

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplomingenieur (FH) Markus Jost

aus: Friedberg (Hessen)

Tag der mündlichen Prüfung:

Identifizierung und Charakterisierung fukosylierter Proteine
sowie Untersuchungen zur Fukosetherapie in einem Mausmodell
zu der humanen Erberkrankung SLC35C1-CDG

Gutachter: Prof. Dr. Sabine Strahl

PD. Dr. Christian Thiel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Zielsetzung	3
3. Einleitung.....	4
3.1. N-Glykosylierung	4
3.2. Fukose und GDP-Fukose	7
3.2.1. Gewinnung und Anwendung.....	7
3.2.2. In vivo-Synthese von GDP-Fukose	8
3.2.3. Fukose in der Glykosylierung.....	8
3.3. Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)	9
SLC35C1-CDG.....	12
3.4. Der GDP-Fukose-Transporter SLC35C1.....	15
3.5. Gene Ontology	17
4. Material und Methoden.....	20
4.1. Material.....	20
4.1.1. Chemikalien	20
4.1.2. Enzyme und zugehörige Lösungen.....	22
4.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze	22
4.1.4. Antikörper, Lektine und weitere Marker	22
4.1.5. Kits und Standards.....	23
4.1.6. Lösungen	24
4.1.7. Primer	27
4.1.8. siRNA.....	28
4.1.9. Geräte.....	29
4.1.10. Verbrauchsmaterialien.....	31
4.2. Versuchstiere.....	32
4.2.1. Mauslinie.....	32
4.2.2. Maushaltung	33
4.3. Methoden	33
4.3.1. Molekularbiologische Methoden.....	33
4.3.2. Zellkultur-Methoden	38
4.3.3. Proteinbiochemische Methoden.....	40
4.3.4. Histologische Methoden.....	47
4.3.5. Bioinformatische Methoden.....	49

5.	Ergebnisse	51
5.1.	Lektinaffinitätschromatographie.....	51
5.2.	Identifizierung fukosylierter Proteine.....	53
5.2.1.	Gene Ontology.....	55
5.2.2.	Untersuchungen in der Lunge.....	68
5.2.3.	Weitere Untersuchungen im Hippocampus.....	70
5.3.	Histologie Lunge und Niere	73
5.3.1.	Histologie der Lunge	73
5.3.2.	Histologie der Niere	75
5.4.	TGF- β und BMP Pathway Untersuchungen	77
5.4.1.	qPCR Lunge und Niere.....	77
5.4.2.	TGF- β -Aktivierung in Lunge und Gehirn	77
5.5.	Alternativer Golgi-GDP-Fukose-Transporter	79
5.5.1.	Fukoserettung von murinen embryonalen Fibroblasten	79
5.5.2.	Screening nach möglichen Transportern innerhalb der SLC35-Familie	82
5.5.3.	Expressionsänderung durch Fukosesupplementation	85
5.5.4.	Knockdown mittels siRNA.....	86
5.5.5.	Untersuchungen zum Salvage-Pathway in Patientenzellen.....	88
6.	Diskussion.....	90
6.1.	Isolierung und Identifizierung von fukosylierten Proteinen.....	90
6.2.	Gene Ontology Auswertung	92
6.3.	Einfluss von RECK auf die extrazelluläre Matrix	94
6.4.	Alveolendilatation in <i>Slc35c1</i> ^{-/-} -Mäusen.....	95
6.5.	Veränderungen der Niere	97
6.6.	Fukosylierte Hippocampusproteine	99
6.7.	TGF- β Pathway	102
6.8.	Alternativer GDP-Fukose-Transporter.....	103
6.8.1.	Salvage-Pathway	104
6.8.2.	Untersuchungen in Mausfibroblasten.....	104
7.	Literaturverzeichnis	107
8.	Anhang.....	113
8.1.	IBF - SOP Maushaltung (GVT-Zucht).....	113
8.2.	Liste aller gefundenen fukosylierten Proteine.....	115
8.3.	TGF- β BMP Signaling Pathway	119
8.4.	<i>Reck</i> -cDNA.....	121

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
μ	mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)
A	Amper
AAL	<i>Aleuria Aurantia</i> Lektin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	biologischer Prozess (<i>biological process</i>)
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	zelluläre Komponente (<i>cellular component</i>)
CDG	angeborene Glykosylierungsdefekte (<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>)
Ci	Curie ($1 \text{ Ci} = 37 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$)
CMP	Cytidinmonophosphat
ConA	Concanavalin A
Da	Dalton ($1,66053892 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$)
ddH ₂ O	Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (<i>g force</i>)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEF	isoelektrische Fokussierung
iPP	inorganic Pyrophosphatase
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
l	Liter
LAC	Lektinaffinitätschromatographie
LLO	lipidverknüpfte Oligosaccharide (<i>lipid-linked oligosaccharides</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LtQ	Quadrupol-Ionenfalle (<i>linear trap quadrupole</i>)
m	Meter
m	milli ($1 \cdot 10^{-3}$)
M	molar (mol pro Liter)
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEM NEAA	MEM Non-Essential Amino Acids
MF	molekulare Funktion (<i>molecular function</i>)
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
n	nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
NP-40	Nonidet™ P 40 (hier nur der Ersatzstoff)
NST	Nukleotid-Zucker-Transporter (<i>nucleotide sugar transporter</i>)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OST	Oligosaccharyltransferase
p / p-Wert	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit (<i>probability</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAPS	Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PBST	PBS mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)

SLC	Solute Carrier
Strep	Streptavidin
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (<i>Tris-Buffered Saline with Tween</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TIMP	Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt
VEGF	vaskulärer Endothelwachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
v. l. n. r.	von links nach rechts
v/v	Volumen pro Volumen
V _{ges}	Gesamtvolumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z. Dt.	zu Deutsch

Verwendete Symbole und Abkürzungen zur Darstellung von Zuckern und Glykanstrukturen

	Galaktose (Gal)
	Glukose (Glc)
	N-Acetylglucosamin (GlcNAc)
	Mannose (Man)
	N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)
	Fukose (Fuc)
	Fruktose
	Dolichol (Dol)
P	Phosphat

Verwendete Symbole zur Darstellung der Signifikanz (p-Wert)

n. s.	p > 0,05
*	0,05 ≥ p > 0,01
**	0,01 ≥ p > 0,001
***	0,001 ≥ p

1. Zusammenfassung

Für ein besseres Verständnis über die Rolle von Fukose in der Glykosylierung von Proteinen wurden fukosylierte Glykoproteine von Mäusen aus den Geweben Lunge und Niere mittels Lektinaffinitätschromatographie isoliert und massenspektrometrisch identifiziert. Zur Elimination falsch positiver Proteine wurden neben Wildtypmäusen auch fukosedefiziente Mäuse mit ausgeschaltetem Golgi-GDP-Fukosetransporter (Slc35c1) für die Untersuchung herangezogen. Die Daten wurden um bereits identifizierte fukosylierte Proteine aus dem Hippocampus erweitert und mit einer Liste bekannter N-glykosylierter Proteine verglichen. Fukosylierte Proteine wurden weiterhin danach unterteilt, ob diese auch in der Liste der N-glykosylierten Proteine vorkommen, da auch O-fukosylierte Proteine angereichert wurden.. Nachfolgende bioinformatische Analysen mittels Gene Ontology (GO) zeigten in den Kategorien Molecular Function, Cellular Component und Biological Process mehrheitlich Übereinstimmungen bezüglich der vorkommenden Termini und deren Verteilung zwischen N-glykosylierten und fukosylierten Proteinen – vornehmlich bei Termini mit einem hohen Abstraktionslevel. Termini mit abweichender Verteilung oder die exklusiv in einer Gruppe (N-glykosyliert oder fukosyliert) vorkamen, fanden sich vermehrt in einem Gene Ontology-Level mit hohem Detail bezogen auf Proteinfunktion und Lokalisation sowie biologische Prozesse. Auch der Vergleich der fukosylierten Proteine nach der Unterteilung, ob diese in der Liste N-glykosylierter Proteine vorkommen oder nicht, ergab signifikante Unterschiede in allen drei GO-Kategorien.

Weiterführende Untersuchungen identifizierten ferner eine Reihe möglicher Zielproteine, die auf Grund der fehlenden Fukosylierung im Slc35c1-/-Mausmodell für die phänotypischen Veränderungen (Alveolendilatation, Albuminurie, verminderte Muskelkraft, Verhaltensauffälligkeiten) verantwortlich sein könnten. Aussichtsreichste Kandidaten für nachfolgende Untersuchungen sind Rezeptoren des PDGF-Signalweges, Proteine der Filtrationsbarriere in der Niere, Enzyme des Zitratzyklusses und Proteine, die das Angst-Lernverhalten beeinflussen.

Zur Untersuchung der Fukoserettung wurden in der Gruppe der Slc35-Transporter mit unbekannter Funktion Transporter ausgewählt, die jedoch Homologien zu bestimmten Slc35c1-Motiven aufwiesen, die für die Erkennung von GDP-Fukose eine Rolle spielen könnten. Darunter befanden sich zwei Transporter (Slc35f3 und Slc35g1), die durch Fukose reguliert werden. Der Knockdown von Slc35g1, sowie des vermeintlichen GDP-Fukose-Transporters im Endoplasmatischen Retikulum Slc35c2 konnten eine Fukoserettung jedoch nicht verhindern. Eine Aussage über den Einfluss von Slc35f3 war nicht möglich.

Durch Untersuchungen zur Bereitstellung von GDP-Fukose im Zytosol an Zellen eines Patienten mit SLC35C1-CDG, der nicht auf die Gabe von Fukose anspricht, konnte ein Defekt des Salvage Pathways ausgeschlossen werden, was den Schluss nahelegt, dass auch hier der alternative Transportweg von GDP-Fukose in den Golgi-Apparat betroffen sein könnte.

Summary

For a better understanding of the role of fucose in protein glycosylation glycoproteins from lungs and kidneys of mice were isolated by lectin affinity chromatography and identified via mass spectrometry. To eliminate false positive proteins, aside from wildtype animals also mice with a knocked-out Golgi GDP-fucose transporter (Slc35c1) were included in this study. The data were complemented by former identified fucosylated proteins from the hippocampus and compared with a list of known N-glycosylated proteins. Fucosylated proteins were further divided into proteins that were already in the list of N-glycosylated proteins or not, since O-fucosylated proteins were also enriched with this procedure. In the categories Molecular Function, Cellular Component and Biological Process bioinformatics analysis conducted by Gene Ontology reveals predominantly accordance regarding the covered terms and its distribution – primarily at terms with a high level of abstraction. Terms which differ in the distribution or occur exclusively in one group (N-glycosylated or fucosylated) can be increasingly found on a Gene Ontology level of high details according to protein function, localization and biological processes. Comparison of fucosylated proteins by taking into account if they were in the list of N-glycosylated proteins or not, also revealed significant differences in all three GO categories.

Further investigations of the identified proteins resulted in a number of potential target proteins, which may be responsible for the Slc35c1^{-/-} phenotype (dilatation of alveoli, albuminuria, reduced muscle strength, behavioral disorders), because of the missing fucosylation. Promising candidates for ongoing studies are receptors of the PDGF pathway, proteins of the filtration barrier in the kidney, enzyme of the citric acid cycle and proteins associated with fear conditioning.

To investigate the rescue by fucose supplementation, transporters with unknown function but with homologous motives to Slc35c1 motives which might be responsible for GDP-fucose recognition were selected from the the group of Slc35 transporters. Among these transporters two of them (Slc35f3 and Slc35g1) were regulated by fucose. However, knockdown of Slc35g1 as well as Slc35c2, the putative GDP-fucose transporter of the endoplasmic reticulum, could not prevent the rescue with fucose. An evaluation of the function of Slc35f3 was not possible.

By experiments on cells derived from a SLC35C1-CDG patient who is not responding to fucose supplementation, a defect in the salvage pathway as cause for the resistance to therapy could be excluded. Potentially, this patient also suffers from a defect in the alternative transport mechanism.

2. Zielsetzung

Die Glykosylierung von Proteinen spielt für deren korrekte Funktion eine wichtige Rolle. Wie entscheidend dabei ein einzelnes Zuckermolekül, wie die Fukose, sein kann, wird unter anderem bei dem Glykosylierungsdefekt SLC35C1-CDG deutlich. Das Fehlen dieses Zuckers in der aus vielen weiteren Molekülen aufgebauten Glykanstruktur, die wiederum Teil der posttranslationalen Modifikation von Proteinen ist, führt zu erheblichen Defekten. Diese sind multisystemisch und die Patienten leiden zudem unter erheblicher mentaler Retardierung sowie Wachstumsretardierung.

Nach derzeitigem Wissensstand ist zwar zumeist bekannt, welche Proteine wo im Gewebe vorkommen und wie deren Aminosäuresequenz lautet, jedoch weiß man nicht von allen Proteinen, ob es sich dabei um ein Glykoprotein handelt oder nicht und ob dieses auch noch den Zucker Fukose in der Glykanstruktur enthält. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, Proteine, die Fukose tragen zu isolieren und zu identifizieren, um mehr über die Rolle der Fukose im Rahmen der Proteinglykosylierung zu erfahren und Zusammenhänge zwischen dem Fehlen der Fukose und den phänotypischen Auswirkungen an Hand unseres fukose-defizienten Mausmodells (*Slc35c1^{-/-}*) herzustellen. Hierzu soll insbesondere der TGF- β Signalweg in erkrankten und gesunden Mäusen untersucht und verglichen werden.

Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, warum sich manche Patienten mit SLC35C1-CDG und auch unsere embryonalen Mausfibroblasten mit ausgeschaltetem *Slc35c1*-Transporter durch Fukose teilweise therapieren lassen, obwohl die Mutationslage dieses nicht vermuten lässt. Auf welchem alternativen Weg die dringend benötigte GDP-Fukose in den Golgi-Apparat gelangt, ist ungeklärt und ebenfalls Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Die Aufklärung dieses unbekanntes Transportweges könnte dazu beitragen, Patienten noch effektiver oder einfacher zu behandeln und eventuell auch erklären, weshalb einige Patienten nicht auf die Fukosegabe ansprechen. Als alternative Transporter kommen hier vor allem die Transporter der SLC35-Familie, deren Funktion bisher noch nicht bekannt ist, in Frage und sollen bezüglich eines möglichen GDP-Fukosetransports untersucht werden. Parallel zu diesen Studien soll bei einer therapieresistenten SLC35C1-Patientenzelllinie der salvage Pathway auf einen Defekt überprüft werden.

3. Einleitung

3.1. N-Glykosylierung

Die N-Glykosylierung ist eine spezielle Form der Glykosylierung, bei der ein Oligosaccharid über das Stickstoffatom der Aminosäure Asparagin an ein Protein gebunden wird [1]. Sie gehört zu den posttranslationalen Modifikationen von Proteinen [2] und findet in allen drei Domänen, bei Bakterien, Archea und Eukaryoten, statt [3]. Es wird angenommen, dass über die Hälfte aller Proteine glykosyliert sind [4, 5], wobei die N-Glykosylierung den überwiegenden Teil ausmacht [6]. Neben der Größenänderung beeinflusst die Glykosylierung von Proteinen die physiochemischen Eigenschaften dieser Moleküle, wie deren Stabilität, Löslichkeit, Polarität und Konformation. Funktional spielen diese Modifikationen eine wichtige Rolle bei komplexen biologischen Prozessen, wie dem Wachstum, der Differenzierung, Entwicklung von Organen, der Signaltransduktion und der Immunabwehr. Sie verändern die Antigenizität der Proteine und die Erkennung durch andere, glykanbindende Proteine, die Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen und die Lokalisation in der Zelle [7-9]. Typischerweise sind daher fast alle Rezeptoren der Zelloberfläche, Proteine der extrazellulären Matrix und sekretierte Proteine N-glykosyliert [10]. Aber auch innerhalb der Zelle und in Zellorganellen sind Proteine mit N-Glykosylierung anzutreffen [11, 12].

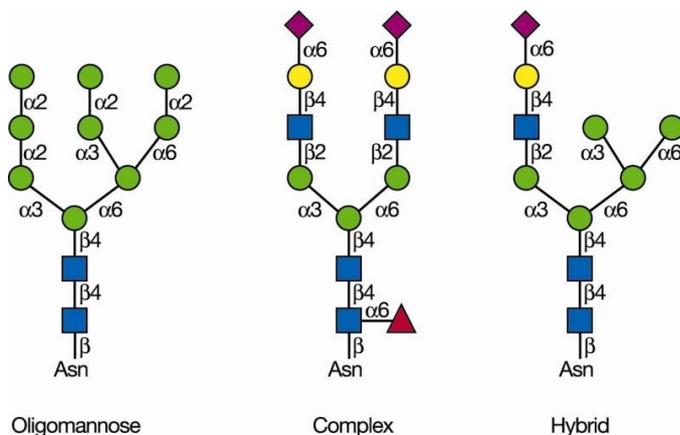


Abbildung 3.1 Beispiele für die drei N-Glykan-Typen Oligomannose (auch High-Mannose), Komplex und Hybrid, zwischen denen unterschieden wird [8].

Strukturell werden die N-Glykane in drei verschiedene Typen unterteilt: Oligomannose oder High-Mannose, Komplex-Typ und Hybrid-Typ (siehe Abbildung 3.1). Allen drei Strukturen gemein ist der Aufbau des unteren Teils, der Corestruktur des Glykans, die mit dem Asparaginrest des Proteins verknüpft ist. Sie lautet: $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$. Während beim High-Mannose-Typ die restliche Struktur oder Antenna-Region nur aus dem Zucker Mannose aufgebaut ist, folgt bei dem Komplex-Typ auf die Corestruktur je ein N-Acetylglucosamin gefolgt von weiteren Monosacchariden. Bei dem Hybrid-Typ ist die Antenna-Region seitens des $\text{Man}\alpha 1-6$ Armes nur aus Mannose aufgebaut, während sich auf der $\text{Man}\alpha 1-3$ -Seite ein oder zwei Antennen vergleichbar mit dem Komplex-Typ befinden [8].

