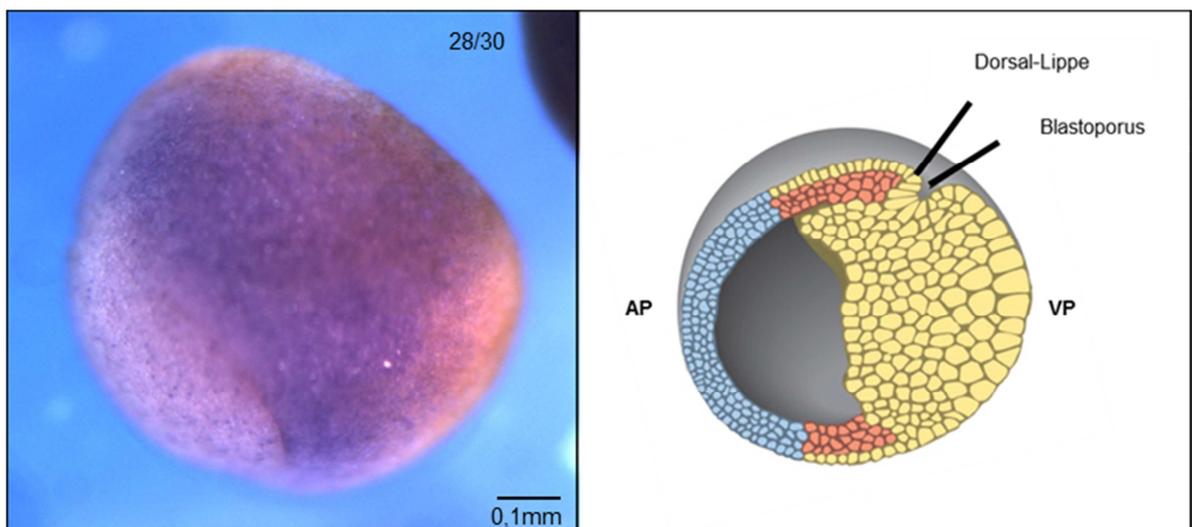


Abbildung 2.8: *Pmm2* *In situ* Hybridisierung in *Xenopus laevis* Est. 10,5. links) Das lokale Expressionsprofil der *Pmm2* konnte durch eine Digoxigenin-Antisense-Hybridisierung und einer folgenden Alkalischen Phosphatase-Reaktion veranschaulicht werden; rechts) Schematischer Querschnitt des frühen *Xenopus laevis* Gastrulastadiums Est. 10,5 (Modifiziert nach Gilbert, 2006).

In den Embryonen ist eine ubiquitäre *Pmm2*-Regulation im Embryo ersichtlich, welche sich als dorsal stärker exprimiert darstellt. Der schematische Querschnitt in Abb.2.8B verdeutlicht, dass am animalen Pol nur eine schwache Expression detektiert werden kann, da in diesem Bereich in Est. 10,5 bis auf in der Animalen Kappe kein exprimierendes Gewebe, sondern das Blastocoel, ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, lokalisiert ist.

2.3 Pmm2 Knockdown in *Xenopus* durch Antisense-Morpholinos

Eine Induktion des Aktivitätsverlusts der Phosphomannomutase2 in *Xenopus laevis* wurde durch die Injektion spezifischer Antisense-Morpholinos (Mo) in das Zwei- bis Vier-Zellstadium des Embryos (E) generiert.

Der direkt nach den ersten Zellteilungen injizierte Pmm2-Morpholino (Pmm2 Mo) bewirkt einen ATG-Translationsblock, wodurch die Phosphomannomutase-Expression der frühen Embryogenese deutlich vermindert werden kann.

2.3.1 Nachweis der reduzierten Pmm2-Aktivität mittels $2[^3\text{H}]$ Mannose-6P-Assay

Für den Knockdown wurden ATG-Morpholinos gegen Pmm2 (NM_001094315.1; 25ng/E), ATG-Morpholinos gegen Pmm1 (NM_001092472.1; 25ng/E) und eine Morpholino-Kombination aus Pmm1 (12,5ng/E) und Pmm2 (12,5ng/E) viermal animal injiziert.

Die Bestimmung der Pmm2-Aktivität erfolgte durch die Analyse zytosolischer Lysate aufgeschlossener Embryonen des Est.10,5 mittels des $2[^3\text{H}]$ Mannose-6P-Assays, bei dem der Umsatz von $2[^3\text{H}]$ Mannose-6-Phosphat zu $2[^3\text{H}]$ Mannose-1,6-Bisphosphat in einer 30min Reaktion (37°C) gemessen wird. In Abb.2.9 werden die ermittelten Pmm2-Aktivitäten von Wildtyp-Embryonen im Vergleich zu Pmm2-Morpholino (Pmm2 Mo) behandelten Embryonen dargestellt.

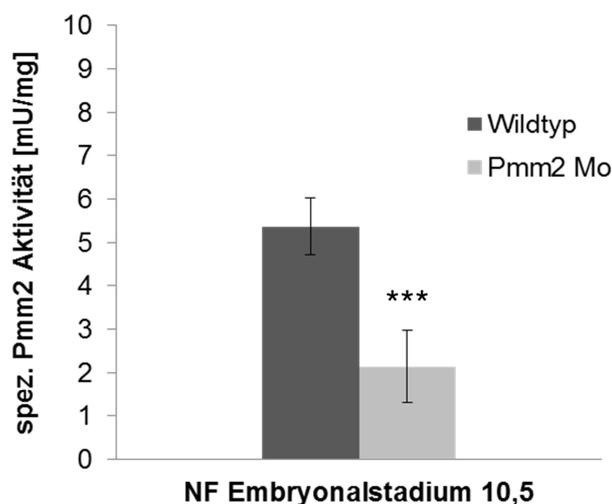


Abbildung 2.9: Pmm2-Aktivität von Wildtyp und Pmm2 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5. Im Vergleich zu der Wildtyp Pmm2-Aktivität konnte die Aktivität der Pmm2 Mo-injizierten Embryonen auf 40% Pmm2 Aktivität reduziert werden ($n=6$ *** $p \leq 0,0005$).

Die spezifische Pmm2-Aktivität in den Wildtyp-Embryonen beträgt in dem frühen Gastrulastadium 10,5 5,37mU/mg (+/-0,65mU/mg). Durch die Injektion der Pmm2-ATG-Morpholinos kann die Aktivität auf 2,15mU/mg (+/-0,85mU/mg) signifikant gesenkt werden.

Der induzierte Pmm2 Mo-Effekt (basierend auf NM_001094315.1) führt zu einer Reduktion der Pmm2-Aktivität um 60,0% (+/-15,6%).

Da zu Beginn dieser Arbeit die Pmm2 in *Xenopus laevis* nicht eindeutig definiert war, wurden vergleichende Experimente mit einem ATG-Morpholino gegen Pmm1 und eine Kombination beider Morpholinos gegen Pmm1 und Pmm2 durchgeführt.

Die Inhibition der Aktivität durch eine Pmm1 Mo Injektion (basierend auf NM_001092472.1) wird in Abb.2.10 dargestellt.

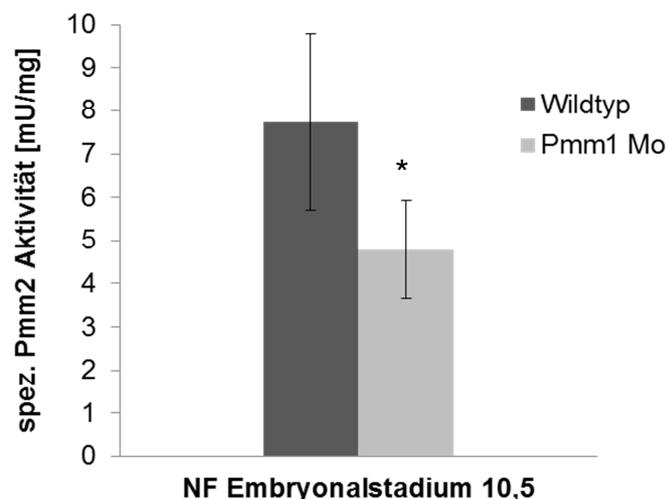


Abbildung 2.10: Pmm2 Aktivität von Wildtyp und Pmm1 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5. Im Vergleich zu der Wildtyp Pmm2-Aktivität konnte die Aktivität der Pmm1 Mo-injizierten Embryonen auf 61,8% Pmm2 Aktivität reduziert werden (n=4 *p≤0,02).

Ausgehend von einer Pmm2 Wildtyp-Aktivität von 7,75mU/mg (+/-2,05mU/mg) erzielte der Pmm1 Mo einen sehr geringen Repressionseffekt. Die Pmm2-Aktivität der Pmm1-ATG-Morpholino behandelten Embryonen entspricht 4,79mU/mg (+/-1,14mU/mg).

Ergebnisse

Die Pmm2-Aktivität konnte durch eine induzierte Pmm1-Inhibition um maximal 38,2% auf 61,8% ($\pm 14,7\%$) Restaktivität reduziert werden.

Eine Kombination der Pmm1/Pmm2 Morpholino Injektion von jeweils 12,5ng/E in das Zwei-Vierzellstadium bewirkte bei der Analyse des Est.10,5 eine bessere Reduktion der Pmm2-Aktivität, da der Pmm2 Mo einen partiellen Einfluss ausübt (Abb.2.11).

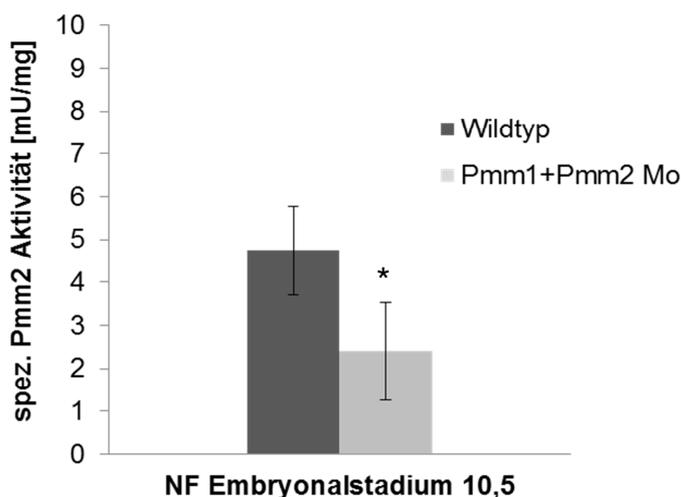


Abbildung 2.11: Pmm2-Aktivität von Wildtyp und Pmm1+Pmm2 Morpholino injizierten Embryonen Est.10,5. Im Vergleich zu der Wildtyp Pmm2-Aktivität konnte die Aktivität der Pmm1/Pmm2 Mo-injizierten Embryonen auf 51% Pmm2 Aktivität reduziert werden ($n=4$ * $p \leq 0,05$).

Durch die Injektion beider Morpholinos konnte die Pmm2-Aktivität von 4,74mU/mg ($\pm 1,04$ mU/mg) in Wildtyp-Embryonen auf 2,4mU/mg ($\pm 1,13$ mU/mg) in Pmm1/Pmm2 Mo Embryonen um 50,6% ($\pm 23,8\%$) reduziert werden.

Die *Xenopus laevis* Pmm2-Aktivität war sowohl in den einzelnen Embryonalstadien als auch in den unabhängigen *In vitro* Fertilisationen stark schwankend.

Abhängig von der Qualität der Embryonen und des Expressionslevels liegt die Pmm2-Aktivität bei Wildtyp-Embryonen im Schnitt bei 6,0mU/mg und schwankt extrem zwischen 3,7-9,8mU/mg, wodurch die Analyse deutlich erschwert wird.

2.3.2 Vergleich spezifischer Pmm2 Morpholinos durch eine Kaplan-Meier-Statistik

Für eine Verbesserung des spezifischen Pmm2-Knockdowneffektes wurden Pmm2 Morpholinos, die die Translation im kodierenden Bereich (ATG Mo) blockieren, mit Pmm2 Morpholinos, die an dem 5'UTR-Ende die Anlagerung der Polymerase verhindern, verglichen.

Die Bewertung der Pmm2 Mo-Effektivität in Bezug auf die Faktoren Letalität und Toxizität erfolgte mit Hilfe einer Kaplan-Meier Überlebensstatistik aus drei unabhängigen Experimenten mit durchschnittlich 30 Embryonen, welche in Abb.2.12 aufgeführt wird.

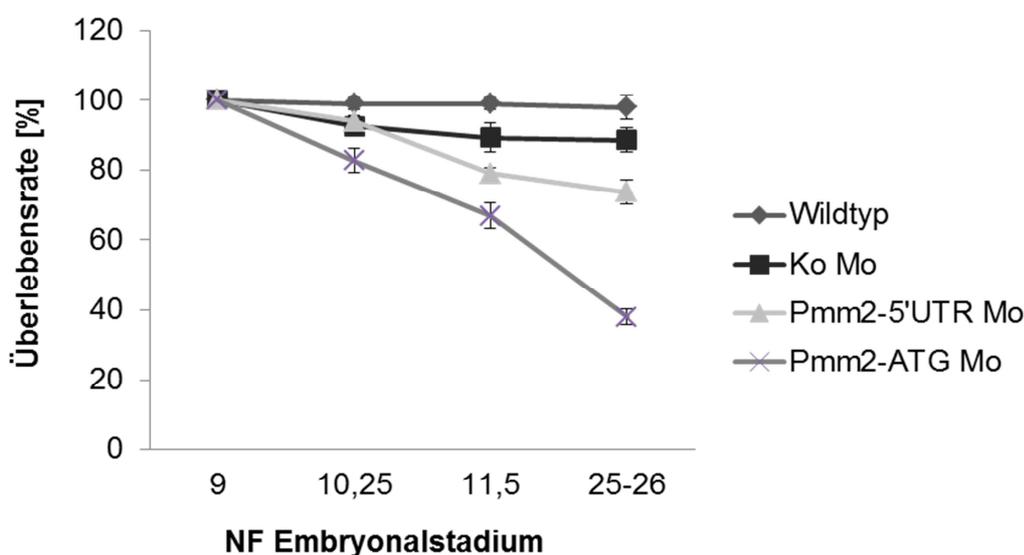


Abbildung 2.12: Kaplan-Meier-Statistik der Morpholino-Effekte. Die Analyse ermöglichte das Abschätzen des Einflusses der ATG- und 5'UTR- Pmm2 Morpholino-Inhibition sowie des Effektes des Kontrollmorpholinos (Ko Mo) auf die Überlebensrate im Verlauf der Embryogenese ($n=3$ $*p \leq 0,05$).

Die Überlebensrate wurde ab Beginn der Gastrulation dokumentiert, um injektionsbedingte Mortalitäten auszuschließen. Der Verlauf der Embryonalentwicklung uninjizierter Wildtyp-Embryonen ist konstant (98% +/-3,4%; $n=3$, $*p \leq 0,05$). Die Entwicklung der Kontrollmorpholino (Ko Mo)-injizierten Embryonen verläuft ebenfalls stabil (89% +/- 3,5%; $n=3$, $*p \leq 0,05$). Vergleicht man sowohl die ATG- als auch die 5'UTR Pmm2 Mo-injizierten Embryonen, so wird ein signifikanter Pmm2-Knockdowneffekt schon in der frühen Embryonalentwicklung ersichtlich.

Ergebnisse

Es fällt auf, dass vor allem der Pmm2 ATG-Morpholino, der den Startpunkt der Translationsexpression blockiert, einen größeren Einfluss auf die Mortalität hat als der Morpholino, der in der untranslatierten regulatorischen Region bindet.

Der Pmm2-ATG-Mo generiert frühe Morphogenesedefekte und führt zu einer embryonalen Letalität der Nachkommen von bis zu 62% (+/-3,5%; n=3, *p≤0,05) in Est. 25-26. Vergleicht man hingegen die Embryogenese Pmm2-5'UTR-Mo injizierter Embryonen so wird deutlich, dass nur ein geringer reprimierender Effekt vorliegt und der angestrebte Defekt in der Entwicklung kompensiert wird, wodurch im Durchschnitt etwa 73% (+/-2,6%; n=3, *p≤0,05) bis zum Est. 25-26 überleben.

2.3.3 Photometrischer Nachweis der Pmm2-Aktivität mit spezifischem Rescue

Bei der photometrischen Pmm2-Aktivitätsbestimmung handelt es sich um eine Enzymkaskade, deren Nachweis auf der Reduktion von NADP⁺ zu NADPH, detektierbar bei 340nm, beruht. Als Startsubstrat wird Man1-P verwendet, wodurch die Kaskade, bestehend aus der Phosphomannose-Isomerase (PMI), der Phosphoglucoisomerase (PGI) und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), abhängig von der Pmm2-Aktivität induziert wird. Diese Methode umgeht die radioaktive Pmm2-Aktivitätsbestimmung und ermöglicht die Analyse größerer Datenmengen in kürzerer Zeit.

Pmm2 Morpholino Embryonen, Kontrollmorpholino (KoMo)-injizierte und Rescue (Pmm2 Mo+ Pmm2 pCl-neo) Embryonen des Est.10,5 wurden aufgeschlossen und die Pmm2-Aktivität in den zytosolischen, dotterfreien Lysaten bestimmt.

Die relativen Werte der Pmm2-Kapazitätsmessungen werden in Abb.2.13 dargestellt.

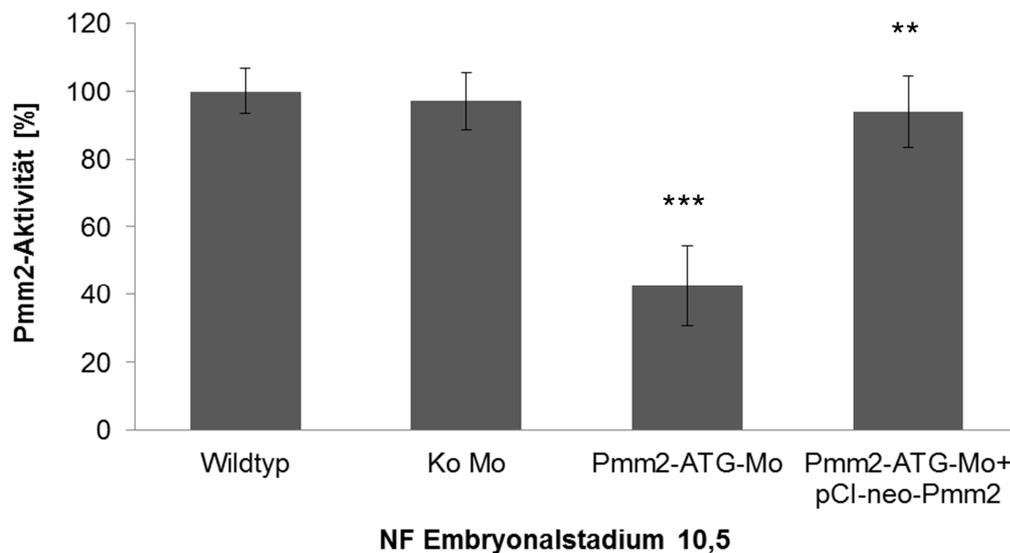


Abbildung 2.13: Pmm2 Aktivität mittels gekoppelt photometrischen NADP-Assays. Die Analyse der *Xenopus laevis* Wildtyp, Kontroll Morpholino-, Pmm2 Morpholino injizierte sowie Rescue -Embryonen des Est.10,5 in einem gekoppelt photometrischem NADP-Assay zeigt einen signifikant reprimierenden Effekt auf die Pmm2 Aktivität durch Pmm2 Morpholinos. Dieser kann spezifisch durch die parallele Injektion eines Plasmid-tragenden Wildtyp Pmm2 wieder aufgehoben werden (n=6 ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$).

Im Vergleich zu der Pmm2-Aktivität des Wildtypes (Wt) ist die Pmm2-Aktivität in den Knockdown Embryonen ([Pmm2 Mo]=25ng/E) des Est.10,5 um 57,4%, auf 42,6% (+/-11,8%) Restaktivität reduziert. In den Kontrollmorpholino ([KoMo]=25ng/E)-injizierten Embryonen wurde eine Wildtyp-ähnliche Pmm2-Aktivität von durchschnittlich 97,2% +/-8,5% detektiert, wodurch ein injektionsbedingter Einfluss auf die Pmm2-Aktivität ausgeschlossen werden kann.

Ein parallel zum Pmm2 Mo injiziertes Pmm2-pCIneo-Konstrukt (50pg/E) ermöglichte eine Wiederherstellung der Pmm2-Aktivität annähernd auf den Wert des Ursprungszustandes (94% +/-10,6%).

2.4 Hypoglykosylierung durch Pmm2-Morpholino-Knockdown

Ein funktionelles PMM2-CDG *Xenopus laevis* Tiermodell erfordert neben einer signifikanten Repression der Pmm2-Aktivität den Nachweis einer generellen Hypoglykosylierung in der frühen Embryogenese.

Hierzu wurde der Glykosylierungsstatus des Wildtyp-Dotters mit dem Profil dotterfreier Zellsate unbehandelter sowie parallel dotterfreie Tunicamycin

Ergebnisse

[5µg/ml] behandelter Embryonen des Embryonalstadiums 10,5 analysiert und quantifiziert, siehe Abb.2.14. Die Detektion der Glykoproteine mit dem biotinylierten ConcanavalinA (ConA) in Lektinblot-Analysen ermöglichte einen Überblick des Profils der Mannosereichen- und Komplextyp-Glykokonjugation.

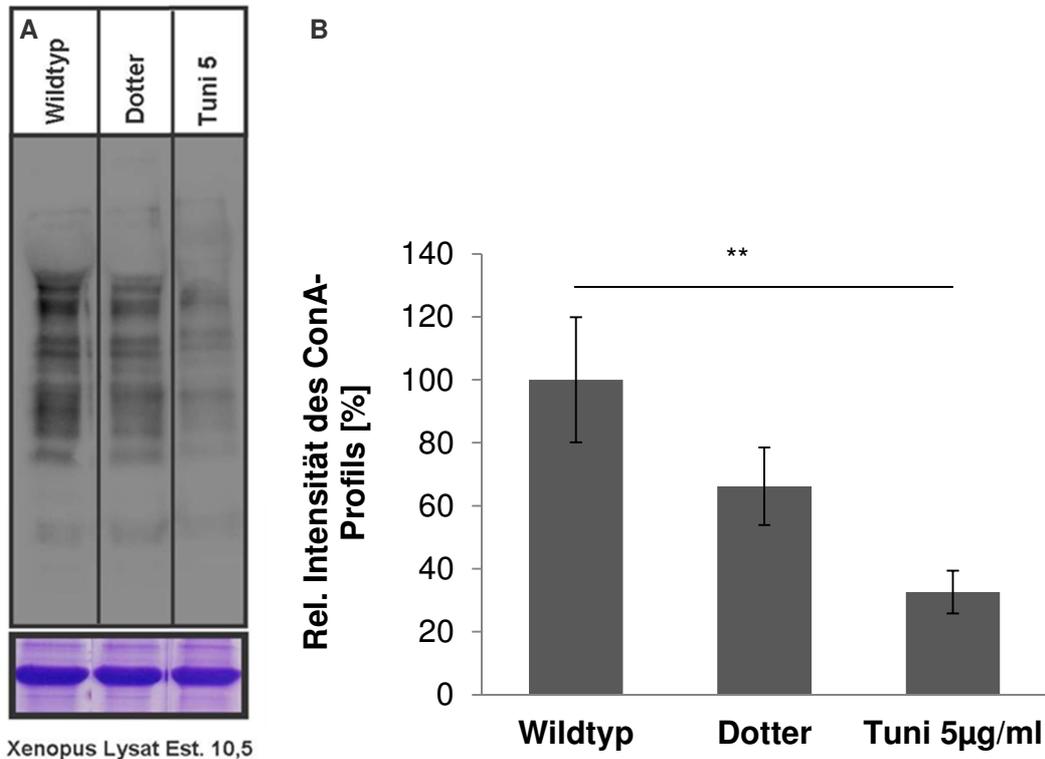


Abbildung 2.14: Detektion des Glykosylierungsprofils von *Xenopus laevis*. A) Oben: Concanavalin (ConA) Lektinblot von *Xenopus laevis* Zelllysaten des Embryonalstadiums 10,5. Analysiert wurden das Glykanprofil des zytosolischen Lysats sowie die Glykosylierung des Dotters vergleichend mit dem zytosolischen Lysat Tunicamycin-behandelter Embryonen (Tuni 5 [µg/ml]); Unten: Coomassie-Ladungskontrolle der aufgetragenen Proteinkonzentrationen von 20µg/Spur. B) Relative Quantifizierung der induzierten Hypoglykosylierung in *Xenopus laevis* Est.10,5 (n=3; **p≤0,005).

Die Quantifizierung der ConA-HRP Detektion veranschaulicht in wiederholten Analysen (n=3), dass der Dotter mit 66,8% +/-12,3% im Vergleich zu den Kontrollen der dotterfreien Wildtyp-Lysate (100% +/-19,8%) ebenfalls ein starkes Glykanprofil aufweist. Eine Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin bewirkte mit einer relativen Signalintensität von 32,6% +/-6,8% im Vergleich zum Wildtyp den stärksten Verlust an Protein-verknüpften Oligosacchariden.

Die Pmm2-defiziente Aktivität in *Xenopus* führte zu einer verminderten Glykoproteinbiosynthese, welche in der frühen Gastrula (Est.10,5) sowie in der späten Gastrula (Est.12,5) und in der frühen Neurula (Est.13,5) detektiert werden (Abb.2.15) konnte.

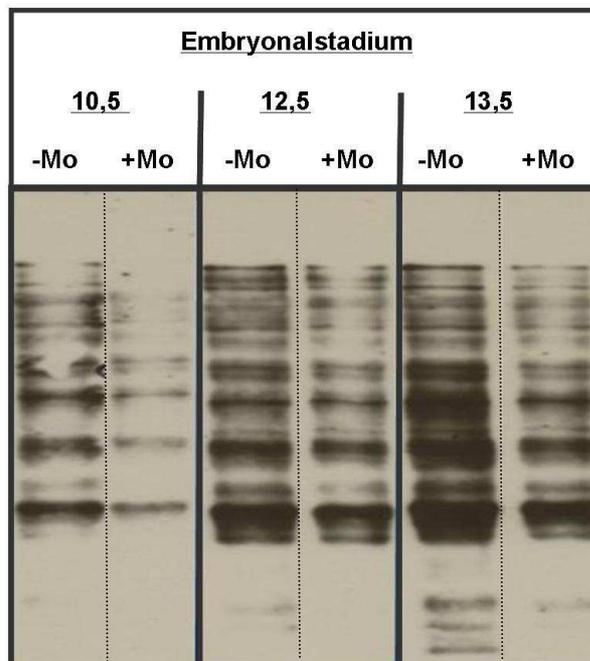


Abbildung 2.15: Lektin Blot Analysen von *Xenopus* Embryonen. ConA-Lektin-Analysen veranschaulichen die Glykanprofile von Wildtyp (-Mo) und Pmm2 Mo (+Mo) injizierten Embryonen in drei *Xenopus laevis* Embryonalstadien. In den aufgeführten Stadien frühe Gastrula (Est.10,5), späte Gastrula (Est.12,5) und frühe Neurula (Est.13,5) wird eine induzierte Hypoglykosylierung in Pmm2 Mo-injizierten Embryonen nachgewiesen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht, dass die Proben auf einem Gel, jedoch nicht nebeneinander gelaufen sind.

Der in Abb.2.15 dargestellte ConA Lektin Blot zeigt, dass durch die reduzierte Pmm2-Aktivität auch weitere Embryonalstadien durch eine Hypoglykosylierung beeinflusst werden.

Die Abb.2.16 zeigt die Quantifizierung der Glykosylierung des frühen Gastrula-Stadiums 10,5, des späten Gastrula-Stadiums 12,5 und des frühen Neurulations-Stadium 13,5.

Ergebnisse

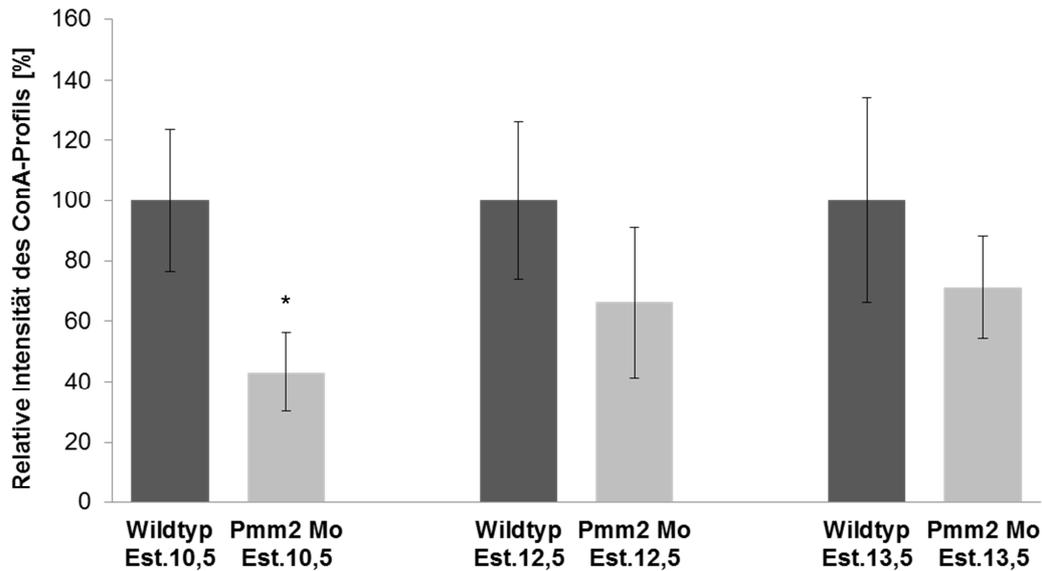


Abbildung 2.16: Quantitative Analysen des Lektin-bindenden Glykanprofils. Die aufgeführte relative Intensität des detektierten ConA-Glykosylierungsprofils verdeutlicht einen signifikanten Verlust der N-Glykane in Pmm2 Mo-injizierten Embryonen des Embryonalstadiums 10,5 (Est. 10,5).

Vergleicht man die Intensität des ConA-HRP Signals, so kann ein deutlicher Signalverlust in Pmm2 Morpholino-injizierten Embryonen durch die Reduktion der Protein-verknüpften Oligosaccharide nachgewiesen werden. In Est. 10,5 betrug die detektierte Signalintensität von Pmm2-Morpholino-injizierten Embryonen 43,3% +/-12,9%, wodurch eine signifikante Hypoglykosylierung im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen 100% +/-23,7 generiert werden konnte. In Est.12,5 wurde in Wildtyp-Embryonen 100% +/-26,1% detektiert, wogegen die Pmm2-Morpholino-injizierten Embryonen eine Intensität von 66,3% +/-24,8 aufzeigten. Wildtyp-Embryonen des Est. 13,5 zeigten eine Signalstärke von 100% (+/-34,1%) im Vergleich zu einem detektierten Glykanstatus in Pmm2 Morpholino-injizierten Embryonen von 71,2% +/-16,9% (n=3, *p≤0,05).

Ein Verlust der Pmm2-Aktivität führte zu einer generellen Hypoglykosylierung, wodurch die Funktionalität des Pmm2-induzierten Morpholino-Knockdowns in *Xenopus laevis* belegt werden konnte.

2.5 Inhibition der Morphogenese durch defiziente N-Glykosylierung

Das *Xenopus laevis* Modell bietet, anders als beispielsweise ein Maus- oder Rattenmodell, den Vorteil, dass die Entwicklung der Froschembryonen extrakorporal in der Petrischale verfolgt und analysiert werden kann. Pmm2-Morpholino-induzierte Veränderungen des Wachstums können somit frühzeitig erkannt und Fehlentwicklungen auf ein terminiertes, begrenztes Zeitfenster der Embryogenese zurückgeführt werden (Tadros und Lipshitz, 2009).

Eine frühe Inhibition der N-Glykosylierung durch Pmm2 Morpholinos führte zu einem deutlichen Verlust an Glykanstrukturen, welche durch posttranslationale Konjugation die Funktionalität von Proteinen gewährleisten. Vergleichende Tunicamycin-Analysen zu Yuan *et al.* 2008 sollen zudem zeigen, wie sich eine reduzierte Glykoprotein-Modifikation auf die Embryogenese von *Xenopus laevis* auswirkt.

2.5.1 Der Tunicamycin-Effekt

Um die Konsequenzen eines Totalverlustes der N-Glykosylierung bei *Xenopus laevis* abschätzen zu können, wurden die Embryonen ab dem 16-Zellstadium mit 2,5µg/ml und mit 5µg/ml Tunicamycin in 1xMBSH kultiviert und der Verlauf der Entwicklung dokumentiert. Zusätzlich wurde die Embryonalentwicklung Pmm2 Mo injizierter Embryonen vergleichend mit der Wildtyp Embryogenese analysiert.