Ob und wie ein Asparaginmolekül eines Proteins glykosyliert wird, kann nicht eindeutig vorausgesagt werden. Jedoch sind einige Voraussetzungen bzw. Einschränkungen für die N-Glykosylierung von Proteinen bekannt. Dazu gehört unter anderem die direkte Umgebung des Asparagins. Die am häufigsten N-glykosylierte Standard- oder Konsensussequenz lautet Asn-X-Ser/Thr, wobei das X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht [8, 13, 14]. Datenbankanalysen haben gezeigt, dass etwa zweidrittel aller N-Glykane an diese Konsensussequenz gebunden sind und es wird angenommen, dass wiederum zweidrittel der Asn-X-Ser/Thr-Sequenzen glykosyliert sind [8]. Weitere bekannte Sequenzen, die N-glykosyliert sein können, sind Asn-X-Cys, Asn-Gly oder Asn-X-Val [13, 14]. Weiterhin hängt die Glykosylierung auch davon ab, wie flexibel die Domäne mit der Konsensussequenz ist [3] oder wie zugänglich sie auf Grund der Proteinkonformation ist [8]. So befindet sich der überwiegende Teil der N-Glykosylierungsstellen auf Loops oder Turns in der Sekundärstruktur der Proteine [14]. Auch die variable Aminosäure X in der Konsensussequenz könnte die Effizienz der Glykosylierung beeinflussen [8]. Auf diese Weise können Glykoproteine eine Vielzahl an N-Glykosylierungsstellen tragen, die wiederum ein unterschiedliches Potential haben, tatsächlich glykosyliert zu werden und das mit einer Variation aus den oben beschriebenen N-Glykanen. Man spricht dabei von der Heterogenität der Glykoproteine [15]. Zudem beeinflussen angeborene Defekte der Glykosylierung (siehe hierzu Abschnitt 3.3) aber auch Erkrankungen wie Krebs oder Entzündungen und selbst eine Schwangerschaft das Glykosylierungsmuster von Proteinen [16].

Im Wesentlichen kann die N-Glykosylierung in drei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird eine einheitliche Vorform eines Oligosaccharids auf einem Dolicholmolekül aufgebaut. Danach erfolgt der *en bloc* Transfer auf das Protein/Polypeptid und im letzten Schritt findet die weitere Prozessierung des Oligosaccharids statt [1]. Die N-Glykosylierung beginnt auf der zytosolischen Seite der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Dort wird das Oligosaccharid für Molekül auf ein in der Membran sitzendes Dolichol-Phosphat neu synthetisiert. Dazu wird von der N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase ein GlcNAc-1-P auf das Dolichol-Phosphat übertragen. Es folgen der Einbau eines weiteren N-Acetylglucosaminrests, sowie fünf Mannosereste. Als Quelle dienen die nukleotidaktivierten Monosaccharide UDP-GlcNAc bzw. GDP-Man, die jeweils von spezifischen Glykosyltransferasen auf das Glykan übertragen werden. Die weitere Synthese erfolgt innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums, nachdem die Glykanvorstufe in Form des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ mittels einer Flippase auf die Membraninnenseite gedreht wurde. Hier werden vier Mannose- und danach drei Glukosemoleküle in die Glykanstruktur eingebaut. Der Transport dieser Zucker erfolgt ebenfalls über je ein Dolichol-Phosphat in der ER-Membran, auf welches zuvor die Monosaccharide auf der zytosolischen Seite übertragen wurden und dann über einen „Flip“ auf die Innenseite gelangen, um den ER-seitigen Transferasen zur Verfügung zu stehen. Die bis hier synthetisierte Glykanstruktur bestehend aus $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ wird nun *en bloc* auf das Asparagin eines naszierenden Proteins übertragen. Das dafür erforderliche Enzym, die aus mehreren Untereinheiten bestehende Oligosaccharyltransferase, bindet dazu an den Dolichol-Glykan-Komplex

und spaltet die hochenergetische GlcNAc-Phosphat-Bindung. Was nun folgt, ist das Trimmen des gerade noch aufgebauten Glykans. Nacheinander werden die drei Glukosemoleküle durch die Enzyme α -Glukosidase I und II wieder entfernt. Diese Schritte spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Glykoproteinfaltung. Die Chaperone des Endoplasmatischen Retikulums erkennen dabei die gekürzten Strukturen des Glykans. In vielen Fällen wird das Oligosaccharid auch noch durch die α -Mannosidase I um eine Mannose verkleinert, so dass die N-Glykane nur acht oder neun Mannosereste neben den zwei N-Acetylglucosaminen bestehen, wenn sie das Endoplasmatische Retikulum verlassen. Von dort gelangen die N-glykosylierten Proteine über Vesikel in den Golgi Apparat, wo die Prozessierung fortgesetzt wird.

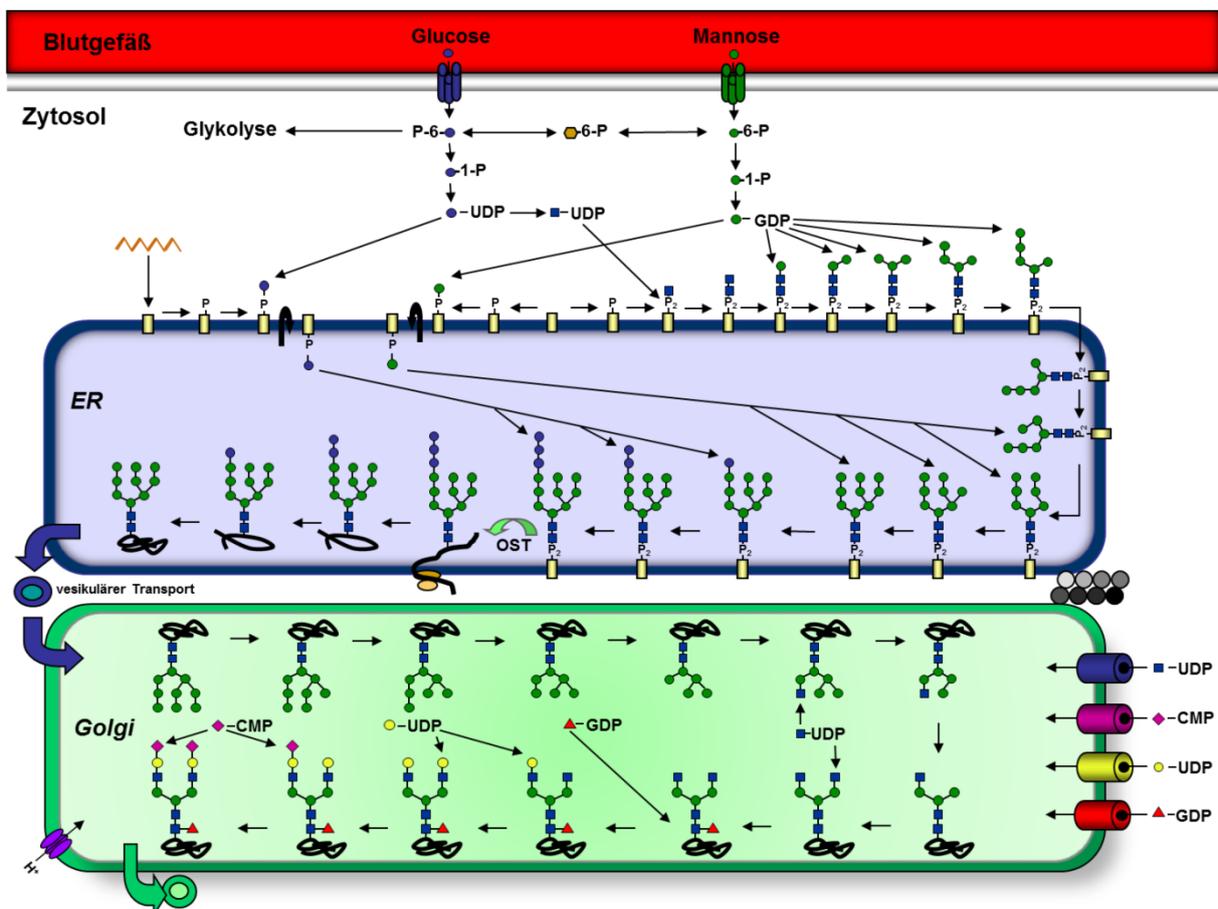


Abbildung 3.2 Schematischer Verlauf der N-Glykosylierung des Komplex-Typs im Zytosol, Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat. Modifiziert nach Thiel und Körner (2011) [7].

Für die Bildung von N-Glykanen des Komplex- oder Hybridtypen, werden bei mehrzelligen Organismen weitere Mannosen durch α -Mannosidasen bis zur Struktur $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ enzymatisch abgespalten. Für die Synthese eines biantennären Komplextypen, wie sie in Abbildung 3.2 beispielhaft dargestellt ist, wird zunächst ein N-Acetylglucosamin eingebaut, wonach zwei weitere Mannosen abgespalten werden können. Anschließend wird auf dem verbleibenden Arm ebenfalls ein N-Acetylglucosamin mit der Mannose verbunden. Zusätzliche mögliche Modifikationen des N-Glykans umfassen den Einbau weiterer Monosaccharide in die Corestruktur, die Verlängerung der Antennen und das „Capping“ der verlängerten Antennen. Bei den Wirbeltieren wird am häufigsten die Fukose über eine α 1-6 Bindung mit dem

ersten N-Acetylglucosamin als Modifikation der Corestruktur verknüpft. Ebenfalls häufig zu finden ist die Erweiterung der Antennen durch Galaktose. Diese Gal-GlcNAc-Kette kann durch weitere N-Acetylglucosamine und Galaktosen sequentiell erweitert werden. Zu den wichtigsten „Capping“-Reaktionen der Antennen zählen der Einbau von Sialinsäure, Fukose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und Sulfaten [8]. Der Transport der erforderlichen Monosaccharide in den Golgi Apparat erfolgt dabei nicht wie im Endoplasmatischen Retikulum über Dolichol, sondern die nukleotidaktivierten Zucker (UDP-N-Acetylglucosamin, CMP-Sialinsäure, UDP-Galaktose und GDP-Fukose) werden über spezifische Membrantransporter in das Golgilumen geschleust [7].

3.2. Fukose und GDP-Fukose

Fukose oder auch 6-Deoxy-Galactose ist ein Monosaccharid mit sechs Kohlenstoffatomen. Im Gegensatz zu den Hexosen, die alle die Summenformel $C_6H_{12}O_6$ haben, besitzt Fukose keine OH-Gruppe an der C-6-Position und die Summenformel der Fukose lautet daher $C_6H_{12}O_5$ bei einer molaren Masse von 164,16 g/mol. Wie bei allen Monosacchariden gibt es auch bei der Fukose zwei isomere Strukturen: die D-Fukose und die L-Fukose. Jedoch unterscheidet sich die Fukose auch hier von den meisten in der Natur vorkommenden Zuckern, da das L-Enantiomer der Fukose (siehe Abbildung 3.3) in der Glykosylierung genutzt wird [17].

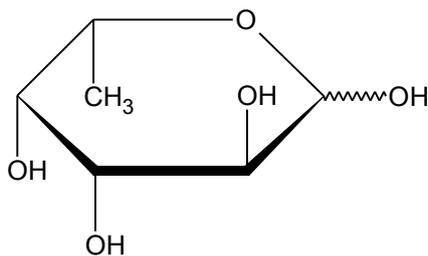


Abbildung 3.3 L-Fukose in der cyclischen Form

L-Fukose und dessen Derivate sind in der Natur weit verbreitet. Angefangen bei Gram negativen Bakterien, wo sie ein Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) sind, über Pflanzen, wie zum Beispiel in den Zellwänden der Kartoffel und Kiwi, in Samen der Sojabohne oder im Schleim des Wasserschilds (*brasenia schreberi*) bis hin zu Menschen und Tieren unter anderem als Bestandteil von Glykoproteinen (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1) [18].

3.2.1. Gewinnung und Anwendung

Eine Methode zur Gewinnung von L-Fukose ist die Hydrolyse von Fucoidan, einer sulfatierten PolyFukose, die in Braunalgen vorkommt. Black et al. entwickelten ein Verfahren mit einer Gesamtausbeute von etwa 50% der in der Alge enthaltenen L-Fukose. Darüber hinaus kann Fukose auch chemisch synthetisiert werden. So lässt sich D-Fukose durch Abspaltung der OH-Gruppe des CH_2OH -Rests am C-5-Atom der D-Galaktose herstellen, jedoch ist D-Fukose weniger von Interesse und die Verfügbarkeit von L-Galaktose zur Herstellung von L-Fukose eingeschränkt. Weitere in der Literatur beschriebene Verfahren zur Synthese von L-Fukose nutzen D-

Glukose, L-Rhamanose, D-Mannose oder D-Galaktose als Ausgangsstoff, jedoch mit vielen Zwischenprodukten und teilweise sehr geringen Ausbeuten. Eine einfachere und günstigere Variante zur Gewinnung von L-Fukose ist daher die Isolierung aus LPS oder extrazellulären Polysacchariden von Mikroorganismen [18].

In der Medizin wird L-Fukose zur Therapie von SLC35C1-CDG, einem Glycosylierungsdefekt, der zu Hypofukosylierung von Proteinen führt, eingesetzt. Durch die Gabe von L-Fukose konnten die Symptome teilweise gelindert werden [19]. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt im Abschnitt 0. Neben dieser medizinischen Anwendung gibt es noch eine kosmetische Anwendung dieses Zuckers. Die Firma Solabia vertreibt unter dem Namen Fucogel[®] ein Produkt aus Galacturonsäure, L-Fukose und D-Galaktose als Zusatz für Pflegeprodukte, die auf der Haut und auf den Haaren angewendet werden [18].

3.2.2. In vivo-Synthese von GDP-Fukose

Die nukleotidaktivierte Form der Fukose, die GDP-Fukose, kann von Säugetieren auf zwei unterschiedliche Arten synthetisiert werden. Zum einen aus der nukleotidaktivierten Mannose (GDP-Mannose) über den *de novo* Pathway oder mittels des salvage Pathways aus freier L-Fukose [17]. Beide Reaktionen finden im Zytoplasma der Zelle statt, jedoch werden etwa 90 % der GDP-Fukose über den *de novo* Pathway bereitgestellt, während die restlichen 10 % auf den salvage Pathway entfallen. Bei der *de novo* Synthese von GDP-Fukose wird über einen Zwischenschritt aus der GDP-Mannose mittels der GDP-Mannose 4,6-Dehydratase und dem Cofaktor NADP GDP-4-Keto-6-Deoxymannose gebildet, welches wiederum im nächsten Schritt von dem sogenannten FX-Protein zu GDP-Fukose umgesetzt wird. Genaugenommen handelt es sich bei dem FX-Protein um ein Protein mit zweierlei Aktivität: eine GDP-Keto-6-Deoxymannose 3,5-Epimerase/4-Reduktase. Daher entsteht hier noch kurzzeitig ein weiteres Zwischenprodukt, GDP-4-keto-6-deoxygalktose, das letztendlich mit NADPH als Cofaktor zu GDP-Fukose umgesetzt wird. Die für den salvage Pathway benötigte freie Fukose kann extrazellulär aufgenommen werden oder stammt aus dem Lysosom, wo Fukose aus Glykanen nach α -Fukosidase-Abbau wiedergewonnen wird. Hier wird die Fukose in einer zweistufigen Reaktion zunächst durch die Fukokinase und ATP zu Fukose-1-Phosphat umgewandelt, aus welche wiederum durch GDP-Fukose-Pyrophosphorylase und GDP die GDP-Fukose entsteht [17, 20].

3.2.3. Fukose in der Glykosylierung

Der Einbau von Fukose erfolgt durch Fukosyltransferasen, die als Substrat die nukleotidaktivierte Form GDP-Fukose benötigen. Bei Säugetieren wird diese Reaktion von mindestens elf verschiedenen Fukosyltransferasen katalysiert. Sie unterscheiden sich in der Glykanstruktur, die dem Enzym als Akzeptor der Fukose dient. Fukose kann in N-, O- und Lipidverknüpften Oligosacchariden gefunden werden [21]. In Säugerzellen kann Fukose an zwei verschiedene Monosaccharide eines N-Glykans während der Prozessierung im Golgi angeheftet werden: in der Antennaregion über eine α 1,2-glycosidische Bindung mit terminaler Galaktose oder weiter innen liegend α 1,3- oder α 1,4-verknüpft mit N-Acetylglucosamin bzw. in der

Coreregion mittels α 1,6-Bindung am ersten N-Acetylglucosamin des N-Glykans [22]. Bei der O-Glykosylierung findet man Fukose α 1,2-verknüpft mit Galaktose, α 1,3-gekoppelt an N-Acetylglucosamin oder auch direkt an der Aminosäure Serin oder Threonin [8].

3.3. Congenital Disorders of Glycosylation (CDG)

Angeborene Glykosylierungsdefekte kurz CDG von der englischen Bezeichnung Congenital Disorders of Glycosylation ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von genetischen Defekten, die im Zusammenhang mit der Glykosylierung von Proteinen und Lipiden stehen. Die Glykosylierung ist ein hochkomplexer Prozess, an dem über 250 Proteine beteiligt sind. Daher ist die Zahl der bekannten CDG-Typen seit der ersten Beschreibung eines N-Glykosylierungsdefekts 1980 stetig gestiegen [9]. So konnten etwa beim Menschen bis 2013 über 100 genetische Defekte ausgemacht werden, die Gene der Glykosylierung betreffen (siehe Abbildung 3.4). Dieser Trend wird vermutlich noch weiter gehen, da wenigstens 2 % des menschlichen Genoms für Proteine kodieren, die an der Biosynthese von Glykanen oder deren Erkennung beteiligt sind und modernere Techniken wie das Next-Generation-Sequenzierung für deren Analytik zur Verfügung stehen [16].

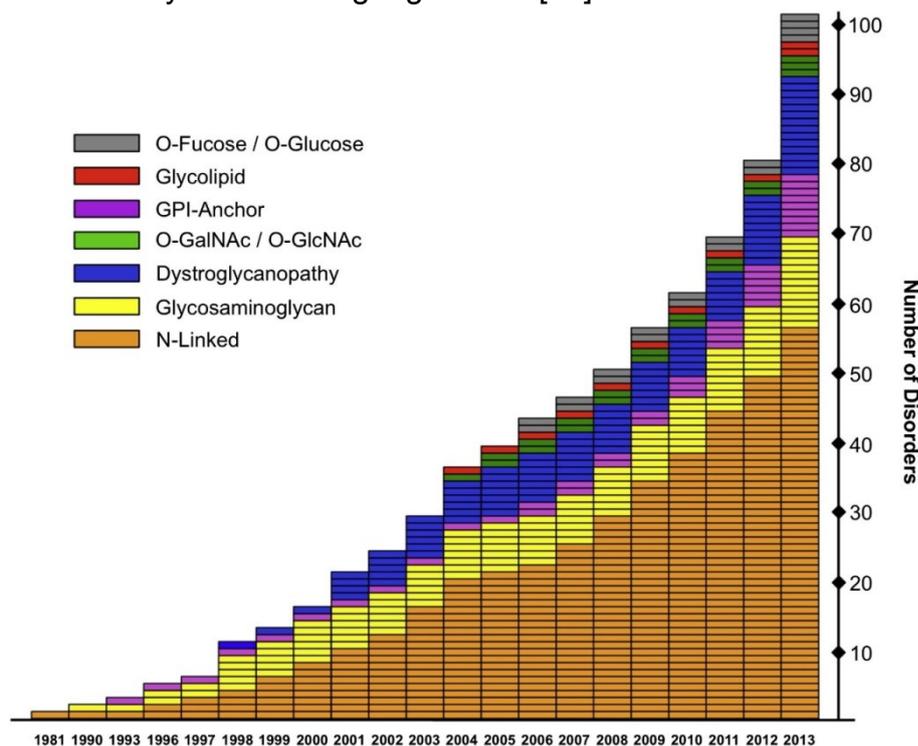


Abbildung 3.4 Darstellung der Summe aller bekannten humanen Glykosylierungsstörungen im jeweiligen Jahr. Aus Freeze et al. (2014) [16]

Obwohl CDG zu den seltenen Erkrankungen zählt, gehören sie zu der am stärksten wachsenden Gruppe monogenetisch vererbter Erkrankungen. Bei den bisher bekannten Typen erfolgt die Vererbung zumeist autosomal-rezessiv mit Ausnahme von MGAT1-CDG, ALG13-CDG, SLC35A2-CDG und SSR4-CDG die gonosomal auf dem X-Chromosom liegt und EXT1/EXT2-CDG, die dominant vererbt werden [16, 23].

Die am häufigsten vorkommende CDG-Erkrankung ist PMM2-CDG (CDG-Ia). Sie macht etwa 60-80 % aller bisher diagnostizierten CDG-Fälle aus [10] und es sind weltweit über 700 Fälle dokumentiert [24]. Ursache für die Erkrankung ist eine Mutation im Gen *PMM2*, welches für das Enzym Phosphomannomutase 2 codiert. Es katalysiert die Reaktion von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat [10] und spielt daher bereits zu Beginn der N-Glykosylierung eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 3.2 in Abschnitt 3.1). Besonders betroffen davon sind das zentrale und periphere Nervensystem. Dennoch handelt es sich um eine multisystemische Erkrankung. Klassische Symptomen bei betroffenen Kleinkindern sind Gedeihstörungen, invertierte Mamillen, subkutane Fettpolster und weitere Lipodystrophien. Die Kinder sind hypoton, entwicklungsverzögert und leiden unter Strabismus. Die Mortalität bei Kleinkindern liegt bei 20 % [10].

Studien zur Häufigkeit von PMM2-CDG-Fällen in der Bevölkerung sind rar. Die erwartete Inzidenz für eine homozygote Mutation liegt aber 1:20.000 und lässt eine weit höhere Fallzahl vermuten, als die bisher dokumentierten Fälle. Die Symptomatik von CDG ist dabei sehr verschieden. Jedoch gibt es für einige CDG-Erkrankungen typische Symptome wie psychomotorische Retardierung, Gedeihstörungen, Koagulopathie, Dismorphien, Krampfanfälle und infarktähnliche Schübe. Erschwerend für die korrekte Diagnose sind die Ähnlichkeit zu anderen, besonders neurologischen Erkrankungen und das fehlende Wissen über CDG seitens der behandelnden Ärzte. Abhängig von der biochemischen Lokalisation des Defekts werden die verschiedenen CDG-Typen in zwei Gruppen unterteilt: dem Typ I und Typ II bzw. CDG-I und CDG-II. Die genaue Bezeichnung der Erkrankung erfolgte ursprünglich dann durch einen nachgestellten Kleinbuchstaben, wie z. B. CDG-Ia oder CDG-IIc [9]. Dabei handelt es sich um einen CDG vom Typ I, wenn die Synthese des dolicholgekoppelten Glykans, dem lipid-linked oligosaccharid (LLO), die Bereitstellung der für die Synthese notwendigen Produkte oder der Transfer von dem LLO auf das nasszierende Protein betroffen ist (früher Defekt). In Folge dessen kommt es bei vielen CDG-I-Typen zur Akkumulation von verkürzten LLOs im ER, da diese ein schlechtes Substrat für die Oligosaccharyltransferase darstellen und es werden weniger Glykane auf neusynthetisierte Glykoproteine übertragen. Ein CDG vom Typ II liegt dagegen vor, wenn der Defekt in der späteren Prozessierung des proteingebundenen N-Glykans auftritt. Daher führt dieser Typ nicht zum Verlust von Glykanen, sondern die Oligosaccharide befinden sich in verkürzter Form auf den Glykoproteinen [25]. Aufgrund der Vielzahl an neuidentifizierten Defekten in den letzten Jahren wurde 2009 jedoch eine genbasierte Nomenklatur eingeführt, die heute primär verwendet wird. Sie besteht aus dem Namen des Gens, welches den Defekt trägt gefolgt von „-CDG“. So lautet z. B. die Bezeichnung von CDG-Ia jetzt PMM2-CDG. Entsprechend wurde auch die Einteilung der CDG-Typen angepasst. Es wird nun zwischen folgenden vier Gruppen unterschieden: Protein N-Glykosylierung, Protein O-Glykosylierung, Lipidglykosylierung und Glycosylphosphatidylinositol-Anker-Glykosylierung, sowie Defekte, die multiple oder andere Pathways der Glykosylierung betreffen. Die klassische Unterteilung der CDG-Subtypen findet aber immer noch bei der Diagnostik des Serumtransferrins statt [9].

Das wie zum Teil schon beschriebene klinische Bild eines CDG-Patienten ist multisystemisch und kann sehr unterschiedlich ausfallen. Die eindeutige Diagnose von CDG erfordert daher immer eine Analyse der Glykanstrukturen. Als Standardmethode ist seit vielen Jahren die Analyse des Serumtransferrins als Markerprotein etabliert. Transferrin ist ein im Serum vorkommendes und eisenbindendes Glykoprotein mit einheitlichem N-Glykosylierungsmuster und Sialinsäuren in der Antennaregion. Die Analyse kann mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF), Kapillarzonen-Elektrophorese, HPLC oder Massenspektrometrie erfolgen [25]. Auf der linken Seite der Abbildung 3.5 ist ein typisches Bandenmuster nach isoelektrischer Fokussierung von Transferrin einer Kontrolle bzw. eines Typ I und Typ II CDG-Falles zu sehen. Bei dem Transferrin einer gesunden Kontrolle findet man überwiegend Oligosaccharide mit insgesamt vier Sialinsäuren (tetrasialo), während bei CDG-I eine Erhöhung des Signals bei Strukturen mit zwei (disialo) bzw. ohne (asialo) Sialinsäuren zu beobachten ist. Bei CDG-II findet man dagegen eine Kombination von verstärkten Banden der trisialen, disialen, monosialen und asialen Strukturen [9].

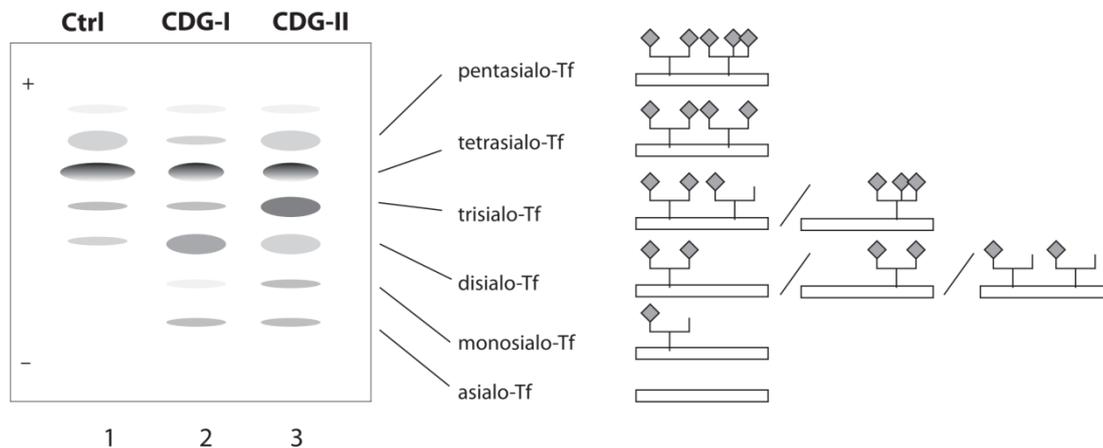


Abbildung 3.5 Schematische Darstellung eines IEF-Laufmusters von Transferrin (Tf) einer Kontrolle (Spur 1), eines CDG Typ I (Spur 2) und Typ II (Spur 3) (linke Seite), sowie der häufigsten Sialinsäureverteilung der N-Glykane (rechte Seite). Aus Goreta et al. (2012) [9]

Die Verwendung von Serumtransferrin als Marker für CDG unterliegt dabei jedoch einigen Einschränkungen. So kann es unter anderem nicht für die Abklärung von Dystroglykanopathien wie Walker-Warburg-Syndrom, Muscle-Eye-Brain Disease oder Fukuyama genutzt werden. Hier verwendet man α -Dystroglykan als Markerprotein. Ferner kann Transferrin auch nicht für die Diagnose von Defekten in der O-Glykosylierung des Mucin-Typs herangezogen werden. Stattdessen ist in diesem Falle das Apolipoprotein-CIII zur Abklärung geeignet. Neben diesen beiden Spezialfällen ist noch zu berücksichtigen, dass es bei der Analyse des Serumtransferrins bei Neugeborenen bis zu einem Alter von 3 Monaten zu falsch positiven CDG-II-Befunden kommen kann, da in diesem frühen postnatalen Stadium die Glykanstrukturen teilweise noch nicht vollständig vorhanden sind. Studien haben allerdings gezeigt, dass zur Untersuchung von CDG-Erkrankungen innerhalb der ersten drei Monate das ebenfalls N-glykosylierte Akute-Phase-Protein α -1-Antitrypsin verwendet werden kann. Hierbei ist jedoch keine Unterscheidung zwischen CDG-I und CDG-II möglich. In solch einem Fall würde eine Analyse des Transferrins zu

einem späteren Zeitpunkt herangezogen werden. Weltweit wurden durch die Untersuchung des Transferrins bereits um die 1000 Fälle vom CDG Typ I und Typ II identifiziert. Die genaue Bestimmung des jeweiligen Typen erfordert allerdings weiterführende Untersuchungen auf biochemischer oder molekularbiologischer Ebene [25].

Zwar haben neuere Analysemethoden dazu beigetragen, dass in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer CDG-Erkrankungen entdeckt wurden, jedoch können bis heute nur sehr wenige Typen von CDG therapiert werden. Gründe für die schleppende Entwicklung geeigneter Methoden sind unter anderem der Mangel an geeigneten Modellsystemen, die hohen Kosten, die geringe Patientenzahl und die eingeschränkte Bioverfügbarkeit der Medikamente, um deren Ziel zu erreichen. Daher sind heute nur sechs der bekannten CDG-Typen, nämlich MPI-CDG, PGM1-CDG, SLC35A2-CDG, SLC39A8-CDG, SLC35C1-CDG und PIGM-CDG, teilweise behandelbar. Bei MPI-CDG, einem Defekt der Phosphomannoseisomerase konnte durch Mannosegabe der Level an Mannose-6-Phosphat erhöht und die klinischen Merkmale bei Patienten verbessert werden. Die Supplementation mit Galaktose führte bei Patienten mit Mutationen der Phosphoglukomutase (PGM1-CDG) zu einer fast vollständigen Normalisierung der Transferriglykosylierung. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei einem Patienten mit einem Defekt des UDP-Galaktosetransporter SLC35A2 nach Galaktosegabe erzielt werden. Auch ein fehlerhafter Mangantransporter (SLC39A8) verursacht Glykosylierungsdefekte, da die β -1,4-Galaktosyltransferase auf Mangan angewiesen ist. Die Glykosylierungsdefekte konnten aber durch Galaktosesupplementation normalisiert werden. Patienten mit SLC35C1-CDG, einem Defekt des Golgi-GDP-Fukose-Transporters sprechen zum Teil auf die Gabe von L-Fukose an. Ein anderer Patient mit einem Defekt in der Biosynthese des Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (PIGM-CDG) konnte mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Natriumphénylbutyrat behandelt werden, wodurch der Patient wieder gehen konnte und keine Krampfanfälle mehr hatte [26-28].

SLC35C1-CDG

Der Glykosylierungsdefekt SLC35C1-CDG wird durch eine Mutation des *SLC35C1*-Gens verursacht. Es codiert für den in der Golgimembran sitzenden GDP-Fukose-spezifischen Transporter, der die für die Glykosylierung notwendige GDP-Fukose vom Zytosol in den Golgi-Apparat befördert [21]. Die Erkrankung ist auch unter der älteren Bezeichnung CDG-IIc sowie Leukozyten-Adhäsionsdefekt Typ II (LAD2) oder Rambam-Hasharon Syndrom bekannt. Der OMIM Code lautet 266265.

In Folge des defekten Membrantransporters kommt es zu einer generellen Hypofukosylierung von Glykoproteinen der Patienten [29]. Die Symptome, die bei Kindern mit SLC35C1-CDG festgestellt wurden, umfassen Dismorphien, wie ein flaches Gesicht mit breitem Nasenrücken und nach vorn geneigten Nasenlöchern, lange Wimpern, breite Handflächen, sowie kurze Arme und Beine (siehe Abbildung 3.6) [30]. Weiterhin leiden die Patienten unter einer mentalen Retardierung, sowie Wachstumsretardierung. Bei etwa der Hälfte aller Fälle wurde eine zerebrale Atrophie festgestellt. Allen Betroffenen gemein ist dagegen ein Anstieg der

neutrophilen Granulozyten und wiederkehrende Infektionen [31]. Nach wie vor biochemisch kennzeichnend für SLC35C1-CDG ist das Fehlen von fukosylierten Glykanstrukturen auf Proteinen wie dem H-Antigen, Lewis X, P- und E-Selectin. Daher kann es auch nicht zu dem Rollen der Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen kommen [32]. Das Fehlen der α -1,2-Bindung von Fukose und Galaktose des H-Antigens an den Glykanen, welche die Blutgruppe codieren [17], führt dazu, dass alle Patienten die Bombay-Blutgruppe (O_h) besitzen [30, 33].

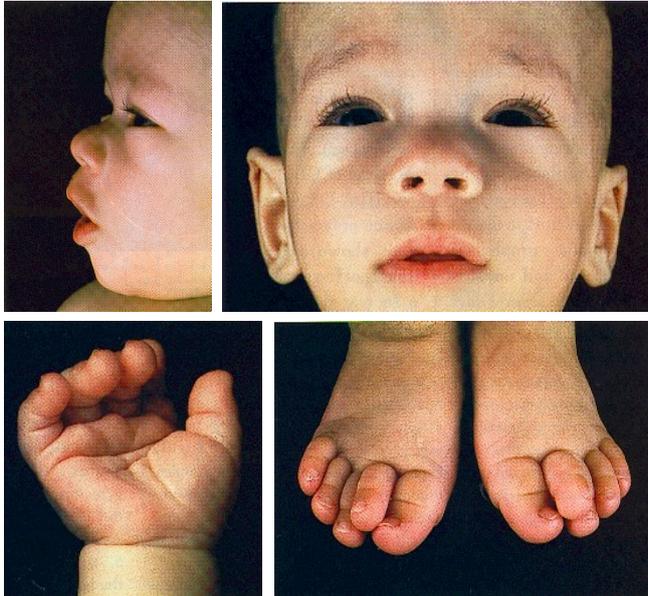


Abbildung 3.6 Dismorphien eines Patienten mit SLC35C1-CDG. Aus Marquardt et al. (1999) [30]

Weltweit gibt es derzeit elf bestätigte Fälle dieses CDG-Typs [34] (Übersicht in Tabelle 3.1). Die ersten beiden bekannten Patienten, zwei Jungen arabischer Herkunft, wurden 1992 von Frydman et al., damals als Rambam-Hasharon Syndrom, in Israel beschrieben [35]. Noch im selben Jahr schlugen Etzioni et al. auf Grund der Ähnlichkeit der Erkrankung zu dem bisher bekannten Leukozyten-Adhäsionsdefekt (in beiden Fällen kann keine Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen stattfinden [36]) die neue Bezeichnung Leukozyten-Adhäsionsdefekt Typ II vor [37]. 1999, sieben Jahre nach dem Bekanntwerden der ersten Fälle wurde der dritte Patient, ein türkischstämmiges Kind, mit Leukozyten-Adhäsionsdefekt Typ II diagnostiziert [30] und ein Jahr später berichteten Etzioni und Tonetti von zwei weiteren Patienten ebenfalls arabischen Ursprungs aus derselben Gegend wie die ersten beiden Patienten [33]. In 2003 und 2006 folgten dann die Fälle eines Kindes brasilianischer [38] und pakistanischer Abstammung [29]. Die Letzten vier bekannten Fälle von SLC35C1-CDG betreffen jeweils zwei Geschwister, zwei Brüder aus Großbritannien, sowie ein Junge und ein Mädchen aus der Türkei, und wurden 2014 veröffentlicht [34, 39].

Bereits bei der Beschreibung der Indexpatienten 1992 wurde auf Grund des Bombay-Phänotyps die Ursache der Erkrankung durch eine fehlerhafte Fukosylierung diskutiert [35]. In mehreren Veröffentlichungen vermutete man den Defekt im *de novo* Pathway der GDP-Fukose-Biosynthese. Mutationen der Fukosyltransferasen hielt man dagegen für unwahrscheinlich, da bei den bekannten

betroffenen Glykoproteinen mehrere Transferasen defekt sein müssten [19, 40, 41]. Obwohl die genaue Ursache noch unbekannt war, begann man bei dem dritten bekannten Patienten mit einer Fukosetherapie, bei der dem Patienten oral L-Fukose verabreicht wurde, nachdem Marquardt et al. eine Refukosylierung von Patientenzellen durch Fukosesupplementation in Zellkulturversuchen nachwies. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten konnte dadurch auf ein normales Level gesenkt werden [19]. Vergleichbare Erfolge blieben jedoch bei den anderen bis dato bekannten Patienten aus [33]. 2001 konnte u. a. von unserer Arbeitsgruppe die genaue Ursache der Erkrankung, Mutationen im *SLC35C1*-Gen, identifiziert werden [42, 43].