In Abb.2.17 wird in der oberen Reihe die *Xenopus*-Normalentwicklung in verschiedenen Embryonalstadien dargestellt. Betrachtet werden späte Gastrula- und frühe Neurulastadien (Est. 12,5-14), die Tailbud Stadien 24-27, die Entwicklungsstadien 30-31 als frühe Organogenesestadien und frühe Morphogenese-Embryonalstadien 41- +.

Vergleicht man den Verlauf der Embryonalentwicklung so wird deutlich, dass die Anwendung von Tunicamycin zu einer zeitlich stark verzögerten Embryogenese führte und je nach Konzentration eine toxische Letalität induzierte. Die *Xenopus*-Embryonalentwicklung unter 2,5µg/ml Tunicamycin-Einfluss zeigte einen retardierten und Morphogenesedefekte induzierenden, jedoch nicht letalen Verlauf (Abb.2.17; 2.Reihe). Die Konzentration von 5µg/ml Tunicamycin im Medium führte zu einer embryonalen Letalität bereits während der Gastrulations- und Neurulationsprozesse (Abb.2.17; 3.Reihe).

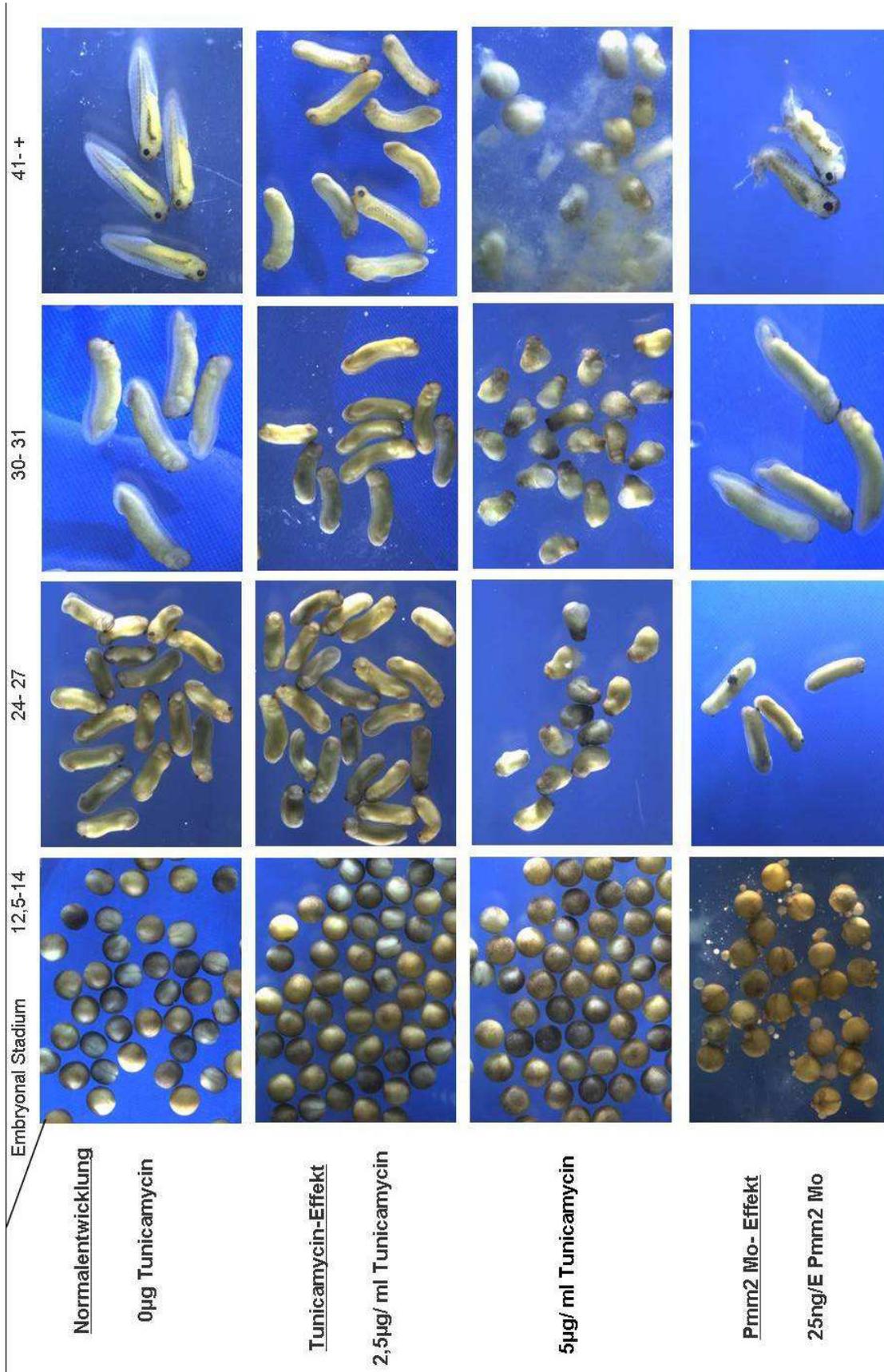


Abbildung 2.17: *Xenopus laevis* Morphogenese. *Xenopus laevis* Normalentwicklung vergleichend mit einer retardierten [2,5µg/ml] und einer Letalität induzierten [5µg/ml] Tunicamycin behandelten Embryogenese sowie einer Pmm2 Mo injizierten Embryonalentwicklung.

Eine Inhibition der N-Glykosylierung induziert frühe Morphogenesedefekte. Die Quantifizierung durch eine Kaplan-Meier Statistik (Abb.2.18) veranschaulicht den Einfluss eines N-glykosidischen Blocks durch Tunicamycin, der konzentrationsabhängig zu einer embryonalen Lethalität führt.

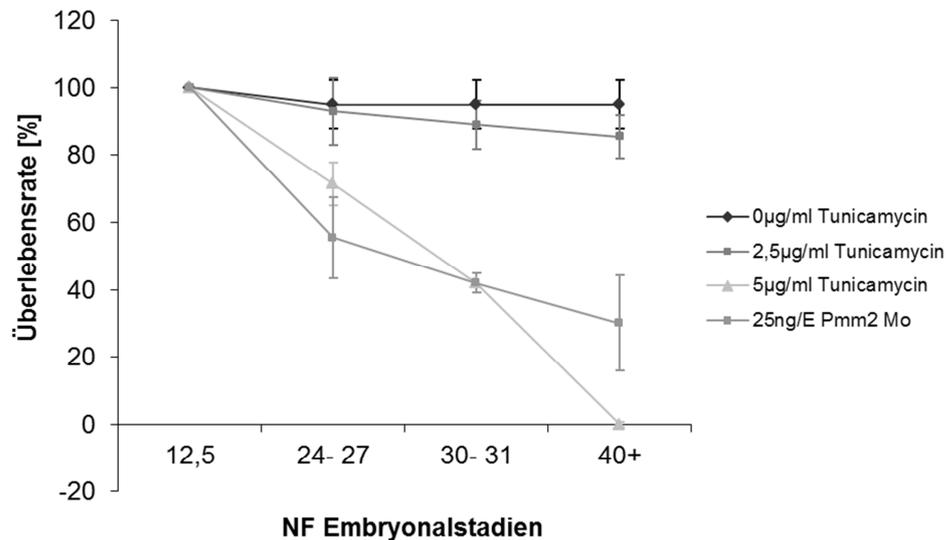


Abbildung 2.18: Kaplan-Meier-Statistik einer N-Glykosylierungs-defizienten *Xenopus laevis* Embryogenese. Im Vergleich zu unbehandelten Embryonen zeigten Embryonen, die mit 2,5µg/ml Tunicamycin im Medium behandelt wurden, einen zeitlich verzögerten Verlauf und leichte Morphogenesedefekte, jedoch keinen induzierten Mortalitätseffekt. Embryonen, die mit 5µg/ml Tunicamycin im Medium behandelt wurden, zeigten eine Stagnation der Embryogenese, welche eine Letalität induzierte. Die Morphogenese der Pmm2 Mo-behandelten Embryonen zeigte zu Beginn der Neurulation eine hohe Mortalität bis annähernd 50%, wobei der Pmm2 Mo-Effekt im Verlauf der Embryogenese stabilisiert werden konnte und noch 30% der Embryonen das Kaulquappen-Stadium erreichten (n=3 à 30Embryonen).

Die Überlebensrate wurde ab dem Ende der Gastrulation, zu Beginn der Neurulation, dokumentiert. Der Verlauf der Embryonalentwicklung unbehandelter *Xenopus laevis* Wildtyp Embryonen wies keine Auffälligkeiten auf.

Die Entwicklung der mit 2,5µg/ml Tunicamycin behandelten Embryonen verlief stabil. Etwa 85% der behandelten Embryonen erreichten ein spätes morphogenetisches Embryonalstadium, jedoch zeitlich verzögert. Die mit 5µg/ml Tunicamycin behandelten Embryonen zeigten einen erheblichen Effekt. Die frühe Embryogenese war stark betroffen, so dass der Embryo den Verlauf der Neurulation zum Teil gerade noch überwinden konnte, jedoch in dem Tailbud Stadium (Est.24-27) nicht mehr elongierte, die Entwicklung stagnierte, was zu einer frühen Letalität führte. Pmm2 Mo (25ng/E) injizierte Embryonen unterlagen in der frühen Embryogenese neben einer retardierten Entwicklung einer hohen Sterberate, wogegen sich die Überlebensrate im Verlauf der Entwicklung stabilisierte (Abb.2.17; 4.Reihe).

2.5.2 Der Pmm2-Morpholino-Effekt

Nach der Injektion von 25ng Pmm2-ATG-Mo pro Embryo zeigten die Embryonen eine zeitlich verzögerte Entwicklung und deutliche Gastrulationsstörungen in Form einer defekten Ausprägung der Dorsallippe und des Blastoporus sowie Auffälligkeiten bei der Bildung der Neuralleiste. Pmm2 Morpholino-injizierte *Xenopus* Embryonen entwickelten sich im Unterschied zu den Kontroll-Morpholino (Ko Mo)-Embryonen deutlich langsamer und zeigten einen auffälligen klinischen Phänotyp in Form schwerer Morphogenese-Defekte.

In Abb.2.19 werden beispielhaft *Xenopus laevis* Kontroll-Morpholino-injizierte Embryonen des Est. 35-36 sowie ein wiederkehrender Phänotyp in 25ng/E Pmm2 Mo-injizierten Embryonen dargestellt.

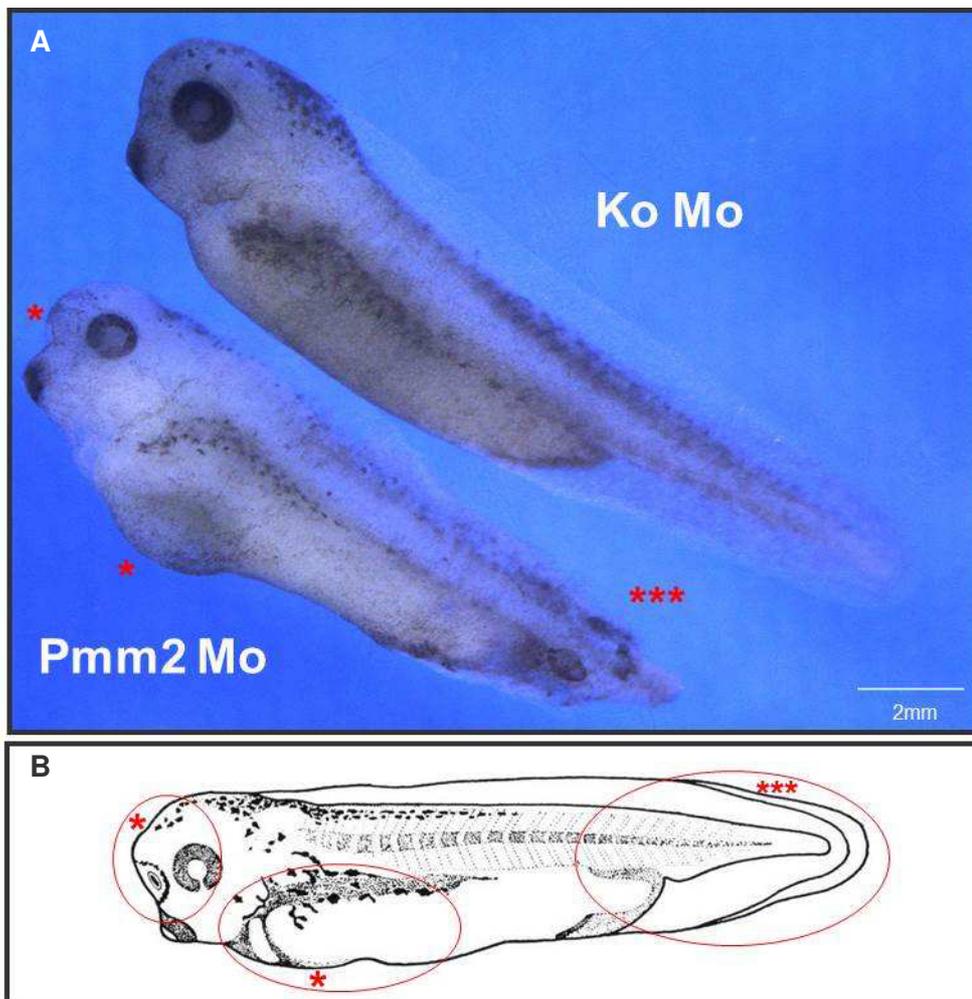


Abbildung 2.19: Morphologischer Pmm2-CDG Phänotyp. (A) Im Vergleich zu Ko Mo-injizierten Embryonen (Est.36) weisen Pmm2 Mo-injizierte Embryonen deutliche Morphogenesedefekte auf. (B) Schematische Abbildung von *Xenopus* Est.35-36 mit Markierungen der morphologisch veränderten Regionen.

Im Verhältnis zu Kontroll-Morpholino-injizierten Embryonen wurden bei Pmm2 Mo-Embryonen frühe Achsendefekte, eine signifikant verkürzte Kopf-Schwanz-Achse (60,18% +/-14,3%; n=10; ***p≤0,001) und eine Reduktion des Notochords (59,6% +/-17,3%; n=10; ***p≤0.001) detektiert. Zudem waren Somitendefekte, ein Augendysmorphismus sowie ein spitz zulaufender Kopf und Malformationen der Magen-Darm Region ersichtlich.

2.6 Pmm2-Defizienz bewirkt eine Hypoglykosylierung von Wnt5a

Die Ansätze dieser reduzierten Pmm2-Genese ermöglichen in noch folgenden Versuchen die Analyse des Einflusses einer beeinträchtigten N-Glykosylierung auf die morphogenetische Wnt-Signaltransduktions-Regulation.

Aktive Wnts sind cysteinreiche, palmitoylierte sowie glykosylierte Proteinliganden, welche durch eine induzierte Hypoglykosylierung beeinflusst werden können. Ein Zusammenbruch der Wnt-Kaskade könnte dabei den beobachteten Pmm2 Mo Phänotypen in *Xenopus laevis* Embryonen verursachen.

Um mögliche Auswirkungen einer induzierten Hypoglykosylierung auf den Wnt-Signalweg näher zu untersuchen war es notwendig, zunächst ein Markerprotein für die weiteren Studien zu etablieren.

Da in Versuchen mit Wnt5a exprimierenden HEK293 Zellen und stabil transfizierten Maus Wnt5a L-Zellen gezeigt werden konnte, dass Wnt5a vier potentielle (N114, N120, N312 und N326) und drei definierte N-Glykosylierungsstellen im Profil aufweist (Kurayoshi et al., 2007), erfolgten erste Analysen anhand dieses Proteins. Dabei wurde das Glykosylierungsprofil von Wnt5a in der 2D-Gelelektrophorese mit einer ConcanavalinA-Lektinfärbung analysiert.

2.6.1 Nachweis der Wnt5a Hypoglykosylierung durch 2D-Gelelektrophorese

Zum Nachweis einer durch den Pmm2 Morpholino-induzierten Hypoglykosylierung von Wnt5a wurde 300pg *Wnt5a-flag* Cap-RNA mit und ohne Pmm2 Morpholino in *Xenopus laevis*-Embryonen des Zwei-Vielzellstadiums injiziert und exprimiert.

Ergebnisse

Die Embryonen der Neurulationsstadien Est.15-18 wurden lysiert, Wnt5a-flag durch Immunopräzipitation aufgereinigt, anschließend über eine 2D-Elektrophorese separiert und im Western Blot durch einen flag-tag spezifischen Antikörper detektiert und analysiert.

Durch die reduzierte Pmm2-Aktivität kommt es im Allgemeinen zu einer verminderten Bereitstellung kompletter Glykanstrukturen und der unvollständigen Besetzung von Glykosylierungsstellen auf dem Protein. Es stand zu vermuten, dass damit ein Verlust an negativ-geladenen Sialinsäureresten einhergeht, wodurch es zu einer Verschiebung des Isoelektrischen Punktes (IP) von Wnt5a kommen könnte. Nachfolgend sollte dieser durch ein verändertes Laufverhalten in der 2D-Elektrophorese nachgewiesen werden.

Die Detektion des Wnt5a-flag Proteins erfolgte mit einem monoklonalen flag-tag spezifischen Antikörper (siehe Abb.2.20A) bei 42kDa. Der Blot wurde gestrippt und erneut geblockt, um das Wnt5a-Glykanprofil durch eine ConcanavalinA (ConA) Markierung ermitteln zu können (Abb.2.20B).

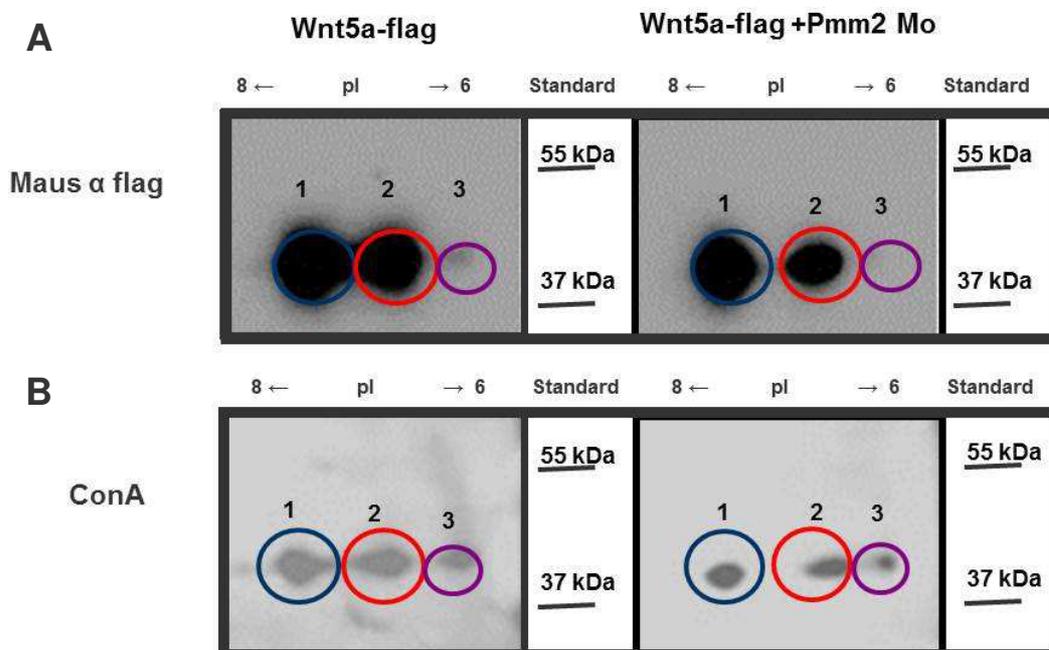


Abbildung 2.20: Analyse des immunopräzipitierten Wnt5a-flag mittels 2D-Gelelektrophorese. (A) Zur Detektion des Wnt5a-Profiles wurde Wnt5a-flag mit und ohne Pmm2 Mo in *Xenopus laevis* exprimiert, Flag-tag spezifisch aufgereinigt und über 2D-Analyse separiert (B) Die ConA Lektin Analyse verdeutlicht das abweichendes Glykosylierungsprofil von Wnt5a in Pmm2 Mo-injizierten Embryonen.

Im Vergleich zu den Wnt5a-flag Wildtyp-Embryonen zeigten Wnt5a-flag Pmm2 Mo injizierte Embryonen einen Verlust an Signalstärke bei den Spots 2 und 3 sowie eine Verschiebung der Spots zum basischen pH (Abb.2.21).

Die dargestellten Ringe um die Spots in der Abbildung 2.20 zeigen die quantifizierte Fläche und ermöglichen die Ausrichtung der exakten Höhe sowie eine Definition der Spots im Vergleich zum anschließenden ConA Blot.

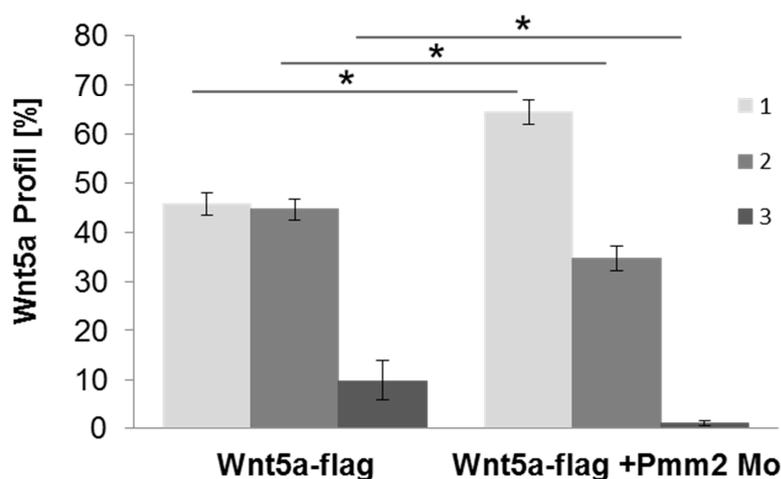


Abbildung 2.21: Quantifizierung des durch 2D-Gelelektrophorese separierten, immunopräzipitierten Wnt5a-flag-Proteins. Die Verteilung der Wnt5a-flag Spots 1 bis 3 zeigt deutliche Abweichungen im Vergleich zu Pmm2 Mo behandelten Embryonen und somit ein Pmm2-abhängiges Wnt5a-2D-Profil (n=3, *p≤0,05).

Quantitative Analysen ermittelten ein Verhältnis der Wnt5a-flag Spots 1 : 2 : 3 von 45,7% (+/-2,3%) : 44,5% (+/-2,0%) : 9,8% (+/-4,7%) für das Wildtyp Wnt5a-flag Profil und 64,3% (+/-7,2%) : 34,7% (+/-6,8%) : 1,0% (+/-0,6%) für das Pmm2 Mo Wnt5a-flag Profil.

Da die Proteinmobilität in einer 2D-Analyse hauptsächlich vom pH-Wert abhängt ist davon auszugehen, dass die Spotverschiebung des Wnt5a-Liganden zu einem basischeren pH bei Wnt5a-flag Pmm2 Mo injizierten Embryonen durch einen Verlust der negativen Ladung der sialinisierten Komplextyp-/ Hybrid-Glykanstrukturen erzeugt worden ist. Die Wnt5a-flag/ Pmm2 Mo-behandelten Embryonen weisen ein deutlich geringeres Expositionssignal in der ConA-Markierung auf, was den Verlust an Glykanen anzeigt. Die quantitative Verteilung des Wnt5a-Glykosylierungsprofils wird in Abb.2.22 dargestellt.

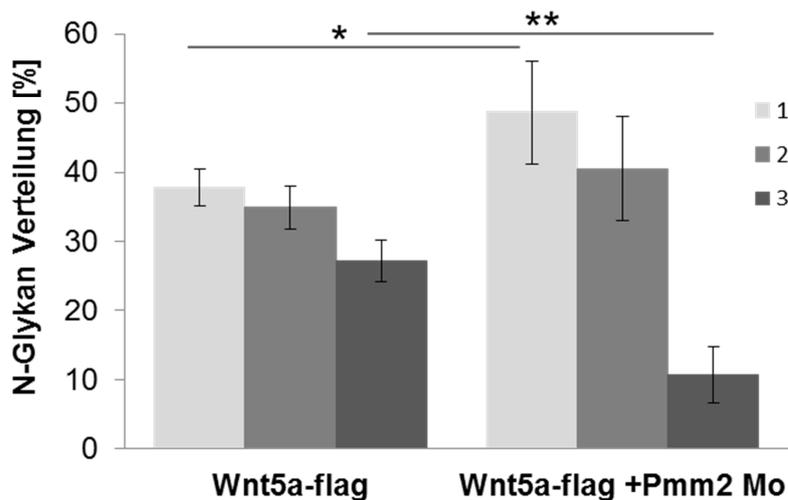


Abbildung 2.22: Quantifizierung der ConA-Detektion. Im Vergleich zu den Wnt5a-flag Embryonen zeigen Wnt5a-flag/Pmm2 Mo-injizierte Embryonen abweichende Verteilung des N-Glykanmusters und somit ein Pmm2 abhängiges Wnt5a-2D-ConA-Glykosylierungsprofil (n=3, $p^* \leq 0,05$).

Betrachtet man die Verhältnisse der drei Glykosylierungsstadien von Wnt5a, welche durch die Verschiebung in der Ladung nachgewiesen werden, so wird eine Defizienz des höchst glykosylierten Status (Ring 3) zu der hypoglykosylierten Variante (Ring 1) in Pmm2 Mo-Embryonen ersichtlich.

Die Verteilung der Verhältnisse in Abb.2.22 veranschaulicht, dass Wnt5a im Wildtyp vom niedrigst glykosylierten bis zum höchst glykosylierten Zustand 1 : 2 : 3, ein Verteilungsmuster von 1 Glykan 37,8% (+/-3,0) : 2 Glykane 34,9% (+/-3,2) : 3 Glykane 27,3% (+/-4,7) aufweist, wogegen in Pmm2 Mo Embryonen eine starke Umverteilung des Glykosylierungsprofils von 1 Glykan 48,7% (+/-7,4) : 2 Glykane 40,6% (+/-7,5) : 3 Glykane 10,8% (+/-4,1) von Wnt5a deutlich wird.

Die Ergebnisse belegen, dass es aufgrund der Pmm2-Morpholinos zu einer Hypoglykosylierung von Wnt5a und infolgedessen zu einem Defizit an negativ geladenen Sialinsäureresten kommt, wodurch eine Ladungsverschiebung des Proteins hervorgerufen wird.

2.7 Pmm2 siRNA in Wnt5a-V5 L-Zellen inhibiert Wnt5a Sekretion

Eine Pmm2-defiziente Aktivität in *Xenopus*-Embryonen bewirkt einen Verlust der Glykane, welches durch eine Ladungsverschiebung und eine reduzierte Concanavalin-(ConA-) Komplextyp-Markierung in der 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden konnte.

Zur Analyse, ob sich die detektierte Hypoglykosylierung von Wnt5a auch auf dessen Sekretion auswirkt, wurden Wnt5a-V5 stabil transfizierte Maus-Fibroblasten (L-Zellen) mit Pmm2 siRNA behandelt.

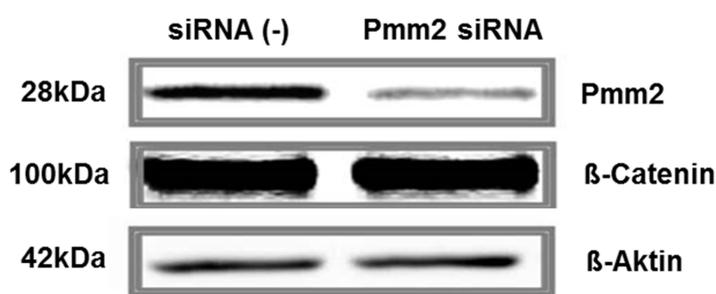


Abbildung 2.23: Western Blot Analysen der Wnt5a-V5-L-Zellen. Darstellungen der Expressionsnachweise durch Pmm2 (oben) bestätigen den Verlust der Pmm2-Aktivität aufgrund einer reduzierten Pmm2-Proteinbiosynthese in Pmm2 RNAi Wnt5a-V5 L-Zellen. Im Vergleich wurde die β -Catenin-Expression durch einen Pmm2-Knockdown nicht beeinträchtigt (Mitte). Die Analyse von β -Aktin bestätigt, dass die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde (unten). Western Blot (10% SDS; 30 μ g Protein/Spur) (n=3, ***p \leq 0,001).

Pmm2-siRNA behandelte Wnt5a-V5 L-Zellen weisen zwar eine deutliche Repression der Pmm2-Expression, jedoch ein konstantes Level einer β -Catenin und β -Aktin -Expression auf, siehe Abb.2.23. Eine Quantifizierung des Pmm2-Proteinexpressionslevels durch Normalisierung mit β -Aktin (Abb.2.24) zeigt, dass die Pmm2-Expression in Pmm2-siRNA behandelten L-Zellen signifikant auf 36,4% \pm 3,2% im Vergleich zu den siRNA(-)-behandelten Zellen (100% \pm 11,4%) reduziert war.

Ergebnisse

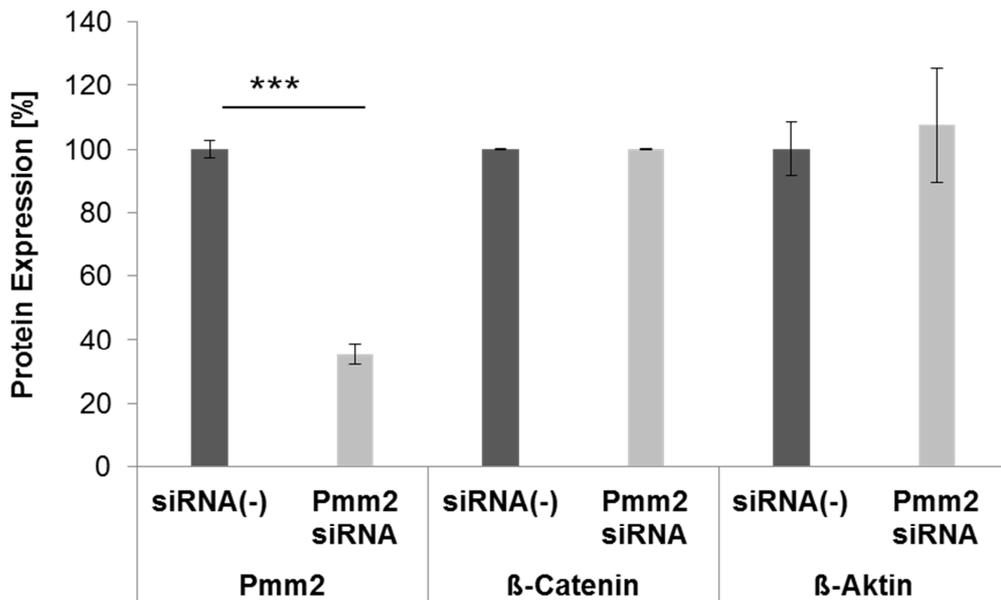


Abbildung 2.24: Quantifizierung der Western Blot Analysen. Im Vergleich zu nonsense-siRNA behandelten Zellen zeigen Pmm2 siRNA Wnt5a-V5 L-Zellen eine signifikant reduzierte Pmm2-Proteinexpression, wobei die Pmm2-RNAi-Behandlung keinen Einfluss auf das Expressionslevel von β-Catenin und β-Aktin ausübt (n=3, **p≤0,005).

Die β-Catenin-Expression der mit nonsense-siRNA behandelten L-Zellen lag bei 100% +/-0,1%, die Expression der Pmm2 siRNA behandelten Zellen ebenfalls bei 100% +/-0,1%. Die Expression des Referenzgens β-Aktin zeigte ebenfalls eine konstante Expression, welche bei den Kontroll-siRNA-L-Zellen bei 100% +/-8,6% und bei den Pmm2-siRNA behandelten Zellen bei 107,5% +/-18,2% lag.

Spezifische radioaktive Pmm2-Flux-Messungen bestätigen die detektierte Pmm2-Defizienz durch eine reduzierte Aktivität in Pmm2 siRNA behandelten Zellen (36,3% +/-7,9%), wodurch die Funktionalität eines Pmm2-RNAi Knockdowns in Maus L-Zellen gewährleistet werden konnte (Abb.2.25).