Tabelle 3.1 Übersicht aller aus der Literatur bekannten Patienten mit *SLC35C1*-CDG, deren Mutationen und Ansprechen auf orale Fukosegabe [19, 29-31, 33-35, 38, 39, 42].

Patient	Abstammung	Geschlecht	Genmutation	Proteinmutation	betroffener Transporterbereiche	erfolgreiche Fukosetherapie	veröffentlicht
1+2	arabisch	M	c.923C>G	p.T308R	9. TM-Domäne	nein	1992
	arabisch	M	c.1010A>G	p.Y337C	C-Terminus		
3	türkisch	M	c.439C>T	p.R147C	4. TM-Domäne	ja	1999
4+5	arabisch	M,W	c.923C>G	p.T308R	9. TM-Domäne	nein	2000
6	brasilianisch	W	c.588delG	p.C196fsX35	6. TM-Domäne und Stopp nach 6. TM-Domäne	ja	2003
7	pakistansisch	M	c.969G>A	p.W323X	Stopp Anfang der 10. TM-Domäne	ja	2006
8+9	britisch	M	[c.91G>T] + [c.501_503delCTT]	[p.E31X] + [F168del]	Stopp vor 1. TM-Domäne bzw. 5. TM-Domäne	k. A.	2014
10+11	türkisch	M	k. A.	p.W49R	1. TM-Domäne	k. A.	2014
		W				ja	

Ein Mausmodell zur Untersuchung der humanen Erkrankung *SLC35C1*-CDG wurde 2007 von Hellbusch et al. generiert. Der Openreadingframe des Gens, welches für das murine Protein *Slc35c1* codiert, wurde durch den Einbau einer Neomycinresistenzkassette unterbrochen. Tests an dem Mausmodell haben gezeigt, dass bei den so generierten Knockoutmäusen der GDP-Fukose-Import nur 3,3 % des Imports von Wildtypkontrollen betrug. Histologische Färbungen mit dem fukosespezifischen *Aleuria Aurantia* Lektin (AAL) in der Zellkultur mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) von Wildtypmäusen zeigten eine positive Färbung. MEF aus *Slc35c1*^{-/-}-Tieren konnten dagegen mit AAL nicht gefärbt werden. Ebenso war es möglich in allen Gewebeschnitten der untersuchten Organe bei *Slc35c1*^{+/-}-Mäusen mit AAL eine strukturspezifische Färbung zu erhalten, wo hingegen bei den Knockoutmäusen nahezu keine Färbung möglich war. *Slc35c1*^{-/-}-Mäuse zeigten eine Wachstumsretardierung und nahmen im Vergleich zu heterozygoten und Wildtyp-Geschwistertieren in den ersten drei Wochen deutlich weniger (ca. 50 %) an Gewicht zu. Die bei *SLC35C1*-CDG typische Leukozytose konnte auch im Mausmodell festgestellt werden. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten war um das 5-fache, die

der eosinophilen um das 3-fache und die Zahl der Lymphozyten und Monozyten um das 2,2 bzw. 3.3-fache erhöht. Weitere Versuche bestätigten das Fehlen von P- und E-Selectin sowie ein stark vermindertes Leukozytenrollen bei *Slc35c1^{-/-}*-Mäusen. Ebenfalls festgestellt wurde bei adulten Knockoutmäusen eine Alveolendilatation und dünnere Alveolenwände im untersuchten Lungengewebe. Morphometrisch waren die Alveolen der *Slc35c1^{-/-}*-Mäuse im Schnitt um das 1,5-fache größer als die der Kontrolltiere. Da auch bei dem Mausmodell mit ausgeschaltetem *Slc35c1*-Transporter eine Refukosylierung von MEF in der Zellkultur mittels Fukosesupplementation erreicht werden konnte, wird ein alternativer Transportmechanismus für GDP-Fukose vermutet [21].

3.4. Der GDP-Fukose-Transporter SLC35C1

Der GDP-Fukose spezifische Transporter SLC35C1 gehört zur Gruppe der Nukleotid-Zucker-Transporter (NST). Dabei handelt es sich um eine Gruppe hoch konservierter hydrophober Proteine mit mehreren Transmembrandomänen, die zur Familie der Solute Carrier 35 (SLC35) gehören. Die Nukleotid-Zucker-Transporter spielen eine wichtige Rolle in der Glykosylierung, da sie die im Zytosol oder Nukleus aktivierten Zucker in die Kompartimente (Golgi bzw. ER) transportieren, in denen die Glykosylierung stattfindet [44]. Das Herunterregulieren von NST führt zu umfassenden Defekten der Proteinsynthese und Sekretion, wovon auch nichtglykosylierte Proteine betroffen sind [45]. NST sind transmembrane Antiporter der Klasse III. Sie transportieren nicht nur die aktivierten Zucker in das jeweilige Kompartiment, sondern gleichzeitig auch die Nukleosid-Monophosphate wieder aus dem Kompartiment in das Zytosol. Ihre Größe umfasst 300 bis 400 Aminosäuren mit 6 bis 10 Transmembrandomänen. Aus der Gruppe der SLC35-Transporter sind beim Menschen zurzeit 31 Proteine bekannt. Diese gliedern sich wiederum in sieben Unterfamilien (SLC35A bis SLC35G) [44]. Eine Übersicht dieser SLC35-Transporter, sowie deren Lokalisation und Substrate, soweit diese bekannt sind, befindet sich in Tabelle 3.2.

Wie alle Nukleotid-Zucker-Transporter liegen auch bei dem SLC35C1 sowohl C- als auch N-Terminus des Proteins auf der zytosolischen Seite der Membran, in der sich der Transporter befindet [46]. Er setzt sich aus 364 Aminosäuren mit zehn Transmembrandomänen zusammen (siehe Abbildung 3.7) [29]. Verglichen mit dem murinen *Slc35c1*-Transporter sind die Proteine zu 87 % identisch. Auch hierfür werden 10 Transmembrandomänen vorausgesagt [21]. Untersuchungen des humanen Transporters haben gezeigt, dass der C-Terminus des Proteins keinen Einfluss auf dessen Lokalisation, aber auf die Transporteraktivität hat. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der Aminosäuren 341-355 bzw. die Mutation der Lysine in diesem Abschnitt die Aktivität drastisch beeinflusst, während die Aminosäuren 356-364 offenbar keinen Einfluss nehmen. Ebenfalls zeigte sich, dass die Mutation des konservierten EM-Motivs an Position 344/345, direkt vor zwei der drei Lysine, mit erheblichen Aktivitätsverlusten einhergeht [47]. Untersuchungen am Transporter von Patienten mit SCL35C1-CDG (Mutation p.T308R und p.W323X) ergaben, dass der Austausch von Threonin zu Arginin in der 9. Transmembrandomäne die Lokalisation des Transporters nicht beeinflusst, während ein Stoppcodon

an der vierten Position der 10. Transmembrandomäne dazu führt, dass der Transporter über die gesamte Zelle verteilt wird. Das komplette Vorhandensein der 10. Transmembrandomäne und drei weiteren Aminosäuren ($\Delta 25C$) führt wiederum zur korrekten Lokalisation im Golgi, aber ohne korrekte Funktion. Die Verkürzung des N-Terminus um die ersten 37 Aminosäuren (4 Positionen vor der ersten Transmembrandomäne) hat dagegen weder Einfluss auf die Lokalisation noch auf die Aktivität des Transporters [29].

Tabelle 3.2 Übersicht der humanen SLC35-Transporter nach Song (2013) [44] und bekannter muriner Transportersequenzen (nach NCBI).

humaner Transporter	primäres Substrat	Vorkommen im Gewebe	subzelluläre Verteilung	muriner Transporter
SLC35A1	CMP-Sialinsäure	ubiquitär	Golgi	Slc35a1
SLC35A2	UDP-Galaktose UDP-N-Acetylgalaktosamin	ubiquitär	Golgi/ER	Slc35a2
SLC35A3	UDP-N-Acetylgalaktosamin	ubiquitär	Golgi	Slc35a3
SLC35A4		ubiquitär		Slc35a4
SLC35A5		ubiquitär		Slc35a5
SLC35B1		ubiquitär		Slc35b1
SLC35B2	PAPS	ubiquitär	Golgi	Slc35b2
SLC35B3	PAPS	ubiquitär	Golgi	Slc35b3
SLC35B4	UDP-Xylose UDP-N-Acetylglukosamin	ubiquitär	ER/Golgi	Slc35b4
SLC35C1	GDP-Fukose	ubiquitär	Golgi	Slc35c1
SLC35C2	GDP-Fukose (?)	ubiquitär	ER	Slc35c2
SLC35D1	UDP-Glucuronsäure UDP-N-Acetylgalaktosamin	ubiquitär	ER	Slc35d1
SLC35D2	UDP-N-Acetylglukosamin	ubiquitär	Golgi	Slc35d2
SLC35D3		Retina		Slc35d3
SLC35E1		ubiquitär		Slc35e1
SLC35E2		ubiquitär		Slc35e2
SLC35E2B		ubiquitär		k. A.
SLC35E3		ubiquitär		Slc35e3
SLC35E4		ubiquitär		Slc35e4
SLC35F1		Gehirn		Slc35f1
SLC35F2		Speicheldrüse		Slc35f2
SLC35F3		Cerebellum		Slc35f3
SLC35F4		Cerebellum		Slc35f4
SLC35F5		ubiquitär		Slc35f5
SLC35F6				k. A. *
SLC35G1				Slc35g1
SLC35G2				Slc35g2
SLC35G3				Slc35g3
SLC35G4				k. A.
SLC35G5				k. A.
SLC35G6				k. A.

* zum Zeitpunkt der Erhebung

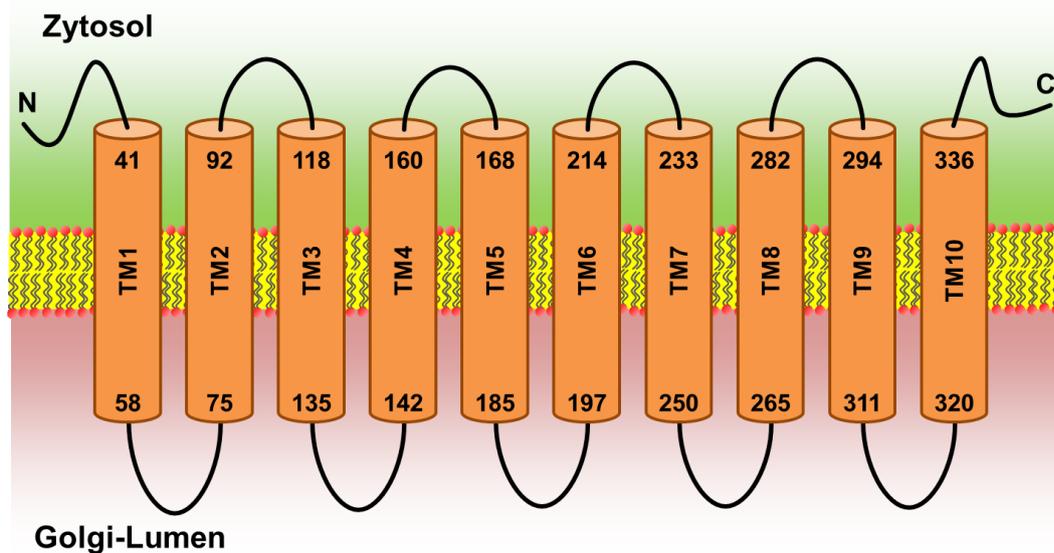


Abbildung 3.7 Schematische Darstellung des humanen SLC35C1 GDP-Fukose-Transporters mit seinen 10 Transmembrandomänen (TM). Nach Helmus et al. (2006) [29]

3.5. Gene Ontology

Die Zahl der von Wissenschaftlern identifizierten Proteine, Gene oder ganzer Genome nimmt stetig zu. Dabei ist eine Vielzahl von Genen konserviert und findet sich in ähnlicher Form auch in anderen Organismen wieder. Hierbei ermöglicht das Wissen über die Funktion eines konservierten Proteins oftmals Rückschlüsse über dessen Rolle in anderen Organismen. Dies lässt sich jedoch nicht immer auf die Nomenklatur von Genen oder Genprodukten verschiedener Organismen übertragen. Das Gene Ontology Consortium wurde gegründet, um mittels eines dynamischen Wortschatzes diese Diskrepanzen zu überwinden und durch spezielle und einheitliche Vokabeln Gene bzw. Genprodukte in allen Eukaryoten zu beschreiben [48]. Etabliert wurde das Gene Ontology Consortium 1998 aus dem Zusammenschluss von drei Datenbanken von Modellorganismen: FlyBase, der Drosophila-Datenbank, der Saccharomyces Genome Database und der Mouse Genome Database. Weitere Gruppen, wie etwa der Arabidopsis Information Resource, folgten [49].

Die Begriffe, mit denen jene Genprodukte beschrieben und klassifiziert werden, werden im Rahmen der Gene Ontology als Terms bezeichnet. Dabei werden innerhalb der Gene Ontology drei Kategorien mit den jeweiligen Terms unterschieden. Diese sind: Biological Process, Molecular Function und Cellular Component. Unter Biological Process (z. Dt. biologischer Prozess) sind die Terms zusammengefasst, die den Prozess, an dem die jeweiligen Proteine beteiligt sind, beschreiben. Diese Prozesse gehen oft mit einer chemischen oder physikalischen Umwandlung eines Stoffes einher, wobei sich ein biologischer Prozess aus einem oder mehreren molekularen Funktionen zusammensetzt. Molecular Function (z. Dt. molekulare Funktion) wiederum beschreibt die biochemische Aktivität eines Proteins. Darunter fallen Funktionen wie zum Beispiel enzymatische Aktivität, Bindung oder

werden und zu dem stetigen Wachsen der Datenbank beitragen. Hierzu ermutigt das Konsortium jene Wissenschaftler, die in spezifischen Gebieten interessiert sind, sie zu kontaktieren und mit dem Konsortium zu kollaborieren [50]. Annotationen werden entweder elektronisch oder manuell vorgenommen, wobei manuelle Einträge von qualifizierten Biologen erstellt werden [51, 52]. Dies führt dazu, dass die Zahl an Einträgen, bezogen auf die Gene Ontology Terms, die erfassten Spezies und deren Genprodukte stetig ansteigt, wie die Tabelle 3.3 zeigt. Um die Qualität der Datenbank zu gewährleisten, werden die Ontologien zum Teil automatisiert auf ihre Logik überprüft und Korrekturen von Kuratoren vorgenommen. Bearbeitung und Veröffentlichung erfolgen täglich [50].

Mittlerweile sind eine Vielzahl von Programmen, sowohl von Seiten des Gene Ontology Konsortiums, als auch von Dritten online verfügbar, die es ermöglichen, Gene Ontology-Analysen mit eigenen Datensätzen durchzuführen. Auf Grund der sich ständig erweiternden und verbessernden Daten ist die Aktualität dieser GO-Browser ein wichtiges Merkmal. Das hier verwendete Tool DAVID zum Beispiel ist mit QuickGO verlinkt, dessen Daten wöchentlich aktualisiert werden [51].

Tabelle 3.3 Übersicht der Verteilung der GO-Terme und der erfassten Spezies mit deren Genprodukten von 2009, 2012 und 2014.

Stand	09/2009 [50]	09/2012 [53]	09/2014 [52]
GO-Terms insgesamt	28.138	36.416	41.775
Biological Process Terms	17.069	23.907	27.284
Molecular Function Terms	8.637	9.459	10.733
Cellular Component Terms	2.432	3.050	3.758
erfasste Spezies	197.439	347.778	461.573
insgesamt erfasste Genprodukte	44.545.253	96.602.850	53.042.843*
manuell erfasste Genprodukte (experimentell)		358.319	311.335
manuell erfasste Genprodukte (phylogenetisch)			79.839

*einschließlich Isoformen

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
6-Aminocaproic acid, ≥99% (titration), powder	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin bovine Fraction V, pH 7.0	Serva, Heidelberg
Aluminiumsulfat-Hydrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat ≥98 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, ACS, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid entwässert gepulvert rein 95%	Merck, Darmstadt
CHAPS Pufferan® ≥98 %, für die Biochemie	Roth, Karlsruhe
cOmplete, EDTA-free proteaseInhibitor Co	Roche, Basel, Schweiz
D(+)-Saccharose ≥99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Deoxycholic acid·Na-salt	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid, getrocknet (max. 0.025% H ₂ O)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfate Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg
Eosin G (gelblich) (C.I. 45380) für die Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %, p.a	Roth, Karlsruhe
Ethanol ≥99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt, ≥99,8 %, mit ca. 1 % MEK	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid - Lösung 1 %	Appllichem, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, ≥99 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler, Freiburg
GDP-L-[U-14C]Fukose, NH ₄ Salz	Amersham Bioscience, Amersham, UK
Gelatine gepulvert (Ph. Eur., NF) reinst	Appllichem, Darmstadt
Glycerin, wasserfrei zur Analyse	neoLab, Heidelberg
Glycin, ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe
HEPES ≥99,5 %, BioScience-Grade	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid reinst Lebensmittelqualität	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse	Merck, Darmstadt
L-[5,6-3H]Fukose	Amersham Bioscience, Amersham, UK
L-Fukose, >98%	Jennewein Biotechnologie, Rheinbreitbach
Lithiumchlorid für die Molekularbiologie min. 99%	Appllichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
McCormick Scientific Leica™ Paraplast™ X-tra	Thermo Scientific, Waltham, USA
Methanol, ≥99,9 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
MOPS Pufferan ® ≥99,5 %	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat kristallin zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumazid reinst	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid ≥99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Nonidet™ P 40 Substitute	Fluka, Buchs, Schweiz
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd, reinst, DAC	Roth, Karlsruhe
Phosphoric acid, ACS reagent, ≥85 wt. % in H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Purified BSA 100X	New England Biolabs, Ipswich, USA
Pyridin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyrophosphatase, Inorganic from baker's yeast	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roticlear®	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure rauchend 37%, p.a.	Roth, Karlsruhe
TEMED, 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Trichlormethan/Chloroform, ≥99 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, ≥99,9%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Solution	Fluka, Buchs, Schweiz
Tween® 20, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe
Ultima Gold™	PerkinElmer, Waltham, USA
UltraPure™ Agarose	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasser für die HPLC	neoLab, Heidelberg
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe

4.1.2. Enzyme und zugehörige Lösungen

Enzym/Lösung	Hersteller
10x Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	Thermo Scientific, Waltham, USA
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix, 10 mM each	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinase K, lyophilisiert, ≥30 mAnson U/mg	Roth, Karlsruhe
Puffer E	Genaxxon BioScience, Ulm
RT ² SYBR® Green ROX™ qPCR Mastermix (2)	Qiagen, Hilden
SensiFAST SYBR® Hi-ROX mix (2x)	Bioline, London, UK
Taq DNA Polymerase (recombinant) (5U/μL)	Thermo Scientific
Taq Polymerase E	Genaxxon BioScience, Ulm

4.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze

Name	Hersteller
DMEM (1X) Glutamax	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM (1X)	Thermo Scientific, Waltham, USA
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pen Strep Penicillin Streptomycin	Thermo Scientific, Waltham, USA
L-Glutamine 200mM (100x)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fungizone® Amphotericin B	Thermo Scientific, Waltham, USA
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gentamicin	Thermo Scientific, Waltham, USA
DPBS	Thermo Scientific, Waltham, USA
0.25% Trypsin-EDTA (1x)	Thermo Scientific, Waltham, USA

4.1.4. Antikörper, Lektine und weitere Marker

Name	Hersteller
Aleuria aurantia lectin, agarose bound	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Aleuria aurantia lectin, biotinylated	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (H+L) A21245 Lot 472938	Thermo Scientific, Waltham, USA
Bisbenzimid H33258	Serva, Heidelberg
Concanavalin A, biotinylated	Vector Laboratories, Burlingham, USA
donkey anti-goat IgG-FITC sc-2024 Lot C2707	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Name	Hersteller
Fluorescein Streptavidin	Vector Laboratories, Burlingham, USA
goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005 Lot A1014	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Horseradish Peroxidase Strepavidin	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Monoclonal Anti-b-Actin Clone AC-15	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-Smad2/3 Antikörper (Ser 423/425) sc-11769 rabbit polyclonal Lot D0114	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit Anti-RECK Polyclonal Antibody bs-2901R Lot 980508W	Bioss, Woburn, USA
Smad 2/3 (FL-425) sc-8332 rabbit polyclonal Lot I2012	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TGF β RII Antikörper (C-16) sc-220 rabbit polyclonal Lot L1310	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
TGF β 1 Antikörper sc-146 rabbit polyclonal Lot F282	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	Dianova, Hamburg

4.1.5. Kits und Standards

Bezeichnung	Hersteller
2x RNA Ladepuffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
AllPrep RNA/Protein Kit	Qiagen, Hilden
DC™ Protein Assay	Bio-Rad, München
GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10,000 bp	Thermo Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
PAMM-035C-12 RT ² Profiler PCR Array Mouse TGF β /BMP Signaling Pathway	Qiagen, Hilden
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA

4.1.6. Lösungen

Lysispuffer

Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	50 mM
NaCl	100 mM
SDS	0,5% (w/v)

Ripa-Puffer

Hepes (pH 7,4)	50 mM
EDTA	1 mM
Na deoxycholate	0,7%
NP-40	1,0%
LiCl	500 mM
Proteaseinhibitor	1-fach

kolloidiale Coomassie-Färbelösung

Coomassie G250	0,02% (w/v)
Aluminiumsulfat (14-18)-Hydrat	5,00% (w/v)
Ethanol (98%)	10,00% (v/v)
Phosphorsäure	2,00% (v/v)
angesetzt in H ₂ O	

LAC-Säulenpuffer

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	500 mM
MgCl ₂	1 mM
MnCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
NaN ₃	0,02%

LAC-Lagerungspuffer

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	500 mM
MgCl ₂	1 mM
MnCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
NaN ₃	0,02%
Fukose	20 mM

TAE-Puffer (50x)

Tris/Acetat pH 8,0	2 M
EDTA	100 mM

Ladepuffer für DNA-Elektrophorese (6x)

Saccharose	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)

Resuspensionspuffer

Tris/HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	1% (w/v)
Proteaseinhibitor	1-fach

SDS-PAGE Probenpuffer (6x)

Tris/HCl pH 6,8	480 mM
SDS	12% (w/v)
Glycerin	45% (v/v)
β -Mercaptoethanol	12% (v/v)
Bromphenolblau	0,06% (w/v)

SDS-PAGE Trenngelpuffer

Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

Tris/HCl pH 6,8	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer für kleine Gele (10x)

Tris	151,1 g
SDS	50 g
Glycin	720 g

SDS-PAGE Kathodenpuffer für große Gele

Tris	50 mM
SDS	0,1% (w/v)
Glycin	380 mM
Bromphenolblau	0,2 mg/ml

SDS-PAGE Anodenpuffer für große Gele

Tris	50 mM
Glycin	380 mM

Semidry-Blot Anodenpuffer

Tris/HCl pH 7,4	75 mM
Methanol	20% (v/v)

Semidry-Blot Kathodenpuffer

ϵ -Aminocaprinsäure	40 mM
Tris/HCl pH 9,0	75 mM
Methanol	20% (v/v)

PBS-Puffer

NaCl	8,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
HCl	auf pH 7,4

PBST-Puffer

NaCl	8,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Tween 20	0,1% (v/v)
HCl	auf pH 7,4

TBST-Puffer

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,5% (v/v)

Mowiol

Glycerin	6,0 g
Mowiol 4-88	2,4 g
H ₂ O	6,0 ml
Tris/HCl 0,2 M pH 8,5	12,0 ml

PFA-Lösung

Paraformaldehyd	4% (w/v)
NaCl	8,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
HCl	auf pH 7,4

Eosin G-Lösung

Eosin G	1,0% (w/v)
Essigsäure	0,2% (v/v)

Pyridinpuffer

Pyridin	0,64% (v/v)
Essigsäure	auf pH 5,5

4.1.7. Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Invitrogen (Life Technologies)

Genotypisierungs-Primer Slc35c1

Name	Sequenz von 5' nach 3'
Slc35c1-F1	GCGTTGCAAGTTCAGCCGAG
Slc35c1-R1	GTGTGTTGGTCAAGAGTGTAACC
Slc35c1-R2	CCGTGACGGTATCGATAAGC

Primer für Reck (nested PCR und Sequenzierung)

Name	Sequenz von 5' nach 3'
Reck outer fwd	GTTGCTACGGCCAGGCTG
Reck inner fwd	CGAGCATCCCGCGGCTT
Reck inner rev	GTGGAGGAAGGCTTTGCAG
Reck outer rev	AGGTGCCACATGCCTTTGCT

qPCR-Primer alternativer Transporter

Name/Gen	Sequenz von 5' nach 3'
Slc35a4 fwd	TGGCGGATGACAAGGATTCT
Slc35a4 rev	ATGGGGAGGACAAGAGGGA
Slc35a5 fwd	GCGGCTCTTAGCTTTGTATTC
Slc35a5 rev	TCGGCAGACCTCAGTCGC
Slc35b1 fwd	TTCATGACAGTCGTGTACTTCG
Slc35b1 rev	ATCAAGACCGAGACCCAGGA
Slc35c1 fwd	ATGAACAGGGCGCCTCTGAA
Slc35c1 rev	CTGTCCAGCAGGTACTIONTTGTTG
Slc35c2 fwd	CTCCTGCAGAAAGCCGATCT
Slc35c2 rev	CAGCGATGGAGAGTGTGAGG
Slc35e1 fwd	GAGTCCTGCTAGCCACTGT
Slc35e1 rev	CACTGAGACACATAGGCCAG
Slc35e2 fwd	GACAGTGAAGAGCTCGGCT
Slc35e2 rev	GAGAACCGGTATTTGTCCCC
Slc35e3 fwd	TTGGTGTGGTAGTCACGTCC
Slc35e3 rev	CAGCAGTACCATAAGCAAAGCA
Slc35e4 fwd	ACCATCCTCTGCAGTTTGCT
Slc35e4 rev	GCAGCAGAGCACTTTGTTGAA
Slc35f3 fwd	CTGACCCTCACCAAAGTGGA
Slc35f3 rev	AACATGTCCAGTTGTGCCGG
Slc35f5 fwd	GGGTGGCATCCTCAGAACTC
Slc35f5 rev	TGCACGCAGCAAAGTAACCT
Slc35g1 fwd	GGTCCAAATGCTAGTTATTATCC
Slc35g1 rev	TGGACGTAAACACGGGACAG
Slc35g2 fwd	GGGTGAAAATCCATCCCAAC
Slc35g2 rev	TTCTGACGACGAAGGCTGAG

qPCR-Primer Reck/MMP9

Name/Gen	Sequenz von 5' nach 3'
Reck fwd	CAAACCCATCATCCCACCAG
Reck rev	GGCTTCTTGCTTGTCACCTTA
MMP-9 fwd	GCTGGCAGAGGCATACTTGT
MMP-9 rev	CCTTTAGTGTCTGGCTGTCC
TIMP-1 fwd	AAGATGACTAAGATGCTAAAAGGATT
TIMP-1 rev	AATTTCCGTTCCCTTAGGCGGC
Col5a1 fwd	ATGCCACCAAGCAGCTGTA
Col5a1 rev	TCCCTGTGTGGTCCTCATAG
Col5a2 fwd	CATATTTAGACATGATGGCAAACCTG
Col5a2 rev	GAGTACAGGCTATTTCTTCATCATA
Col5a3 fwd	ATGAGAAGCTGCCGGAGACT
Col5a3 rev	AGCCTGGTCTCTATGCACAC

qPCR-Primer Rab3a Untersuchung

Name/Gen	Sequenz von 5' nach 3'
Rab3a fwd	TGCAGATCTGGGACACAGCA
Rab3a rev	CGCTGGCCTCAAAGAACTCA
Usp38 fwd	ATTTCCAGTGCGTGTCCACT
Usp38 rev	GACAGCCAGTCAATCATTTCTG
Prdx2 fwd	GCATTGCTTACAGGGGTCTC
Prdx2 rev	TGGGCTTGATGGTGTCACTG
Lpl fwd	GGAGAGACTCAGAAAAAGGTC
Lpl rev	AAACCCACTTTCAAACACCCAA

qPCR-Primer Referenzgen

Name/Gen	Sequenz von 5' nach 3'
Gapdh fwd	ACTCCACTCACGGCAAATTC
Gapdh rev	CCTTCCACAATGCCAAAGTTG

4.1.8. siRNA

Die verwendete siRNA, sowie das Transfektionsreagenz stammen von der Firma Life Technologies (Thermo Scientific)

Name/Gen	Typ
Slc35c2	s106050
Slc35f3	s102185
Slc35g1	s109317
Negative Control	#1 siRNA

4.1.9. Geräte

4.1.9.1. Nucleinsäurearbeiten

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	Eigenbau	Universitätsklinikum, Heidelberg
Mastercycler	GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Waltham, USA
Mikrowellenherd	R-233(W)	Sharp, Osaka, Japan
Nanophotometer	P 300	Implen, München
Netzgerät für Elektrophorese	E835	Consort, Turnhout, Belgien
Real-Time PCR System	StepOnePlus™	Applied Biosystems, Waltham, USA
UV-Handlampe	VL-4.LC	Vilber, Eberhardzell
UV-Transilluminator	CN-TFX	Vilber, Eberhardzell

4.1.9.2. SDS-PAGE / Westernblot

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Blottkammer	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter; SEDEC M	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer (große Gele)	Hoefer™ SE 600 Ruby™ standard vertical electrophoresis unit	Amersham Bioscience, Amersham, UK
Elektrophoresekammer (kleine Gele)	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Biorad, München
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Bioscience, Amersham, UK
Westernblot Dokumentationssystem	Fusion SL4	Peqlab, Erlangen
Wippe	Rocky 1100	Labortechnik Fröbe, Lindau

4.1.9.3. Zellkultur

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Inkubator	CO2 Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Loughborough, UK
Sicherheitswerkbank Klasse 2	SterilGard III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Wasserbad	1092	GFL, Burgwedel
Phasenkontrastmikroskop	Wilovert	Hund, Wetzlar

4.1.9.4. Histologie

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Ausgießstation	EG 1150H	Leica, Wetzlar
Heizplatte	HI 1220	Leica, Wetzlar
Kühlplatte	EG 1150C	Leica, Wetzlar
Mikroskop	DMI 4000B	Leica, Wetzlar
Rotationsmikrotom	RM 2255	Leica, Wetzlar
Wasserbad	HI 1210	Leica, Wetzlar
Vakuumpumpe	Typ MZ 2C	Vakuubrand, Wertheim

4.1.9.5. Sonstiges

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Analysegerät für Dünnschicht- chromatogramme	Tracemaster 20	Berthold, Bad Wildbad
Autoklav	VX-95	Systemec, Linden
Binokular	Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Drehrad	Eigenbau	Universitätsklinikum, Heidelberg
Gefriertrocknungsanlage	100-SRC	Vitris, Gardiner, USA
Haartrockner	Mirage 1200 Mod. 5410	WIK
Papiererelektrophorese- kammer	<i>Beschreibung in Abschnitt 4.3.3.10</i>	Camag, Muttenz, Schweiz
Netzgerät für Papiererelektrophorese	EC4000P	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kaltlichtlampe	KL 1500 LCD	Schott, Mainz
Kühlung für Elektrophoresekammer	Multi Temp III	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach
Messerhomogenisator	Art-Micra D-8	Art Labortechnik, Müllheim
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Photometer	Spectra max Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Vakuumpumpe für Gefriertrocknungsanlage	2012 A	Alcatel, Wertheim
Reinstwasser	GenPure Pro UV-TOC/UF	Thermo Scientific, Waltham, USA
Schüttelinkubator	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg

Bezeichnung	Typ/Modell	Hersteller
Schüttelinkubator	HTMR-133	HLC Haep Labor Consult, Bovenden
Scintillationscounter	LS6500 Scintillation Counter	Beckman Coulter, Brea, USA
Ultraschall	Sonifier 450; Konverter 102C; Branson, Dietzenbach Becherresonator 101-147-047	
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 255 H	Brandelin, Berlin
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	PH204L	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Waage	XP56	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Optima TLX120	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge	Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen

4.1.10. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml Säulen mit Luer-lock Adapter und Filter	MoBiTec, Göttingen
50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Adhäsions Objektträger SuperFrost® Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig
Costar® serologische Pipette (1,5,10,25ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Deckgläser Stärke No. 1 24x55mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Deckgläser Stärke No. 1 rund 12mm	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
Dialyseclips Spectra/Por 35 mm	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
Dialyseschlauch, MWCO 12-14 kDa	Neolab, Heidelberg
Einbettkassetten Biopsie	Sanowa, Leimen
Einbettkassetten Mega Cassette	Bio-Optica, Mailand, Italien

Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Papier 330 g/cm ²	Neolab, Heidelberg
Einwegskalpelle Nr. 21	Feather, Osaka, Japan
Hybond ECL nitrocellulose membrane	GE Healthcare Life Science, München
ImmEdge™ Pen	Vector Laboratories, Burlingham, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Thermo Scientific, Waltham, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Thermo Scientific, Waltham, USA
Microplatte, 96-Well, flacher Boden, transparent	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikrotommesser A35	Feather, Osaka, Japan
Multiply®-Pro 0,2ml PCR-Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Nalgene™ Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pasteur Capillary Pipettes 230/150mm	Wilhelm Ulbrich, Bamberg
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Scintillationsröhrchen	Perkin Elmer, Waltham, USA
Sekuroka®-Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Seraflex 3/0 nicht resorbierbares Nahtmaterial	Serag-Wiessner, Naila
Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Flasche T-25 für adhärenente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Flasche T-75 für adhärenente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Flasche T-75 für Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 24-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschale 60 x 15 mm	Sarstedt, Nümbrecht

4.2. Versuchstiere

4.2.1. Mauslinie

Bei den für diese Arbeit verwendeten Mäusen handelt es sich um eine hybride Linie mit 129S2/SvPasCrl (Sv129) und C57BL/6NCrl (BL6) Hintergrund. Die Elterntiere stammen aus zwei reinrassigen Linien des jeweiligen Hintergrundes und sind heterozygote Träger des ausgeschalteten *Slc35c1*-Gens (*Slc35c1*^{+/-}) [21]. Zur Linienhaltung dieser heterozygoten Tiere wurden diese mit Wildtyptieren desselben Hintergrunds verpaart, jedoch nur heterozygote Nachkommen für die weitere Zucht verwendet. Die verwendeten hybriden Mäuse sind die F1-Generation aus der Verpaarung von Sv129 *Slc35c1*^{+/-} Tieren mit BL6 *Slc35c1*^{+/-} Tieren.

4.2.2. Maushaltung

Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte in der Doppelunit 3/4 der Interfakultären Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg. Dabei handelt es sich um eine spezifisch-pathogenfreie Einrichtung, in der die Tiere in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden. Die Ernährung der Tiere erfolgte ad libitum. Verpaart wurden Tiere im Alter von 10 bis maximal 40 Wochen. Eine ausführliche Beschreibung der Haltungsbedingungen befindet sich im Anhang unter Punkt 8.1 IBF - SOP Maushaltung (GVT-Zucht).

4.3. Methoden

4.3.1. Molekularbiologische Methoden

4.3.1.1. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA und RNA (zum Test auf Degradierung) erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde das noch flüssige Gel auf ca. 60 °C im Wasserbad abgekühlt, bevor zu 400 ml Gel 13 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung zum Anfärben der Nucleinsäuren gegeben wurde. Auf Grund der Fragmentgrößen wurde in der Regel ein 1%iges (w/v) Gel gegossen. Lediglich zum Testen der qPCR-Primer, bei denen die PCR-Produkte kleiner als 300 Basenpaaren waren, wurde ein 2%iges (w/v) Gel verwendet.

Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei 120 Volt (10 V/cm) in TAE-Puffer. Ausgewertet und dokumentiert wurden die Gele nach der Elektrophorese im Transilluminator.