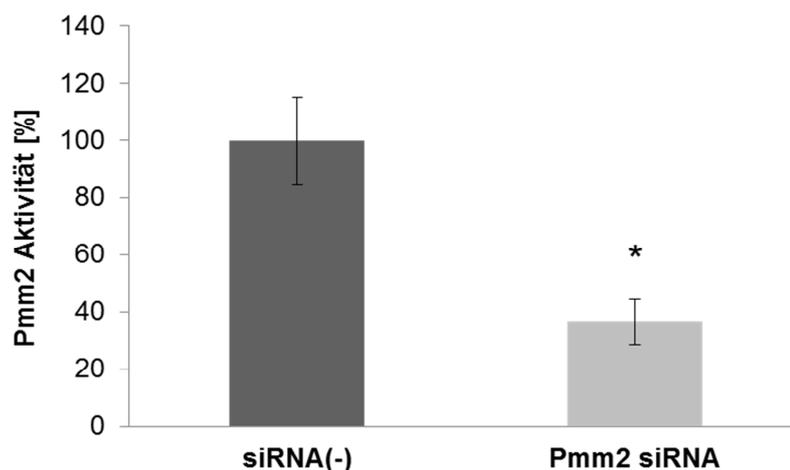


Abbildung 2.25: Pmm2-Aktivität der siRNA-behandelten Wnt5a-V5-L-Zellen. Ein durch RNAi generierter Knockdown der Pmm2 zeigte eine signifikant reduzierte Pmm2-Aktivität in Pmm2 RNAi Wnt5a-V5 L-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (siRNA [-]) (n=3, *p≤0,05).

Zum Nachweis, dass ein Pmm2-Knockdown die Wnt5a-Sekretion beeinträchtigt, wurde Wnt5a aus Zelllysaten und Zellkultur-Überständen mittels Western Blot analysiert (Abb.2.26).

Aufgetragen wurden Wnt5a-V5 Zelllysate sowie vergleichend die Wnt5a-V5 Immunopräzipitate der Kulturmedien-Überstände von ‚nonsense‘-siRNA(-) transfizierten und Pmm2 siRNA transfizierten L-Zellen.

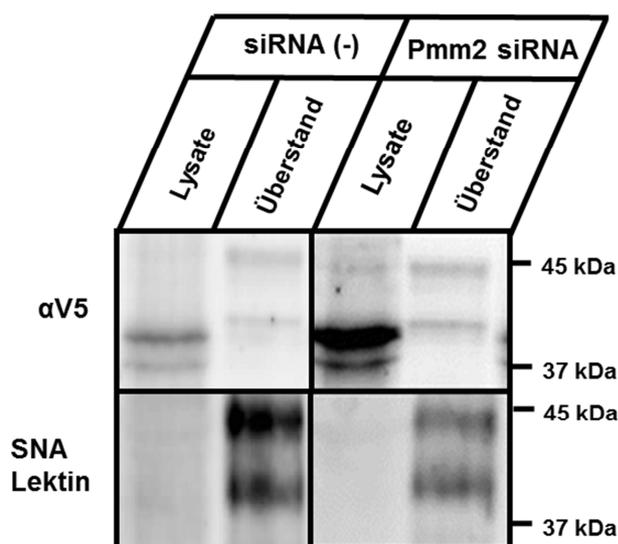


Abbildung 2.26: Sekretions-Analysen für Wnt5a-V5. Western Blot Analysen durch Maus-α-V5 (oben) und des Glykosylierungsprofils durch das Lektin *Sambucus nigra* (SNA; unten) zeigten bei Untersuchungen der Zelllysate und der Überstände der Wnt5a V5 L-Zellen eine Akkumulation des Wnt5a-V5 in Pmm2-siRNA behandelten Zellen. Auch ein Verlust der Signalstärke des sekretierten Wnt5a-V5 in den Überständen wurde abhängig eines Pmm2-Knockdown detektiert.

Ergebnisse

Die Immunodetektion gegen den Wnt5a-V5-Tag zeigte in den Wnt5a-V5 Zelllysaten verglichen mit den Überständen ein generell abweichendes Wnt5a-Profil, unabhängig von der Pmm2 siRNA Transfektion.

In allen Zelllysaten wurde Wnt5a-V5 in zwei verschiedenen Größen identifiziert. Es erfolgte eine spezifische Lokalisierung bei einer Größe von 37kDa und 39kDa, vergleichbar mit einem reifen Wnt5a-Protein und einem Wnt5a-Propeptid. Die Lysate der Pmm2-siRNA-behandelten Zellen zeigten eine deutlich intensivere Detektion von Wnt5a bei 39kDa im Vergleich zu siRNA(-) -behandelten Zellen.

Das Wnt5a-V5 aus den Zellkultur-Überständen konnte, abweichend von den Analysen des Zelllysate-Profiles, bei einer Größe von 40kDa und 44kDa nachgewiesen werden.

In Abb.2.27 werden die quantifizierten Wnt5a-V5-Signale in der Summe des Lysates und des Überstandes dargestellt. SiRNA(-) -behandelte Zellen weisen im Durchschnitt ein Verhältnis der Wnt5a-Lokalisation von 69,7% im Lysat und 30,3% (+/-1,4%) des Wnt5a-V5 im Überstand auf. In Pmm2-siRNA behandelten L-Zellen konnte eine Verteilung von 82,0% des Wnt5a-V5 im zytosolischen Lysat und 18,0% (+/-2,4%) in den Überständen detektiert werden.

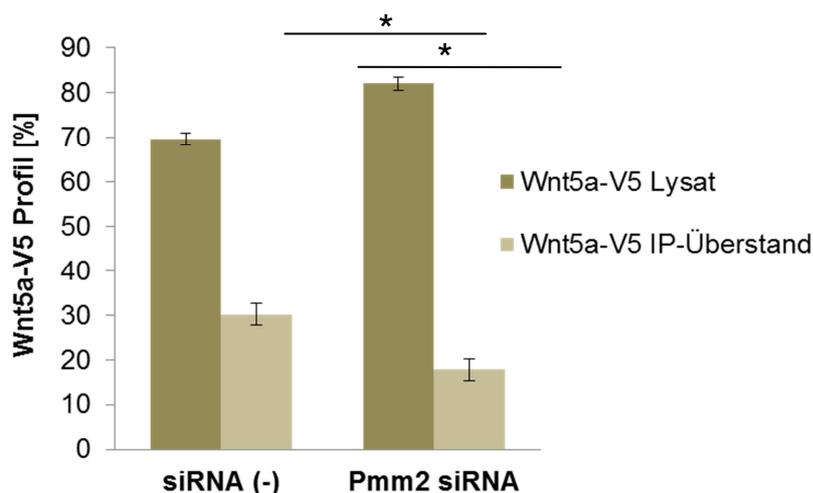


Abbildung 2.27: Quantifizierung des Wnt5a-V5 Profils. Die Quantifizierung der Western Blots zeigt tendenziell eine ähnliche Verteilung des Wnt5a-V5-Profiles in siRNA-behandelten Zellen. Im Vergleich zu siRNA (-) behandelten L-Zellen zeigen Pmm2 siRNA behandelte Zellen eine Akkumulation des Wnt5a-V5 in den L-Zellen.

Vergleicht man die beiden aufgeführten Wnt5a-V5-Profile so wird deutlich, dass eine Pmm2 RNAi Inhibition in L-Zellen eine Wnt5a-V5 Akkumulation bei 39kDa induziert.

Um nachzuweisen, dass die detektierten, unterschiedlichen Wnt5a-Größenprofile in Zelllysaten und Überständen durch posttranslationale Glykosylierungsmodifikationen verursacht wurden, wurde das Glykanprofil durch Lektin-Färbungen gegen spezifische Glykanstrukturen untersucht.

Vorhergehende Analysen von Wnt5a-flag in *Xenopus* zeigten in der 2D-Gel-Elektrophorese einen isoelektrischen Shift, der eine Auftrennung von drei physiologisch vorkommenden Wnt5a-Glykoprotein-Varianten vermuten ließ. Da sich diese Verschiebung am ehesten durch einen Verlust an negativen Ladungen der Sialinsäure auf komplexen sowie hybriden Glykokonjugaten erklärt werden könnte, wurden SNA Lektin-Markierungen gegen terminale Sialinsäure-Reste durchgeführt.

Vergleicht man die spezifische Wnt5a-V5 Detektion mit der SNA-Lektin-Markierung (Abb.2.26) wird deutlich, dass nur glykosylierte, sialinisierte Wnt5a-Proteine sekretiert wurden, da kein glykosyliertes Wnt5a mit SNA in den zytosolischen Zelllysaten nachgewiesen werden konnte.

Eine Quantifizierung des Sekretionsmusters des Wildtyp-Glykanprofils im Vergleich zu dem Pmm2 reprimierten Wnt5a-Profil zeigte, dass Pmm2-siRNA transfizierte Zellen im Vergleich zu siRNA(-) -behandelten Zellen (100,0% +/-11,2%) einen Verlust der glykosylierungsabhängigen Wnt5a Sekretionskapazität um 70,3% +/-13,1% aufwiesen (Abb.2.28).

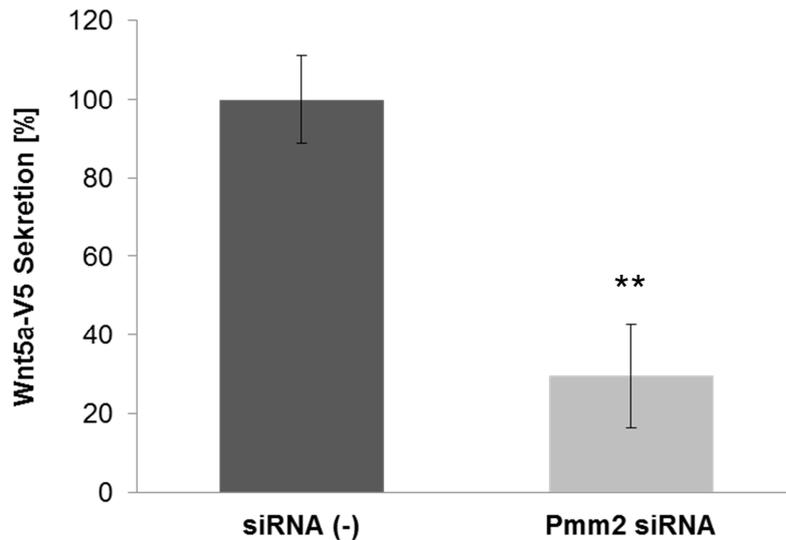


Abbildung 2.28: Quantifizierung des Pmm2-abhängigen Wnt5a Sekretionsprofils. Die Sekretionskapazität der Wnt5a-V5 exprimierenden Maus L-Zellen, die mit Pmm2 siRNA transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu siRNA(-) behandelten L-Zellen einen signifikanten Verlust der Wnt5a-V5 Sekretion in den Überstand (Wnt5a-SNA/Wnt5a-V5; $n \geq 3$, $**p \leq 0,005$).

Dabei wurde das im Überstand detektierte, glykosylierungsabhängige SNA-Signal durch das Signal der aufgetragenen Wnt5a-V5 Proteinkonzentration ins Verhältnis gebracht und verglichen (SNA/V5).

2.8 Konsequenz einer Pmm2-abhängigen Wnt5a Hypoglykosylierung

Kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktionskaskaden spielen eine kritische Rolle im Verlauf der Embryogenese. Wnt-Komponenten tragen unter anderem zur Zelldifferenzierung, Ausprägung der Zellpolarität und Zellmotilität sowie der Zelladhäsion bei.

Ein Pmm2-Knockdown induziert frühe Defekte in musterbildenden Prozessen. Da bekannt ist, dass die Wnt-Signaltransduktion in Morphogeneseprozesse involviert ist und vermutet wird, dass die Liganden-Sekretion von der N-Glykosylierung abhängig ist, wurde exemplarisch die Wnt5a/ Ror2-Signalkaskade mit PAPC (Paraxiales Protocadherin) als spezifischem Zielgen-,readout' gewählt.

Das Schlüssel-molekül PAPC eignet sich besonders gut als transkriptionelles Downstream-,readout'-System, da es früh gewebespezifisch exprimiert wird und ausschließlich durch die Interaktion von Wnt5a mit Ror2 reguliert werden kann.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob ein Pmm2 Mo-basierender Verlust der Glykosylierung einen Einfluss auf die *PAPC*-Expression in der dorsalen Marginalzone sowie in Regionen des invaginierenden Mesoderms des Est.10,25 hat.

2.8.1 Pmm2-Aktivität beeinflusst *Paraxial Protocadherine* Expression

2.8.1.1 *In situ* Hybridisierung

In situ Hybridisierungsexperimente mit spezifischen Digoxigenin-Sonden gegen *PAPC* zeigten, dass die *PAPC*-Expression in Est.10,25 am entstehenden Mesoderm am deutlichsten in fixierten, halbierten Embryonen visualisiert werden konnte (Abb.2.29). Die *PAPC*-Expression in Wildtyp-, Ko Mo-, sowie Pmm2 Mo- und Pmm2 Mo mit Pmm2 Rescue- Embryonen kann anhand der purpurnen Alkalischen Phosphatase Reaktion detektiert werden.

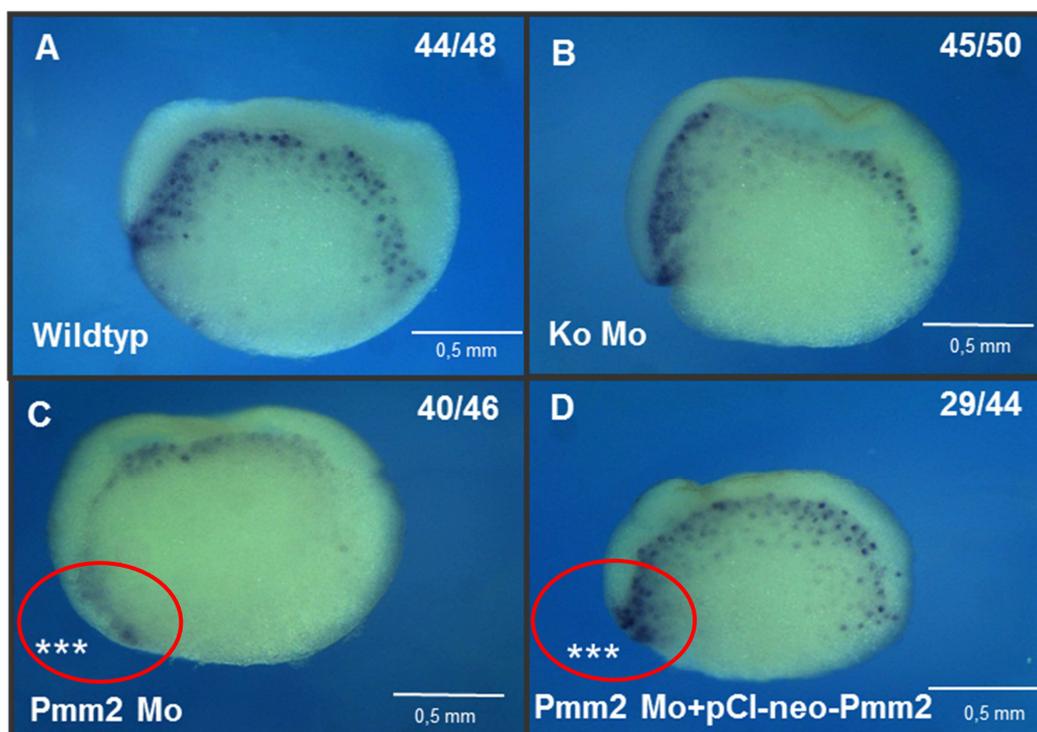


Abbildung 2.29: *PAPC In situ* Hybridisierungen. Uninjizierte Embryonen (Wildtyp; A) und Kontrollmorpholino-injizierte Embryonen (Ko Mo; B) zeigen bei der Analyse des *PAPC* in hemisektionierten Embryonen (Est. 10,25) ein deutliches Expressionsmuster, dessen Profil sich entlang des invaginierenden Mesoderms veranschaulichen lässt. Im Vergleich dazu zeigen Pmm2 Mo-Embryonen (Pmm2 Mo; C) des Est. 10,25 eine signifikant verminderte Expression, die durch die parallele Injektion des Wildtyp Pmm2 wieder hergestellt werden kann (Pmm2 Mo+pCl-neo-Pmm2; D) (** $p \leq 0.001$). Die roten Kreise verdeutlichen die zu vergleichenden Regionen der *PAPC*-Expression in der dorsalen Marginalzone(DMZ).

Ergebnisse

Die *PAPC*-Expression erstreckt sich im frühen Gastrula-Stadium von der dorsalen Urmundlippe und entlang des Randes des invaginierenden Mesoderms. Die Injektion des Kontrollmorpholinos wies im Vergleich zum Wildtyp *PAPC*-Expressionsprofils (91,7% +/-3,6%; n=48) keine Abweichungen (90,1% +/-3,2%; n=50; ***p≤0,0005) auf, wohingegen die *In situ* Hybridisierungen hemisektionierter Embryonen zeigten, dass durch die Pmm2 Mo Injektion die *PAPC*-Expression signifikant reduziert werden konnte (12,9% +/-6,1%; n=46; ***p≤0,0005). Weiterhin konnte der Defekt der Pmm2-Mo induzierten reprimierten *PAPC*-Expression durch die parallele Injektion der cDNA des pCl-neo NM_001094315.1-Konstruktes regeneriert werden (65,9% +/-1,4%; n=50; ***p≤0,0005).

2.8.1.2 Quantifizierung der *PAPC*-Expression

Zur Quantifizierung der *PAPC*-Deregulierung wurden in parallelen Ansätzen quantitative Realtime-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurde aus Embryonen des Est.10,25 die dorsalen Marginalzone DMZ geschnitten, um nach RNA Extraktion und cDNA Synthese das regionspezifische Pmm2-abhängige Expressionsprofil von *PAPC* zu analysieren, siehe Abb.2.30.

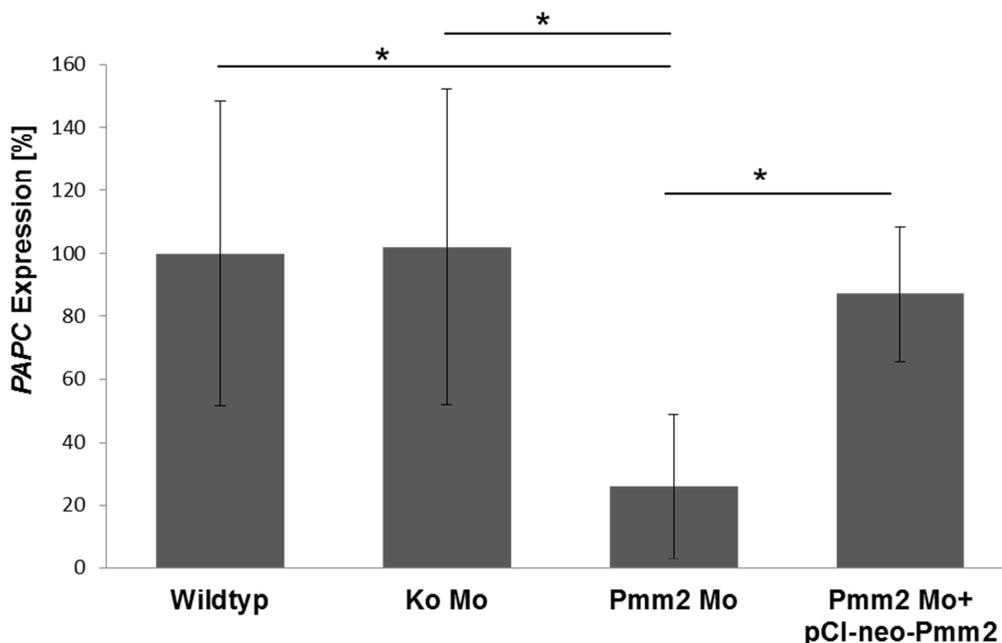


Abbildung 2.30: Quantitative RT-PCR von *PAPC* der *Xenopus laevis* DMZ 10,25. Die Analyse der *PAPC*-Expression durch die qRT-PCR bestätigt den signifikanten Verlust der *PAPC*-Expression durch einen Pmm2 Mo-Knockdown (Pmm2 Mo) im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen und Kontrollmorpholino-behandelten Embryonen. Die *PAPC*-Repression aufgrund des Pmm2 Mo konnte die parallele Injektion eines Pmm2-Plamids (Pmm2 Mo+pCl-neo-Pmm2) wieder signifikant hergestellt werden (n=9; *p≤ 0,02).

Die aufgeführten *PAPC* Expressionswerte ($y = 20,503x - 3,1973$) wurden mit der Expression des Referenzgens *Ornithin-Decarboxylase* ($y = 19,96x - 2$) normalisiert.

Die Werte der *PAPC* Expression im Wildtyp (Wt) wurden bei einer relativen ΔCq ($\Delta Cq = Cq_{(ZIELGEN)} - Cq_{(REF)}$; $Cq =$ ‚quantification cycle‘) -Expression von 3 (+/-1,5) detektiert und auf 100% (+/-48,4%) festgesetzt. Kontrollmorpholino (KoMo) injizierte Embryonen weisen zu Wt-Embryonen mit 102,2% (+/-50,1%) ein sehr ähnliches *PAPC*-Expressionslevel auf. Die relative *PAPC* Expression lässt sich durch einen Pmm2 Knockdown (25ng/E) auf einen ΔCq -Wert von 0,79 (+/-0,69) um 74% (+/-22,9%) reduzieren. Dieser Regulationsverlust der *PAPC* Expression auf 27% konnte mit der parallelen Injektion von 200pg eines XPmm2-pCIneo Rescue-Plasmids auf einen Wert der relativen ΔCq Expression von 2,63 (+/- 0,64) auf 87,1% (+/-21,3%) korrigiert werden, was durch die Wiederherstellung *PAPC*-hybridisierenden Expressionsprofils verdeutlicht wurde (Abb.2.29D).

Die durch Phosphomannomutase2 Morpholino induzierte, reduzierte Pmm2-Aktivität verursacht einen starken Defekt in der *PAPC*-Regulation, was durch einen signifikanten Signalverlust des *PAPC*-Expressionsmusters in den Hybridisierungs-Experimenten dargestellt werden kann.

2.8.2 Induktion eines spezifischen *Wnt5a/ ror2* ‚Gain of function‘

In Folge des Nachweises eines *PAPC*-Expressionsverlusts in der DMZ aufgrund reduzierter Pmm2-Aktivität sollte nun geprüft werden, ob eine Pmm2-abhängige Wnt-Glykosylierung einen Einfluss auf die Sekretionskapazität der Signaltransduktion hat. Die Spezifität des *PAPC*-‚readout‘ Targetsystems wurde durch ein induziertes ‚Gain of function‘ Experiment analysiert.

In der Animalen Kappe von *Xenopus laevis* ist in Est.9 eine geringe *PAPC*-Transkription detektierbar. Es ist jedoch möglich, in dieser Zone durch die frühe dorsale Injektion (4-Zellstadium) der beteiligten Komponenten *Wnt5a/ Ror2* nach Inkubation eine spezifische *PAPC*-Expression in der Animalen Blastulakappe zu bewirken. Hierzu wird *Wnt5a* mit und ohne Pmm2 Mo in die benachbarte dorsale Blastomere der *Ror2*-Blastomere injiziert.

Ergebnisse

Die Blastomere stellen dabei getrennte Kompartimente dar und ermöglichen den Nachweis einer Pmm2-sekretionsabhängigen *PAPC*-Induktion durch eine funktionale Wnt5a Glykosylierung.

Nach der Dissektion der Animalen Kappen in Est.9 wurde das *PAPC*-Expressionsprofil durch qRT-PCR quantifiziert, siehe Abb.2.31.

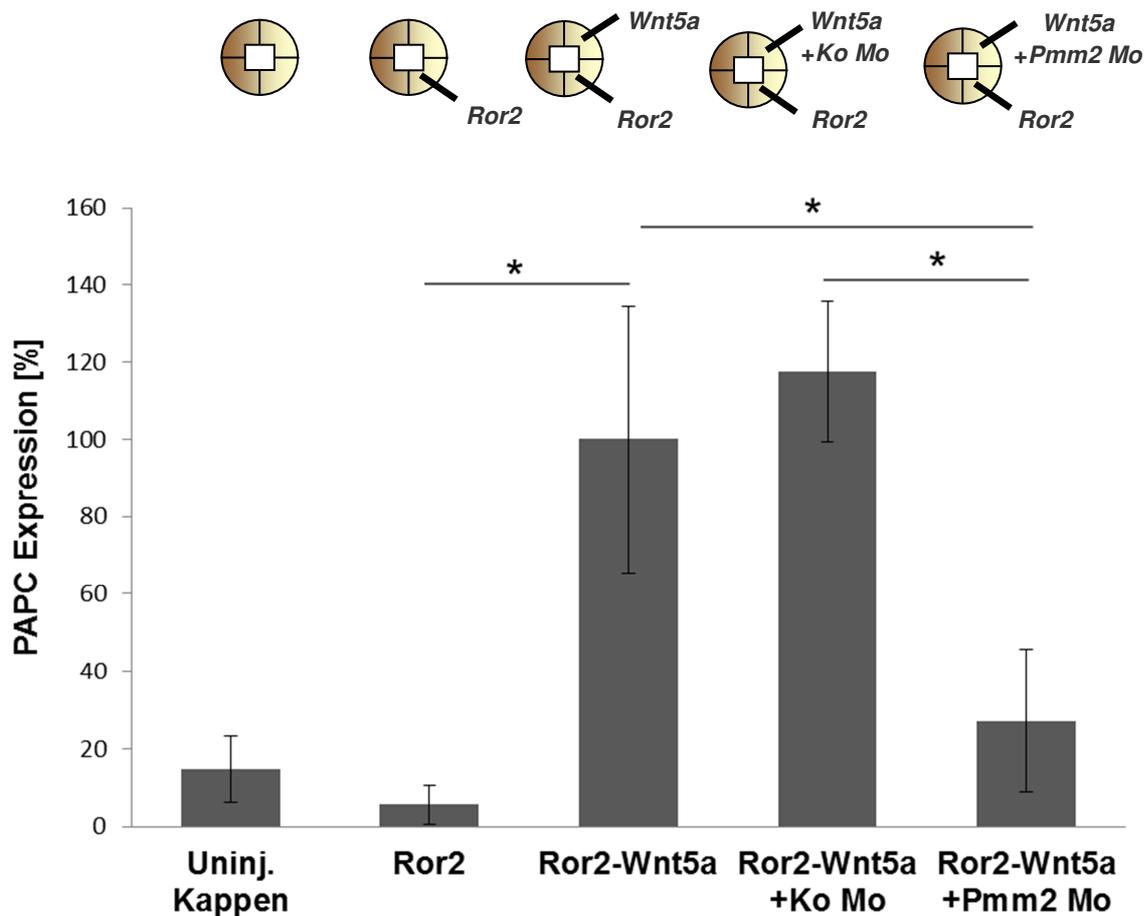


Abbildung 2.31: Quantitative RT-PCR für *PAPC*. Der induzierte Wnt5a/ Ror2 ‚Gain of function‘ in Animalen Kappen wurde durch die Injektion der beteiligten Komponenten in zwei dorsal benachbarte Blastomere generiert und verdeutlicht die sekretionsabhängige Wnt5a-Signaltransduktion (n=8; *p≤ 0,05). In uninjizierten sowie Ror2-Rezeptor injizierten Kappen war nur eine geringe *PAPC*-Expression nachweisbar. Die Sezernierung von glykosylierten Wnt5a und das Aktivieren des Ror2-Rezeptors führten zu einer *PAPC*-Expression, welche durch die parallele Injektion des Kontrollmorpholinos nicht beeinträchtigt wurde. Animale Kappen des induzierten ‚Gain of function‘, die mit dem Pmm2 Mo behandelt wurden zeigen einen Verlust der glykosylierungsabhängigen Sekretion.

Die ermittelten *PAPC*-Expressionswerte der qRT-PCR wurden mit der Expression des Referenzgens *Ornithin-Decarboxylase* normalisiert.

Die Animale Kappe des uninjizierten Embryos weist in Est.9 als Negativkontrolle eine geringe *PAPC*-Expression auf. Die relative *PAPC*-Expression beträgt 14,6% (+/-8,6%) im Verhältnis zu einer maximal induzierten *PAPC*-Expression.

Die Injektion synthetisierter *Ror2*-mRNA (50pg/5nl) in eine dorsale Blastomere weist ebenfalls nur eine sehr geringe *PAPC*-Expression (5,5% +/-5,0%) in der animalen Kappe des Blastula-Est.9 auf.

Erst die Kombination der Injektion von *Wnt5a*-mRNA (300pg/5nl) in eine dorsale Blastomere und die Injektion von *Ror2*-mRNA (50pg/5nl) in die benachbarte dorsale Blastomere induzierten ein klares *PAPC*-Expressionssignal (100% +/-34,6%) in der animalen Kappe in Est.9. Dieses induzierte *PAPC*-Expressionslevel wurde als maximaler Wert gesetzt, wodurch die Reduktion im Verhältnis dargestellt und der Durchschnitt quantifiziert werden konnte.

Die parallele Injektion von *Wnt5a* mit KoMo (25ng/E) in eine dorsale Blastomere und der erneuten Injektion des *Ror2*-Rezeptors in die benachbarte dorsale Blastomere zeigte mit einem induzierten *PAPC*-Expressionslevel von 117,6% +/-18,4% nur einen gering abweichenden Effekt.

Die Kombination von *Wnt5a* mit Pmm2 Morpholinos (25ng/E) in eine dorsale Blastomere und der erneuten Injektion des *Ror2*-Rezeptors in die benachbarte dorsale Blastomere bewirkte einen negativen Effekt auf das *PAPC*-Expressionsprofil (27,2% +/-18,4%) in der animalen Kappe des Est.9.

Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser *Wnt5a*-Signaltransduktionsdefekt aufgrund einer verminderten N-Glykosylierung spezifisch durch eine reduzierte Pmm2-Aktivität hervorgerufen wurde und sich durch eine reduzierte *PAPC*-Zielgenexpression detektieren ließ.

Diese Experimente verdeutlichen, dass die Funktionalität des induzierten *Wnt5a/ror2* ‚Gain of function‘-Assays abhängig von der N-Glykosylierung ist, die durch eine detektierbare *PAPC*-Expression in Animalen Kappen dargestellt werden kann.

2.9 Pmm2-abhängige Morphogenesebewegungen (Konvergente Extension)

Folgende Experimente zeigen Methoden der PMM2-CDG Analytik in *Xenopus laevis* betreffend der Pmm2-abhängigen Morphogenesebewegungen im Verlauf der Gastrulation.

Da in Pmm2 Mo-behandelten Embryonen das Muster der Genexpression nur in seiner regulatorischen Aktivität, nicht aber in seinem lokalen Expressionsverhalten gestört wird, wurden im folgenden DorsalMarginalZone (DMZ)-Explantate auf ihr morphogenetisches Verhalten mit und ohne Pmm2 Mo-Einfluss untersucht.

Nach der DMZ-Explantation erfolgte eine Aggregation der Zellen und eine anschließende Neuorganisation, die zu einer konvergenten Extension und einer geringen Konstitution führte, wie in Abb.2.32 dargestellt.

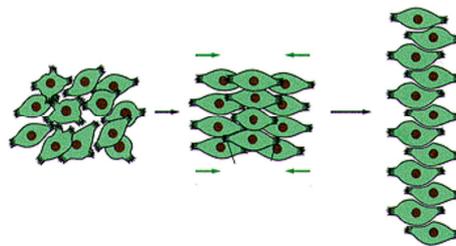


Abbildung 2.32: Schematische Darstellung der konvergenten Extension. Die Reorganisation explantierter Gewebe wird durch die Aggregation, Migration, Neuorganisation und Elongation der Zellen induziert (Adaptiert aus Alberts 2004).

Die DMZ wurden aus dem Est. 10,25 isoliert und über 28 Stunden mit der mesodermalen Seite auf einer Rinderserumalbumin (BSA)-beschichteten Schale inkubiert. Nach 28 Stunden wurden die DMZ-Explantate analysiert und dokumentiert. In der Abb.2.33 wird das morphogenetische Verhalten der DMZ-Explantate der Wildtypen und Pmm2 Mo behandelten Embryonen aufgeführt.

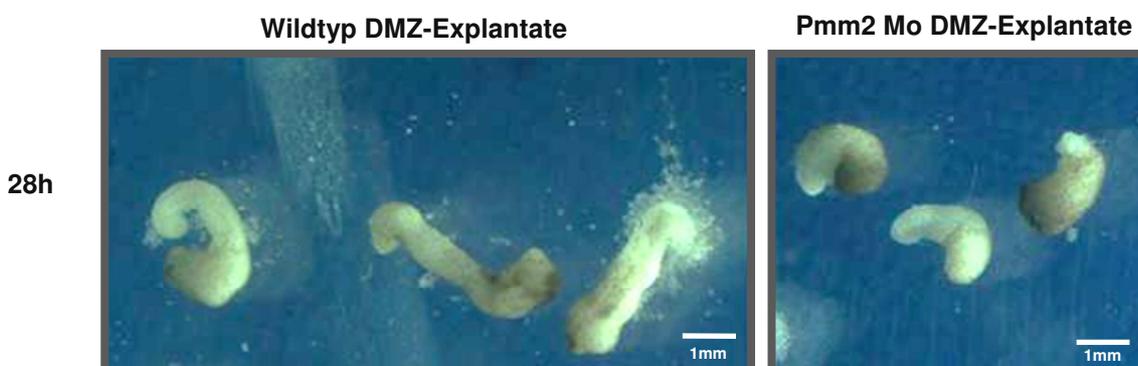


Abbildung 2.33: DorsalMarginalZone (DMZ) -Explantate. Im Vergleich zu Explantaten aus Wildtyp-DMZ zeigten Pmm2 Mo-DMZ nach 28 Stunden (h) eine signifikant reduzierte Elongation und einen deutlichen Verlust der konvergenten Extension.