4.3.1.2. Gewinnung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien, Zellen und Gewebeproben

Zu den ca. 3 mm langen Mausschwanzbiopsien wurden 500 µl Lysispuffer und 50 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml Proteinase K in Lysispuffer) gegeben. Für den enzymatischen Verdau der Biopsien wurden die Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 56 °C und 850 rpm für zwei Stunden inkubiert. Zum Abtrennen unverdauter Bestandteile wurden die Proben anschließend für 20 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß dekantiert. Zu dem Überstand wurden 1400 µl Ethanol (unvergällt) gegeben und vorsichtig geschwenkt, bis die Lösung homogen und die genomische DNA als weißer Faden ausgefallen ist. Mit einer abgerundeten Glaspipette wurde der DNA-Faden aus der Lösung gefischt, in 70 % (v/v) Ethanol durch kurzes Eintauchen gewaschen und nach kurzer Lufttrocknung in 150 µl Wasser (HPLC grade) bei 37 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Bei der Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben wurde analog verfahren. Lediglich auf den Zentrifugationsschritt nach der Inkubation wurde verzichtet und Zellen wurden vor dem Verdau gewaschen und pelletiert.

4.3.1.3. Fällern und Waschen von DNA

Um DNA zu fällen und zu waschen, wurde zu einem Teil DNA-Lösung ein Fünftel Teil 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und fünf Teile Ethanol (unvergällt) gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Lösung bei 16.000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde danach mit zehn Teilen 70% (v/v) Ethanol durch vorsichtiges Schwenken gewaschen und erneut bei 16.000 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet, in dem gewünschten Volumen HPLC-Wasser aufgenommen und bei 37 °C gelöst.

4.3.1.4. Genotypisierungs-PCR zur Bestimmung des *Slc35c1* Genotyps

Der *Slc35c1*-Genotyp von murinen Proben konnte mittels der spezifischen Primer, die um das Exon1 des *Slc35c1* Gens bzw. in der Neomycinresistenzkassette liegen, bestimmt werden.

Der Reaktionsansatz pro Probe setzte sich wie folgt zusammen:

10x Puffer E	2,5 µl
Primer <i>Slc35c1</i> -F1	0,2 µM
Primer <i>Slc35c1</i> -R1	0,2 µM
Primer <i>Slc35c1</i> -R2	0,2 µM
dNTP	0,2 mM
Taq Polymerase E	1,25 U
Template DNA	1,0 µl
HPLC-Wasser	ad 25,0 µl

Im Anschluss erfolgt die PCR unter folgenden Bedingungen:

initiale Denaturierung	94 °C	5:00 min	
Denaturierung	94 °C	0:20 min	} 10 Zyklen
Primerannealing	62 °C	0:30 min	
Elongation	72 °C	3:00 min	
Denaturierung	94 °C	0:20 min	} 25 Zyklen
Primerannealing	62 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	3:00 min + 10 sec/Zyklus	
Finale Elongation	72 °C	5:00 min	

4.3.1.5. Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe

Zur Gewinnung von RNA wurde das RNeasy Kit von Qiagen verwendet. Die Isolierung aus Zellen und Geweben erfolgte gemäß des Handbuchs jeweils nach der Methode für Zellen bzw. Gewebe mit Zentrifugation. Für den Zellaufschluss wurden die QIAshredder-Säulen verwendet. Gewebe wurde mittels Messerhomogenisator aufgeschlossen. Zusätzlich wurden die Proben gemäß Anhang D des Handbuchs mit DNase I verdaut, bevor sie von den Säulen eluiert wurden, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Lediglich für die RNA-Isolierung nach siRNA-Behandlung (siehe Abschnitt 4.3.2.5) wurde das AllPrep RNA/Protein Kit von Qiagen gemäß Handbuch verwendet.

Nach Aufarbeitung der RNA wurde die Integrität, Konzentration sowie die Reinheit der RNA überprüft. Dazu wurden 2 µl der RNA-Lösung mit 2 µl des 2x RNA Ladepuffers gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Waren nach dem Lauf die 18S und 28S Untereinheiten der ribosomalen RNA als klare Banden bei 4,7 bzw. 1,8 kb zu erkennen wurde die RNA als nicht degradiert angenommen. Des Weiteren wurde die RNA mit einem Nanophotometer analysiert. Aus der Absorption bei 260 nm lässt sich die Konzentration der RNA nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt bestimmen:

$$A_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad \text{bzw.} \quad c_{RNA} = \frac{A_{260nm}}{0,025ml \cdot \mu l^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot d}$$

Aus den Verhältnissen A_{260nm}/A_{280nm} und A_{260nm}/A_{230nm} konnten Verunreinigungen durch Proteine bzw. Phenole erkannt werden. Lag einer der beiden Werte unter 1,8 wurde die RNA durch Fällung (siehe Abschnitt 4.3.1.6) gereinigt.

4.3.1.6. Fällern und Waschen von RNA

Um RNA zu fällen und zu waschen, wurde zu einem Teil RNA-Lösung ein Zehntel Teil 3 M Natriumacetat und 2,5 Teile gekühlter Ethanol (unvergällt) gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Lösung bei 16.000 x g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde danach mit zehn Teilen 75% (v/v) gekühltem Ethanol durch vorsichtiges Schwenken gewaschen und erneut bei 16.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und anschließend in dem gewünschten Volumen HPLC-Wasser gelöst.

4.3.1.7. Umschreiben von RNA in cDNA

Für die Herstellung von cDNA aus RNA wurde das Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific gemäß Anleitung verwendet. Zur Synthese der cDNA eines Gens wurde ein entsprechend spezifischer Primer verwendet. Zur Synthese von cDNA aus gesamt-RNA für qPCR-Anwendungen wurden die zum Kit gehörigen Oligo (dT)₁₈ Primer verwendet. Je Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt. Wenn die cDNA für eine qPCR verwendet wurde, so wurde diese 1 zu 10 mit Wasser (HPLC-grade) verdünnt.

4.3.1.8. quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR oder kurz qPCR dient der Quantifizierung des Expressionslevels von Genen auf Basis der mRNA-Menge. Bei der hier verwendeten $\Delta\Delta Ct$ -Methode handelte es sich um eine relative Quantifizierung. Das heißt, das Ergebnis beschreibt die Expression des Zielgens in einer Probe relativ zu dessen Expression in einer Kontrolle, wobei die Werte noch auf ein Referenzgen normiert werden. Dieser sogenannte Fold-change berechnet sich nach folgender Formel:

Fold-change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mit

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{Probe} - (Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{Kontrolle}$$

qPCR mit eigenen Primern

Die für die qPCR verwendeten Primer wurden so entworfen, dass das PCR-Produkt eine Größe zwischen 80 bp und 300 bp hatte, einer der Primer auf zwei Exons lag und/oder das Primerpaar durch ein größeres Intron auf Ebene der genomischer DNA getrennt war. Dies sollte sicherstellen, dass eventuell vorhandene genomische DNA nicht amplifiziert wurde oder zumindest im Nachhinein bei der Analyse der Schmelzkurven auffallen würde.

Der Reaktionsansatz für einen Lauf setzte sich je Well wie folgt zusammen:

2x SensiFAST	5,0 µl
cDNA (1:10)	1,0 µl
fwd Primer	0,4 µM
rev Primer	0,4 µM
HPLC-Wasser	ad 10,0 µl

Die qPCR wurde mit dem Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

initiale Denaturierung	95 °C	2:00 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	0:05 min	
Primerannealing	55 °C	0:10 min	
Elongation	72 °C	0:15 min	

Im Anschluss an die qPCR erfolgte bei jedem Lauf eine Schmelzkurvenbestimmung der PCR-Produkte. Verschiedene PCR-Produkte mit unterschiedlicher Größe würden in der abgeleiteten Darstellung der Schmelzkurve in Form von zusätzlichen Peaks auffallen.

Kommerzielles TGF-β / BMP qPCR Array

Neben der oben beschriebenen Methode zur quantitativen PCR wurden auch Expressionsanalysen mit dem von Qiagen vertriebenen Profiler PCR Array für den TGF-β / BMP Signaling Pathway verwendet. Da Qiagen nur bei Verwendung eigener Produkte während Materialaufarbeitung und Probenmessung für ein einwandfreies Funktionieren des Systems garantiert, wurden für diese Proben folgende Änderungen in den Methoden durchgeführt:

Nach der Aufarbeitung der RNA erfolgte die cDNA-Synthese nicht mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermofischer, sondern mit dem RT² First Strand Kit von Qiagen. Es wurden hierzu 500 ng RNA eingesetzt, die gemäß des RT² Profiler PCR Array System Handbuch von Qiagen für das 96-Well Format in cDNA umgeschrieben und für die qPCR vorbereitet wurden. Für die Reaktionslösung wurde dann der SYBR Green ROX qPCR Mastermix von Qiagen, ebenfalls gemäß des Handbuchs, verwendet.

Die Bedingungen für die qPCR entsprachen den Standardeinstellungen des StepOnePlus™ und waren wie folgt:

initiale Denaturierung	95 °C	10:00 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	0:15 min	
Primerannealing und Elongation	60 °C	1:00 min	

Auch hier wurden am Ende der qPCR die Schmelzkurven der Produkte bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der von Qiagen eigens für diese Platte erstellten Excel-Arbeitsmappe. Die Auswertung basiert ebenfalls auf der oben beschriebenen $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei es das Plattendesign erlaubt, bis zu fünf Referenzgene (*Gusb*, *Hprt1*, *Hsp90ab1*, *Gapdh* und *Actb*) für die Auswertung zu verwenden. Ergebnisse mit auffälligen Schmelzkurven (mehrere Peaks / kein eindeutiger Peak) wurden bei der Auswertung nicht mitberücksichtigt.

4.3.1.9. PCR und nested PCR (geschachtelte PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte, deren Enden durch Primer bestimmt werden. Um die Spezifität des PCR-Produkts weiter zu erhöhen, kann das Produkt einer ersten Reaktion als Template einer weiteren PCR genutzt werden. Hierbei liegen die Primer der zweiten Reaktion innerhalb des Abschnittes, der in der vorherigen Reaktion synthetisiert wurde. In diesem Fall spricht man von einer nested oder geschachtelten PCR.

Der Reaktionsansatz pro Probe setzte sich wie folgt zusammen:

	V_{ges} 50,00 μl	V_{ges} 25,00 μl
10x Puffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5,00 μl	2,50 μl
MgCl ₂	4,00 μl	2,00 μl
dNTPs	1,00 μl	0,50 μl
DMSO	1,00 μl	0,50 μl
Primer fwd	1,25 μl	0,63 μl
Primer rev	1,25 μl	0,63 μl
Taq	0,20 μl	0,10 μl
Template	1,00 μl	1,00 μl
H ₂ O	35,30 μl	17,14 μl

Im Anschluss erfolgte die Reaktion mit den folgenden Einstellungen:

initiale Denaturierung	95 °C	3:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	} 35 Zyklen
Primerannealing	55 °C	0:30 min	
Elongation	72 °C	5:00 min	
Finale Elongation	72 °C	7:00 min	

4.3.1.10. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um spezifisch PCR-Produkte aufzureinigen, wurden diese wie in Abschnitt 4.3.1.1 beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese zunächst aufgetrennt. Im Anschluss wurden die gewünschten Banden mit Hilfe einer UV-Handlampe und einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit gemäß der Anleitung. Lediglich die Elution der Probe erfolgte mit H₂O.

4.3.1.11. DNA-Sequenzierung

Nucleinsäuresequenzierungen wurden nicht selbst, sondern von dem kommerziellen Anbieter Seqlab durchgeführt. Die Proben mit einem Gesamtvolumen von jeweils 15 μl enthielten 7 μl aufgereinigter DNA, 3 μl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 5 μl des

zu verwendenden Primers. Die Proben wurden bei Raumtemperatur zum Anbieter gesendet. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der Software Chromas (Version 2.3) der Firma Technelysium.

4.3.2. Zellkultur-Methoden

Dieser Abschnitt beschreibt die durchgeführten Arbeiten mit Zellen in Kultur. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Die verwendeten Medien und Pufferlösungen, mit Ausnahme des Trypsins, wurden vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt. Wenn im Folgenden von Kulturmedium die Rede ist, bezeichnet dies DMEM Glutamax mit 10% FCS (für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert), Pen Strep, Fungizone und L-Glutamin, das für die Kultivierung von Fibroblasten verwendet wurde. Davon abweichend wurde für die Kultivierung von Lymphoblasten RPMI-Medium mit 10% FCS, Pen Strep, MEM NEAA und Gentamicin verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C mit 5,0% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit.

4.3.2.1. Isolierung und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Embryonen zur Gewinnung von embryonalen Fibroblasten wurden zwischen dem Stadium E11,5 und E13,5 aus dem Uterus eines trächtigen Muttertieres entnommen, welches zuvor gemäß Tierschutzgesetz mittels zervikaler Dislokation getötet wurde. Die Embryonen wurden in DPBS von maternalem Gewebe frei präpariert und durch Dekapitation getötet. Mit einem Skalpell wurde dem Embryo dorsal eine Gewebeprobe entnommen, die makroskopisch keine Blutgefäße erkennen ließ. Diese Probe wurde äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert, in sterilem DPBS gewaschen und mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend erfolgte eine enzymatische Zerkleinerung für fünf bis zehn Minuten in einer Trypsinlösung bei 37 °C. Die Reaktion wurde danach mit Kulturmedium abgestoppt und die Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät. Eine Probe aus dem restlichen Embryo wurde zur Genotypisierung verwendet (siehe Abschnitt 4.3.1.4).

4.3.2.2. Zellernte und Passagieren von Fibroblasten

Haben die Zellen in dem jeweiligen Kulturgefäß Konfluenz erreicht, so wurden diese in eine neue Passage überführt oder Zellen wurden für Versuche abgeerntet. In beiden Fällen wurde zunächst das Kulturmedium mit einer sterilen Glaspipette abgenommen und die Zellen durch Zugabe von DPBS und leichtes Schwenken gewaschen. Das DPBS wurde ebenfalls abgenommen, und auf die Zellen wurde 0,25%ige Trypsinlösung gegeben, so dass der Boden des Kulturgefäßes mit der Lösung vollständig benetzt war (20-40 µl/cm²). Anschließend wurden die Zellen zum Ablösen für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Trypsinaktivität wurde zu den Zellen frisches Kulturmedium gegeben, welches anschließend mit einer Pipette einige Male vorsichtig aufgezogen und über den Boden des Kulturgefäßes ausgelassen wurde, um noch zusammenhängende Zellen zu vereinzeln, evtl. noch anhaftende Zellen vom Boden zu lösen und die Zellen homogen zu verteilen.

Zum Passagieren wurde nun ein Teil der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und weiter im Inkubator kultiviert. War hierbei eine genaue Zellzahl erforderlich, wurde vor dem Aussähen ein Aliquot genommen, 1:2 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt. Zur Gewinnung eines Zellpellets wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 1200 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen und mit DPBS einmal gewaschen, bevor es erneut unter den gleichen Bedingungen pelletiert wurde.

4.3.2.3. Kryokonservierung und Auftauen von Fibroblasten

Um Zellen einer bestehenden Kultur für lange Zeit zu konservieren, wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurde zunächst eine konfluente T-75 Zellkulturflasche, wie in Abschnitt 4.3.2.2 abgeerntet, die Zellsuspension für 5 min bei 1200 rpm pelletiert und dann in 3 ml Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf drei Kryokonservierungsröhrchen aufgeteilt und zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryokonservierungsröhrchen für wenige Minuten in ein Becherglas mit 70%igen Ethanol gestellt, bevor zu einem Milliliter der Zellsuspension ein Milliliter vorgewärmtes Medium dazugegeben wurde. Die Suspension wurde vorsichtig auf und ab pipettiert, bis das Eis vollständig geschmolzen war. Anschließend wurde die Suspension in weiteren 4 ml Medium verdünnt und die Zellen für 5 min bei 1200 rpm pelletiert, um das DMSO-haltige Medium zu entfernen. Das Zellen wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T-25 Zellkulturflasche ausplattiert.

4.3.2.4. Fukosesupplementation von Fibroblasten

24 Stunden vor Beginn der Zuckersupplementation wurden die Fibroblasten in die jeweiligen Zellkulturgefäße ausgesät und konnten am Boden adhären. Zu Beginn der Supplementation wurde das alte Kulturmedium abgenommen, die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und durch frisches Medium mit der jeweiligen Fukosekonzentration ersetzt. Die Supplementation erfolgte danach für 24 Stunden bei 37 °C im Inkubator.

4.3.2.5. Knockdown mit siRNA in Fibroblasten

Fibroblasten wurden in eine 24-Well-Platte mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in einem Milliliter Kulturmedium ausgesät, um sich über Nacht abzusetzen und anzuwachsen. Zur Vorbereitung des Transfektionsreagenz wurden je Well zu 25 µl DMEM 0,5 µl der 10 µM siRNA-Lösung und zu weiteren 25 µl DMEM 1,5 µl Lipofectamine RNAiMAX-Reagenz gegeben. Im Anschluss wurden die beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 50 µl in das entsprechende Well pipettiert. Als Negativkontrollen wurden mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen und unbehandelte Zellen verwendet. Nach der Transfektion mit siRNA inkubierten die Zellen für 48 Stunden im Inkubator, bevor für weitere 24 Stunden 20 µl DMEM mit 0,5 M Fukose hinzugegeben wurde.

4.3.2.6. Kultivierung und Passagieren von Lymphoblasten

Die Kultivierung von Lymphoblasten erfolgte in T-75 Zellkulturflaschen für Suspensionskulturen. Die Flaschen wurden aufrecht stehend kultiviert. Diese enthielten 14 ml Kulturmedium. Hatte sich das Medium deutlich gelb verfärbt, wurden weitere 7 ml Kulturmedium hinzugegeben. Zum Passagieren der Zellen wurden diese durch leichtes Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 7 ml Zellsuspension in eine neue T-75 Zellkulturflasche mit 7 ml frischen Kulturmedium überführt.

4.3.2.7. Kryokonservierung und Auftauen von Lymphoblasten

Aus einer vitalen Lymphoblastenkultur wurden 7 ml resuspendierter Zellen entnommen und für fünf Minuten bei 2000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einem Milliliter FCS mit 10% DMSO resuspendiert und in einem Kryoröhrchen für 20 Minuten bei -20 °C gelagert, bevor es für weitere 24 Stunden auf -80 °C gekühlt wurde. Danach wurde es zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von Lymphoblasten wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in 9 ml Kulturmedium aufgenommen, die Zellen für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 14 ml Kulturmedium gelöst.

4.3.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.3.1. Gewinnung von Gewebe aus Mäusen

Die Mäuse wurden gemäß Tierschutzgesetz mittels zervikaler Dislokation getötet. Jungtiere im Alter von einer Woche wurden per Dekapitation getötet. Die Eröffnung des Bauchraums erfolgte nach oberflächiger Desinfektion des Fells mit 70%igem Ethanol durch zwei nacheinander ausgeführte Schnitte entlang der Medianebene durch die Haut und die Bauchwand. Für eine bessere Zugänglichkeit zu den Organen wurde die Haut zusätzlich distal zu den Hinterläufen und die Bauchwand entlang des seitlichen Bauchs bis zum Rippenbogen eingeschnitten. Bei Entnahme der Leber wurde darauf geachtet, dass die Gallenblase dabei vollständig und unversehrt entfernt wurde, um einen Kontakt des Gewebes mit der Gallenflüssigkeit zu vermeiden. Bei Entnahme der Nieren wurde das Gewebe auch von der umgebenden Nierenkapsel befreit. Um an die im Brustkorb liegenden Organe zu gelangen, wurde das Diaphragma vorsichtig eingeschnitten, was zum Kollaps der Lunge führte. Dadurch konnten nun die Rippen seitlich eingeschnitten und schließlich samt Brustbein entfernt werden, ohne die Lunge zu schädigen. Besonders um die stark durchblutete Lunge von dem Blut zu befreien, wurde der Lungenkreislauf gespült. Dazu wurde der linke Vorhof des Herzens eingeschnitten und über eine 22G-Kanüle DPBS in den rechten Ventrikel geleitet, bis sich die Lungenlappen deutlich entfärbt hatten.

4.3.3.2. Zell- und Gewebeaufschluss

Der Zell- oder Gewebeaufschluss diente zur Aufarbeitung von Proteinen aus Zellkulturen oder verschiedenen Geweben von Mäusen. Zellen lagen als mit DPBS gewaschenes Zellpellet vor, Gewebe als komplettes Organ oder Organteil. Für den Aufschluss wurde ein Ripa-Puffer verwendet. Zellpellets wurden in dem

Aufschlusspuffer resuspendiert und mechanisch mittels einer 27G-Kanüle durch wiederholtes Aufziehen und schnelles Auslassen aufgeschlossen. Für den Gewebeaufschluss wurden die Organe bzw. Organteile mit dem Ripa-Puffer in einem Glaspotter zunächst mit dem groben Stempel (A), dann mit dem feinen Stempel (B) durch wiederholtes Eintauchen des Stempels homogenisiert.

Das Homogenat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, gevortext und zweimal für 10 sec mit Ultraschall behandelt (Output Control 8/10, Duty Cycle 80%). Diese Prozedur wurde nach einer und zwei Stunden wiederholt. Dazwischen inkubierte das Homogenat auf Eis. Anschließend wurde zur Entfernung nichtlöslicher Zelltrümmer die Probe für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.3.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit dem DC™ Protein Assay von Bio-Rad gemäß Handbuch im 96-Well Format durchgeführt. Als Referenz diente eine BSA-Standardreihe mit 8 Standards zwischen 0,0 mg/ml und 2,0 mg/ml BSA im selben Puffer, wie die zu messenden Proben. Alle Standards und Proben (in der jeweiligen Verdünnung) wurden als Doppelbestimmung aufgetragen und im Photometer bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mittels der Regressionsgerade des BSA-Standards aus der Absorption der Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors zurückgerechnet.

4.3.3.4. Lektinaffinitätschromatographie

Zur Aufreinigung fukosylierter Proteine wurde eine Affinitätschromatographie mit dem an Agarose gebundenen *Aleuria Aurantia*-Lektin durchgeführt. Dabei wurden pro Aufreinigung zwei gleiche Säulen verwendet. Auf die erste Säule wurde die Wildtyp-Probe gegeben, auf die zweite Säule die Konockout-Kontrolle, um unspezifische Bindung an die Säule zu identifizieren. Das Bettvolumen einer Säule betrug dabei 3 ml, was laut Herstellerangaben einer Bindungskapazität von >12 mg fukosylierten Glycoproteinen entsprach. Um die Säulen nicht zu überladen, wurden maximal 9 mg Gesamtprotein auf eine Säule gegeben. Zur späteren Quantifizierung wurde dabei immer die gleiche Proteinmenge von Wildtyp- und Knockout-Lysat auf die jeweilige Säule aufgetragen.

Die Lagerung der Säulen erfolgte in LAC-Lagerungspuffer bei 4 °C. Vor Beginn der Lektinaffinitätschromatographie wurden die Säulen mit 10 Säulenvolumen (CV) LAC-Säulenpuffer gewaschen, um die zur Stabilisierung enthaltene Fukose zu entfernen. Für die Proteinbindung wurde das entsprechende Volumen an Proteinlysate auf die Säule gegeben und auf 3,5 ml mit LAC-Säulenpuffer aufgefüllt. Die verschlossenen Säulen wurden über Nacht bei 4 °C auf einen Rotator mit ca. 8,5 rpm bei einem Durchmesser von 30 cm gegeben. Nach der Proteinbindung wurde der Säulendurchfluss erneut auf die jeweilige Säule gegeben, um etwaige an den Säulenwänden anhaftende Beads auf das Gelbett zu spülen und der Durchfluss gesammelt. Im Anschluss daran wurden die Säulen mit 10 CV LAC-Säulenpuffer gewaschen, um nichtgebundene Proteine von der Säule zu spülen, wobei das erste CV zusätzlich 0,1 % Tween 20 enthielt. Um die an das *Aleuria Aurantia*-Lektin

gebunden Proteine von den Säulen zu waschen, wurde mit 5 CV einer 200 mM Fukoselösung eluiert. Das erste CV der Elutionslösung wurde dabei auf die unten verschlossenen Säulen gegeben und für 10 min inkubiert, bevor die Lösung abgelassen und mit der restlichen Elutionslösung eluiert wurde. Danach wurden die Säulen mit 10 CV LAC-Säulenpuffer gewaschen, um die Fukoselösung von den Säulen zu entfernen. Der gesammelte Säulendurchfluss wurde erneut auf die Säulen gegeben, um in einer zweiten Lektinaffinitätschromatographie noch nicht gebundene fukosylierte Proteine aufzureinigen. Dabei wurde analog zur ersten Säulenaufreinigung verfahren, und die Säulen wurden im Anschluss der Aufarbeitung wieder im LAC-Lagerungspuffer bei 4 °C aufbewahrt.

Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden zur leichteren Handhabung zunächst in einer Lyophylle von 15 ml auf ca. 3 ml aufkonzentriert und dann gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 über Nacht dialysiert. Die dialysierten Proben konnten nun nach Entfernung der Fukose lyophilisiert und in 200 µl Wasser aufgenommen werden. Als letzter Aufarbeitungsschritt wurde eine Proteinfällung nach Wessel und Flügge durchgeführt.

Nach Abschluss der Aufarbeitungen eines Organs wurden die Lektinsäulen zur Erhaltung der Bindungskapazität regeneriert. Dazu wurden die Säulen dreimal im Wechsel mit jeweils 10 CV 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 und 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5 gespült. Anschließend wurden die Säulen wieder mit 10 CV des Säulenpuffers equilibriert und für die Lagerung mit LAC-Lagerungspuffer versetzt.

4.3.3.5. Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Bei dieser Proteinfällung handelt es sich um eine Chloroform-Methanol-Fällung basierend auf der Veröffentlichung von Wessel und Flügge (1984) [54].

Zu einem Probenvolumen von 200 µl in einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 800 µl Methanol hinzugegeben und gevortext. Nach zehn Sekunden Zentrifugation bei 9.000 g wurden weitere 200 µl Chloroform hinzugefügt und nach Vortexen für weitere zehn Sekunden bei 9.000 g zentrifugiert. Zur Phasentrennung wurden nun 600 µl HPLC-Wasser dazupipettiert und gevortext. Nach 60 sekundiger Zentrifugation bei 9.000 g wurde die obere Phase vorsichtig soweit abgenommen und verworfen, dass kein Protein aus der Interphase mit abgenommen wurde. Im Anschluss wurden erneut 600 µl Methanol hinzugegeben und nach Vortexen für 120 s bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in Resuspensionspuffer aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst.

4.3.3.6. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (kurz SDS-PAGE) dient der eindimensionalen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in denaturiertem Zustand.

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die jeweiligen Lösungen unmittelbar vor dem Gießen wie in Tabelle 4.1 aufgeführt angesetzt, wobei TEMED und APS-Lösung als letztes hinzugegeben wurden. Danach wurde zunächst das Trenngel zwischen die Glasplatten bis zur angegebenen Höhe gegossen und mit Isopropanol

überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel mit dem Kamm für die Ladetaschen gegossen.

Tabelle 4.1 Zusammensetzung von kleinen und großen Acrylamidgelen für die SDS-PAGE mit einer Acrylamidkonzentration von 10% im Trenngel.

	kleines Trenngel	kleines Sammelgel	großes Trenngel	großes Sammelgel
Rothiphorese	2010 µl	338 µl	10500 µl	1300 µl
Trenngelpuffer	1500 µl	--	7500 µl	--
Sammelgelpuffer	--	338 µl	--	2500 µl
10% APS	60 µl	30 µl	250 µl	100 µl
TEMED	6 µl	3 µl	25 µl	10 µl
Wasser	2835 µl	1500 µl	11725 µl	6100 µl
Gelhöhe	5,6 cm		12,0 cm	

Pro Tasche wurden 30 µg Protein bei kleinen Gelen bzw. 60 µg Protein bei großen Gelen aufgetragen. Die Proteinlösungen wurden zuvor mit 6x Ladepuffer gemischt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturisieren und mit SDS zu versetzen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei kleinen Gelen zunächst bei einer konstanten Spannung von 100 V, bzw. bei einem konstanten Strom von 60 mA bei großen Gelen, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen sind. Danach wurden Spannung bzw. Strom auf U=150 V (kleines Gel) bzw. I=80 mA (großes Gel) erhöht, bis die Laufbande aus Bromphenolblau das untere Ende des Polyacrylamidgels erreicht hatte.

4.3.3.7. Blotten von Proteinen

Für den Transfer der Proteine von dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde ein Elektroblot nach dem Semi-Dry Prinzip durchgeführt. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 10 Minuten in Kathodenpuffer gewaschen, bevor es, wie in Abbildung 4.1 zu sehen, mit den Filterpapieren und der Nitrocellulosemembran luftblasenfrei in die Blotkammer gelegt wurde. Das anodenseitige Filterpapier wurde zuvor in Anodenpuffer, das kathodenseitige Filterpapier, sowie die Nitrocellulosemembran wurden zuvor in Kathodenpuffer getränkt.

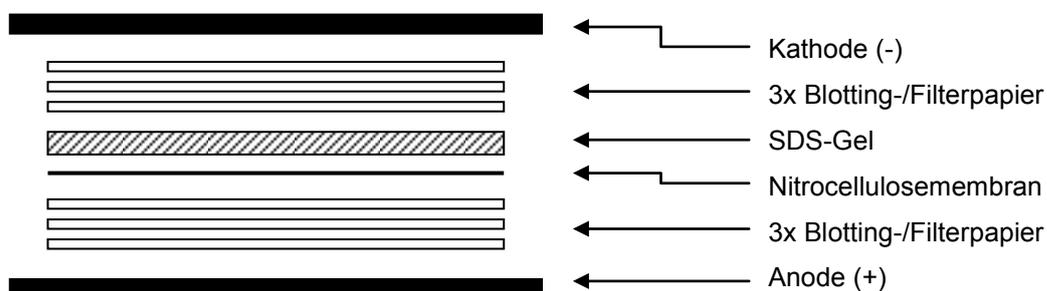


Abbildung 4.1 Schematischer Aufbau der Blotkammer mit SDS-Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran und Filterpapieren. Alle Lagen haben die gleiche Fläche und werden genau übereinander geschichtet.

Für den Proteintransfer wurde für 50 Minuten durch die Kammer ein konstanter Strom von 1 mA/cm^2 geleitet. Um den vorgefärbten Größenmarker auch später noch erkennen zu können, wurden dessen Banden nach dem Blot mit einem Kugelschreiber direkt auf der Membran nachgezeichnet. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran je nach Fragestellung in PBST- oder TBST-Puffer gewaschen.

4.3.3.8. Western-Blot

Mit einem Western-Blot kann das Vorhandensein von bestimmten Proteinen in der jeweiligen Probe durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einer Wippe bei Raumtemperatur. Nach dem Blotten und Waschen des Blots mit PBST wurde die Membran zunächst mit 1% (w/v) BSA in PBST für eine Stunde geblockt und der Blot anschließend drei Mal für 15 Minuten mit PBST gewaschen, bevor der primäre Antikörper, der ebenfalls in PBST verdünnt wurde (Verdünnungen abhängig vom Antikörper) für eine Stunde auf der Membran inkubiert. Vor und nach der 45-minütigen Inkubation des verdünnten und HRP-gekoppelten Zweitantikörpers wurde der Blot erneut drei Mal für 15 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran eine Minute lang in einer ECL-Lösung geschwenkt, um die Meerrettichperoxidase mit dem Chemilumineszenzsubstrat zu versorgen. Zum Schutz des Geräts und des Blots vor dem Austrocknen wurde die Membran zwischen die transparente Folie eines Entsorgungsbeutels gelegt und in der Expositions-kammer des Fusion-Geräts analysiert. Zur Quantifizierung von Banden wurde die Software ImageJ (Version 1.48) verwendet.

Wurde ein Blot mit verschiedenen Antikörpern behandelt, so geschah dies nacheinander. Nach Detektion des ersten Antikörpers wurde der Blot zunächst in Puffer Gewaschen und zur Entfernung der primären und sekundären Antikörper für 10 Minuten in 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert. Im Anschluss wurde dieser solange gewaschen, bis kein Geruch von Essigsäure mehr wahrnehmbar war.

Lektin-Blots wurden analog zu den oben beschriebenen Blots mit Antikörpern durchgeführt, jedoch in TBST-Puffer anstelle des PBST-Puffers und statt des Blockens mit BSA wurden die Membranen für eine Stunde in TBST-Puffer inkubiert. Da alle verwendeten Lektine biotinyliert sind, wurde nach der Lektininkubation der Blot mit HRP-gekoppelten Streptavidin inkubiert.

4.3.3.9. Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Die Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) durchgeführt. Das Probenmaterial bestand aus Proteinen, die wie in den Abschnitten 4.3.3.4 und 4.3.3.5 aufgearbeitet wurden und mit 6x SDS-PAGE Probenpuffer für fünf Minuten bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt wurden. Die Proben auf ein 10%iges NuPAGE Tris-Acetat Mini Gel der Firma Life Technology aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 150 Volt ca. 3 cm in das Gel einlaufen lassen. Anschließend wurde das Gel drei Mal für je zehn Minuten mit Wasser gewaschen und für eine Stunde mit SimplyBlue SafeStain (ebenfalls Life Technology) gefärbt. Die Gelspuren wurden entsprechend der

Lauf­länge in Teil­stücke geschnitten und in einer 96 Well-Platte reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut, wie von Tegha-Dunghu et al. [55] beschrieben. Jedoch wurde Triethylammoniumbicarbonat-Puffer anstelle des Ammoniumbicarbonat-Puffers verwendet. Im Anschluss wurden die Peptide mit 50% Acetonitril/0.1% TFA aus dem Gel extrahiert und mit einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert, bis die Proben nahezu trocken waren. Das Dimethyl­labeling wurde gemäß Boersema et al. [56] mit 20 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 4 µl 150 mM NaBH₃CN und 4 µl 1% Formaldehyd (leicht bzw. medium) für 1 h bei 25° C durchgeführt. Die leicht und medium markierten Proben wurden nacheinander auf eine C-18 Säule mit einem Volumenstrom von 10 µl/min 0,1% TFA gegeben und so auch gemischt. Die Trennung der Peptide erfolgte im Anschluss auf einer analytischen Säule (75 µm x 150 mm) mit einem Volumenstrom von 300 nl/min (nanoAcquity, Waters), die an ein ESI LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher) gekoppelt war. Fünf informationsabhängige Scans der Ionen folgten auf einen Übersichtsscan (Auflösung 60.000) in dem LTQ. Es wurden nur doppelt oder dreifach geladene Ionen für die Fragmentierung ausgewählt.

Zur Analyse der Daten wurden der Proteome Discoverer 1.4 und Mascot (Matrix Science; version 2.4) verwendet. Mascot verwendete die SwissProt-Datenbank mit der Taxonomie Mus (16700 Einträge) und Trypsin als Protease. Ferner betrug die Massentoleranz der Fragmentationen 0,50 Da und die „parent mass tolerance“ 4,0 ppm. Iodoacetamid­derivate des Cysteins wurden in Mascot als feste Modifikation angegeben, sowie Deamidation von Asparagin und Oxidation von Methionin als variable Modifikationen. „Target decoy PSM validator“ wurde auf „target FDR (strict)“ mit Wert 0,01 gesetzt.

4.3.3.10. Untersuchungen zum Salvage-Pathway in Patientenzellen

Um auszuschließen, dass bei dem Indexpatienten mit SLC35C1-CDG, der sich nicht mit Fukose therapieren lässt, nicht bereits der Salvage-Pathway, also der Weg von der extrazellulären Fukosezugabe bis zur cytosolischen Bereitstellung von GDP-Fukose, betroffen ist, wurden der Fukoseimport in die Zelle und die Aktivierung der Fukose in Patientenzellen und Kontrollzellen untersucht.

Untersuchung zum Fukoseimport in die Zelle

Patienten- und Kontrolllymphoblasten wurden einmal mit DPBS gewaschen und $2,5 \cdot 10^5$ Zellen jeweils in eine 6 cm-Petrischale mit Hungermedium (DMEM (1x), mit 10% FCS, 0,5 mM Glucose) gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation wurde je ein Milliliter Medium mit 10 µl L-[5,6-³H]Fukose (≈ 10 µCi) zu den Zellen gegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils durch fünfminütige Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml kaltem DPBS gewaschen, bevor sie in einem Milliliter DPBS resuspendiert wurden. Die Zellen wurde mittels des Branson Sonifier (Output Control 8/10, Duty Cycle 80% – 5-mal 15 sec) aufgeschlossen und zur Entfernung der Zelltrümmer die Suspension für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung der zytosolischen Fraktion gemäß Abschnitt 4.3.3.3.

Zur Aktivitätsmessung wurden von jedem Ansatz jeweils 5 μl des Mediums und 50 μl des Zytosols im Flüssig-Scintillationszähler (Probe + 5 ml Ultima Gold) gemessen.