Die Wildtyp DMZ-Explantate zeigten nach 28 Stunden eine eindeutige konvergente Extension, was zu einer starken Elongation und definierten Reorganisation des Embryos führte.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Explantaten kommt es in Pmm2 Mo-Explantaten aufgrund defekter N-glykosidischer Signaltransduktion zu einer deutlich verminderten Extension des Gewebes sowie zu einer stark verminderten Reorganisation des Embryos.

Die reduzierte konvergente Extension der DMZ Explantate Pmm2 Mo behandelter Embryonen wurde quantifiziert und in Abb.2.34 aufgeführt.

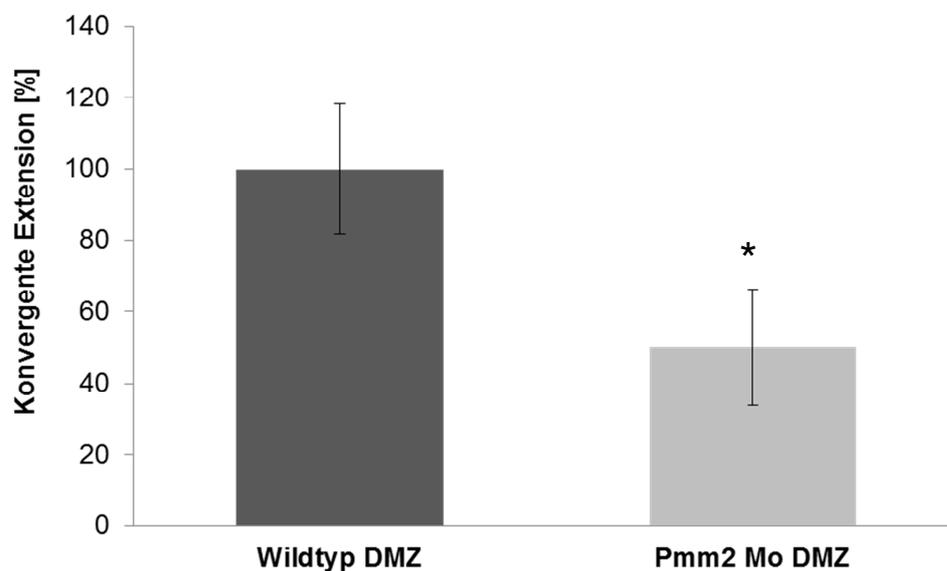


Abbildung 2.34: Quantifizierung der konvergenten Extension der DMZ. Im Vergleich zu Wildtyp-DMZ-Explantaten zeigten Pmm2 Mo DMZ-Explantate eine signifikante Reduktion der Extension um 50% (n=5; *p≤0,05).

Die Längen der Elongation ausgewachsener Wildtyp DMZ-Explantate und der DMZ Explantate aus Pmm2 Mo behandelten Embryonen wurden quantifiziert. Es zeigte sich ausgehend von der Wildtyp Extension von 100% +/-18,3% eine um 50% (+/-16%) verminderte Elongation in Pmm2 Mo DMZ, wodurch belegt wird, dass eine verminderte Pmm2-Expression einen Einfluss auf die konvergente Extension ausübt (n≥3, *p≤0,05).

Ergebnisse

Diese morphologische Inhibition ermöglicht weiterführende Analysen des beeinträchtigten Wnt-Signaltransduktionswegs, wobei die Liganden-Spezifität des Pmm2-Defektes in Bezug auf eine morphogenetische Regulation untersucht werden können.

Um eine Vorstellung zu bekommen, welche Vielfalt an Konsequenzen eine Pmm2-defiziente Entwicklung birgt, wurden abschließend Beispiele einer Pmm2-abhängigen Zielgenexpression aufgeführt.

2.10 Pmm2-abhängige Signalkaskaden

Zur Analyse, welchen Einfluss eine verminderte Pmm2-Expression im Generellen auf N-glykosylierungsabhängige Signalkaskaden haben kann, wurden exemplarisch *In situ* Hybridisierungs-Experimente spezieller Zielgene durchgeführt, siehe Abb.2.35.

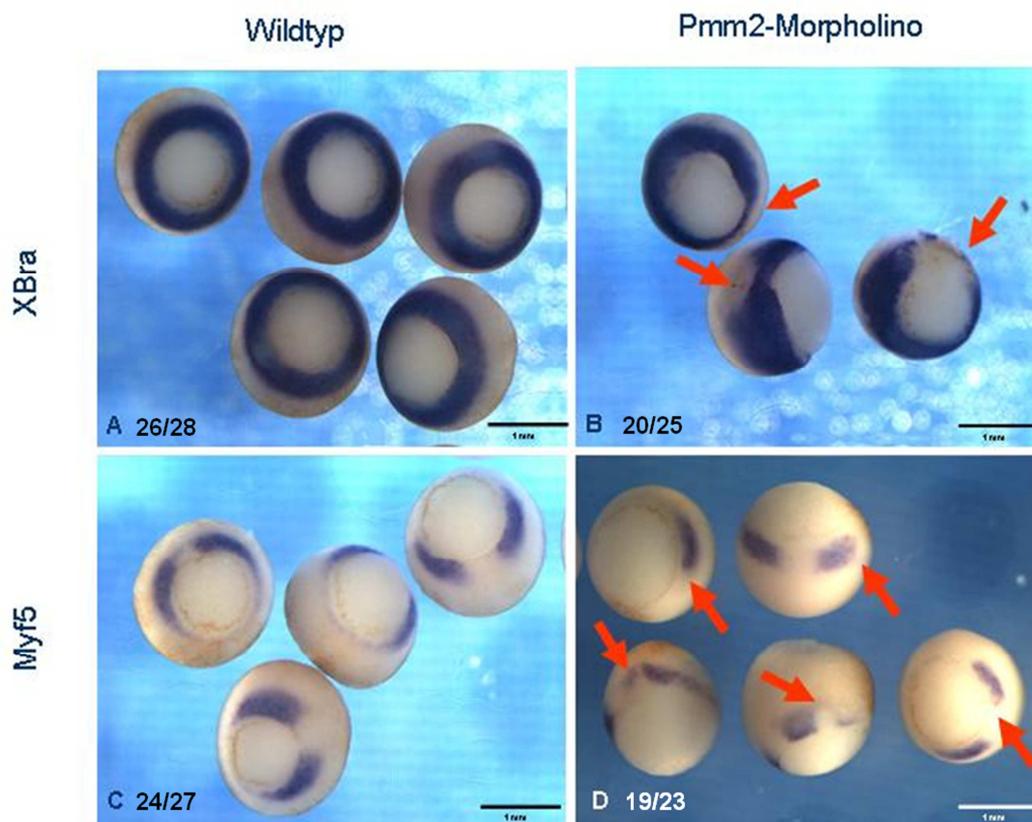


Abbildung 2.35: *In situ* Hybridisierungen detektieren definierte Zielgene in *Est.10,5*. (A) *XBra* - uninjizierte Embryonen (B) *XBra* - Pmm2 Mo injizierter Embryonen (C) *Myf5* - uninjizierte Embryonen (D) *Myf5* -Pmm2 Mo injizierter Embryonen.

Sowohl ‚*XBrachyury*‘ (*XBra*) (Abb.2.35A) als auch ‚*MyogenicFactor5*‘ (*Myf5*) (Abb.2.35C) zeigen ein spezifisches Hybridisierungsmuster des Expressionsprofils im frühen Gastrulastadium 10,5 und werden mit einer glykosylierten Wnt8-Regulation in Verbindung gebracht.

Eine defiziente Pmm2-Funktion führt bei beiden analysierten Zielgenen zu einer Reduktion der Expression in Regionen des mesodermalen Gewebes um den Blastoporus (Abb.2.35B,D)], womit der Bezug zu einer reprimierten Wnt8-Regulation erklärbar wäre. Auffallend ist zudem, dass Pmm2 Mo-Embryonen in der *XBra*-Analyse ein ausgedehntes diffuses Muster aufzeigen, welches jedoch untypisch für einen Wnt8-Verlust ist und wahrscheinlich eher der Defizienz eines N-glykosylierungs-abhängigen FGF-Rezeptors zuzuschreiben ist. Zukünftige Versuche sollen die Spezifität des glykosylierungsabhängigen Transduktionsverlustes durch parallele Injektionen betroffener Glykoproteine, beispielsweise Wnt8 oder FGFR, identifizieren und regenerieren können.

Das Zielgen-Expressionsprofil mit Hilfe von *In situ* Hybridisierungen veranschaulicht beispielhaft die Auswirkungen des Pmm2-Verlustes in der frühen Embryogenese.

Die regulatorische Beeinträchtigung eines PMM2-CDG-Defektes ist sehr vielfältig und die Pathophysiologie der Erkrankung sehr komplex. Um die Komplexität nicht kompliziert werden zu lassen, bedarf es einer Analyse definierter spezifischer Mediatoren, vergleichend der klinischen Phänotypen, damit interagierende pathophysiologische Prozesse identifiziert werden können.

3. Diskussion

Die Glykosylierung von Proteinen ist neben der Phosphorylierung eine der häufigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen in Flora und Fauna. Glykoproteine sind an intra- und extrazellulären Mechanismen beteiligt, wobei die korrekte Glykosylierung ausschlaggebend für die Ausübung ihrer biologischen Funktion ist. Die Kohlenhydratketten modulieren hierbei charakteristische physikalisch-biochemische Eigenschaften von Proteinen und haben somit direkten Einfluss auf zahlreiche zelluläre Wechselwirkungen bei der Regulation von Entwicklungsprozessen, insbesondere bei der Embryonalentwicklung (Dennis *et al.*, 1999; Haltiwanger und Lowe, 2004; Ohtsubo und Marth, 2006).

Erblich-bedingte Störungen der Glykokonjugat-Biosynthese im Menschen werden als ‚Congenital Disorders of Glycosylation‘ (CDG) bezeichnet. Bis heute sind mehr als 50 verschiedene CDG-Typen beschrieben und mehr als 1000 Patienten weltweit identifiziert (Cylwik *et al.*, 2013).

Obwohl intensive Studien in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen zu einzelnen Erkrankungstypen durchgeführt wurden, sind die pathophysiologischen Auswirkungen aufgrund verkürzter oder fehlender Oligosaccharid-Modifikationen in Bezug auf die Organentwicklung und den Verlauf der Erkrankung noch immer wenig verstanden. (Thiel und Körner, 2012; Cline *et al.*, 2012; Struwe und Reinhold, 2012; Chu *et al.*, 2013).

Die beim häufigsten CDG-Typ, PMM2-CDG vermindert vorliegende Phosphomannomutase2-Aktivität führt im Menschen zu schweren psychomotorischen und neurologischen Retardierungen sowie zu multisystemischen Auffälligkeiten, die durch den Verlust von Glykokonjugaten hervorgerufen werden (Jaeken, 2013).

Da morphogenetische Prozesse, vor allem die Gewebeseperation, im Verlauf der frühen Embryogenese stark von einer intakten Signaltransduktions-Regulation abhängt (Podbilewicz, 2004, Liwosz, A. *et al.*, 2006, Davidson *et al.* 2010, Heisenberg und Bellaiche, 2012; Santiago-Medina *et al.*, 2012), wurde als

Diskussion

Arbeitshypothese postuliert, dass es durch eine Fehlglykosylierung zu Veränderungen innerhalb der Zell-Zell-Kommunikation kommen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, N-glykosylierungsabhängige Funktionen der Signaltransduktion embryonal musterbildender und gewebedifferenzierender Prozesse, die durch eine generelle Hypoglykosylierung aufgrund eines Pmm2-Knockdowns im Krallenfrosch *Xenopus laevis* beeinträchtigt werden, zu untersuchen.

3.1 Phosphomannomutase2 (Pmm2) in *Xenopus laevis*

3.1.1 Identifizierung der Pmm2

Der Etablierung eines Pmm2-defizientes *Xenopus*-Modells bedurfte es zunächst der Identifikation und Definition der Phosphomannomutase-Genfamilie in *Xenopus*. Die Phosphomannomutasen werden in der kategorischen Klassifizierung der Familie der Mutasen sowie in die Klasse der Isomerasen eingestuft. Sie katalysieren die reversible Umlagerung von Mannose-1-Phosphat und Mannose-6-Phosphat.

Da sowohl im Menschen als auch in der Maus zwei PMM-Isoformen, PMM1 und PMM2, beschrieben sind (Schollen *et al.*, 1998; Heykants *et al.*, 2001), stand zu vermuten, dass auch im Frosch zwei Isoenzyme vorliegen, die vermutlich durch eine Gen-Duplikation vor 75-110 Mio Jahren entstanden sind (Quental *et al.*, 2010). Bisher führen lediglich Mutationen in der, bis auf im Gehirn, ubiquitär exprimierten PMM2 zu einer CDG-Erkrankung. Die Funktion des vor allem im Gehirn exprimierten paralogen Pmm1-Gens ist noch unklar und es ist fraglich, welche Rolle es in der Stoffwechsel-Prozessierung der frühen Embryogenese übernimmt. Ein Knockout der Pmm1 verursacht zudem im Mausmodell keinen klinischen Phänotyp (Cromphout *et al.*, 2006).

Neben Abweichungen in der Hydrophilizität lassen sich PMM1 und PMM2 vor allem durch ihre verschiedenen Proteingrößen unterscheiden. Sowohl die humane als auch die murine PMM2 ist kürzer als das entsprechende PMM1-Enzym. Aufgrund der abweichenden Datenlage der Aminosäuresequenzen für die beiden

Proteine bei *Xenopus laevis* stellte sich die Frage, ob in der Datenbank des ‚National Center for Biotechnical Information‘ (ncbi) ein Fehler vorlag.

Weiterführende Abgleiche der Proteinsequenzen von PMM1 und PMM2 des Frosches aus Daten von 2006 und 2011 zeigten, dass ein Vertausch der Daten stattgefunden hat (Stand: 26.01.2006; Locus Pmm1: AAH85032; Locus Pmm2: BC081220 – Gene ID:447608); (Stand: 07.09.2011; Pmm1 Gene ID: 447608; Pmm2 Gene ID: 444370).

Definierte Pmm2-Aktivitätsanalysen bestätigten nach heterologer Expression der *Xenopus* Pmm1 und Pmm2 in COS-7-Zellen eine deutlich höhere Pmm2-Aktivität des fälschlich postulierten Pmm1-Proteins. Da zudem der Antikörper gegen das humane Pmm2 nur das in COS-7-Zellen exprimierte *Xenopus* Pmm1-Enzym, nicht aber das *Xenopus* Pmm2-Protein detektierte, belegt die Summe der Ergebnisse die Verwechslung der Gensequenzen.

3.1.2 Expression von *Pmm2* während der Embryonalentwicklung

Um das *Pmm2*-Expressionslevel im Laufe der *Xenopus*-Entwicklung zu untersuchen, wurde gesamt-RNA aus *Xenopus*-Embryonen der Entwicklungsstadien 1 bis 46 (Befruchtung bis zur frühen Kaulquappe) extrahiert und die *Xenopus*-Pmm2-cDNA anschließend über RT-PCR, vergleichend mit den *Xenopus* Referenzgen *Ornithin-Decarboxylase* (ODC), amplifiziert.

Hierbei zeigte sich, dass die *Pmm2*-Genexpression in *Xenopus* schon sehr früh nachweisbar und in allen untersuchten Embryonalstadien ubiquitär vertreten ist, wodurch dieser Prozessierung eine essentielle Rolle im Verlauf der Embryogenese zugesprochen werden kann. Dies steht im Einklang mit Daten aus einem Pmm2-Knockout in der Maus, der zu einer sehr frühen embryonalen Letalität führt (Thiel *et al.*, 2006). Zudem wurde bis heute kein Patient mit der homozygoten Mutation p.R141H gefunden, die vergleichbar mit einem vollständigen Verlust der Pmm2-Aktivität ist (Schollen *et al.*, 2000). Ein Leben ohne PMM2 und damit ohne Glykosylierung scheint daher nicht möglich zu sein.

Diskussion

Eine Quantifizierung der *Pmm2* relativ zu *ODC* verdeutlicht, dass ab dem Embryonalstadium (Est.) 10 (Beginn der Gastrulation) die *Pmm2*-Transkription in den Embryonen stark exprimiert wird und sich auf einem konstanten Level bewegt. Das Est.10 veranschaulicht das zygotische *Pmm2*-Expressionsprofil, da der Embryo die ‚Midblastula Transition‘ bewältigt hat und die zuvor maternale, stabilisierende Komponente keinen Einfluss mehr auf die Entwicklung ausübt (Heasman 2006).

In *In situ* Hybridisierungsexperimenten konnte für das frühe Gastrulastadium 10,5 ein im Embryo ubiquitär verteiltes *Pmm2*-Expressionsmuster nachgewiesen werden.

Auch dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen aus der Maus und dem Menschen, was zeigt, dass die Glykosylierung in jeder Zelle eines Organs benötigt wird (Pirard *et al.*, 1997; Heykants *et al.*, 2001; Cromphout *et al.*, 2005; Ohtsubo und Marth 2006).

3.2 *Pmm2* Knockdown durch Antisense-Morpholinos

Da in *Xenopus laevis* die Adaption des *Pmm2*-CDG-Defektes aufgrund eines Mangels des Argonaute (Ago)-Proteins, nicht durch RNAi generiert werden konnte (Lund *et al.*, 2011; Flynt und Lai, 2011) wurde ein reprimiertes *Pmm2*-Expressionsmodell durch die Injektion von Morpholinos in das 2- bis 4-Zellstadium induziert (Summerton und Weller, 1997; Zhao *et al.*, 2012).

Nachfolgende Aktivitätsanalysen mittels radioaktiven *Pmm*-Flux-Assays und gekoppelten photometrischen *Pmm*-Kapazitäts-Assays erfolgten ab dem Blastulastadium Est.9, um den Effekt der zygotischen Repression durch die Antisense-Morpholinos definieren zu können (Heasman, 2002). Diese Methoden wiesen in ihren Auswertungen keine Abweichungen in dem Repressionsverhalten auf, weshalb die Analyse der *Pmm*-Aktivität aufgrund der hohen Probenzahl und aus Zeit/Kosten Gründen hauptsächlich durch Kapazitätsmessungen ermittelt wurde.

Die Spezifität des Pmm2-ATG-Morpholinos konnte durch die parallele Injektion von Pmm2-Plasmid-DNA belegt werden, wodurch die Pmm-Aktivität in den Embryonen nahezu normalisiert werden konnte.

Eine maximale Inhibition der Pmm-Aktivität von 60% konnte durch die Injektion von 25ng Pmm2-ATG-Mo pro Embryo im frühen Gastrula-Stadium 10,5 erreicht werden. Auch im Pmm2-CDG *Danio rerio*-Modell konnte durch einen Knockdown eine durchschnittliche Inhibition der Pmm2-Aktivität um 66,6% detektiert werden (Cline *et al.* 2012), was die Grenzen eines Knockdown-Tiermodells im Gegensatz zu Knockout-Tiermodell verdeutlicht. Dagegen zeigte die Injektion von 25ng Pmm1-ATG-Mo pro Embryo lediglich den Verlust von 38% der Pmm-Aktivität.

Da sich die Pmm1- und Pmm2-Morpholinos in ihrer Sequenz stark unterscheiden, kann der Verlust an Pmm- Aktivität nicht durch eine Kreuzreaktion des Pmm1-Morpholinos mit der Pmm2-mRNA erklärt werden. Dies führt weiterhin zu der Aussage, dass das Pmm1-Enzym nicht nur *in vitro* (Pirard *et al.*, 1999; Cromphout *et al.*, 2005), sondern auch *in vivo* Phosphomannomutaseaktivität ausübt, zumindest im Bereich der frühen Embryonalentwicklung. Die Kombination von 12,5ng Pmm1-ATG-Mo und 12,5ng Pmm2-ATG-Mo pro Embryo ergab eine reduzierte Pmm-Aktivität von 50%.

Es hat somit den Anschein, dass der Pmm-Morpholinoeffekt mit der eingesetzten Konzentration korreliert, so dass demnach 12,5ng Pmm1 Mo zu einer 20%-igen Reduktion der Pmm-Aktivität und 12,5ng an Pmm2 Mo zu einer Reduktion um 30% führen. Diese Annahme steht im Einklang mit der detektierten 50%igen Reduktion der Pmm-Aktivität.

3.3 Hypoglykosylierung durch Tunicamycin und Pmm2 Morpholino

Zum Nachweis, dass sich der Verlust der Pmm2-Aktivität auch auf Glykoproteinebene auswirkt, wurden Lektinbindestudien durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Wildtyp-Embryonen untersucht. Dabei wurde das Glykanprofil des Zytosols mit dem des Dotters verglichen. Es zeigte sich, dass auch im Dotter lektinbindende-Glykanstrukturen detektiert werden konnten. Das Ausmaß der Glykosylierung des Dotters betrug 60% im Vergleich zur Lysat-Glykosylierung,

Diskussion

wodurch aufgezeigt werden konnte, dass zum Nachweis einer Pmm2 Mo-induzierten Hypoglykosylierung ein dotterfreies Arbeiten notwendig war.

Damit zunächst die Auswirkungen einer nahezu vollständigen Inhibition der Glykoproteinbiosynthese auf die Embryogenese zu untersucht werden konnte (siehe unten), wurde der Hemmstoff Tunicamycin (Yuan *et al.*, 2007) verwendet. Neben seines inhibitorischen Effekts auf den Spindelapparat während der Mitose wirkt Tunicamycin vor allem reprimierend auf das Enzym UDP-N-Acetylglucosamine--dolichyl-phosphat N-Acetylglucosaminephosphotransferase (DPAGT1), das in den initialen Schritten des N-Glykosylierungswegs die Übertragung des ersten phosphorylierten N-Acetyl-glucosaminrests auf den Lipidträger Dolichol-Phosphat katalysiert. Es zeigte sich, dass durch die Inkubation der Froschembryonen in 5µg Tunicamycin pro ml Nährmedium über einen Zeitraum von 10h ein signifikanter Verlust von ca. 70% an proteinverknüpften Zuckerstrukturen im Embryonalstadium 10,5 erreicht werden konnte. Längere Inkubationen führten ebenso wie höhere Konzentrationen an Tunicamycin zur Letalität der Embryonen, was den Schluss nahelegt, dass das Überschreiten eines bestimmten Maßes an Hypoglykosylierung nicht mehr mit dem Leben vereinbar ist.

In weiterführenden Lektinbindestudien mit zytosolischen Extrakten von Wildtyp-embryonen der Entwicklungsstadien von Gastrula bis Neurula konnte zudem nachgewiesen werden, dass im Verlauf der Entwicklung das detektierte Glykanmuster an Signalstärke zunimmt, was auch hier die Bedeutung der Glykosylierung für diesen Bereich der Embryogenese hervorhebt. Im Gegensatz dazu wiesen Pmm2-Morpholino-injizierte Embryonen eine stark verminderte Detektion der Signale auf, wodurch eine induzierte Hypoglykosylierung im Verlauf der Embryogenese nachgewiesen und die Funktionalität des Froschmodells belegt werden konnte. Ein signifikanter Hypo-glykosylierung-Effekt auf durchschnittlich 45% konnte in Embryonalstadium 10,5 detektiert werden, weshalb vor allem dieses Gastrulastadium für weitere Analysen verwendet wurde. Bemerkenswert ist, dass in diesem Embryonalstadium die Pmm-Restaktivität von 40% nahezu mit dem reduzierten Glykosylierungsprofil korreliert.

3.4 Pmm2-abhängige Morphogenese in *Xenopus laevis*

Phänotypische Untersuchungen Pmm2-Morpholino-injizierter *Xenopus laevis* Embryonen zeigten in wiederholten Experimenten einen deutlich retardierten Verlauf der Embryonalentwicklung was sich vor allem in Gastrulationsverzögerungen und einer Fehlentwicklung des Blastoporus' äußerte. Auffällig im Verlauf der Entwicklung waren die Ausprägung eines Augendysmorphimus' und ein spitz zulaufender Kopf. Zudem wurden eine Malformationen des Herzens sowie des Magen-Darmtrakts beobachtet. Weiterhin zeigten Pmm2 Morpholino-injizierte Embryonen frühe Achsendefekte sowie eine Reduktion des Notochords.

Diese induzierten Retardierungen können zum Teil mit den beschriebenen Leit-Symptomen des PMM2-CDG Patienten wie eine verzögerte Entwicklung, Strabismus, zerebellare Hypoplasie, Kardiomyopathie und Skelett-Fehlbildungen, in Verbindung gebracht werden (Grünewald, 2009). Der klinische Phänotyp des Pmm2-CDG Patienten zeigt zudem oftmals eine schwere Verkrümmung des Rückgrats (Skoliose), was sich vergleichend in Pmm2 Morpholino-injizierten Embryonen in Form der reduzierten Körperachse und des verkürzten Notochords ausprägt.

Anders als bei dem vollständigen Abschalten der Glykosylierung durch Tunicamycin, was in einem schweren morphogenetischen Phänotyp mit einhergehender Letalität der Embryonen in der Neurulation resultiert (Yuan *et al.*, 2007), ermöglicht dieser Ansatz mit Pmm2-Restaktivität potentiell vergleichende Analysen der Pathogenese der Neuralinduktion, des Strabismus' (Engle, 2006) sowie der Skelettentwicklung (Giampietro, 2012). Diese Studien sollen in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Durch den Verlust an Pmm2-Aktivität ein morphogenetischer Phänotyp in den Embryonen generiert werden konnte stand zu vermuten, dass sich die generelle Hypoglykosylierung auch auf Glykoproteine innerhalb der Signaltransduktion auswirkt. Obwohl in allen Signaltransduktionswegen Glykoproteine beschrieben wurden, wiesen die morphogenetischen Auffälligkeiten in Pmm2 Morpholino-injizierten Embryonen auf eine Beeinträchtigung des nicht-kanonische Wnt-Signalwegs hin (Cohen *et al.*, 2008; Solis *et al.*, 2013; Alexandre *et al.*, 2014).

Diskussion

Wnt5a-Knockout Mäuse zeigen unter anderem eine reduzierte Körperachse sowie verkürzte Mandibeln, einen verkleinerten Kopf, reduzierte Gliedmaßen und einen Verlust des Schwanzes (Buttler *et al.*, 2013; Van Amerongen und Berns, 2006; Logan und Nusse, 2004). Des Weiteren gibt es Parallelen zum Menschen. Mutationen im Wnt5a- sowie im Ror2-Gen führen hier zum Robinow-Syndrom. Patienten sind überwiegend durch einen Kleinwuchs sowie durch Fehlbildungen des Kopfes und des Gesichtes gekennzeichnet (Person *et al.*, 2010; Brunetti-Pierri *et al.*, 2008; van Bokhoven *et al.*, 2000). Interessanterweise sind neben Wnt5a bis heute weitere 18 Wnt Proteine in Mensch und Maus identifiziert worden, die alle in glykosylierter Form vorliegen, was eine signifikante Funktion in der Signaltransduktion vermuten lässt (Harterink und Korswagen 2012; Willert und Nusse 2012; Yamamoto *et al.*, 2013; Kikuchi *et al.*, 2011).

3.5 Pmm2-Knockdown induziert eine Hypoglykosylierung von Wnt5a

In morphogenetischen Prozessen stellt die Wnt-Signalkaskade eine entscheidende regulatorische Komponente im Verlauf der Embryogenese dar (Yamaguchi, 2008; Solis *et al.*, 2013), weswegen der Wnt5a-Signaltransduktionsverlust anhand der APC-spezifisch regulierenden Wnt5a/Ror2-Kaskade (Shambony und Wedlich, 2007) untersucht wurde.

Wnt5a weist an den Positionen N114, N120, N312 und N326 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf. Zur näheren Analyse, ob sich durch den Einsatz der Pmm2-Morpholinos das Wnt5a-Glykosylierungsprofil in überexprimierenden Wnt5a-flag *Xenopus*-Embryonen verändert, wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Pmm2-Defizienz bewirkte den Verlust der Wnt5a-Glykokonjugate und führte nachfolgend zu einem Shift im Isoelektrischen Punkt zum Basischen.

Da bei einer 2D-Gelelektrophorese die Auftrennung in der ersten Dimension über die Ladung eines Proteins erfolgt, lässt sich eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch den Verlust von Hybrid-/Komplextyp-N-Glykanen aufgrund des Pmm2-Aktivitätsverlusts erklären (Barrabés *et al.*, 2010).

Eine α -flag-HRP-Analyse detektierte im 2D-Blot drei Punkte bei einer Höhe von 43kDa, welche der physiologischen Größe von Wnt5a entspricht. Ein aufgrund der reduzierten Pmm2-Aktivität erwarteter Massenverlust von ca. 2-6kDa wegen nicht übertragender N-Glykane auf das Wnt5a-Protein konnte in der 2D-Gel-elektrophorese nicht detektiert werden, weil in der zweiten Dimension ein Gradientengel verwendet wurde (Kurayoshi *et al.*, 2007; Barrabés *et al.*, 2010).

Die drei Spots wiesen darauf hin, dass mindestens zwei der potentiellen Glykosylierungsstellen auf Wnt5a Hybrid- bzw. Komplextypen darstellen, da nur diese N-Glykantypen terminale Sialinsäurereste tragen (Natsuki und Machida, 2005). Hierbei wurde aufgrund des Laufverhaltens vermutet, dass es sich bei Spot 3 um die Wnt5a-Variante handelte, auf der die meisten sialylierten N-Glykane vertreten sind. Spot 1 stellt die nicht-sialylierte Wnt5a-Variante und Spot 2 die einfach sialylierte Form dar.

Im flag-Blot konnte der sehr schwache dritte Spot bei den Wildtyp-Embryonen noch mit 10% des Wnt5a-Gesamtprofils detektiert werden, wogegen dieser Spot in Pmm2 Mo behandelten Embryonen nur noch 1% des Wnt5a-Vorkommens ausmachte. Bei Pmm2 Mo-Embryonen wurde zusätzlich ein starker Shift um bis zu 20% zu dem ersten basischen unterglykosylierten Wnt5a-flag Spot sichtbar.

Interessanterweise konnte nach dem Strippen der Blots, eines erneuten Blockens und einer ConA-Analyse dieser dritte vollglykosylierte Spot in beiden Blots deutlich verstärkt werden. Die ConA Markierung detektierte alle drei Spots des Wnt5-flag - Wildtyps sowie die der Wnt5a-flag -Pmm2 Mo Embryonen, zeigte jedoch ebenfalls eine signifikante Umverteilung des vorliegenden glykosylierten Wnt5a in Richtung des basischen pHs.

Die maximal glykosylierte Wnt5a-Variante wurde in Pmm2 Mo Embryonen im Vergleich zu Wildtypembryonen stark reduziert (von 27% auf 10%). Weiterhin verschob sich das Profil bei den Pmm2 Mo Embryonen deutlich zu einer Wnt5a hyposialylierten Form, so dass diese Variante 50% des detektierten Wnt5a-Profiles ausmachte, im Vergleich zu 38% bei den Wildtypembryonen. Obwohl das typspezifische N-Glykanprofil von Wnt5a in dieser Arbeit nicht aufgeklärt wurde,

konnte durch die 2D-Gelelektrophorese in Zusammenhang mit den ConA-Lektinstudien nachgewiesen werden, dass nicht nur sialylierte N-Glykane auf Wnt5a übertragen wurden, sondern sich auch mannosereiche N-Glykane detektieren ließen.

3.6 Pmm2 RNAi-Knockdown in Wnt5a-V5 L-Zellen

Um die glykosylierungsabhängige Signaltransduktion von Wnt5a zu untersuchen, wurden L-Zellen, die Wnt5a zusammen mit einem V5-Tag stabil exprimiert, mit Pmm2-siRNA behandelt. Dies ermöglichte zum einen den Nachweis im Western Blot, da gegen Wnt5a zurzeit kein funktionsfähiger Antikörper vorliegt. Zum anderen konnte die induzierte Glykosylierungsdefizienz in einem abweichenden Expressionssystem als dem Frosch analysiert werden.

Vergleichbar mit der Pmm2 Morpholino-Injektion in *Xenopus* konnte durch Pmm2-siRNA eine signifikante Reduktion der Pmm2-Expression um nahezu 65% erzielt werden, wodurch es nachfolgend zu einem signifikanten Pmm2-Aktivitätsverlust auf 35% kam. Durch diese Restaktivität wurde sichergestellt, dass die Zellen zwar einen Glykosylierungsdefekt aufwiesen (siehe unten 3.7), nicht aber so beeinträchtigt wurden, dass es zu Artefakten kam. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Pmm2-Aktivitätsverlust keinen Einfluss auf die β -Catenin-Expression hatte, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass eine Pmm2-Defizienz keinen Effekt auf den kanonischen Wnt-Signalweg ausübt.

3.7 N-Glykosylierungsabhängige Sekretion von Wnt5a in L-Zellen

Da das Maß der Glykosylierung das Sekretionsverhalten der Wnt-Liganden beeinflusst (Yamamoto *et al.*, 2013; Kikuchi *et al.*, 2013), wurde im Folgenden der Effekt der Wnt5a-V5-Sezernierung mit und ohne Pmm2-Repression untersucht.

Betrachtet wurden die Wnt5a-V5-Profile der Zelllysate im Vergleich zu dem immunopräzipitierten Wnt5a des Überstandes. Es stellte sich heraus, dass Wnt5a in vier verschiedenen Größen vorlag, was mit den Beobachtungen von Komekado

et al., 2007 bei der Analyse von Wnt5a in HEK-Zellen korreliert. Verwunderlich war jedoch, dass theoretisch fünf Größenprofile des potentiell vierfach glykosylierten Wnt5a auftreten müssten, da jeder Verlust eines Glykokonjugates in einem 1-2kDa Größenshift ersichtlich sein müsste (Roth *et al.*, 2012). Dies lässt vermuten, dass Wnt5a nur dreifach glykosyliert ist. Auch die Veröffentlichung von Komekado zeigt keinen Größenshift bei der Deletion von N120Q, welches der postulierten vierfach glykosylierten Variante widerspricht. Weitere Analysen von Wnt5a-Deletionsmutationen durch Massenspektrometrie werden folgen, um das genaue Glykosylierungsprofil zu beschreiben.

Die Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den V5-HRP detektierte in den Zelllysaten von L-Zellen, die entweder mit siRNA gegen Pmm2 oder Nonsense-siRNA behandelt wurden, abweichende Wnt5a-Größenprofile im Vergleich zum Zellkulturüberstand.

Im Zelllysate wurde Wnt5a-V5 bei einer Größe von 37kDa und 39kDa nachgewiesen, wogegen im Überstand Wnt5a-V5 bei einer Größe von 40kDa und 44kDa aufzufinden war.

Auffällig ist, dass die hochmolekularen Banden nicht in den Zelllysaten detektierbar waren, obwohl sich die vollglykosylierte Form in den Exosomen hätte befinden müssen. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass keine Ultrazentrifugation zur Auftrennung der einzelnen Kompartimente durchgeführt (Gross *et al.*, 2012), sondern aufgrund geringer vorliegender Materialmengen lediglich Gesamtzelllysate analysiert wurden.

Sowohl die nonsense-siRNA transfizierten als auch die mit siRNA transfizierten Zellen zeigten bei den Analysen in den Lysaten und Zellkulturüberständen jeweils zwei verschiedene Wnt5a-Profile. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen abweichend glykosylierter Wnt5a-Proteine unter physiologischen Bedingungen.

Bei den in den Zelllysaten detektierten Banden könnte es sich um die unglykosylierte Wnt5a-Variante (37kDa) sowie die mit einem mannosereichen N-Glykan besetzte Wnt5a-Variante (39kDa) handeln. Da nur sialylierte Wnt5a-

Diskussion

Proteine sekretiert werden, steht weiterhin zu vermuten, dass es sich bei den zwei Proteinformen im Zellkulturüberstand um Wnt5a mit einem (40kDa) bzw. zwei (44kDa) übertragenen Hybrid- bzw. Komplextyp N-Glykanen handelt. Diese Annahme wird weiter durch den ebenfalls durchgeführten SNA-Lektinblot bestätigt, wodurch lediglich sialyliertes Wnt5a aus dem Zellkulturüberstand detektiert werden konnte.

Dieses Glykosylierungsprofil deckt sich mit den Analysen des *Xenopus* Wnt5a-flag in der 2D-Gelelektrophorese, wobei die Spots 2 und 3 im ConA-Profil durch zwei Komplex/- Hybridglykane aufgrund der Sialylierung erklärt werden können und Spot 1 eine Überlagerung eines Mannosereichen ungeladenen Glykans und der unglykosylierten Wnt5a-Variante darstellen kann.

Damit abgeschätzt werden konnte, wie sich die detektierte Glykosylierung in Bezug auf das nachgewiesene Wnt5a-Protein verhält, wurde das SNA-Glykansignal durch das Wnt5a-V5-Profil normiert. Es zeigte sich, dass in Pmm2-defizienten Zellen im Vergleich zu nonsense-RNA transfizierten Zellen Wnt5a signifikant geringer (minus 70%) im Überstand vorlag. Hierdurch konnte belegt werden, dass eine induzierte Hypoglykosylierung durch Pmm2-Inhibition Einfluss auf das Sekretionsverhalten von Proteinen hat. In Kombination mit den o.g. Daten aus den Wnt5a-Flag-Experimenten in Froschzellen lässt sich schließen, dass dies in direktem Zusammenhang mit dem Verlust von N-Glykanen steht.

3.8 Wnt5a -Pmm2-abhängiger ‚Loss of function‘

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass ein Aktivitätsverlust von Pmm2 Einfluss auf das Sekretionsverhalten von Wnt5a hat, sollte in nachfolgenden Experimenten die Signaltransduktion auf Ebene der *PAPC*-Zielgenexpression im Wnt5a/Ror2-Weg überprüft werden (Shambony und Wedlich 2007). Da das Wnt5a-abhängige *PAPC* an der Involution des Mesoderms beteiligt ist (Kim *et al.*, 1998), lässt sich ein Verlust des Expressionsprofils weiterhin am dorsalen Urmund sowie in Zellen des invaginierenden Urdarms detektieren.

Die Pmm2-Abhängigkeit der PAPC-Signalkaskade wurde durch *In situ* Hybridisierung halbierter Embryonen gegen *PAPC* sowie durch quantitative Realtime-PCR gegen *PAPC* in DMZ-Explantaten untersucht. Hierbei zeigte sich jeweils eine signifikante Reduktion des *PAPC*-Expressionslevels in Pmm2-Morpholino injizierten Embryonen im Gegensatz zu Kontrollmorpholino injizierten Tieren. Der spezifische Pmm2-Effekt des Morpholinos konnte in wiederholten Ansätzen erfolgreich durch Rescue-Experimente mit einem Pmm2-tragenden Plasmid regeneriert und belegt werden.

3.9 Wnt5a/Ror2 induzierter ‚Gain of function‘ in animalen Kappen

Zum Nachweis, dass die Glykosylierung von Wnt5a entscheidend für die PAPC-Aktivierung des Wnt5a/Ror2-Signalwegs ist, wurden ‚gain of function‘-Studien durchgeführt. Hierzu wurden in ein 4-Zellstadium mit definierter Dorsal-/Ventral-Achse die Cap-RNA des Rezeptors *Ror2* und die Cap-RNA des Liganden *Wnt5a* in je eine der zwei benachbarten Blastomere animal dorsal injiziert. Parallel mit der Injektion der *Wnt5a*-RNA kann dabei auch entweder der Pmm2 Mo, der Ko Mo oder die Pmm2-cDNA injiziert werden. Die Embryonen wurden bis zum Embryonalstadium 9 (Nieuwkoop und Faber, 1967) kultiviert, die animale Kappe vor Entstehung der Dreikeimblättrigkeit präpariert und die Expression von *PAPC* mittels qRT-PCR analysiert.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Expression des *PAPC* in animalen Kappen durch einen induzierten Wnt5a/Ror2 ‚gain of function‘, ebenso wie bei der parallelen Injektion des Kontrollmorpholinos. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Reduktion von *PAPC* detektiert, wenn parallel zu *Wnt5a/Ror2* der Pmm2 Morpholino injiziert wurde. Auffällig ist, dass in den uninjizierten Kappen wie auch in den *Ror2*-injizierten Kappen eine geringe *PAPC*-Expression nachweisbar war. Dies lag vermutlich an der Präparation der animalen Kappen, wobei möglicherweise mesodermales Gewebe, in dem *PAPC* endogen exprimiert wird, mit in den Probenansatz überführt wurde.

Obwohl *PAPC* in viele Prozesse der frühen *Xenopus*-Embryogenese wie der konvergenten Extension und der Gewebeseperation involviert ist (Unterseher *et al.*, 2004), kann der beobachtete Pmm2-defiziente Phänotyp in den Embryonen

nicht alleine durch eine verminderte *PAPC*-Expression ausgelöst werden. Diese Annahme wird auch durch einen *PAPC* Mo-Knockdown in *Xenopus laevis* unterstützt, bei dem sich die behandelten Embryonen mit einem eher milden Phänotyp, der sich vor allem durch eine zeitlich verzögerte Bildung des Blastoporus sowie einen etwas verkürzten Körper im Kaulquappen-Stadium charakterisiert war (Medina *et al.*, 2004), präsentierten.

3.10 *Pmm2*-Defizienz beeinträchtigt die Konvergente Extension

Um zu überprüfen, ob die selektive Adhäsion des *Pmm2*-abhängigen *PAPCs* Einfluss auf die Gewebeseparation der DMZ in morphogenetischen Prozessen hat (Wallingfort *et al.*, 2002; Unterseher *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008), wurde die konvergente Extension, welche im Verlauf der Gastrulation eine spezifische Zellbewegung darstellt und an der Ausrichtung des Mesoderms beteiligt ist, untersucht. Da es in *Pmm2* Mo DMZ-Explants nur noch zu 50% der Erstreckung der Achse kam, konnte dadurch nachgewiesen werden, dass der *Pmm2*-Knockdown zwar nicht zu einer Beeinträchtigung des Patternings als strukturellen Anlageplan führte, jedoch frühe Defekte in der Morphogenese induziert.

Betrachtet man die reduzierte Kopf-Schwanz-Länge der *Pmm2*-defizienten Embryonen, kann diese Symptomatik neben dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg auch durch eine Fehlregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs durch die Inhibition des Wnt8-Glykoproteins ausgelöst werden. Diese Annahme beruht auf der Analyse von Yuan *et al.*, 2007, bei der *Xenopus* Embryonen mit dem Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin behandelt wurden. Folgende Realtime-Analysen spezifischer mesodermaler, endodermaler und neuroektodermaler Zielgene zeigten, dass der N-glykosidische Block neben vielen Fehlregulationen unter anderem auch eine reduzierte Wnt8-Expression detektiert werden konnte (Yuan *et al.*, 2007), weshalb sich nachfolgende Untersuchungen auf Zielgenexpressionsprofile von *Brachyury* (*XBra*) und *Myf5* konzentrierten, die mit Wnt8 in Zusammenhang gebracht werden (siehe 3.11).

3.11 Pmm2-abhängige Zielgenexpression

Damit der Einfluss einer induzierten Pmm2-abhängigen Hypoglykosylierung im Verlauf der Embryogenese verdeutlicht werden kann, wurden Zielgen-Expressionsanalysen von *Myf5* und *XBra* durch *In situ* Hybridisierung in Est.10,5 durchgeführt.

Bei den Loss of function- studien zeigte sich in wiederholten Versuchen ein abweichendes oder auch teils deutlich reduziertes *Myf5*- und *XBra*-Expressionsmuster bei den mit *Pmm2*-Morpholino-injizierten Embryonen, was vor allem durch einen deutlich sichtbaren Signalverlust, aber auch durch eine Expansion des Zielgens in Regionen des mesodermalen Gewebes um den Blastoporus sowie in der Region des Spemann-Regulators am Embryo charakterisiert war.

Ein solcher Signalverlust wies auf eine Störung im Wingless/ Wnt-Signalweg hin. Weil aktive Wnts zwei konservierte N-Glykosylierungsstellen aufweisen (Komekado *et al.*, 2007), kann diese Reduktion der *XBra*- als auch der *Myf5*-Expression beispielsweise mit einem regulatorischen Einfluss von Wnt8 in Verbindung gebracht werden, welches zwei definierte Glykosylierungsstellen aufweist.

Eine Verstärkung des Expressionsmusters von *XBra* wird auch bei der Regulation des Fibroblast Growth Factor' (FGF)-Signalings eine essentielle Rolle zugeschrieben (Lechter und Harland, 2008; Dorey und Amaya, 2010). Da unter anderem auf dem FGF-Rezeptor (FGFR) eine starke N-Glykosylierung nachgewiesen wurde (Duchesne *et al.*, 2006; Polanska *et al.*, 2009), kann vermutet werden, dass der Pmm2-Funktionsverlust auch diesen Signalweg beeinträchtigt.

Nähere Expressionsanalysen im Profil mit definierten Pmm2-Signaltransduktions-einfluss können in zukünftigen Projekten mittels ‚Digital multiplexed gene expression analysis‘ – einer Methodik des NanoString nCounter Systems zu schnelleren Ergebnissen kommen (Kulkarni, 2011).

Diskussion

Obwohl es sich hierbei nur um Vorläuferexperimente handelt, weisen die Ergebnisse der frühen Embryogenese des Frosches darauf hin, dass eine generelle Hypoglykosylierung Auswirkungen auf mehrere Signalwege hat.

4. AUSBLICK: Pmm2-abhängige Signalkaskaden

Nahezu jeder Signaltransduktionsweg von Wnt über Hedgehog, FGF und TGF- β weist glykosylierte Komponenten (Liganden oder Rezeptoren) auf, dessen interagierende Komplexität durch eine Pmm2-Defizienz multisystemische Konsequenzen hervorrufen kann (Abb. 4.1).

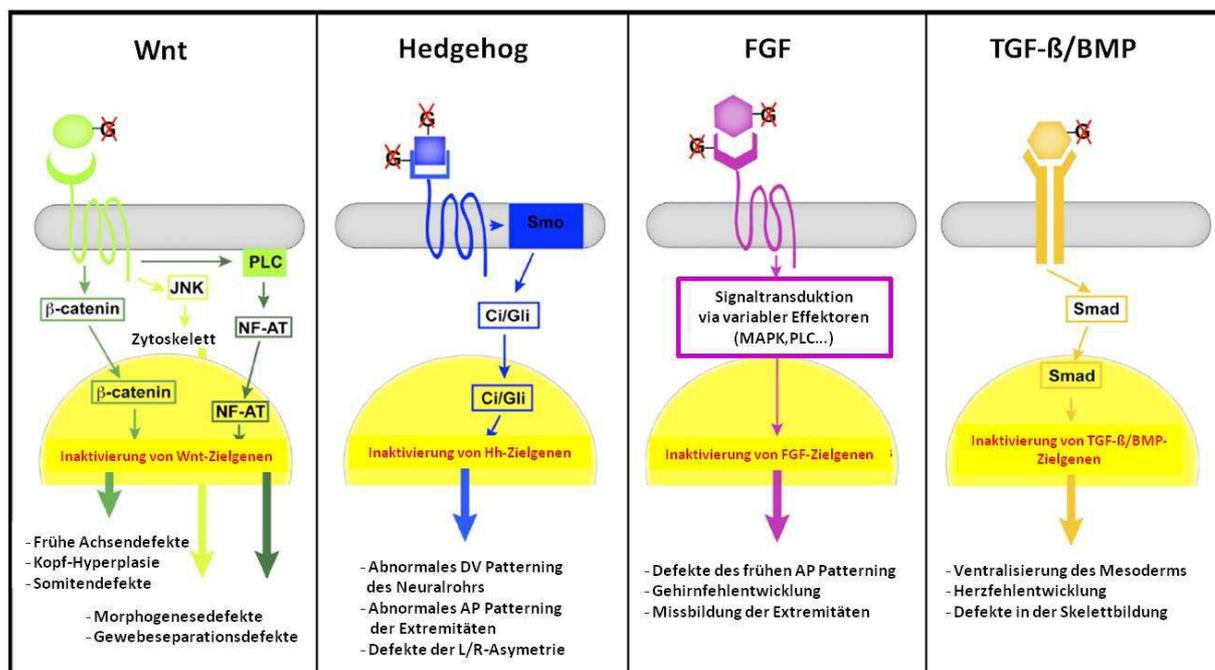


Abbildung 4.1: N-Glykosylierungsabhängige Signaltransduktion. Im Vergleich werden die potentiellen Auswirkungen einer fehlerhaften Signalkaskade aufgrund einer generellen Hypoglykosylierung verschiedener Signalmoleküle dargestellt. Jeder Signalweg wird schematisch mit den Haupteffektoren aufgezeigt. Die erwarteten Ergebnisse, abhängig von einer Pmm2-defizienten Aktivität, wurden bei jedem Signalweg unterhalb aufgeführt. In grün: Wnt-Signalweg; in blau: Hedgehog-Signalweg; in pink: FGF-Signalweg; in orange: TGF- β /BMP-Signalweg. In grau wurde die Plasmamembran dargestellt sowie in Gelb der Zellkern angedeutet. G: N-Glykosylierung; JNK: C-Jun N-terminale Kinase; PLC: Phospholipase C; smo: smoothened; Ci: Cubitus interruptus; DV: dorsoventral; AP: anteriorposterior; L/R: Links/Rechts; MAPK: Mitogen-aktivierte Kinase.

Wnt-Signalweg

Die Wingless/ Wnt-Proteine sind eine Gruppe Cystein-reicher Lipid-modifizierter Glykoproteine, die zur Aktivierung der kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade, der Wnt/ Ca^{2+} -Signalkaskade und der Signalkaskade der planaren Zellpolarität (PCP) führen. Der Signaltransduktionsmechanismus dieser Kaskade wird durch die Sekretion von Wnt in den interzellulären Raum aktiviert, was die Glykosylierung von mindestens zwei Asparaginresten im ER voraussetzt (Komekado *et al.*, 2007). Sezerniertes Wnt bindet auf der Zelloberfläche an

Ausblick

Proteoglykane der extrazellulären Matrix (EZM), bevorzugt an Heparansulfatproteoglykane (HSPGs). Die Interaktion zwischen Wnt und HSPGs scheint ebenfalls von der Glykosylierung abhängig und je nach Gewebe entscheidend für die Übertragung des Wnt-Signals zu sein (Reichman, 1996; Haeker, 1997). Ein Verlust der Glykosylierung der Wnt-1-Typ Liganden (kanonischer Wnt/ β -Catenin-Signalweg) sollte im Verlauf der Embryogenese zu frühen Achsendefekten sowie einer Kopfhypertrophie und Somatiddefekte (Abb.4.1) führen.

Da möglicherweise die reduzierte Kopfgröße der Pmm2 Mo-injizierten Embryonen durch ein stark hoch reguliertes Wnt-Signaling in der Zone des Kopf-Organisators, abhängig einer Dickkopf (Dkk) –Hypoglykosylierung, induziert werden kann (Hani *et al.*, 2011; Cruciat *et al.*, 2006), soll in folgenden Untersuchungen die glykosylierungsabhängige Dkk-Regulation, vergleichend der Wnt5a-Analyse, analysiert werden. In weiteren Ansätzen soll der Einfluss der Pmm2-defizienten Aktivität auf weitere Glykomarkerproteine studiert werden, welche beeinträchtigt sein könnten.

Neben weiteren Zielgenexpressionsstudien sollen spezifisch Rescue-Experimente mit den betroffenen Proteinen durchgeführt werden. Da der Verlust der *XBra* und *Myf5*-Zielgenexpression mit einer Hypoglykosylierung von Wnt8 in Verbindung gebracht werden kann (Martin und Kimelman, 2008; Baker *et al.*, 2010; Janda *et al.*, 2012), sollte der induzierte Pmm2-Defekt mit der zusätzlichen Gabe von Wnt8 spezifisch regeneriert werden können. Weitere Untersuchungen könnten ebenfalls zeigen, dass auch die Pmm2-abhängige konvergente Extension bei einem Pmm2-Mangel potentiell durch hypoglykosyliertes Wnt11 verursacht sein kann, wodurch ein Rescue mit Wnt11 spezifisch eingeleitet werden sollte.

Hedgehog-Signalweg

Wie Wnt-Proteine sind auch Hedgehog-Proteine (Hh) Lipid-modifizierte Glykoproteine. Sie tragen nur eine N-Glykosylierungsstelle, deren Bedeutung bezüglich des Hh-Signalwegs allerdings noch unklar ist. Dahingegen konnte für das N-Glykan auf dem Hh-Rezeptor 'patched' (*ptc*) die Notwendigkeit für die Bindung an Hh und die anschließende Signaltransduktion nachgewiesen werden (Marigo *et al.*, 1996). Daher ist anzunehmen, dass eine Hypoglykosylierung von

Hh und/ oder ptc eine abnormale Entwicklung, wie beispielsweise die dorsoventrale Musterbildung des Neuralrohrs, die anteroposteriore Musterbildung der Extremitäten sowie die Bildung der Links-Rechts-Asymmetrie, hervorruft (Abb.4.1). Da primär Defekte im Mittellinien-Signalweg zu erwarten sind, die in fehlerhaften Organsystemen wie Darm und Herz resultieren würden, sollen Pmm2-defiziente Embryonen älterer Stadien durch ‚clustered regularly interspaced short palindromic repeats‘ (CRISPR) histologisch und biochemisch charakterisiert werden.

‚Fibroblast Growth Factor‘ (FGF)-Signalweg

FGF-Proteine bilden eine große Familie von Signalmolekülen, deren N-Glykosylierung eine entscheidende Rolle zugesagt wird. In *Xenopus* wurde die Glykosylierung von FGF3 als essentiell für dessen Sekretion beschrieben (Kiefer *et al.*, 1993). Des Weiteren wurde die N-Glykosylierung des FGF-Rezeptors beschrieben, welche die Verbindung von FGF mit Heparansulfat reguliert und dadurch die Bindung von FGF reduziert (Duchesne 2006).

Eine Glykosylierungsdefizienz von FGF3 oder des Rezeptors aufgrund einer Pmm2-Defizienz sollte Defekte in der frühen anteroposterior Musterbildung sowie in der Bildung von Gehirn und Extremitäten sowie frühe Defekte in der Mesodermbildung und der anteroposterior Körperachse (Abb.4.1) induzieren. Um darzustellen, wie sich eine Pmm2-Defizienz beispielsweise auf die N-Glykosylierung des FGF-Rezeptors auswirkt, sollen folgende Analysen vergleichend der *PAPC*-Expressionsregulation mit dem FGF-abhängigen *ER81* durchgeführt werden. Der Ets Transkriptionsfaktor XER81 kann als Marker für Regionen mit aktiven FGF-Signaling in *Xenopus* Embryonen in Betracht gezogen werden (Münchberg und Steinbeisser, 1999).

Transforming Growth Factor/ Bone morphogenic protein-Signalweg

Das Protein DAN wurde als Mitglied der Familie der Transforming Growth Factor (TGF- β)/ Bone morphogenic protein (BMP) als Signalmolekül beschrieben, das dem BMP-Signalweg entgegenwirkt (Stanley *et al.*, 1998). DAN ist N-glykosyliert, wobei die Bedeutung der Glykosylierungsstelle für die Funktion des Proteins bislang nicht belegt werden konnte (Hung *et al.*, 2012). Sollte sie essentiell sein, könnte das Fehlen des N-Glykans zu einer gesteigerten Aktivierung der BMP-

Ausblick

Signalkaskade führen, was in einer Ventralisierung des Mesoderms sowie Defekten in der Bildung des Herzens und der Skelettentwicklung resultieren würde (Abb.4.1). Um zu beweisen, dass die Glykosylierung von DAN von der Pmm2-Aktivität abhängig ist und für seine Funktion essentiell zu sein scheint, sollen in folgenden Experimenten die DAN-abhängige Pmm2-defiziente *Xenopus* Embryogenese untersucht werden. Dabei sollen vor allem Pulldown-Analysen durchgeführt werden, um mögliche beeinträchtigte Proteininteraktionen dieser Signalkaskade zu untersuchen.

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Der Vektor (pCI-neo)

Die Klonierungen der in den Experimenten aufgeführten Konstrukte beruhen auf der Grundlage des mammalinen pCI-neo-Expressionsvektors (Promega, Mannheim).

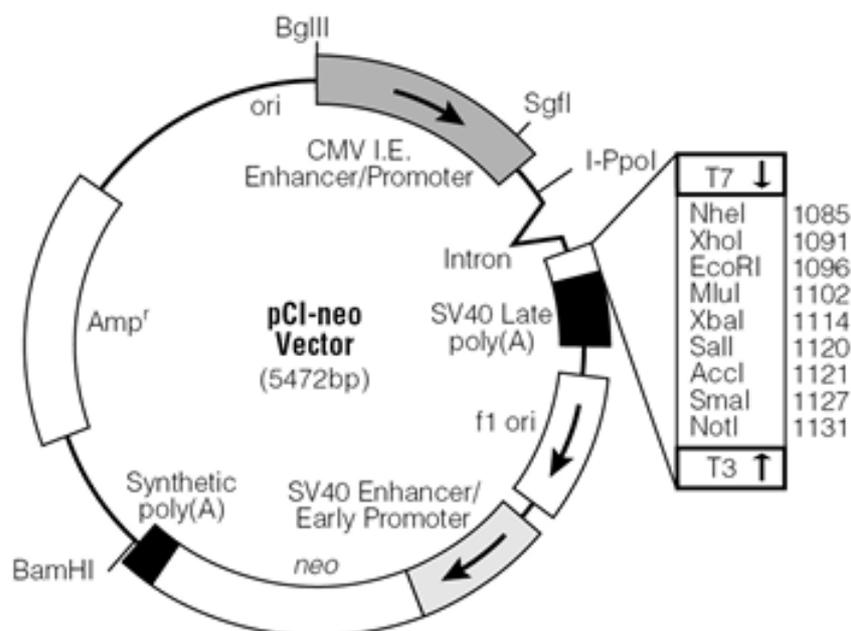


Abbildung 5.1: Aufbau des pCI-neo Vektors. Vermerkt ist das Gen für die Ampicillin-Resistenz (Amp^r), sowie eine Neomycin-Resistenz (neo). Die Polylinker-Region mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen (multiple Klonierungsstellen) befindet sich stromaufwärts vom Startpunkt für die *in-vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase (T7↓).

5.1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

5.1.2.1 Isolierung der DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA von pro- und eukaryotischen Zellkulturen wurde durch alkalische Lyse nach Sambrook *et al.* (2001) oder mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma nach Vorschrift durchgeführt.

Methoden

Die Isolation der Plasmid-DNA oder der PCR-Reaktionen aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma) unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Protokolle. Zur Elution der DNA wurden 50µl H₂O_{bidest} verwendet.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 2ml (für Minipräp) und 50ml (für Midipräp) in LB-Amp mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.2.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus 5 Embryonen, 10 Dorsal Marginal Zonen oder 10 animalen Kappen erfolgte unter Verwendung des MasterPure RNA Purification Kits (Epicentre Biotechnologies) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.1.2.3 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion

Zur Extraktion der Proteine und Lipide aus einer DNA-haltigen Lösung wurden die Proben einer PCI-Aufreinigung unterzogen, wobei Phenol die Proteine denaturiert und diese in der organischen Phase verbleiben.

Dabei wurde der Lösung dasselbe Volumen PCI (25:24:1) zugegeben, vermischt und anschließend für 5min bei 4°C bei 13.000rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der DNA wurde ohne Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Um letzte Phenol-Reste auszuwaschen, wurde die Probe mit demselben Volumen CI (24:1) versetzt, erneut vermischt und bei 5min bei 4°C bei 13.000rpm zentrifugiert.

Die obere Nukleinsäure-haltige, wässrige Phase konnte abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Abschließend wurde die Probe einer Alkoholpräzipitation unterzogen.

5.1.2.4 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren wurde eine Ethanol-Fällung angewandt. Routinemäßig wurde jedoch in diesen Versuchen eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

Dabei bildet die DNA beziehungsweise RNA in Gegenwart monovalenter Kationen einen unlöslichen Niederschlag (Dehydratisierung), wodurch eine Isolierung durch Zentrifugation ermöglicht wird.

Der zu präzipitierenden Lösung wurde 1/5 des Probenvolumens 3M NaAc pH 4,8 und die 5x Menge des Probenvolumens an 100% Ethanol zugegeben und durch pipettieren vermischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20min bei 13.000rpm bei RT. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in H₂O_{bidest} aufgenommen.

5.1.2.5 Qualitätsanalyse und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen wässriger DNA- oder RNA-Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm bestimmt (Photometer GensysTM 5/ Spectronic, Leeds, UK bzw. NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Delaware USA).

Dabei wurde eine optische Dichte (OD 260nm) von 1 einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40µg/ml RNA gleichgesetzt. Um Proteinverunreinigungen zu registrieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 280nm ermittelt. Ein Verhältnis von 1,8-2 gilt als Maß für geringe Verunreinigung durch Proteine (Sambrook et al., 1989). Die Qualität wurde zusätzlich in der Gelelektrophorese überprüft.

5.1.3 Restriktion der DNA

Plasmide und PCR-Produkte wurden mit FastDigest Restriktionsenzymen (Fermentas) in dem aufgeführten Reaktionsvolumen verdaut oder das Volumen wurde dem entsprechend der DNA-Menge angepasst:

1µg	DNA
2µl	FastDigest Reaktionspuffer
1µl	FastDigest Reaktionsenzym
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
20µl	

Methoden

Die Reaktionen wurden für 15min bei 37°C inkubiert und durch Hitze bei 80°C oder durch Ethanol-Präzipitation der DNA, inaktiviert. Eine anschließende Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese.

5.1.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld wurden 0,8 bis 2%ige Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer oder 1XTBE-Puffer verwendet. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 10µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Die DNA- oder RNA-Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer vermischt und auf ein TAE- oder TBE Agarosegel beladen.

Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA- oder RNA-Fragmente in dem entsprechenden Puffer bei 100-140V für ca. 90min.

Als Längenstandard wurde die 100bp DNA-Leiter oder die 1kbp DNA-Leiter von Fermentas verwendet.

Um die Nukleinsäuren darzustellen, wurde das interkalierende Ethidiumbromid des Gels bei 354nm angeregt und mit dem Gel-Dokumentations-System detektiert (Epi Chemie II Darkroom, UVP laboratory product).

Die gewünschte Bande eines DNA-Fragmentes konnte aus präparativen Gelen mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gelextraktion Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

5.1.5 Klonierung der Plasmid-Konstrukte

5.1.5.1 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende

Um eine Religation linearisierter DNA-Fragmente zu vermeiden, wurde eine Shrimp Alkaline Phosphatase zur Dephosphorylierung der 5'-Enden zugefügt. Dabei wurden 2µl direkt zu dem Restriktionsansatz dazugegeben und für 15min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsmix wurde im Anschluss direkt für 15min bei 65°C Hitze inaktiviert.

5.1.5.2 Ligation von DNA Fragmenten

Die Klonierung des zu analysierenden, verdauten DNA Fragments in den Zielexpressions-Vektor basiert auf der DUGAICZYK-Formel (Dugaiczky *et al.*, 1975). Diese besagt, dass das für eine optimale Ligation das zu klonierende DNA-Fragment in einem 2 bis 4-fachen molaren Überschuss im Verhältnis zur Vektor-DNA zugegeben werden muss.

Die Ligationen erfolgten mit der T4 DNA Ligase (Fermentas) nach den Herstellerangaben.

Die Ligationsreaktion wurde vermischt und 1h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend in kompetente *E. Coli* DH-5α oder *E. Coli* XL-1 Blue transformiert.

5.1.6 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation der Ligationsansätze in *E.coli* dient einer schnellen Amplifikation der gewünschten Plasmid-DNA. Durch eine Ampicillin-Resistenz kann die Selektion gewährleistet werden.

Bei dem Ansatz wurden 50µl der kompetenten Bakterien mit 50ng aufgereinigter Plasmid-DNA oder mit dem Ligationsansatz transformiert.

Elektro-kompetente Zellen wurden durch einen Elektropuls von 1.8V transformiert, wogegen chemisch kompetente Zellen durch einen Hitzeschock für 1min in 42°C und direkter Überführung in Eis für 5min transfiziert wurden. Den Bakterien wurde 500µl LB Medium zugegeben und für 1Stunde bei 37°C unter Schütteln ohne Antibiotika kultiviert. Anschließend wurden 50 bis 100µl der transformierten Bakterien auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Methoden

5.1.6.1 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte nach der Präparation der Plasmide durch GATC:

400ng	Plasmid-DNA
2µl	5x Puffer
1µl	Oligonukleotid-Primer (5µM)
5µl	dNTPs (2mM)
1µl	Big Dye
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
10µl	

5.1.7 cDNA-Synthese

5.1.7.1 DNaseI-Verdau

Zur Vermeidung unerwünschter, unspezifischer Reaktionen aufgrund genomischer DNA-Kontaminationen wurde die RNA-haltige Lösung vor der reversen Transkription einem DNaseI-Verdau unterzogen.

1µg	RNA (1µl@69µl H ₂ O [1:70] → A ₂₆₀ *40*70)
1µl	10x Omniskript-Puffer
1µl	DNaseI (Fermentas)
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
10µl	

Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert. Die DNaseI wurde anschließend durch eine Hitzebehandlung für 10min bei 85°C inaktiviert.

5.1.7.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ermöglicht das Umschreiben von mRNA in cDNA. Dabei wurden die 10µl DNaseI-Reaktion direkt für den reversen Transkriptionsansatz mit dem Qiagen Omniscript RT Kit verwendet.

1µg/10µl	RNA
2µl	10x Omniscript RT-Puffer
1,25µl	R1-Primer (10pmol)
1µl	RNase Inhibitor
2µl	dNTPs (5mM)
Xµl	H ₂ O RNase frei
1µl	Omniscript Reverse Transkriptase
<hr/>	
20µl	

Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C wurde die Reaktion für 15min bei 70° abgestoppt.

5.1.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht durch spezifisch gewählte Primer eine Amplifikation des gewünschten Genproduktes.

5.1.8.1 Klonierung eines PCR-Fragmentes

Für Klonierungen wurde die ‚proofreading‘ DNA Polymerase Pfu verwendet. Spezifische Primer beinhalten kompatible Restiktionsstellen, die benötigt werden, um das DNA Fragment durch spezifische Restiktionsmuster, zu integrieren.

Um in abweichenden Reaktionen generell die Retransformation des Ursprungsplasmids zu verhindern, wurde es vor der PCR Reaktion linearisiert.

In Klonierung erfolgte mittels nested PCR, bei der durch Schalten drei nacheinander folgender nur im Ansatz abweichender PCRs durch Primerüberlagerung das gewünschte Genprodukt stärker amplifiziert werden kann. Die folgenden Konzentrationen und Reaktionsvolumen wurden für die hintereinander geschaltete Amplifikation von NM_...315 (XPmm2) und NM_...472 (XPmm1) durch das aufgeführte Programm eingesetzt:

Nested PCR:

Programm	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	3min	Denaturierung
2.	95°C	30sec	Denaturierung
3.	55°C	30sec	Annealing
4.	72°C	3min	Elongation
5.	72°C	5min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	

Die Programme 2-4 wurden 35 mal wiederholt

Tabelle 2: PCR Programm der Amplifikation

Methoden

PCR #1:

5µl	Probe des RT-Ansatzes
5µl	10x Pfu-Puffer + MgSO ₄
1,25µl	F1-Primer (10pmol)
1,25µl	R1-Primer (10pmol)
1µl	dNTPs (10mM)
Xµl	H ₂ O
1µl	Pfu-Polymerase
<hr/>	
50µl	

PCR #2:

1µl	Probe der PCR#1
5µl	10x Pfu-Puffer + MgSO ₄
1,25µl	F2-Primer (10pmol)
1,25µl	R2-Primer (10pmol)
1µl	dNTPs (10mM)
Xµl	H ₂ O
1µl	Pfu-Polymerase
<hr/>	
50µl	

PCR #3:

3µl	Probe der PCR#2
5µl	10x Pfu-Puffer + MgSO ₄
1,25µl	Fw-NOTI-ATG-Primer (10pmol)
1,25µl	Rev-NOTI-TGA-Primer (10pmol)
1µl	dNTPs (10mM)
Xµl	H ₂ O
1µl	Pfu-Polymerase
<hr/>	
50µl	

Die routinemäßige Standard-PCR Ansatz erfolgte mit der Phusion Polymerase:

10ng	linearisierte Plasmid-DNA
10µl	5xHF Puffer
5µl	Primer Mix1 (je 10µM)
5µl	dNTPs (2mM)
Xµl	H ₂ O
1µl	Phusion
<hr/>	
50µl	

5.1.8.2 Site-directed Mutagenese (SDM)

Mittels Site-directed mutagenese PCR können Mutationen in ein Plasmid eingebracht oder deletiert werden.

Für die Konstrukte pCIneo #315 & #472 wurde das Protokoll des QuickChange™ Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die eingesetzten Mutagenese Primer werden im Materialteil aufgelistet.

100ng	linearisierte Plasmid-DNA
5µl	10xPfu-Puffer+ MgSO ₄
5µl	Oligonukleotid-Primer Mix (je 10µM=
5µl	dNTPs (2mM)
1µl	Pfu DNA-Polymerase (2,5U/µl)
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
50µl	

Der Vektor wurde mit dem folgenden PCR-Programm amplifiziert:

Programm	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	2min	Denaturierung
2.	95°C	50sec	Denaturierung
3.	58°C	50sec	Annealing
4.	68°C	10min	Elongation
5.	68°C	10min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	
Die Programme 2-4 wurden 25 mal wiederholt			

Tabelle 3: PCR Programm der SDM-Mutagenese

Da durch die synthetische Amplifikation keine Methylierung des mutagenisierten Plasmids erfolgt, ermöglicht ein DpnI-Verdau den Abbau parentaler nicht mutierter Template-DNA. Hierzu wurden die PCR-Produkte mit 10U DpnI für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend in *E.coli* transformiert.

Methoden

5.1.8.3 RT-PCR und qRT-PCR

Um Genexpressionen in *Xenopus*-Embryonen zu untersuchen wurde die Reverse Transkription verwendet. Isolierte Total-RNA aus ganzen Embryonen, DorsalMarginal-Zonen oder animalen Kappen wurde durch die M-MuLV Reverse Transkriptase (RT) in cDNA transkribiert.

Alle verwendeten Primer für die RT-PCR und die qRT-PCR werden bei den Primern im Materialteil aufgelistet.

Der RT-PCR Ansatz wurde in einer 10µl PCR-Reaktion durchgeführt und im Anschluss auf einem 1% Agarosegel analysiert.

1-3µl	cDNA
0,4µl	MgCl ₂ (10mM)
1µl	10x Reaktionspuffer
1µl	Primer-Mix (je 10µM)
1µl	dNTPs (2mM)
0,2µl	EuroTaq
Xµl	H ₂ O
10µl	

Programm	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	3 min	Denaturierung
2.	95°C	30 sec	Denaturierung
3.	55°C-65°C	30 sec	Annealing
4.	72°C	1-3 min	Elongation
5.	72°C	5 min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	

Die Programme 2-5 wurden 25-35 mal wiederholt

Tabelle 4: PCR Programm der RT-PCR

Zur Quantifizierung des Genexpressionsprofils wurden quantitative Real-time-RT-PCR Analysen mit Hilfe des qTowers (JenaAnalytik) durchgeführt.

Die qPCR Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

2µl	cDNA
10µl	Absolute™ QPCR SYBR® Green Rox Mix
0,4µl	Primer-Mix (je 10µM)
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
20µl	

Programm	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	25°C	15min	
2.	95°C	15min	Denaturierung
3.	95°C	15sec	40x Zyklen
4.	60°C	1min	Elongation
5.	100°C-25°C	5 min	Dissoziation
6.	@ 4°C	∞	
Die Programme 2-5 wurden 3-5 mal wiederholt			

Tabelle 5: PCR Programm der qRT-PCR

5.1.9 *In-vitro* Transkription von RNA

Für Mikroinjektionen wurde synthetisierte 5'Cap-RNA von linearisierten Plasmiden transkribiert. Dafür wurde das ‚mMessage mMachine High yield capped RNA Transcription kit (Ambion)‘ nach Herstellerangaben verwendet. Die folgende Reaktion wurde für 2h bei Raumtemperatur inkubiert.

1µg	Linearisiertes Plasmid
5µl	2x NTP/CAP
1µl	10x Reaktionspuffer
1µl	Sp6, T7 oder T3 Enzym-Mix
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
10µl	

Methoden

Anschließend wurde 1µl TurboDNAse zugefügt und die Reaktion für 15min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 15µl Ammonium Acetat Stop-Lösung dazugegeben und die Reaktion auf ein Gesamtvolumen mit 115µl Nuklease-freiem H₂O aufgefüllt.

Die synthetisierte CAP-RNA wurde über Ethanol-Fällung aufgereinigt, in 15µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde durch das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer quantifiziert und die Probenqualität durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

Digoxigenin- oder Fluorescein-markierte Antisense-Sonden für 'whole mount' *In situ* Hybridisierungen wurden von linearisierten Plasmiden *in-vitro* transkribiert. Dabei wurden Fluorescein/Digoxigenin-markierende Kits (Roche) in dem folgenden Ansatz verwendet.

1µg	Linearisiertes Plasmid
1µl	Digoxygenin markierender Mix
1µl	10x Transkriptionsspuffer
1µl	Ribolock RNase Inhibitor
1µl	Sp6, T7 oder T3 RNA-Polymerase
Xµl	H ₂ O
<hr/>	
10µl	

Die Reaktion wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der *in-vitro* transkribierten RNA durch Ethanol-Fällung.

Die synthetisierte Hybridisierungssonde wurde in 15µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Die Sondenqualität wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

5.2 Embryologie

5.2.1 *Xenopus laevis* Embryonen Kultivierung und Mikromanipulation

Xenopus Eier ovulutierender Weibchen, die 12h zuvor mit 500 IU humanen Chorion Gonadotropin (Sigma) behandelt wurden, wurden entnommen und *in-vitro* mit einem Stück mazerierten Hoden fertilisiert. Die Embryonen wurden nach 1h für 5min mit 2% Cystein-Lösung behandelt, um die Gallerthülle zu entfernen, wodurch eine Mikroinjektion in 1xMBSH ermöglicht wird.

Die Mikroinjektion von Pmm2-Antisense-Morpholinos oder *in-vitro* synthetisierter 5'CAP-RNA erfolgte im 2-4 Zellstadium der Embryonen mit einem IM300 Mikromanipulator und ausgezogenen Glaskapillaren. Die Injektionen wurden auf 5nl kalibriert und unter konstanten Zeit und Druckbedingungen durchgeführt.

Die Embryonen wurden in 0,1xMBSH kultiviert und die Entwicklung nach Nieuwkoop und Faber definiert (Nieuwkoop und Faber, 1975).

5.2.2 Whole mount *In situ* Hybridisierung

Die Whole mount *In situ* Hybridisierung ermöglicht die Analyse des räumlichen Expressionsmusters endogener mRNA im Embryo.

Diese Methode basiert auf einer Epitop-erkennenden Antisense-RNA Sonde, welche die zu analysierende endogene RNA hybridisiert. Diese synthetisierte RNA-Sonde wurde mit einer Digoxigenin- oder Fluoresceinmarkierung versehen, welche durch einen Epitop-spezifischen Antikörper, mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt, durch einen Substrat-induzierten Farbumschlag lokalisiert werden kann.

In situ Hybridisierungen halbierter Embryonen und die Präparation der Antisense Proben wurden nach Epstein *et al.*, 1997 durchgeführt.

Methoden

Für die Detektion wurden Anti-Digoxigenin-AP und Anti-Fluorescein-AP Antikörper (Roche) verwendet. BMPurple (Roche) wurde als Substrat der Alkalischen Phosphatase eingesetzt.

Die Embryonen wurden 2h bei RT mit MEMFA fixiert und über Nacht mit 100% Methanol bei 4°C entwässert. *In situ* Hybridisierungen wurden wie folgt durchgeführt:

Tag 1:

- Rehydratisierung der Embryonen für 5 min in je 75%, 50% and 25% MeOH in PBST
- 2x 5 min PBST
- Proteinase K Verdau: 10µg/ml in PBST, 30min auf RT, halbierte Embryonen 10min auf RT
- Refixierung der Embryonen in 4% PFA/PBS für 10min bei RT
- 4x 5min PBST
- 1ml Hybridisierungspuffer/PBST (1:1) für 5min auf RT
- 1ml vorgewärmter Hybridisierungspuffer 5min bei RT
- 1ml Hybridisierungspuffer 1Stunde bei 65°C
- 1ml frischer Hybridisierungspuffer 2-4Stunden bei 65°C
- Hybridisierung der Antisense-Sonde: 1µl Sonde/1ml Hybridisierungspuffer über Nacht bei 65°C

Tag 2:

- 1x 5min 50% Formamid/0,1% Chaps/5x SSC (vorgewärmt auf 65°C) bei RT
- 1x 5min 25% Formamid/0,1% Chaps/3,5x SSC bei RT
- 1x 5min 2x SSC/0,1% Chaps (vorgewärmt auf 37°C) bei RT
- 2x 25min 2x SSC/0,1% Chaps bei 37°C
- 1x 5min 0,2x SSC/0,1% Chaps bei RT
- 2x 30min 0,2x SSC/0,1% Chaps bei 60°C
- 2x 5min 0,2x SSC/0,1% Chaps bei RT
- 2x 10min 0,2x SSC/0,1% Chaps bei RT
- 1x 10min 0,2x SSC/0,1% Chaps:MABT (1:1) bei RT

- 2x 5min und 2x 10min MABT bei RT
- 1x 1Stunde 1ml MABT/2% BBR
- 1x 1Stunde 1ml Blocklösung
- Antibody: α -Dig-AP (1:10000), α -Flu-AP (1:10000) über Nacht bei 4°C

Tag 3:

- 2x 30 min MABT bei RT
- 4x 1Stunde MABT bei RT
- Färbung der Embryonen mit pH 9-Puffer/BMPurple (1:1) im Dunklen
- Abstoppen der Reaktion durch Waschen: 2x in PBS
- Refixierung der Embryonen in 3,7% Formaldehyde/PBS über Nacht bei 4°C

Pigmentierte Embryonen wurden mit 1% H₂O₂/5% Formamid in 0,5x SSC unter intensivem Licht gebleicht.

5.2.3 Animal Cap Assay

Animale Kappen wurden aus Embryonen des Blastula-Stadiums 9 explantiert. Im ersten Schritt wurde die Vitellin-Membran der Embryonen entfernt und der pigmentierte animale Pol mit Hilfe von zwei Pinzetten ausgeschnitten.

Die animalen Kappen wurden für 30min in 1xMBSH kultiviert und in N_{2liq} fixiert.

Für den Animal Cap Assay wurde Embryonen im 4-Zellstadium in eine der dorsalen Blastomere 500pg *Wnt5a* Cap-RNA entweder alleine, mit Ko Mo oder mit dem Pmm2 Mo [25ng] injiziert. Weiterhin wurde in die benachbarte dorsale Blastomere 100pg *ror2* Cap-RNA injiziert.

Nach der Animal Cap-Isolierung in Stadium 9 und der gewebsspezifischen RNA-Aufreinigung konnten qRT-PCR Analysen des PAPC-Expressionlevels zu einem induzierten ‚Gain of function‘ durchgeführt werden.

5.2.4 Dorsal Marginal Zonen-Explantate

Um konvergente Extensions-Bewegungen *in vitro* zu untersuchen, wurden Explantate der Dorsal Marginal Zonen (DMZ) gastrulierender Embryonen angefertigt.

Zuvor wurde den Embryonen in die 2 dorsalen Blastomere des 4-Zellstadiums Pmm2 Mo [25ng/E] injiziert.

Anschließend wurden die DMZ in Stadium 10,5 nach Keller *et al.* 1992 präpariert und mit der mesodermalen Seite auf einer 2% BSA beschichteten Petrischale in 1xMBSH eingedeckelt und auswachsen lassen.

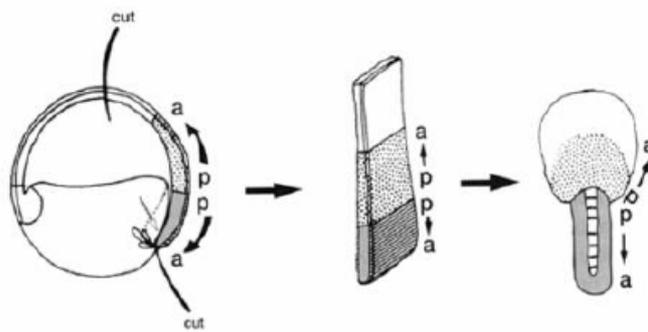


Abbildung 5.2: Dorsal Marginal Zonen Explantate

Elongierende Explantate wurden nach 28 Stunden dokumentiert und die konvergente Extension durch Abmessen der Elongation analysiert.

5.2.5 Lektin Histochemie und Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Glykokonjugation in *Xenopus laevis* wurden Lektin-spezifische Analysen in histologischen Präparaten durchgeführt.

Die Embryonen wurden für 2 Stunden auf RT oder bei 4°C über Nacht in MEMFA (4% Formaldehyde, 0.1M MOPS (pH 7.4), 2mM EGTA, 1mM MgSo₄) fixiert und mit 100% Methanol über Nacht bei -20° dehydriert.

Nach der Fixierung und Rehydrierung wurden die Embryonen in Paraffin eingebettet. Die Embryonen wurden mittels Leica Mikrotom in 5µm Schnitte sektioniert und durch eine Biotin-konjugierte Lektin-Markierung analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem sekundären Streptavidin-FITC tragenden Antikörper (Vector Laboratories) durch einen Fluoreszenz-Nachweis. Die Markierung wurde mit einem Leica-Mikroskop, Kamera und Software System dokumentiert.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Phosphomannomutase2 (PMM2) Aktivität

5.3.1.1 Radioaktiver Pmm2-[³H] Mannose-6-Phosphat-Assay

Die enzymatische Aktivität der Phosphomannomutase wurde in *Xenopus* Embryonen, des frühen Gastrulastadiums 10,5, durch die Analyse des direkten Fluxes von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat bestimmt.

Zuerst wurden die Embryonen mit einem spezifischen Pmm2-Lysispuffer (20mM HEPES pH7,1, 25mM KCl, 1mM DTT, 10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Antipain) versetzt und für 30min bei -80°C gelagert.

Die Zellen wurden mit einer 22G Kanüle aufgeschlossen und für 2x15min bei 45.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dotterfrei isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt (Lowry et al., 1951).

Die durchgeführten Aktivitätsanalysen erfolgten mit 4µg Gesamtprotein in *Xenopus* Proben (8µg Maus L-Zellen; 12µg humane Fibroblasten) in einem 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM MgCl₂, 50.000 d.p.m. [³H]Mannose-6-phosphat, 1mM Glucose-1,6 bisphosphat Puffer für eine Reaktionsdauer von 30min bei 37°C.

Die Reaktionsprodukte von [³H]Mannose-6-Phosphat zu [³H]Mannose-1,6-bisphosphat wurde durch die Hochspannungspapierelktrophorese (Whatman 3MM) mit einem 80mM Pyridin-Puffer pH 5,5 bei 2600V für 45min separiert.

Die Evaluation der Reaktion erfolgte durch den Vergleich des Verhältnisses der Menge des konvertierten Monophosphates im Vergleich zum Pyrophosphat. Durch die Analyse der cpm der detektierten Spots in einem Flachbettscanner (Argon/Methan) konnte die spezifische Pmm2-Aktivität quantifiziert werden.

5.3.1.2 Substratherstellung von [2³H] Mannose-6-Phosphat

Die Herstellung des radioaktiven Pmm2-Substrates erfolgte durch eine Hexokinase-Reaktion. Dabei wurden 200µl der [2³H]Mannose mit 100mM ATP und 2U Hexokinase für 8h bei 37°C inkubiert und bei -80°C weggefroren. Die Auftrennung der radioaktiven Mannosen erfolgte auf einem 3MM Whatman über die Hochspannungselektrophorese (2h bei 100V) und anschließender Detektion des Substrates durch den Flachbettscanner. Das Substrat [2³H]Mannose-6-Phosphat wurde aus dem Whatman-Papier ausgeschnitten und in einem 50ml Falcon und 20ml HPLC-H₂O für fünf Tage bei 4°C auf einem Drehrad extrahiert.

5.3.1.3 Gekoppelt photometrischer PMM2-Assay

Die enzymatische Aktivität der Pmm2 wurde auch in Form von Kapazitätsmessungen in einem gekoppelt-photometrischen Ansatz detektiert.

Dieser Ansatz beruht auf der Detektion einer spektrometrischen Veränderung durch eine Reduktion von NADP⁺ zu NADPH bei A_{340nm} im Verlauf der enzymatischen Reaktion von 120min bei 37°C.

Die Embryonen wurden mit dem Pmm2-Lysispuffer, wie in 7.3.4.1 beschrieben, aufgeschlossen und der dotterfreie Zellextrakt isoliert.

Für die Analyse der Pmm2-Aktivität wurden zwei Reaktionspuffer angesetzt. Der chemische Reaktionspuffer bestand aus 50mM HEPES pH 7,1, 1,6mM NADP, 35mM MgCl₂, 10µM Glucose-1,6-diphosphat. Der zusätzliche Pmm2 Enzympuffer bestand aus 250mU Phosphogluco-Isomerase (PGI), 250mU Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) and 250mU Phosphomannose-Isomerase (PMI).

Die Reaktion wurde mit 30µg Gesamtprotein mit und ohne Zugabe von 10mM Mannose-1-Phosphat als Substrat in Doppelansätzen wiederholt durchgeführt.

Die enzymatische Aktivität unter den Umständen des Kapazitätsassay beschreibt, dass 1U der Formation von 1µmol NADPH/min entspricht.

5.3.2 SDS Page und Western Blot Analysen

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-Page) wurden denaturierte Proteine der Zelllysate durch SDS einer negativen Ladung ummantelt und im elektrischen Feld abhängig ihres Molekulargewichtes voneinander getrennt.

Fünf ganze Embryonen oder 10 Animale Kappen wurden in einem neutralen Western Blot Puffer (1x TBS, 1% Triton X-100 und 1x Protease Inhibitor) mit einer 20G Kanüle mechanisch aufgeschlossen, 3x für 10Stöße mit dem Ultraschall belastet und 1-2 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2x für 30min bei 45.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dotterfrei isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt (Lowry *et al.*, 1951).

Die einzusetzende Proteinkonzentration variierte abhängig der Fragestellung zwischen 5-100µg. Die Proben wurden mit Probenpuffer versehen und bei 95°C für 5min denaturiert (Laemmli, 1970).

Die Extrakte wurden in einem 10-15% Polyacrylamidgel durch SDS-Page (Laemmli, 1970) bei 160V aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membrane (GE Healthcare) mittels einen Semi-dry Elektrophoretischen Transfer geblottet (1mA/cm²; 50min).

Die Membran wurde mit entweder mit PBS-T (0,1%)+ 5% Milchpulver, PBS-T (0,5%) oder TBS-T (0,5%) für 2 Stunden auf RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Nach dem Block wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern oder mit biotinylierten Lektinen, wie ConA, SNA und WGA (Vector Laboratories, [1mg/ml], 1:1000, 2Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C) be handelt.

Die anschließende Detektion erfolgte mit einem wirtsspezifischen Anti-IgG oder mit Hilfe eines Streptavidin tragenden Anti-Biotin IgG, welche mit der Horseradish Peroxidase (HRP) (Vector Laboratories, [1 mg/ ml], 1:10000) konjugiert waren. Nach 1Stunde Inkubation bei RT erfolgte durch Zugabe des ECL-Reagenz (Thermo Fisher) die Detektion einer chemolumineszenten Reaktion der HRP mit dem ECL Reagenz in Form einer Lichtreaktion.

5.3.3 Immunopräzipitation

Diese Pulldown-Methode wurde verwendet, um 500pg überexprimiertes Wnt5a-flag (+/-25ng/E MoPmm2) aus *Xenopus* Embryonen oder das Wnt5a-V5 der Überstände der Wnt5a-V5 L-Zell-Medien (+/- 500nmol Pmm2siRNA) zu extrahieren.

Die Aufreinigung der -tags erfolgte über einen magnetischen Pulldown der Antikörper gekoppelten Beads (Adamtech).

Für die Präparation des Wnt5a aus Extrakten Wnt5a-flag injizierter Embryonen wurden diese in 100µl Lysis-Puffer (1xTBS, 1% Triton, 0,1% Proteinase-Inhibitor) durch eine 22G Kanüle aufgeschlossen, 3x 10" sonifiziert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach zweifacher anschließender Zentrifugation für 30min bei 13.000rpm wurde der Überstand dotterfrei separiert.

Der Überstand wurde mit 1µg eines monoklonalen Maus Anti-flag Antikörpers (Sigma) für 4 Stunden auf einem Drehrad bei 4°C vor inkubiert.

Die Immunopräzipitation des V5-Tags aus dem Überstand der Wnt5a-V5 stabil transfizierten, sekretierenden L-Zellen wurde mit 1ml Zellkulturmedium und 1µg Anti-V5 angesetzt.

Anschließend wurden die Proben mit 20µl in Lysispuffer aufgenommenen magnetischen AG Beads versetzt.

Im Allgemeinen wurde der Protein/ Antikörper-Komplex mit den magnetischen Beads über Nacht bei 4°C unter Bewegung inkubiert.

Während des magnetischen Pulldowns wurden die Beads 4-5mal mit Lysispuffer gewaschen und das getaggte Protein über eine saure Elution mittels des PEG-Puffers (Adamtech) aufgereinigt. Die Proben wurden mit 6xSDS Ladepuffer für 5min bei 95°C denaturiert, in der SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

5.3.4 2D-Gelelektrophorese

Mit der 2D-Gelelektrophorese wurden die immunpräzipitierten Wnt5a-flag +/-Pmm2 Mo behandelten Embryonen auf einen detektierbaren Verlust der Wnt5a Ladungsverhältnisse aufgrund mangelnder Sialylierung analysiert.

Dabei wurde mit den immunpräzipitierten Proben nach den Herstellerangaben von Invitrogen verfahren.

Nach Analyse mit dem α -flag Antikörper wurden die Blots für 10min mit 10% Essigsäure gestrippt.

Nachdem auf dem Blot mit einer ECL-Reaktion kein Signal detektiert werden konnte, wurde dieser für eine folgende ConA-Lektin Analyse erneut geblockt (1xTBS 0,5%Tween-20).

5.4 Zellkultur

5.4.1. Kultivierung der Zelllinien

Alle adherenten Zelllinien wurden in ihrem spezifischen Medium bei humiden 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die COS7-Meerkatzen-Zelllinie wurden in DMEM-High Glucose Medium, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 225µg/ml Neomycin (G418-Gentamycin) kultiviert.

Die Wnt5a-V5 stabil transfizierten Maus L-Zellen (immortalisierte Fibroblasten) wurden in RPMI Medium, 10% FCS, 1% P/S, 1% L-Glutamin kultiviert.

Bei einer Dichte der Zellen von circa 80% wurden die Zellen nach Trypsinbehandlung im Verhältnis von 1:3 passagiert.

Für Expressionsanalysen wurden die Zellen geerntet, zweimal mit 1xPBS gewaschen, bei 2000rpm für 10min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde bei -20°C eingelagert.

5.4.2. Transfektion von Zellen

COS7 Zellen wurden durch eine Lipofektion transfiziert. Dabei wurde Lipofectamin2000 in Opti-MEM nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für einen effizienten Pmm2 Knockdown durch 500nmol Pmm2-siRNA (16µl 20µM siRNA) wurden 12µl Dharmafect2 im Verhältnis zu einer Endkonzentration von 50nM in 2ml Kulturmedium zugegeben.

5.5 Mikroskopie

Fluoreszenz-Bilder wurden an einem Eclipse 90i Mikroskop oder einem Type DMI4000B Invers-Mikroskop aufgenommen.

5.6 Statistik

Jedes Ergebnis stellt einen Mittelwert aus mindestens drei Replikaten dar ($n \geq 3$). Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken aufgeführt und der signifikante p-Wert durch einen vergleichenden Students *t*-test (Microsoft Excel) ermittelt.

Die Anzahl der Sterne (*) beschreibt die Signifikanz, dabei entspricht * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,001$.

6. Material

6.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

ABsolute™ qPCR SYBR Green ROX Mix	Thermo Scientific
Adenosintriphosphat (ATP)	Merck, Darmstadt
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma, Taufkirchen
Albumin aus Rinderserum	Serva, Heidelberg
Aminocapronsäure	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Carbogen-Gas (95% O ₂ /5% CO ₂)	Grandpair, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros Organics
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
dNTP-mix, 2 and 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-Citrat	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Eukitt	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (36,5% -38%)	Sigma, Taufkirchen
Formamide	J.T. Baker

Material

GeneRuler 1 kb and 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucose-1,6-Bisphosphat	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
H ₂ O HPLC-Reinheitsgrad	Carl Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
L-Cystein	Biomol, Hamburg
LE Agarose	Biozym, Hamburg
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2 ^[3H] D(+)-Mannose	GE Healthcare
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS (3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
NADP	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Applichem, Hamburg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NNN´N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg

Orange G	Merck, Darmstadt
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
Paraformaldehyde (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS für Zellkultur	PAA Laboratories
Penicillin	PAA Laboratories
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Fluka, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20)	Carl Roth, Karlsruhe
Ponceau S Konzentrat	Sigma, Taufkirchen
Pyridin	Sigma, Taufkirchen
RNase freies Wasser	Ambion, St. Leon-Rot
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schaf Serum	Sigma, Taufkirchen
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	PAA Laboratories
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Turbofect	Thermo Fisher
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
UltimaGold	PerkinElmer, USA
Urea	Invitrogen, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (33%)	Merck, Darmstadt
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

6.2 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Als Referenz zum Ansetzen aller gebräuchlichen Puffer und Lösungen diene das Laborhandbuch von Sambrook et al., 2001.

BBR (10%): 10% Boehringer Block Reagenz, 1xMAB

Bleich-Lösung: 1% H₂O₂
5% Formamid
0,5x SSC

Block-Lösung-Antikörper: 5% Milchpulver
0,1% Tween-20 in 1x PBS

Block-Lösung-Lektine: 0,5% Tween-20 in 1x TBS

Cystein-Lösung: 2% L-Cystein, pH 8.0

DNA-Ladepuffer (6x): 40% Glycerol
0,25% Bromphenolblau

Embryonen Aufschluss Puffer: 20 mM Hepes pH 7.1
25 mM KCl
1 mM DTT
10µg/ml Antipain
10µg/ml Leupetin

Embryonen Pmm2 Puffer: 0,1 M Tris
4 mM MgCl₂
50 mM Glucose-1,6-diphosphat
2[³H] Mannose-6-Phosphat

Embryonen Western Blot Puffer: 1% TBS
1% Triton X-100
1x Protease Inhibitor

<u>Hybridisierungs-Puffer:</u>	5x SSC, 50% Formamid, 1% BBR → 1h bei 65°C + 1mg/ml Hefe tRNA, 0,1mg/ml Heparin 0,1% Tween-20, 0,1% Chaps, 5mM EDTA → gefiltert, gelagert bei -20°C
<u>LB Medium:</u>	1% (w/v) Bactotrypton 1% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefe Extrakt
<u>LB-Amp:</u>	50 µg/ml Ampicillin in LB
<u>LB-Amp Platten:</u>	1,5% Agar in LB-Amp
<u>10x MAB:</u>	1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,5
<u>10x MBSH:</u>	88 mM NaCl 1 mM KCl 2,4 mM NaHCO ₃ 0,82 mM MgSO ₄ 0,33 mM Na(NO) ₃ 0,41 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES pH 7,4 10 µg/ml Streptomycinsulfat 10 µg/ml Penicillin
<u>10x MEM:</u>	1 M MOPS 20 mM EGTA 10 mM MgSO ₄ , pH 7,4
<u>MEMFA:</u>	0,1 M MOPS pH 7.4 2 mM EGTA, 1 mM MgSO ₄ 3,7% Formaldehyd

Material

<u>Mowiol:</u>	20 mg Mowiol 80 ml PBS 50 ml Glycerol
<u>10x PBS:</u>	27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 1,37 M NaCl 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
<u>PBS-T (0,1):</u>	1x PBS, 0.1% (v/v) Tween-20
<u>pH 9 Puffer:</u>	100 mM Tris pH 9.5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
<u>Pyridinpuffer:</u>	0,64% Pyridin (v/v) pH 5,5 mit Essigsäure
<u>SDS- Ladepuffer (6x):</u>	150 mM Tris-HCl pH 6.8 6% SDS (w/v) 0,3% Bromphenol Blau (w/v) 30% Glycerol (v/v) 300 mM DTT
<u>SDS-PAGE Laufpuffer:</u>	24,8 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7.0
<u>Tris/NaCl:</u>	100 mM Tris-HCl pH 7.4 100 mM NaCl

<u>50xTAE:</u>	2 M Tris-Base 100 mM EDTA pH 8,0 mit Eisessig
<u>10x TBE:</u>	890 mM Tris-Borat 0,2 mM EDTA, pH 8,0
<u>10x TBS:</u>	80g/l NaCl 2g/l KCl 30g/l Tris Base pH 8.0
<u>TBS-T (0,1):</u>	1 x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20
<u>TBS-T (0,5):</u>	1 x TBS, 0.5% (v/v) Tween-20
<u>10x TE:</u>	100 mM Tris/ HCl 10 mM EDTA pH 7,6 -8,0
<u>Western Blot-Anodenpuffer (5x):</u>	50 mM Tris 380 mM Glycin pH 8,6
<u>Western Blot-Kathodenpuffer (5x):</u>	50 mM Tris 380 mM Glycin 0,1% SDS 0,1% Bromphenolblau 0,2 mg/ml
<u>Zellkulturmedium (COS-7):</u>	DMEM (high glucose) 10% FCS 1% Pen/Strep 1% Neomycin (Gentamycin/ G418)

Material

Zellkulturmedium (L-Zellen):

RPMI
10% FCS
1% Pen/Strep
1% L-Glutamin

Die Zusammensetzung von speziellen Puffern und Lösungen wurde im Abschnitt der entsprechenden Methode aufgeführt.

6.2.1 Zellkulturmedien und Medienzusätze

DMEM (high Glucose)	PAA, Cölbe
RPMI	Gibco Life Technology
DMSO	Merck, Darmstadt
FCS/ FKS	PAA, Cölbe
PBS	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin (10.000U/ ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin/ G418	Life Technologies, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe

Die Hitzeinaktivierung des FKS (Inaktivierung des Komplementsystems) erfolgte bei 56°C für 45 min.

6.3 Geräte

Analysegerät für Dünnschicht-Chromatogramme, Tracemaster 20	Berthold, Bad Wildbad
Analysenwaagen Typ M5P und CP3202P	Sartorius, Göttingen
Autoklav Typ 5075ELV	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Biofuge pico	Heraus, Osterode
Brutschrank Typ 2771	Köttermann, Häningsen
Brutschrank Typ MCO-20AIC	Sanyo, Bad Nenndorf
Digitalkamera Typ DFC320	Leica, Bensheim

Digitalkamera Typ PowerShot A80	Canon, Krefeld
Drehrad	Schütt Labortechnik, Göttingen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Elektrophoresekammern für SDS-Page	GE Healthcare, München
Eppendorfszentrifugen	
Typ 5402, 5414, 5415D	Eppendorf, Hamburg
Flüssigkeitsszintillationszähler 1900TR	Packard, Frankfurt
Filmentwicklungsmaschine	
Typ X-OMAT2000	Kodak, Stuttgart
Fusion	Peqlab, Erlangen
Gefrierschrank -80°C	Colora Messtechnik, Lorch
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, USA
GeneAmp PCR System 2720	ABI Applied Biosystems, USA
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Hochspannungselektrophorese	Camag, Schweiz
Inkubationsschüttler Typ G25	New Brunswick Scientific, USA
Inkubator	Memmert, Schwabach
Kaltlicht KL1500	Zeiss, Göttingen
Kodak RP X-Omat 2000 Processor	Kodak, Stuttgart
Kühlplatte Typ EG1150C	Leica, Bensheim
Kühlplatte	Julabo
Kühlzentrifuge Typ Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Typ Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Lyophile	Virtis Company, USA
Magnetrührer Typ MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikroinjektor IM300	Narishige, USA
Mikromanipulator	Micro Instruments
Mikro-Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten -Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Mikroskop Typ DM LS2	Leica, Bensheim
Mikroskop SZX12	Olympus
Mikrotom Typ RM2255	Leica, Bensheim
Mikrowellenherd	Siemens, München

Material

NanoDropSpektrophotometer	Wilmington, USA
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific
Nikon TE2000 Invers Mikroskop	Perkin Elmar, USA
Novex XCell Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Novex Zoom IPG Runner	Invitrogen, Karlsruhe
Paraffinausgießstation Typ EG1150	Leica, Bensheim
Paraffin-Strecktisch Typ HI1220	Leica, Bensheim
pH-Meter Typ InoLab	WTW, Weilheim
pH-Meter Delta 320	Mettler
PhastSystem™	GE Healthcare, München
PhotometerSpectraMaxPlus 384	Molecular Devices, USA
Pipettierhilfe Typ Pipet Aid XP	Drummond, Broomall, USA
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Power Pac 300	BioRad
Puller PD-5 (Herstellung der Mikronadeln)	Narishige, USA
QTower Realtime PCR	Analytik Jena
Schüttelwasserbad Köttermann,	Häningsen, Göttingen
Semi-Dry-Blot-System	Peqlab, Erlangen
Scintillationscounter	Beckman Coulter
Spannungsgeräte	Hölzel, München
Spannungsgeräte (Hochspannung) EC400P	Thermo Scientific
Spektralphotometer Spectra MaxPlus 384	Molecular Devices, USA
Stereomikroskop 2000 C	Zeiss, Göttingen
Sterilbank Typ Lamin Air HLB2448	Heraeus, Hanau
Sterilbank Typ SG400	Baker Company, Sanford, USA
Stickstofftank Typ Biosafe Chronos	Messer, Griesheim
Thermomixer Typ compact und 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Ultraschall-Desintegrator Typ Sonifier450	Branson Ultrasonic SA, USA
Ultrazentrifuge Typ Optima TLX	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transiluminator	MWG Biotech, Ebersberg
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Schweiz
Waage Typ 1265MP	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach

Wasserbad Typ 1003	Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad Typ HI1210	Leica, Bensheim
Wipptisch Typ Rocky	Labortechnik, Wasserburg
Zentrifuge Typ Labofuge	Heraeus, Hanau

6.4 Verbrauchsmaterialien

6/96well-Platten	Greiner, Nürtingen
Biopsiekassetten	LaborService Brenzinger, Walldorf
DC Protein Assay Kits	Biorad, Karlsruhe
DE53-Microganula Anion Exchanger	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser 24x50 mm	LaborService Brenzinger, Walldorf
Einbettformen	Leica, Bensheim
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Färbeküvetten und -kästen	LaborService Brenzinger, Walldorf
Gewebekulturschalen (3, 6, 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen T25, T75, T125	Sarstedt, Nümbrecht
Glas Vials (4ml)	NeoLab, Heidelberg
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Kanülen Sterican, 20G, 22G, 23G	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Mikrotom-Einmalklingen Typ A 35	PFM, Köln
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulose Membran ECL	GE Healthcare, München
Novex NuPage 4%-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger Typ Superfrost plus	LaborService Brenzinger, Walldorf
Objektträger mit Mattrand	LaborService Brenzinger, Walldorf
Objektträger-Kästen	Neolab, Heidelberg
Parafilm	American National, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
PCR-Gefäße Multiply-Pro (0,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Platten Schutzfolie Star Seal	Star Lab, Hamburg
PCR Streifen (0,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Material

Phast Gel Casette	GE Healthcare, München
Phast Gel Dry Gel	GE Healthcare, München
Phast Gel Sample Applicator	GE Healthcare, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten, steril (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen (10, 15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Spritzen, steril	BD Biosciences, Heidelberg
Präparierbesteck	Neolab, Heidelberg
Polyallomer-Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Scintillation Vial	Perkin Elmer, USA
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Thermo Fast 96-well PCR Platten	Applied Biosystems
VectaShield Hard Set	Vector Laboratories
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman-Vertrieb, Göttingen
Whatman-Papier (2 mm)	Whatman-Vertrieb, Göttingen

6.5 Reaktionssysteme (Kits)

Absolute™ QPCR SYBR Green Rox Mix	Thermo Scientific
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
Dherma Fect2 -Transfection	Thermo Fisher
Lipofectamin	Qiagen, Hilden
MasterPure™ Complete RNA Purification Kit	Epicenter, Madison/USA
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma, Taufkirchen
Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
RNA/ Protein Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
mMessage mMachine® @ T3, T7. Sp6 Kit	Ambion, Europe Ltd.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei der Verwendung von Reaktionssystemen stets die Angaben des Herstellers befolgt.

6.6 Enzyme, Marker, Proteine und Reagenzien

Alle Enzyme wurden entweder von New England Biolabs, Roche oder von Thermo Fisher bezogen. Sollte dies nicht der Fall sein, wurde es aufgeführt.

AG beads (Magnetisch)	Ademtech
4-Amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochlorid (APMSF)	AppliChem, Darmstadt
BM Purple AP Substrat	Roche, Mannheim
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
EuroTaq DNA Polymerase	BioOne
FastDigest [®] Restriktions-Enzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler kb DNA ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Glucokinase (<i>B. stearothermophilus</i>)	Sigma, Taufkirchen
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	Sigma, Taufkirchen
Hexokinase	Sigma, Taufkirchen
Humanes Chorionic Gonadotropin	Sigma, Taufkirchen
Maxima Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Phusion high fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Phosphoglucoisomerase	Sigma, Taufkirchen
Phosphomannoseisomerase	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysine	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor complete Mini (10 x)	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
RevertAidH-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
T3, T7 und Sp6 Polymerasen	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	PAA Laboratories
TurboDNase	Ambion, Europe Ltd.
Ziegenserum	Dako

6.6.1 Antikörper

Primärantikörper (1:1.000)

Kaninchen-Anti-Maus-Pmm2 (15min Exposition; Proteintech)

Maus-Anti-flag (90min Exposition, Sigma)

Maus-Anti-V5 (Immunopräzipitation [1µg/ml], Life Technologies)

Maus-Anti-V5-HRP (2xüN Inkubation, 120min Exposition, Life Technologies)

Maus-Anti-Maus- α/β -Aktin (5min Exposition, Sigma)

Ziege-Anti-Maus- β -Catenin (20min Exposition, Sigma)

Sekundärantikörper (1:10.000)

Kaninchen-Anti-Ziege, HRP-gekoppelt (Sigma)

Kaninchen-Anti-Ratte, HRP-gekoppelt (Sigma)

Kaninchen-Anti-Maus, HRP-gekoppelt (Sigma)

Ziege-Anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt (Sigma)

Ziege-Anti-Maus, HRP-gekoppelt (Dianova)

Ziege-Anti-Maus, AP-gekoppelt (*In-situ* Hybridisierung, Sigma)

Schaf-Anti-Digoxigenin, APgekoppelt (*In-situ* Hybridisierung Roche)

Maus-Anti-IgG , HRP-gekoppelt (Sekundärantikörper. Dianova)

6.6.2 Lektine und Streptavidin-Konjugate

Wheat germ agglutinin, biotinyliert Vector Laboratories, Burlingham, USA

Concanavalin A, biotinyliert Vector Laboratories, Burlingham, USA

Sambucus nigra, biotinyliert Vector Laboratories, Burlingham, USA

Streptavidin-FITC Vector Laboratories, Burlingham, USA

6.7 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen Invitrogen, bezogen.

Primer für Reverse Transkriptase-PCR

Xenolaev-Pmm2-F1 5'-ATGGCTCAGTGTGACGTTCTG-3'
 Xenolaev-Pmm2-R1 5'-TCACTGGAAGAATAGCTCTTTGC-3'

Nested-PCR

NM_001094315.1-F1 5'-CGAGCGCTCCATTCATCTGAG-3'
NM_001094315.1-R1 5'-ATTAGTGCCATTAATTGCCTCTG-3'
NM_001094315.1-F2 5'-GCAGTCATGGCTCAGTGTGAC-3'
NM_001094315.1-R2 5'-ATGGGTCACTGGAAGAATAGCT-3'
NM_001094315.1-F3 5'-GACGTGTTTCCTACCGGCTG-3'

NM_001094315.1-Fw-NotI-ATG

5'-GCTGCGGCCGCATGGCTCAGTGTGACGTTCTG-3'

NM_001094315.1-Rev-TGA-NotI

5'-GTAGCGGCCGCTCACTGGAAGAATAGCTCTTTGC-3'

NM_001092472.1-F1 5'-GGCCTCTGCACATCAGATGG-3'
NM_001092472.1-R1 5'-ACCTGCAGGTAACATGGTCCT-3'
NM_001092472.1-F2 5'-GAACACCATGGCAGACAGAAG-3'
NM_001092472.1-R2 5'-GAAGCCAATCATACTTCATTGTC-3'
NM_001092472.1-F3 5'-CGTTGCTGTCTGGATGTTGTAG-3'

NM_001092472.1-Fw-NotI-ATG

5'-GCTGCGGCCGCATGGCAGACAGAAGGCTCCC-3'

NM_001092472.1-Rev-TGA-NotI

5'-GTAGCGGCCGCTCATACTTCATTGTCTCTTTCTA-3'

Side directed Mutagenese (SDM) -Primer

SDM_315-fwd 5'-GAACAGTTCAGAGACAAATTTGTGGCT-3'
SDM_315-rev 5'-AGCCACAAATTTGTCTCTGAACTGTTC-3'

Material

SDM_472-fwd 5'-CCAAGAGCTTTTCTTCTCAGAAAGAGA-3'

SDM_472-rev 5'-TCTCTTTCTGAGAAGAAAAGCTCTTGG-3'

Primer für quantitative Realtime-PCR

PAPC-fwd 5'-CCCAGTCGGTCTCTTCTTCTTTG-3'

PAPC-rev 5'-TTGCTGATGCTGCTCTTGGTTAG-3'

ODC-U 5'-GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC-3'

ODC-D 5'-TTCGGGTGATTCCTTGCCAC-3'

Morpholino Antisense Oligonukleotide

Die aufgeführten Morpholino wurden von Gene Tools LLC bezogen.

Xeno-Pmm2-kodierend (#315) 5'-AACACAGAACGTCACACTGAGCCAT-3'

Xeno-Pmm2-5-UTR (#315) 5'-CCGGCTCTGTCTCAGCTCAGATGAA-3'

Xeno-Pmm1-kodierend (#472) 5'-GTTTTGGGAGCCTTCTGTCTGCCAT-3'

Kontroll-Morpholino 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

RNAi (Thermo Fisher)

Pmm2-siRNA 5'-UAAGCGGUUUUGCCUGAGA-3'

siGENOME Non-Targeting siRNA #2 5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'

6.8 Radioaktive Substanzen

2^{[3]H} Mannose

GE Healthcare, München

2^{[3]H} Mannose-6-Phosphat

Eigensynthese

6.9 Plasmide

pCI-neo	Promega, Madison, USA
pCS2+_Brachyury	H. Steinbeisser (K. Linsmeier)
pCS2+_Myf5	H. Steinbeisser (K. Linsmeier)
pCS2+_ror2	H. Steinbeisser (K. Linsmeier)
pCS2+_PAPC	H. Steinbeisser (A. Kietzmann)
pCS2+_Wnta	H. Steinbeisser (E. Brinkmann)
pCS2+_Wnt5a-flag	H. Steinbeisser (R.K. Swain)

6.10 Bakterien

Routinemäßig wurden folgende Bakterienstämme zur Transformation von Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Genotypisierung siehe Bachmann (1987).

E.coli DH5 α

(Genotyp: F⁻ deoR recA1 endA1 hsdR1(rk⁻mk⁺) supE44 1-thi gyrA96 relA1)

E.coli XL-1 Blue

(Genotyp: F⁻::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^P Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal) thi hsdR17 (rk⁻mk⁺) supE44 relA1 lac)

6.11 Stabil transfizierte Zelllinien

COS-7 pCI-neo (Mock)	N. Himmelreich (NH)
COS-7 pCI-neo NM_001094315.1	NH (Nested Klonierung durch NotI)
COS-7 pCI-neo NM_001092472.1	NH (Nested Klonierung durch NotI)
L-Zellen Wnt5a-V5	C.Niehrs (Andrey Glinka)

6.12 Tiere

Die für die Experimente eingesetzten *Xenopus laevis* Frösche wurden von Nasco bezogen. Alle Versuche mit dem Modellorganismus wurden beim Regierungspräsidium Karlsruhe angezeigt und entsprechen den Rahmenbedingungen des Tierschutzgesetzes.

6.13 EDV

Hardware:

PC Pentium IV, 2.8 GHz, 512MB	G-DAS Datenservice,Hockenheim
Apple Macintosh Typ Power 7300/200	Apple Macintosh, Cupertino, USA
Canon i865 Tintenstrahldrucker	Canon, Krefeld
HL-5250DN Laserdrucker	Brother GmbH, Bad Vilbel
CanoScanLide25	Canon, Krefeld

Software:

AnalySIS	Soft Imaging Sytem GmbH
Adobe-Photoshop 6.0	Adobe, San Jose, USA
DNASStar (MegAlign, MapDraw, Protean, EditSeq)	DNASStar, Madison, USA
ImageJ	W.R. NIH, Maryland, USA
Image Reader	Fuji, Elmsford
Quantity One	Bio-Rad, Karlsruhe
Windows 2000 Professional	Microsoft, Bellevue, USA
Windows XP Professional	Microsoft, Bellevue, USA
Windows Office Professional 2003	Microsoft, Bellevue, USA
Windows Office Professional 2007	Microsoft, Bellevue, USA
PAWS Statistics 17	SPSS Inc SPSS, Chicago, USA

6.14 Online Datenbanken

Human Gene Compendium	www.genecards.org
National Center for Biotechnology Information	www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer Design	www.biotoools.com
Proteomic Tools	www.expasy.org
<i>Xenopus</i> Web Resource	www.xenbase.org

6.15 Sterilisationen von Lösungen und Arbeitsgeräten

Zur Sterilisation wurden Einmalplastikmaterialien, Lösungen, Nährmedien, Puffer, und Glasmaterial 20min in feuchter Hitze bei 2,25bar/ 121°C autoklaviert.

7. Referenzen

- Alexandre C, Baena-Lopez A, Vincent JP. (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature* 505:180-5.
- Amerongen R Van, and Berns A. (2006). Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends in Genetics* 22: 678-689.
- Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, and Perrimon N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 12: 2610-2622.
- Baker KD, Ramel MC, Lekven AC. (2010). A Direct Role for Wnt8 in Ventrolateral Mesoderm Patterning. *Developmental Dynamics* 239: 2828–2836.
- Baldessari D, Shin Y, Krebs O, König R, Koide T, Vinayagam A, Fenger U, Mochii M, Terasaka C, Kitayama A, Peiffer D, Ueno N, Eils R, Cho KW, Niehrs C. (2005). Global gene expression profiling and cluster analysis in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* 122: 441-75.
- Barone R, Pavone L, Fiumara A, Bianchini R, Jaeken J. (1999). Developmental patterns and neuropsychological assessment in patients with carbohydrate-deficient glycoconjugate syndrome type IA (phosphomannomutase deficiency). *Brain Dev.* 21: 260-3.
- Barone R, Aiello C, Race V, Morava E, Foulquier F, Riemersma M, Passarelli C, Concolino D, Carella M, Santorelli F, Vleugels W, Mercuri E, Garozzo D, Sturiale L, Messina S, Jaeken J, Fiumara A, Wevers RA, Bertini E, Matthijs G, Lefeber DJ. (2012) DPM2-CDG: a muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. *Ann Neurol.* 72: 550-8.
- Barrabés S, Sarrats A, Fort E, De Llorens R, Rudd PM, Peracaula R. (2010). Effect of sialic acid content on glycoprotein pI analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 31: 2903-12.
- Basson MA, Wingate RJ. (2013). Congenital hypoplasia of the cerebellum: developmental causes and behavioral consequences. *Front Neuroanat.* 3;7:29.
- Beck CW, Izpisua Belmonte JC, Christen B. (2009). Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Dev Dyn.* 238: 1226-48.
- Berwick BC and Harvey K. (2013) LRRK2: an éminence grise of Wnt-mediated neurogenesis? *Front. Cell. Neurosci.* 82: 1-13.

Referenzen

- Blum M, Beyer T, Weber T, Vick P, Andre P, Bitzer E, Schweickert A. (2009). *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry. *Dev Dyn.* 238: 1215-25.
- Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, Ferrer I, Maties M, Busquets C, Artuch R, Gort L, Marco M, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J, Chabás A, (2002). Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25: 635- 646.
- Brunetti-Pierri N, Del Gaudio D, Peters H, Justino H, Ott CE, Mundlos S, Bacino CA. (2008). Robinow syndrome: phenotypic variability in a family with a novel intragenic ROR2 mutation. *Am J Med Genet A.* 146A: 2804-9.
- Burda P, Borsig L, Andel JDR, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, and Berger, EG (1998). A Novel Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Characterized by a Deficiency in Glucosylation of the Dolichol-linked Oligosaccharide. *J. Clin. Invest.*, 102: 647–652.
- Buttler K, Becker J, Pukrop T, Wilting J. (2013). Maldevelopment of dermal lymphatics in Wnt5a-knockout-mice. *Dev Biol.* 381: 365-76.
- Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Freeze HH (2010). SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder. *Cell*, 142: 203–217.
- Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 17382-7.
- Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ and Belmonte JC (2000). Mechanisms of Left-Right Determination in Vertebrates. *Cell*, Vol. 101, 9–21.
- Chantret I, Dancourt J, Dupré T, Delenda C, Bucher S, Vuillaumier-Barrot S, Moore SEH. (2003). A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl alpha3-glucosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 9962–71.
- Chantret I, Dupré T, Delenda C, Bucher S, Dancourt J, Barnier A, Moore SEH. (2002). Congenital disorders of glycosylation type Ig is defined by a deficiency in dolichyl-P-mannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 25815–22.
- Chu J, Mir A, Gao N, Rosa S, Monson C, Sharma V, Steet R, Freeze HH, Lehrman MA, Sadler KC. (2013). A zebrafish model of congenital disorders of glycosylation with phosphomannose isomerase deficiency reveals an early opportunity for corrective mannose supplementation. *Dis Model Mech.*6: 95-105.
- Clayton PT, Winchester BG, Keir G. (1992). Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 15: 857–861.

- Cline A, Gao N, Flanagan-Steet H, Sharma V, Rosa S, Sonon R, Azadi P, Sadler KC, Freeze HH, Lehrman MA and Steet R. (2012). A zebrafish model for PMM2-CDG and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency. *MBoC*, 23: 4175-4187.
- Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE. (2008). Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal *Development* 135: 789-798.
- Corey DR, Abrams JM. (2001). Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol.* 2 REVIEWS: 1015.1-1015.3. Epub 2001 Apr 26.
- Cromphout K, Keldermans L, Snellinx A, Collet JF, Grünwald S, De Geest N, Sciot R, Vanschaffingen E, Jaeken J, Matthijs G, Hartmann D. (2005). Tissue distribution of the murine phosphomannosidases Pmm1 and Pmm2 during brain development. *Eur J Neurosci.* 22: 991-6.
- Cromphout K, Vleugels W, Heykants L, Schollen E, Keldermans L, Sciot R, D'Hooge R, De Deyn PP, von Figura K, Hartmann D, Körner C, Matthijs G. (2006) The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Mol Cell Biol.* 26: 5621-35.
- Cruciat CM, Hassler C, Niehrs C. (2006). The MRH protein Erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synexpression group and functions in N-glycan recognition. *J Biol Chem.* 281: 12986-93.
- Cylwik B, Naklicki M, Chrostek L, Gruszewska E. (2013). Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation. *Acta Biochim Pol.* 60: 151-61.
- Damen G, de Klerk H, Huijmans J, den Hollander J, Sinaasappel M. (2004). Gastrointestinal and other clinical manifestations in 17 children with congenital disorders of glycosylation type Ia, Ib, and Ic. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38: 282–287.
- Darken RS and Wilson PA. (2001). Axis induction by wnt signaling: Target promoter responsiveness regulates competence. *Dev. Biol.* 234, 42-54.
- Davidson LA, Hoffstrom BG, Keller R, and DeSimone DW. (2002). Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and tissue geometry. *Dev. Biol.* 242: 109-129.
- Davidson LA, Joshi SD, Kim HY, von Dassow M, Zhang L, Zho J (2010) Emergent morphogenesis: Elastic mechanics of a self-deforming tissue. *Journal of Biomechanics* 43: 63-70.
- Dawson AL, Cassell CH, Riehle-Colarusso T, Grosse SD, Tanner JP, Kirby RS, Watkins SM, Correia JA, Olney RS. (2013). Factors associated with late

Referenzen

- detection of critical congenital heart disease in newborns. *Pediatrics*.132: e604-11.
- Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol*. 148178: 1-15.
- Defaus S, Gupta P, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R. (2014). Mammalian protein glycosylation--structure versus function. *Analyst*. ;139: 2944-67.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays*. 21: 412-21.
- De Robertis EM. (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mechanisms of Development*. 126: 925–941.
- Dorey K, Amaya E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate Embryogenesis. *Development* 137, 3731-3742.
- Duchesne L, Tissot B, Rudd TR, Dell A, David G. (2006). Heparan Sulfate Co-receptor Binding Factor Receptor 1 Regulates Ligand and N-Glycosylation of Fibroblast Growth. *J. Biol. Chem*. 281: 27178-27189.
- Dugaiczuk A, Boyer HW, Goodman HM. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol*. 96: 171-84.
- Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J and Shi D. (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 127: 3091-3100.
- Engle EC. (2006). The genetic basis of complex strabismus. *Pediatr Res*. 59: 343-8. Review.
- Enns GM, Steiner RD, Buist N, Cowan C, Leppig KA, McCracken MF, Westphal V, Freeze HH, O'Brien JF, Jaeken J, Matthijs G, Behera S, and Hudgins L. (2002). Clinical and molecular features of congenital disorder of glycosylation in patients with type 1 sialotransferrin pattern and diverse ethnic origins. *J. Pediatr*. 141: 695-700.
- Enns GM, Shashi V, Bainbridge M, Gambello MJ, Zahir FR, Bast T, Crimian R, Schoch K, Platt J, Cox R, Bernstein JA, Scavina M, Walter RS, Bibb A, Jones M, Hegde M, Graham BH, Need AC, Oviedo A, Schaaf CP, Boyle S, Butte AJ, Chen R, Clark MJ, Haraksingh R, Cowan TM, He P, Langlois S, Zoghbi HY, Snyder M, Gibbs RA, Freeze HH, Goldstein DB. (2014). Mutations in NGLY1 cause an inherited disorder of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Genet Med*. 16: 751-758.
- Eisen JS, Smith JC. (2008) Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*. 135:1735-43.

- Elinson RP. (2011) Cleavage and Gastrulation in *Xenopus laevis* Embryos. *Wiley* DOI: 10.1002/9780470015902.a0001074.pub3
- Elinson RP, del Pino EM. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 1: 345-69. Review.
- Erlandson A, Bjursell C, Stibler H, Kristiansson B, Wahlstrom J and Martinsson T. (2001). Scandinavian CDG-Ia patients: genotype/phenotype correlation and geographic origin of founder mutations. *Hum. Genet.* 108: 359-367.
- Fiumara A, Barone R, Buttitta P, Di Pietro M, Scuderi A, Nigro F, Jaeken J. (1994). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I: ophthalmic aspects in four Sicilian patients. *Br J Ophthalmol.* 78: 845-6.
- Fletcher RB, Harland RM (2008). The role of FGF signaling in establishment and maintenance of mesodermal gene expression in *Xenopus*. *Dev Dyn.* 237: 1243-1254.
- Flynt AS, Lai EC. (2011). RNAi in *Xenopus*: look before you leap. *Genes Dev.* 25: 1105-8.
- Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Matthijs G. (2006). Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103: 3764–9.
- Foulquier F, Ungar D, Reynders E, Zeevaert R, Mills P, García-Silva MT, Matthijs G. (2007). A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Human Molecular Genetics.* 16: 717–30.
- Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, Race V, Bammens R, Morelle W, Rosnoblet C, Legrand D, Demaegd D, Buist N, Cheillan D, Guffon N, Morsomme P, Annaert W, Freeze HH, Van Schaftingen E, Vikkula M, Matthijs G. (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet.* 91: 15-26.
- Frank CG, Grubenmann CE, Eyaid W, Berger EG, Aebi M, and Hennet T. (2004). Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type IL. *American Journal of Human Genetics,* 75: 146–50.
- Freeze HH Elbein AD. (2009) Glycosylation Precursors. *Essentials of Glycobiology.* 2nd edition. Cold Spring Harbor.
- Fujii H, Nagai T, Shirasawa H, Doi JY, Yasui K, Nishimatsu S, Takeda H, Sakai M. (2007). Anteroposterior Patterning in *Xenopus* Embryos: Egg Fragment Assay System Reveals a Synergy of Dorsalizing and Posteriorizing Embryonic Domains *Developmental Biology* 252: 15–30.

Referenzen

- Garcia-Silva MT, de Castro J, Stibler H, Simón R, Chasco Yrigoyen A, Mateos F, Ferrer I, Madero S, Velasco JM, and Guttierrez-Larraya F. (1996). Prenatal hypertrophic cardiomyopathy and pericardial effusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19: 257–259.
- Garshasbi M, Kahrizi K, Hosseini M, Nouri Vahid L, Falah M, Hemmati S, Hu H, Tzschach A, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW. (2011). A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet A.* 155: 1976-80.
- Gehrmann J, Sohlbach K, Linnebank M, Böhles HJ, Buderus S, Gert Kehl H, Vogt J, Harms E, Marquardt T. (2003). Cardiomyopathy in congenital disorders of glycosylation. *Cardiol. Young.* 13: 345–351.
- Geng X, Xiao L, Lin GF, Hu R, Wang JH, Rupp RA and Ding X. (2003). Lef/Tcf-dependent Wnt/beta-catenin signaling during *Xenopus* axis specification. *FEBS Lett.* 547: 1-6.
- Giampietro PF. (2012). Genetic aspects of congenital and idiopathic scoliosis. *Scientifica (Cairo).* 152365: 1-15.
- Gilbert SF. (2006). *Developmental biology.* Sinauer, Sunderland, Mass.
- Glickman NS, Kimmel CB, Jones MA and Adams RJ. (2003). Shaping the zebrafish notochord. *Development* 130: 873-887.
- Gorny AK, Steinbeisser H. (2012) Brachet's cleft: a model for the analysis of tissue separation in *Xenopus*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 1: 294-300.
- Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol.* 14: 1036-45.
- Grubenmann CE, Frank CG, Kjaergaard S, Berger EG, Aebi M, Hennet T. (2002). ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2331-2339.
- Grubenmann CE, Frank CG, Hulsmeier AJ, Schollen E, Matthijs G, Mayatepek E, Berger EG, Aebi M, Hennet T. (2004). Deficiency of the first mannosylation step in the Nglycosylation pathway causes congenital disorder of glycosylation type Ik. *Hum Mol Genet* 13: 535-42.
- Grünewald S. (2009) The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim Biophys Acta.* 1792: 827-34.
- Gurdon JB, Hopwood N. (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 43-50.

- Haeuptle MA, Pujol M, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis AJ, Aebi M, and Hennet T. (2008). Human RFT1 Deficiency Leads to a Disorder of N-Linked Glycosylation. *The American Journal of Human Genetics* 82: 600–606.
- Haeuptle MA, Hennet T. (2009). Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum Mutat.* 30: 1628-41.
- Haltiwanger RS, Lowe JB. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem.* 73: 491-537.
- Haniu M, Horan T, Spahr C, Hui J, Fan W, Chen C, Richards WG, Lu HS. (2011). Human Dickkopf-1 (huDKK1) protein: characterization of glycosylation and determination of disulfide linkages in the two cysteine-rich domains. *Protein Sci.* 20: 1802-13.
- Hansen SH, Frank SR, Casanova JE. (1997). Cloning and characterization of human phosphomannomutase, a mammalian homologue of yeast SEC53. *Glycobiol.* 7: 829-34.
- Hansske B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Höning S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Körner C. (2002). Deficiency of UDP-galactose: N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IIId. *J Clin Invest* 109: 725-33.
- Hardin J and Walston T. (2004). Models of morphogenesis: the mechanisms and mechanics of cell rearrangement. *Curr Opin Genet Dev.* 14: 399-406.
- Harterink M and Korswagen HC. (2002). Dissecting the Wnt secretion pathway: key questions on the modification and intracellular trafficking of Wnt proteins. *Acta Physiol (Oxf).* 204: 8-16.
- Heasman J. (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol.* 243: 209-14. Review.
- Heasman J. (2006). Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development.* 133: 1205-17. Review.
- Heisenberg CP, Bellaïche Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell.* 153: 948-62.
- Heykants L, Schollen E, Grünewald S, Matthijs G. (2001). Identification and localization of two mouse phosphomannomutase genes, Pmm1 and Pmm2. *Development.* 128: 53-9.
- Hikasa H, Shibata M, Hiratani I, Taira M. (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development.* 129: 5227-39.

Referenzen

- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. (1998). The *Xenopus* Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities. *Molecular Cell*. 1: 673–683.
- Hubbard SC, and Ivatt RJ. (1981). Synthesis and Processing of Asparagine-linked Oligosaccharides 1,2. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555–583.
- Huelsken J and Behrens J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 115: 3977-3978.
- Huelsken J and Birchmeier W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 547-553.
- Hung WT, Wu FJ, Wang CJ, Luo CW. (2012). DAN (NBL1) specifically antagonizes BMP2 and BMP4 and modulates the actions of GDF9, BMP2, and BMP4 in the rat ovary. *Biol Reprod.* 86: 158, 1-9.
- Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grünewald S, Hennet T. (2000). Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J. Clin. Invest.* 105: 233–239.
- Imbach, T., Burda, P., Kuhnert, P., Wevers, R.A., Aebi, M., Berger, E.G. and Hennet, T. (1999). A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic. *PNAS*, 96, 6982–6987.
- Imtiaz F, Worthington V, Champion M, Beesley C, Charlwood J, Clayton P, Winchester B. (2000). Genotypes and phenotypes of patients in the UK with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23: 162–74.
- Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. (1984). Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 144: 245–247.
- Jaeken J, Carchon H, Stibler H. (1993a). The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: pre-Golgi and Golgi disorders? *Glycobiol.* 3: 423-428.
- Jaeken J, Carchon H. (1993b). The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: An overview. *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 813-820.
- Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, and Freeze HH. (2009). CDG nomenclature: time for a change! *Biochimica et Biophysica Acta.* 1792: 825–6.
- Jaeken J and Matthijs G. (2009a). From glycosylation to glycosylation diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792: 823.
- Jaeken J and Matthijs, G. (2009b). From glycosylation to glycosylation diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792: 823.

- Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B and Spik G. (1994). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Archives of Disease in Childhood (Arch Dis Child)*, 71: 123–127.
- Jaeken J and Matthijs G. (2001). Congenital Disorders of glycosylation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2: 129–151.
- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E and Eeckels R. (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased CSF protein: a new syndrome?, *Pediatr. Res.* 14:179.
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science*. 337: 59-64.
- Jenny A and Mlodzik M. (2006). Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. *Mt. Sinai J. Med.* 73: 738-750.
- Jones MA, Ng BG, Bhide S, Chin E, Rhodenizer D, He P, Losfeld ME, He M, Raymond K, Berry G, Freeze HH, Hegde MR.(2012). DDOST mutations identified by whole-exome sequencing are implicated in congenital disorders of glycosylation. *Am J Hum Genet.* 90: 363-8.
- Jones CM, Smith JC. (2008). An overview of *Xenopus* development. *Methods Mol Biol.* 461:385-94.
- Kaneda T, Motoki JY. (2012). Gastrulation and pre-gastrulation morphogenesis, inductions, and gene expression: similarities and dissimilarities between urodelean and anuran embryos. *Dev Biol.* 369: 1-18.
- Keller R, Shook D and Skoglund P. (2008). "The forces that shape embryos: physical aspects of convergent extension by cell intercalation." *Phys Biol.* 5: 1–22.
- Keller R. (2005). Cell migration during gastrulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 533-541.
- Keller R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298: 1950-1954.
- Keller R, Davidson L, Edlund A, Elul T, Ezin M, Shook D and Skoglund P. (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 355: 897-922.
- Keller R, Shih J and Domingo C. (1992). The patterning and functioning of protrusive activity during convergence and extension of the *Xenopus* organiser. *Dev. Suppl* 81-91.

Referenzen

- Keller R and Jansa S. (1992). *Xenopus* Gastrulation without a blastocoel roof. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 195: 162-76.
- Keller R. (1986). The cellular basis of amphibian gastrulation. *Developmental biology* 2: 241-327.
- Kepes F and Schekman R, (1988). The yeast SEC53 gene encodes phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* 263: 9155-9161.
- Kestler HA and Kühl M. (2008). From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 36:, 1333-1347.
- Kiefer P, Mathieu M, Close MJ, Peters G, Dickson C. (1993). FGF3 from *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 12: 4159-68.
- Kiefer P, Peters G, Dickson C. (1993). Retention of fibroblast growth factor 3 in the Golgi complex may regulate its export from cells. *Mol Cell Biol.* 13: 5781-93.
- Kietzmann A, Wang Y, Weber D, Steinbeisser H. (2012). *Xenopus* paraxial protocadherin inhibits Wnt/ β -catenin signalling via casein kinase 2 β . *EMBO Rep.* 13: 129-34.
- Kikuchi A, Yamamoto H and Kishida S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cellular Signalling*, 19: 659-71.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., & Sato, A. (2009). Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Cell* 1-2.
- Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 291: 21-71.
- Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 204: 17-33.
- Kikuchi A. (2013). Canonical Wnt signaling pathway and cellular responses. *Clin Calcium.* 23: 799-807.
- Kim SH, Yamamoto A, Bouwmeester T, Agius E and Robertis EM. (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development*, 125: 4681-90.
- Kim S, Westphal V, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Freeze HH. (2000). Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). *The Journal of Clinical Investigation*, 105: 191-198.
- Kim SH, Jen WC, De Robertis EM and Kintner C. (2000). The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* 10: 821-830.

- Kirschner M, Newport J and Gerhart J. (1985). The timing of early successfully dealt with intermittent responses developmental events by cells to external signals, such as the hormonal stimulation of in *Xenopus*. *Cell*, 1: 41–47.
- Kjaergaard S, Skovby F, Schwartz M. (1998). Absence of homozygosity for predominant mutations in *PMM2* in Danish patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 331–336.
- Kjaergaard S, Skovby F and Schwartz M. (1999). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A: expression and characterisation of wild type and mutant *PMM2* in *E.coli*. *Eur. J. of Hum. Gen.* 7: 884-888.
- Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F. (2001). Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. *Arch. Dis. Child.* 85: 236–239.
- Kjaergaard S. (2004). Congenital disorders of glycosylation type Ia and Ib - Genetic, biochemical and clinical studies. *Dan. Med. Bull.* 51: 350-363.
- Klein TJ and Mlodzik M. (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 155-176.
- Knauer R, Lehle L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1426: 259-73.
- Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. (2013). De novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 34: 1708-14.
- Koehler K, Malik M, Mahmood S, Gießelmann S, Beetz C, Hennings JC, Huebner AK, Grahn A, Reunert J, Nürnberg G, Thiele H, Altmüller J, Nürnberg P, Mumtaz R, Babovic-Vuksanovic D, Basel-Vanagaite L, Borck G, Brämswig J, Mühlenberg R, Sarda P, Sikiric A, Anyane-Yeboah K, Zeharia A, Ahmad A, Coubes C, Wada Y, Marquardt T, Vanderschaeghe D, Van Schaftingen E, Kurth I, Huebner A, Hübner CA. (2013). Mutations in *GMPPA* cause a glycosylation disorder characterized by intellectual disability and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 93: 727-34.
- Körner C, Lehle L and Von Figura K. (1998a). Abnormal synthesis of mannose 1-phosphate derived carbohydrates in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I fibroblasts with phosphomannomutase deficiency. *Glycobiology*, 8: 165–171.
- Körner C, Lehle L and Von Figura K. (1998b). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose. *Glycoconjugate Journal*, 15: 499–505.

Referenzen

- Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, Von Figura K. (1999). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV : deficiency of dolichyl-P-Man : Man 5 GlcNAc 2 - PP-dolichyl mannosyltransferase. *The EMBO Journal*, 18: 6816–6822.
- Köster I. (2007) Identification and characterization of interacting partners of cytoplasmic domain of *Xenopus* Paraxial Protocadherin. Doktorarbeit, Universität Heidelberg.
- Köster I, Jungwirth MS, Steinbeisser H. (2010). xGit2 and xRhoGAP 11A regulate convergent extension and tissue separation in *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol*. 344: 26-35.
- Koide T, Hayata T, Cho KW. (2005) *Xenopus* as a model system to study transcriptional regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 4943-8.
- Komekado H, Yamamoto H, Chiba T and Kikuchi A. (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes to Cells*, 12: 521-534.
- Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Mundlos S. (2008). Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nature Genetics*, 40, 32-4.
- Kornfeld R and Kornfeld S. (1985). Asparagine-linked Oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-64.
- Kranz C, Denecke J, Lehle L, Sohlbach K, Jeske S, Meinhardt F, Marquardt T. (2004). Congenital Disorder of Glycosylation Type Ik (CDG-Ik): A Defect of Mannosyltransferase I. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 545-551.
- Kranz C, Denecke J, Lehrman MA, Ray S, Kienz P, Kreissel G, Marquardt T. (2001). A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If). *The Journal of Clinical Investigation*, 108: 1613-1619.
- Kranz C, Jungeblut C, Denecke J, Erlekotte A, Sohlbach C, Debus V, Marquardt T. (2007). A Defect in Dolichol Phosphate Biosynthesis Causes a New Inherited Disorder with Death in Early Infancy. *The American Journal of Human Genetics*, 80: 433-440.
- Kranz C, Ng BG, Sun L, Sharma V, Eklund Ea, Miura Y, Freeze HH. (2007). COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Human Molecular Genetics*, 16: 731-41.
- Kristiansson B, Andersson M, Tonnby B, Hagberg B. (1989). Disialotransferrin developmental deficiency syndrome. *Arch. Dis. Child*. 64: 71-76.
- Kühl M. (2002). Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin. Cell Dev. Biol*. 13: 243-249.

- Kühl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT and Wedlich D. (2001). Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech. Dev.* 106: 61-76.
- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR and Moon RT. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16: 279-283.
- Kulkarni MM. (2011). Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 94: 1-25
- Kumano G and Smith WC. (2002). Revisions to the *Xenopus* Gastrula Fate Map: Implications for Mesoderm Induction and Patterning. *Developmental Dynamics* 225: 409-421.
- Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, and Kikuchi A. (2007a). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary. *Biochem. J.*, 402: 515-523.
- Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S and Kikuchi A. (2007b). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *The Biochemical Journal*, 402: 515-23.
- Leach L, Babawale MO, Anderson M and Lammiman M. (2002). Vasculogenesis , Angiogenesis and the Molecular Organisation of Endothelial Junctions in the Early Human Placenta. *Journal of Vascular Research*, 39: 246-259.
- Lefeber DJ, Schönberger J, Morava E, Guillard M, Huyben KM, Verrijp K, Grafakou O, Evangelidou A, Preijers FW, Manta P, Yildiz J, Grünwald S, Spilioti M, van den Elzen C, Klein D, Hess D, Ashida H, Hofsteenge J, Maeda Y, van den Heuvel L, Lammens M, Lehle L, Wevers RA. (2009). Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am. J. Hum. Genet.* 1: 76-86.
- Li L, Zheng P, Dean J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development.* 137: 859-70.
- Lin J, Redies C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol.* 222: 369-76.
- Liwosz A, Lei T, Kukuruzinska MA. (2006). N-glycosylation affects the molecular organization and stability of E-cadherin junctions. *J Biol Chem.* 281: 23138-49.
- Logan CY and Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 20: 781-810.
- Lonlay P, De, Seata N, Barrot S, Chabrol B, Drouin V, Gabriel BM, Journe H, Kretz M, Laurent J, Le Merrer M, Leroy A, Pedespan D, Sarda P, Villeneuve N, Schmitz J, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J, Koerner C, Munnich A,

Referenzen

- Saudubray JM, Cormier-Daire V. (2001). A broad spectrum of clinical presentation in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J. Med. Genet.* 38:14-19.
- Losfeld ME, Ng BG, Kircher M, Buckingham KJ, Turner EH, Eroshkin A, Smith JD, Shendure J, Nickerson DA, Bamshad MJ, Freeze HH. (2014) A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in SSR4, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex. *Hum Mol Genet.* 23: 1602-5.
- Lottspeich. (2012). *Bioanalytik. Springer Spektrum (3.Auflage)*
- Lowe JB and Marth JD. (2003). A genetic Approach glycan function to contents. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 643-691.
- Lübbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen BHCMT, de Koning TJ, Körner C. (2010). Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. *Human Molecular Genetics*, 19: 3623-33.
- Lübke T, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, Von Figura K and Körner C. (2001). Complementation cloning identifies CDG-IIc , a new type of congenital disorders of glycosylation , as a GDP-fucose. *Nature Genetics*, 28: 73-76.
- Lübke T, Marquardt T, Von Figura K and Körner C. (1999). A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 25986-9.
- Lühn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R and Vestweber D. (2001). The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nature Genetics*, 28: 69-72.
- Lund E, Sheets MD, Imboden SB, Dahlberg JE. (2011). Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 25: 1121-31.
- Mader I, Dobler-Neumann M, Kuker W, Stibler H, Kraegeloh-Mann I, (2002). Congenital disorder of glycosylation type Ia: benign clinical course in a new genetic variant. *Childs Nerv. Syst.* 18: 77-80.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 10: 957-63. Review.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature.* 384: 176-9.
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ. (1996) Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol.* 180: 273-83.
- Marigo V and Tabin CJ. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 9346-51.

- Marigo V, Laufer E, Nelson CE, Riddle RD, Johnson RL, Tabin C. (1996) Sonic hedgehog regulates patterning in early embryos. *Biochem Soc Symp.* 62: 51-60.
- Martin BL and Kimelman D. (2008). Regulation of canonical Wnt signaling by Brachyury is essential for posterior mesoderm formation. *Dev Cell.* 15: 121-33.
- Martinez-Duncker I, Dupré T, Piller V, Piller F, Candelier J-J, Trichet C, Mollicone R. (2005). Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood*, 105: 2671–6.
- Marquardt T, Hulskamp G, Gehrman J, Debus V, Harms E, Kehl HG. (2002). Severe transient myocardial ischaemia caused by hypertrophic cardiomyopathy in a patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Eur. J. Pediatr.* 161: 524–527.
- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ and Van Schaftingen E. (1997). Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature*, 16: 88–92.
- Medina A, Reintsch W and Steinbeisser H. (2000). *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 227-237.
- Medina A. and Steinbeisser H. (2000). Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 218: 671-680.
- Medina A, Swain RK, Kuerner KM and Steinbeisser H. (2004). *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *EMBO J.* 23: 3249-3258.
- Medzhradszky KF. (2008). Characterization of site-specific N-glycosylation. *Methods Mol Biol.* 446: 293-316.
- Miller JR. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3, Review
- Miller BS, Freeze HH. (2003). New disorders in carbohydrate metabolism: congenital disorders of glycosylation and their impact on the endocrine system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 4: 103-113.
- Miossec-Chauvet E, Mikaeloff Y, Heron D, Merzoug V, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Matthijs G, Van Hulle C, Ponsot G, Seta N. (2003). Neurological presentation in pediatric patients with congenital disorders of glycosylation type Ia. *Neuropediat.* 34: 1-6.
- Mocellin S and Provenzano M. (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med.* 22: 39.

Referenzen

- Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J, Edkins S, Futreal PA, Stratton MR, Turner G, Matthijs G, Gecz J, Munnich A, Colleaux L. (2008). Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet.* 82: 1150-7.
- Morava E, Wevers RA, Cantagrel V, Hoefsloot LH, Al-gazali L, Schoots J, Ko C. (2010). A novel cerebello-ocular syndrome with abnormal glycosylation due to abnormalities in dolichol metabolism. *BRAIN*, 133: 3210–3220.
- Moreman KW, Tiemeyer M and Nairn AV (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Molecular Cell Biology.* 13: 448-462.
- Munro EM and Odell GM. (2002). Polarized basolateral cell motility underlies invagination and convergent extension of the ascidian notochord. *Development* 129: 13-24.
- Myers DC, Sepich DS and Solnica-Krezel L. (2002). Bmp activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation. *Dev. Biol.* 243: 81-98.
- Nieuwkoop PD and Faber J. (1975). *Normal table of Xenopus laevis. (Daudin), North Holland:Amsterdam.*
- Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). *Normal table of Xenopus laevis. (Daudin), Garland Publishing Inc., New York.*
- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Marquardt T. (1998). Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Type Ib Phosphomannose Isomerase Deficiency and Mannose Therapy. *J. Clin. Invest.*, 101: 1414–1420.
- Ohno K, Yuasa I, Akaboshi S, Itoh M, Yoshida K, Ehara H, Ochiai Y, Takeshita K. (1992). The carbohydrate deficient glycoprotein syndrome in three Japanese children. *Brain Dev.* 14: 30–35.
- Ohtsubo K and Marth JD. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 126: 855-67. Review.
- Oppenheimer SB, Alvarez M and Nnoli J. (2008). Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta Histochem.*, 110: 6–13.
- Paesold-Burda P, Maag C, Troxler H, Foulquier F, Kleinert P, Schnabel S, Hennet T. (2009). Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation. *Human Molecular Genetics*, 18: 4350–6.
- Panneerselvam K and Freeze HH. (1996). Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest.* 97: 1478-87.

- Papan C, Boulat B, Velan SS, Fraser SE, Jacobs RE. (2007). Formation of the dorsal marginal zone in *Xenopus laevis* analyzed by time-lapse microscopic magnetic resonance imaging. *Dev Biol.* 305: 161-71.
- Pearl PL and Krasnewich D. (2001). Neurologic course of congenital disorders of glycosylation. *J Child Neurol.* 16: 409-13.
- Person AD, Beiraghi S, Sieben CM, Hermanson S, Neumann AN, Robu ME, Lohr JL. (2010). WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239: 327–37.
- Peters V, Penzien JM, Reiter G, Körner C, Hackler R, Assmann B, Heidemann PH. (2002). Congenital disorder of glycosylation IId (CDG-IId) -- a new entity: clinical presentation with Dandy-Walker malformation and myopathy. *Neuropediatrics*, 33: 27–32.
- Petersen MB, Brostrom K, Stibler H and Skovbya F. (1993). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J. Pediatr.* 122: 66-70.
- Pirard M, Collet JF, Matthijs G and Van Schaftingen E. (1997). Comparison of PMM1 with the phosphomannomutases expressed in rat liver and in human cells. *FEBS Letters.* 411: 251–254.
- Pirard M, Matthijs G, Heykants L, Schollen E, Grünewald S, Jaeken J, van Schaftingen E. (1999). Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett.* 452: 319-22.
- Podbilewicz B. (2004). Sweet control of cell migration, cytokinesis and organogenesis. *Nat Cell Biol.* 6(1):9-11.
- Pollet N, Muncke N, Verbeek B, Li Y, Fenger U, Delius H, Niehrs C. (2005). An atlas of differential gene expression during early *Xenopus* embryogenesis. *Mechanisms of Development.* 122: 365-439.
- Polanska UM, Duchesne L, Harries JC, Fernig DG, Kinnunen TK. (2009). N-Glycosylation regulates fibroblast growth factor receptor/EGL-15 activity in *Caenorhabditis elegans* in vivo. *J Biol Chem.* 284: 33030-33039.
- Powell LD, Panneerselvam K, Vij R, Diaz S, Manzi A, Buist N, Freeze HH, Varki A, (1994). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? *J. Clin. Invest.* 94: 1901-1909.
- Praeter CM De, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegthart JFG, Breuer W, Van Coster RN. (2000). A Novel Disorder Caused by Defective Biosynthesis of N-Linked Oligosaccharides Due to Glucosidase I Deficiency. *The American Journal of Human Genetics.* 66: 1744-1756.

Referenzen

- Quental R, Moleirinho A, Azevedo L and Amorim A. (2010). Evolutionary history and functional diversification of phosphomannomutase genes. *Journal of Molecular Evolution*, 71: 119-27.
- Rafiq MA, Kuss AW, Puettmann L, Noor A, Ramiah A, Ali G, Hu H, Kerio NA, Xiang Y, Garshasbi M, Khan MA, Ishak GE, Weksberg R, Ullmann R, Tzschach A, Kahrizi K, Mahmood K, Naeem F, Ayub M, Moremen KW, Vincent JB, Ropers HH, Ansar M, Najmabadi H. (2011). Mutations in the alpha 1,2-mannosidase gene, MAN1B1, cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 89: 176-82.
- Reynders E, Foulquier F, Leão Teles E, Quelhas D, Morelle W, Rabouille C, Matthijs G. (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Human Molecular Genetics*, 18: 3244-56.
- Rind N, Schmeiser V, Thiel C, Absmanner B, Hocks J, Apeshiotis N, Lehle L. (2010). A severe human metabolic disease caused by deficiency of the endoplasmatic mannosyltransferase hALG11 leads to congenital disorder of glycosylation-Ip. *Human Molecular Genetics*, 19: 1413-1424.
- Roth Z, Yehezkel G and Khalaila I. (2012). Identification and quantification of protein glycosylation. *Int. J. Carbo. Chem.* 2012: 1-10.
- Sambrook J and Russel DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition, *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, N.Y.*
- Santiago-Medina M, Myers JP, Gomez TM (2012). Imaging adhesion and signalling dynamics in *Xenopus laevis* growth cones. *Dev Neurobiol.* 72:585-599.
- Sausedo RA and Schoenwolf GC. (1994). Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos. *Anat. Rec.* 239: 103-112.
- Schade van Westrum SM, Nederkoorn P, Schuurman P, Vulsma T, Duran M, Poll-The B, (2006). Skeletal dysplasia and myelopathy in congenital disorder of glycosylation type IA. *J. Pediatr.* 148: 115-117.
- Schaftingen E Van and Jaeken J. (1995). Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Letters*, 377: 318-320.
- Schambony A and Wedlich D. (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev. Cell* 12: 779-792.
- Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond GV, Hurvitz H, Aebi M (2001). MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If. *JCI*, 108: 1579-1582.

- Schneider A, Thiel C, Rindermann J, DeRossi C, Popovici D, Hoffmann GF, Gröne HJ, Körner C. (2011). Successful prenatal mannose treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice. *Nat Med.* 18: 71-3.
- Schoenwolf GC and Alvarez IS. (1989). Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate. *Development* 106: 427-439.
- Schollen E, Pardon E, Heykants L, Renard J, Doggett NA, Callen DF, Matthijs G. (1998). Comparative analysis of the phosphomannomutase genes PMM1, PMM2 and PMM2 ψ : the sequence variation in the processed pseudogene is a reflection of the mutations found in the functional gene. *Hum Mol Genet.* 7: 157-164.
- Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G. (2000). Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet.* 8: 367-71.
- Schwarz M, Thiel C, Dorland B, De Koning T, Von Figura K, Lehle L and Ko C. (2004). Deficiency of GDP-Man: GlcNAc 2-PP-Dolichol Mannosyltransferase Causes Congenital Disorder of Glycosylation Type Ik. *American Journal of Human Genetics*, 74: 472–481.
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M and Moon RT. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell Biol.* 161: 769-777.
- Shental-Bechor D and Levy Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 8256-61.
- Shrimal S, Ng BG, Losfeld ME, Gilmore R, Freeze HH. (2013). Mutations in STT3A and STT3B cause two congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet.* 22: 4638-45.
- (2000). Early Development of *Xenopus laevis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2000.
- Xenopus laevis* In Vitro Fertilization and Natural Mating Methods. Cold Spring Harb Protoc; 2007.
- Skirkanich J, Luxardi G, Yang J, Kodjabachian L, Klein PS. (2011). An essential role for transcription before the MBT in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 357: 478-91.
- Solis GP, Lüchtenborg AM, Katanaev VL. (2013). Wnt Secretion and Gradient Formation. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 5130-5145.
- Solnica-Krezel L. (2005). Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol.* 15: 213-28.

Referenzen

- Spiro RG. (1973). Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 39: 599–638.
- Spiro RG. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 12: 43-56.
- Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang CC, Hatzistavrou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M, Buckingham M, Hilton D, Nash A, Mohun T, Harvey RP. (1998). DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev.* 77: 173-84.
- Stojkovic T, Vissing J, Petit F, Piraud M, Orngreen MC, Andersen G, Claeys KG, Wary C, Hogrel JY, Laforêt P. (2009). Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 361: 425-7.
- Strom EH, Stromme P, Westvik J and Pedersen SJ. (1993). Renal cysts in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 7: 253–255.
- Stromme P, Maehlen J, Strom EH, Torvik A. (1991). Postmortem findings in two patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, *Acta Paediatr. Scand.* 375 (Suppl.):55–62.
- Stromland K, Hagberg B, Kristiansson B. (1990). Ocular pathology in disialotransferrin developmental deficiency syndrome. *Ophthalmic. Paediatr. Genet.* 11: 309-313.
- Struwe WB and Reinhold VN. (2012). The conserved oligomeric Golgi complex is required for fucosylation of N-glycans in *Caenorhabditis elegans*. *Glycobiology.* 22: 863-75.
- Sumanas S and Ekker SC. (2001). *Xenopus* frizzled-7 morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation. *Genesis.* 30: 119-122.
- Summerton J and Weller D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 187-95. Review.
- Swain RK, Katoh M, Medina A, Steinbeisser H. (2005). *Xenopus* frizzled-4S, a splicing variant of Xfz4 is a context-dependent activator and inhibitor of Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Commun Signal.* 19; 3-12.
- Tada M, Concha ML and Heisenberg CP. (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13: 251-260.
- Tadros W and Lipshitz HD. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development.* 136: 3033-42.
- Takada S, Stark KL, Shea MJ, Vassileva G, McMahon JA and McMahon AP. (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes & Development,* 8: 174-189.

- Tamano K, Sugiura M, Natsuki J, Sawakami-Kobayashi K, Tajima H, Machida M. (2005). Improvement of the lectin-antibody enzyme immunoassay of the alpha-fetoprotein carbohydrate chain for automation with the enzyme immunoassay robot. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69: 1616-9.
- Tan J, Dunn J, Jaeken J and Schachter H. (1996). Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *American Journal of Human Genetics*, 59: 810-7.
- Tan EM and Hhang J. (2008). Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol Rev.* 222: 328-340.
- Tandon P, Showell C, Christine K, Conlon FL. (2012). Morpholino injection in *Xenopus*. *Methods Mol Biol.* 843: 29-46.
- Tatu U, and Helenius A. (1997). Interactions between Newly Synthesized Glycoproteins, Calnexin and a Network of Resident Chaperones in the Endoplasmic Reticulum. *JCB*, 136: 555-565.
- Taylor SC and Posch A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int.* 2014: 361590.
- Tran DT and Ten Hagen KG. (2013). Mucin-type O-glycosylation during development. *J Biol Chem.* 288: 6921-9.
- Thiel C, Lu T, Matthijs G, Von Figura K and Koerner C. (2006). Targeted Disruption of the Mouse Phosphomannomutase 2 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Mol Cell Biol.* 26: 5615-5620.
- Thiel C and Körner C. (2011). Mouse models for congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* 34: 879-89.
- Thiel C, Meßner-Schmitt D, Hoffmann GF and Körner C. (2013). Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36: 887-92.
- Thiel C, Schwarz M, Peng J, Grzmil M, Hasilik M, Bräulke T and Körner C. (2003). A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-li) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 22498–505.
- Timal S, Hoischen A, Lehle L, Adamowicz M, Huijben K, Sykut-Cegielska J, Paprocka J, Jamroz E, van Spronsen FJ, Körner C, Gilissen C, Rodenburg RJ, Eidhof I, Van den Heuvel L, Thiel C, Wevers RA, Morava E, Veltman J, Lefeber DJ. (2012). Gene identification in the congenital disorders of glycosylation type I by whole-exome sequencing. *Hum Mol Genet.* 21: 4151-61.
- Torres MA, Yang-Snyder J.A, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL and Moon RT (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are

Referenzen

- antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133: 1123-1137.
- Traving C and Schauer R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci.* 54: 1330-49.
- Trombetta ES. (2003). The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology.* 13: 77-91.
- Unterseher F, Hefele JA, Giehl K, De Robertis EM, Wedlich D and Schambony A. (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J.* 23: 3259-3269.
- van Bokhoven H, Celli J, Kayserili H, van Beusekom E, Balci S, Brussel W, Skovby F, Kerr B, Percin EF, Akarsu N, Brunner HG. (2000). Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet.* 25: 423-6.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33: 151-208.
- Van der Oost J. (2013). Molecular biology. New tool for genome surgery. *Science.* 339: 768-70.
- Varki A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology,* 3: 97–130.
- Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH and Moon RT. (2003). Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr. Biol.* 13: 680-685.
- Von Dassow M, Davidson LA. (2009) Natural variation in embryo mechanics: gastrulation in *Xenopus laevis* is highly robust to variation in tissue stiffness. *Dev Dyn.* 238: 2-18.
- Vuillaumier-Barrot S, Le Bizec C, De Lonlay P, Madinier-Chappat N, Barnier Anne, Dupré T, Durand G, Seta N, (2006). PMM2 intronic branch-site mutations in CDG-Ia. *Mol. Genet. Met.* 87: 337-340.
- Vuillaumier-Barrot S, Isidor, B, Dupré, T, Le Bizec, C, David, A, Seta, N. (2012). Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. *JIMD Rep.* 5: 123-125.
- Wallingford JB, Fraser SE and Harland RM. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell* 2: 695-706.
- Wallingford JB and Harland RM. (2001). *Xenopus* Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development.* 128: 2581-2592.

- Wallingford JB and Harland RM. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development*. 129: 5815-5825.
- Wallingford JB, Rowing BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, and Harland RM, (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature*. 405: 81-85.
- Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, Segil N, Fraser SE, Chen, P, Wallingford JB and Wynshaw-Boris A. (2006). Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133: 1767-1778.
- Wang Y. (2007). Identification and characterization of interacting partners of cytoplasmic domain of *Xenopus* Paraxial Protocadherin. Doktorarbeit, Universität Heidelberg.
- Wang Y, Janicki P, Köster I, Berger CD, Wenzl C, Großhans J and Steinbeisser H. (2008). *Xenopus* Paraxial Protocadherin regulates morphogenesis by antagonizing Sprouty. *Genes & Dev*. 22: 878-883
- White JA and Heasman J. (2008). Maternal Control of Pattern Formation in *Xenopus laevis*. *Mol Dev Evol*. 310B
- Willert K and Nusse R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4: 1-13.
- Winklbauer R, Medina A, Swain RK and Steinbeisser H. (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature*. 413, 856-860.
- Winklbauer R and Schurfeld M. (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development* 126: 3703-3713.
- Wu X, Rush JS, Karaoglu D, Krasnewich D, Lubinsky MS, Waechter CJ, Freeze HH. (2003). Deficiency of UDP-GlcNAc: Dolichol Phosphate N-Acetylglucosamine-1 Phosphate Transferase (DPAGT1) Causes a Novel Congenital Disorder of Glycosylation Type Ij. *Hum Mutat*. 22: 144-50.
- Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, Freeze HH. (2004). Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nature Medicine*, 10: 518–23.
- Yamaguchi TP. (2008). Genetics of Wnt Signaling During Early Mammalian Development. *Methods in Molecular Biology™ Wnt Signaling Volume* 468: 287-305.
- Yamamoto H, Awada C, Hanaki H, Sakane H, Tsujimoto I, Takahashi Y, Kikuchi A. (2013). The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in

Referenzen

polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms. *Journal of Cell Science*, 126: 2931–43.

Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, Fukushima K, Yuasa I, Ohno K, Takeshita K. (1993a). Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *J. Biol. Chem.* 268: 5783-5789.

Yang Y. (2003). Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 69: 305-17.

Yuan L, Cao Y, Knöchel W. (2007). Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin disables germ layer formation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Dyn*. 236: 2844-51.

Zhao Y, Ishibashi S, Amaya E. (2012). Reverse genetic studies using antisense morpholino oligonucleotides. *Methods Mol Biol*. 917: 143-54.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:...

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Körner dafür, dass er mir das Vertrauen entgegengebracht hat diese Arbeit anzufertigen.

Prof. Dr. Sabine Strahl für das Koreferat sowie eine kritische Analyse der Daten.

Prof. Dr. Thomas Holstein für den prägenden, wissenschaftlichen Enthusiasmus.

Prof. Dr. Gudrun Rappold für die spontane Übernahme des Prüfungsbeisitzes.

PD Dr. Christian Thiel für die ausgezeichnete Korrektur, die konstruktive Kritik sowie das entspannte Ambiente und die angenehmen Diskussionen.

Xenopus laevis dafür, dass sie immer kooperativ ihre Eier zur Verfügung gestellt haben. Wenn sie nicht gestorben sind dann leben sie noch heute:

♂ **Emil, Franz, George, Hugo, Max& Moritz, Paul, Oskar** für eure Gonaden-euer goldenes Perikard wird mir für immer in Erinnerung bleiben- sowie den Damen ♀ **Emma, Lotta, Karla, Amelie, Hannah und wie sie alle heißen ;)**

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Körner, AG Steinbeisser, AG Sauer, AG Peters sowie AG Rappold für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft, die fröhlichen Abende und die spannenden Diskussionen.

Dr. Diana Popovici, Bianca Dimitrov, Markus Jost, Kai Thiemann, Dorothea Messner-Schmidt, Virginia Geiger, Dr. Silvana Opp, Thorsten Ruppert, Charles DeRossi, Kristina Klingbeil, Benji Singler, PD Dr. Verena Peters, PD Dr. Sven Sauer, Dr. Roland Posset, Dr. Ali Tunc Tuncel, Dr. Shoko Komatsuzaki, Roland Imle, Leander Hock, Max Breuer, Dr. Nan Shen, Beitzu Wang, Thorsten Traub, Verena Hemberger sowie allen pädiatrischen Stoffwechsler...

Danksagung

Dr. Lilian Kaufmann, Eva Brinkmann, Judith Schlupf, Rahul Kumar, Kirsten Linsmeier, Inge Bender, Dr. Maria Jungwirth, Anja Kietzmann, Susanne Theiss, Birgit Weiss, Antonino Montalbano, Slavil Peykov.

Meinem *Xenopus laevis* Mentor Prof. Dr. Herbert Steinbeisser für seinen kämpferischen, herzlichen Geist sowie seinen prägenden, wissenschaftlichen Enthusiasmus. Ich werde dich nie vergessen.

Meiner wissenschaftlichen Basis Dr. Mareike Barth, Dr. Hi-Jea Cha, Dr. Valerie Voss, Sven Siegfart und Petra Zugschwerdt für eine großartige, wundervolle Zeit.

Allen Freundinnen und Freunden, die des Öfteren meine Launen ertragen mussten.

Meiner Oma die allzeit für mich da ist und immer einen guten Rat parat hat.

Meinem Vater und Birgit dafür, dass sie mich immer auf dem Boden gehalten haben und mich zu jederzeit unterstützt haben.

Meiner Mutter, Max und Niklas für die aufgebrachte Geduld.