Untersuchung zur Aktivierung der Fukose

Lymphoblastenzellen wurden zweimal mit 65 mM MOPS pH 7,5 bei 4 °C und 1500 rpm gewaschen und anschließend in 100 μl desselben Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall mit dem Branson Sonifier (Output Control 8/10, Duty Cycle 80% – 5-mal 15 sec). Zur Isolierung der zytosolischen Fraktion wurde das Lysat danach in der Ultrazentrifuge für 60 Minuten bei 45.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Proteinbestimmung des Überstandes erfolgte gemäß Abschnitt 4.3.3.3. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Protein	100 μg
L-[5,6- ³ H]Fukose	0,5 $\mu\text{l} \triangleq 0,0795 \mu\text{M}$ bzw. 0,5 μCi
MgSO ₄	5 mM
ATP	5 mM
GTP	5 mM
iPP	1 U
MOPS	65 mM
V _{ges}	100 μl

Die Reaktion erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C und 700 rpm im Thermoschüttler und wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben über Nacht lyophilisiert und in 30 μl Wasser aufgenommen.

5 μl der Probe wurden für die Papierelektrophorese mit 1 μl Orange G-Lösung gemischt und 5 cm von der Unterkante (Kathodenseite) des mit Pyridinpuffer getränkten und abgetupften Elektrophoresepapiers (Filterpapier 20 cm x 40 cm) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte wie in Abbildung 4.2 dargestellt für 45 Minuten bei einer Spannung von 2600 Volt.

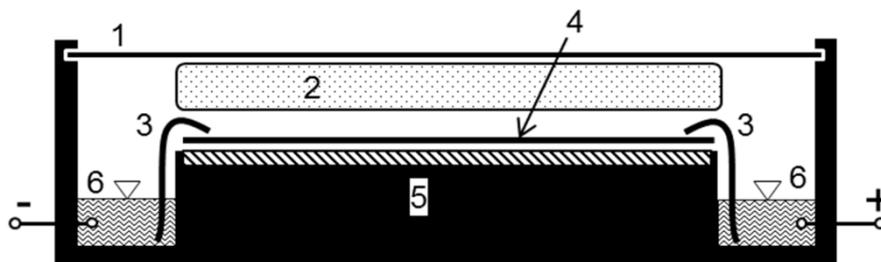


Abbildung 4.2 Schematischer Aufbau der Papierelektrophoresekammer. Die Glasplatte (1) und der Luftsack (2) drücken die Filterpapierbrücken (3) und das Elektrophoresepapier (4) auf die wassergekühlte Quarzplatte (5). Die mit Pyridinpuffer gefüllten Reservoirs (6) stellen die Verbindung zwischen den Elektroden und den Filterpapieren her.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Elektrophoresepapier mit einem Haartrockner getrocknet und zur Analyse auf dem Tracemaster 20 gescannt.

4.3.4. Histologische Methoden

4.3.4.1. Fixierung von Organen

Die hier histologisch untersuchten Organe wurden alle systemisch mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Tötung und Eröffnung der Maus erfolgte hierbei analog zu Punkt 4.3.3.1. Zusätzlich wurde die Trachea der Maus freigelegt und über einen kleinen Schnitt in die Trachea und mit einer abgerundete 22G-Kanüle ein Zugang gelegt. Dieser wurde mit einem 3/0er Faden fixiert und gleichzeitig die Trachea nach oben verschlossen. Vor der PFA-Fixierung wurde ein zweiter Zugang in den linken Ventrikel gelegt und der rechte Vorhof des Herzens eingeschnitten. Über diesen Zugang wurden die Blutgefäße zunächst mit 5 ml DPBS gespült. Blut und DPBS konnten über den rechten Vorhof abfließen. Gleichzeitig wurde über den ersten Zugang PFA-Lösung mit einem Druck von 250 mmH₂O in die Lunge geleitet, um diese in einem nativen, nicht kollabierten Zustand zu fixieren. Nach der systemischen Spülung mit DPBS wurden über denselben Zugang die Organe mit 5 ml der PFA-Lösung fixiert. Lediglich bei Tieren im Alter von einer Woche, die mittels Dekapitation getötet wurden, konnte keine systemische Spülung und Fixierung vorgenommen werden. Hier wurden die Organe direkt bzw. die Lunge nach fünfminütiger Fixierung über die Trachea entnommen. Alle entnommenen Organe wurden für weitere 24 Stunden in PFA-Lösung fixiert und anschließend bis zur Einbettung in 70%igem Ethanol (vergällt) gelagert.

Wurden parallel auch Organe für biochemische Zwecke entnommen, so wurden die entsprechenden Gefäße vor der Spülung und Fixierung mit einem 3/0er Faden abgebunden und die Organe abgesetzt. Die weitere Behandlung dieser Organe erfolgte ebenfalls wie in Punkt 4.3.3.1 beschrieben.

4.3.4.2. Einbetten von Organen

Zur Vorbereitung der fixierten Organe für die Mikrosektion wurden diese zunächst in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Hierfür wurde vergällter Ethanol verwendet. Der Ablauf gestaltete sich wie folgt:

96 % Ethanol	30 min
96 % Ethanol	30 min
100 % Ethanol	45 min
100 % Ethanol	45 min
Roticlear	45 min
Paraplast ohne Vakuum	45 min
Paraplast mit Vakuum	45 min
Paraplast ohne Vakuum	45 min

Das Paraffin wurde dabei auf 60 °C vorgeheizt und die Präparate verblieben bis zur Einbettung im Paraffinbad. Nach dem Ausgießen kühlten die Präparate in den Formen auf einer Kühlplatte ab, bis diese herausgelöst werden konnten. Die Paraffinblöcke lagerten bis zur Mikrosektion bei 4 °C.

4.3.4.3. Mikrosektion von Organen

Die zu schneidenden Paraffinblöcke wurden vor der Mikrosektion auf dem Rotationsmikrotom auf der Kühlplatte weiter heruntergekühlt, bevor diese geschnitten wurden. Bis zum Erreichen der gewünschten Schnittebene wurden Organe und Paraffin mit einem Vorschub von 16 µm/Schnitt abgetragen. Die eigentlichen Präparate hatten eine Dicke von 3 µm. Es wurden maximal drei Präparate in Serie geschnitten ohne das eingebettete Organ zwischenzeitlich zu kühlen. Geschnittene Präparate wurden zunächst mittels Objektträger von dem Wasserbad des Rotationsmikrotoms in ein auf 40 °C vorgeheiztes Wasserbad überführt, bis sich das Präparat vollständig geglättet hatte. Anschließend wurden diese auf den eigentlichen Objektträger aufgezo- gen und bei 40 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

4.3.4.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder kurz HE-Färbung ist eine Standardfärbung der Mikroskopie. Der Farbstoff Hämatoxylin hat eine tief blaue Farbe und färbt Nukleinsäuren in einer komplexen Reaktion. Das pinke Eosin dagegen färbt unspezifisch Proteine. Für gewöhnlich lassen sich in Gewebeschnitten so die blauen Zellkerne von dem umgebenden Zytoplasma und der extrazellulären Matrix, die beide pink erscheinen, unterscheiden. Zum Teil kann auch der Golgi Apparat als nicht gefärbte Zone um den Nukleus identifiziert werden [57].

Paraffinschnitte von Geweben wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

Xylol	10 min
Xylol	10 min
100 % Ethanol	4 min
96 % Ethanol	4 min
70 % Ethanol	3 min
ddH ₂ O	2 min
Hämalaun	3-5 min
ddH ₂ O	kurz spülen
Leitungswasser	15 min (fließend wässern)
ddH ₂ O	2 min
Eosin G-Lösung	5 min
Leitungswasser	kurz spülen
70 % Ethanol	sehr kurz
96 % Ethanol	sehr kurz
100 % Ethanol	30 sec
100 % Ethanol	3 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt. Es wurde vergällter Ethanol verwendet.

4.3.4.5. Bestimmung der Alveolengröße in Lungenschnitten

Die Berechnung der durchschnittlichen Alveolengröße erfolgte durch die Auswertung verschiedener HE-gefärbter Lungenschnitte von Wildtyp und Knockout Geschwister-tieren. Mit der Software ImageJ (Version 1.48) wurden in verschiedenen Aufnahmen, die am Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen wurden, Geraden über die Aufnahmen gelegt und deren Länge durch die Anzahl der Septen, die von den Geraden gekreuzt wurden, geteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass Blutgefäße und Bronchiolen nicht mit berücksichtigt wurden.

4.3.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten

Nach Abschluss der Versuche mit Fibroblasten, die unter sterilen Bedingungen und für histologische Färbungen bereits auf den beschichteten Deckgläsern kultiviert wurden, erfolgten die nachfolgenden Schritte unter unsterilen Bedingungen:

3x waschen mit DPBS

3 min Fixierung mit Methanol:Aceton 1:1 (v/v), dabei vorsichtig schwenken

Lösung abnehmen und 10 min an der Luft trocknen lassen

3x waschen mit DPBS

Blocken mit DPBS+1% BSA für 45 min auf der Wippe

Markierung für 30 min mit 4 µg/ml AAL (1:500) (biotinyliert) in DPBS+1% BSA

4x 2 min waschen mit DPBS

30 min Inkubation mit Strep-FITC (1:50 in DPBS+1% BSA) im Dunkeln

2x 2 min waschen mit DPBS

2x 2 min waschen mit H₂O

10 min Inkubation mit Bisbenzimid (1:2000 in H₂O) im Dunkeln

2x 2 min waschen mit H₂O

Eindeckeln mit Moviol

Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln

Lagerung bei 4 °C

4.3.5. Bioinformatische Methoden

4.3.5.1. Aufarbeitung der Proteinlisten nach MS Analyse

Das Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH), das als Kooperationspartner die massenspektrometrische Analyse der Proteine übernommen hat, hat die nach der Lektinaffinitätschromatographie aufgereinigten Proteine aus den Wildtyp- und Knockoutproben identifiziert und quantifiziert. Um mögliche falsch positiv identifizierte Proteine auszuschließen, mussten die folgenden Kriterien erfüllt sein, damit ein Protein als vermeintlich fukosyliertes Protein in der Liste verblieb: Es mussten mindestens drei Unique Peptides in der Wildtyp-Probe identifiziert werden und das Verhältnis von Wildtyp zu Knockout musste bei dem Dimethyl labeling größer oder gleich fünf betragen.

Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden von Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) an Hand des ebenfalls in der Liste enthaltenen Uniprot-Accession-Codes bezogen und mit der browserbasierten Software NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) auf mögliche N-Glykosylierungsstellen überprüft.

4.3.5.2. Sequenz-Alignment

Der Abgleich von Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzen erfolgte mit der browserbasierten Software ClustalW2 des EMBL European Bioinformatics Institute auf der Seite <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Alle Suchanfragen erfolgten mit den unveränderten Standardeinstellungen für Proteine bzw. DNA. Der Service wurde mittlerweile eingestellt und durch das neuere Clustal Omega ersetzt.

4.3.5.3. Functional Annotation

Zur Auswertung der Proteinlisten wurde die webbasierte Datenbank „DAVID“ (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), zu finden unter <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, verwendet. Bei der Gene Ontology-Untersuchung wurden die *annotation categories* GOTERM_BP_ALL, GOTERM_CC_ALL bzw. GOTERM_MF_ALL angewandt. Als Grenzwerte wurden eine minimale Anzahl von drei Genen und ein maximaler P-Wert von 0,05 je Terminus festgelegt.

4.3.5.4. Gene Ontology enrichment

Die Analyse auf angereicherte Gene Ontology Termini wurde mit der browserbasierten Software GOrilla mit der Web-Adresse <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> durchgeführt. Als Organismus wurde *Mus musculus* ausgewählt und die Methode für zwei nicht geordnete Listen verwendet. Als Ziel wurde die Liste der identifizierten fukosylierten Proteine und als Hintergrund die Liste von N-glycosylierten Proteinen von Zielinska. et al. [14] eingegeben.

5. Ergebnisse

Durch die Amplifikation des Exons 1 von genomischen DNA der Mäuse aus der hybriden Line, konnten die Genotypen der Tiere eindeutig bestimmt werden. Wie bereits von Hellbusch et al. beschrieben [21], bilden die Primer Slc35c1-F1 und Slc35c1-R1, die vor und nach Exon 1 des Slc35c1-Gens liegen, im Wildtyp ein Produkt mit 2,3 kb und die Primer Slc35c1-F1 und Slc35c1-R2, wobei letzterer in der eingebauten Neomycinresistenzkassette der Knockout-Mäuse bindet, ein Produkt mit einer Größe von 1,8 kb in den Slc35c1^{-/-}-Mäusen. Heterozygote Tiere weisen dagegen beide Banden im Gel auf (siehe Abbildungen 5.1 und 5.2).

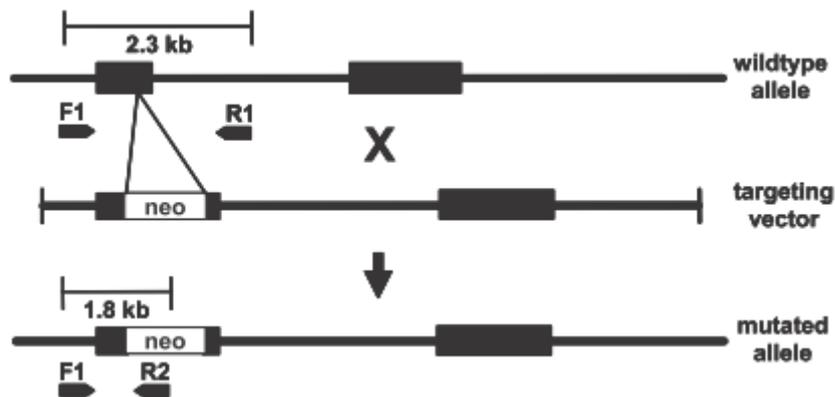


Abbildung 5.1 Einbau der Neomycinresistenzkassette (neo) in das Exon 1 (schwarze Box) des *Slc35c1*-Gens. Aus Hellbusch et al. (2007) [21]

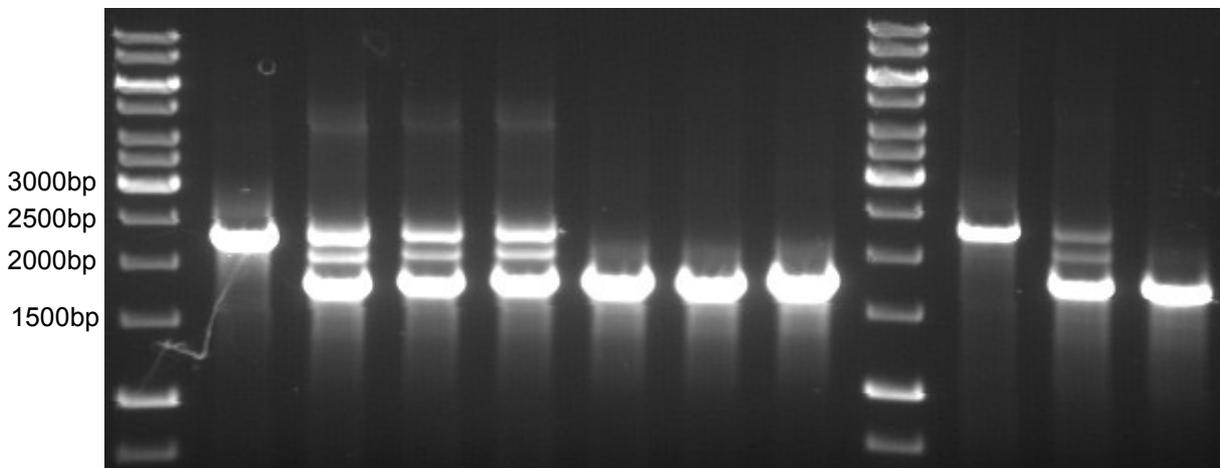


Abbildung 5.2 Agarosegel (1% w/v) von Proben (Spuren 2-8), Kontrollen (Spuren 10-12 - Slc35c1^{+/+}, Slc35c1^{+/-} und Slc35c1^{-/-}) und 1kb-Marker (Spuren 1 und 9) zur Genotypisierung der Versuchstiere.

5.1. Lektinaffinitätschromatographie

Um gezielt fukosylierte Proteine zu identifizieren, wurden diese mit dem immobilisierten *Aleuria Aurantia* Lektin (AAL) chromatographisch aus Gewebe von Wildtypmäusen isoliert. Gewebe aus den hypofukosylierten Knockoutmäusen diente als Negativkontrolle.

In den Abbildungen 5.3 und 5.4 sind die Aufnahmen von Dot-Blot Proben zu sehen, die während der Lektinaffinitätschromatographie gesammelt wurden. Es wurden sowohl Blots für fukosespezifische AAL-Färbungen (A), als auch gegen

manosereiche Strukturen mit ConA (B) angefertigt. Aus Abbildung 5.3 geht hervor, dass im Durchfluss (D) der Knockout- und der Wildtypproben Signale nach der AAL-Färbung von Proteinen zu erkennen sind, die nicht an die Säule gebunden haben. Dies gilt sowohl nach erstmaliger Auftragung des Gesamtproteingemischs (WT1 bzw. KO1), als auch nach erneutem Auftragen der Durchflussfraktionen (WT2 bzw. KO2), wobei beim zweiten Auftragen die Signale schwächer sind. Es bleibt daher festzuhalten, dass nicht alle durch AAL detektierbaren Strukturen der Proteine auch an die AAL-Säule gebunden haben.

Zwischen den $Slc35c1^{+/+}$ und $Slc35c1^{-/-}$ -Proben ist erwartungsgemäß ein deutlich schwächeres Signal bei den $Slc35c1^{-/-}$ -Proben mit AAL zu sehen. Für alle vier Spuren der Dot-Blots gilt, dass bereits in der zweiten Waschfraktion kein Signal mehr zu detektieren ist. Dies ist erst wieder in der ersten Elutionsfraktion (E1) der Wildtypprobe nach erstmaligem Auftragen zu erkennen.

Der mit ConA gefärbte Dot-Blot der gleichen Proben lässt dagegen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen der Mäuse erkennen. Auch die Signalintensität der einzelnen Spots nach der ersten und zweiten Auftragung der Proteinlösung erscheint vergleichbar. Lediglich in der zweiten Waschfraktion der Wildtypproben im ersten Durchlauf ist hier noch ein schwaches Signal zu detektieren. Auch mit ConA ist hier erst wieder in der E1 Fraktion des Wildtyps im ersten Durchgang wieder ein Signal erkennbar.

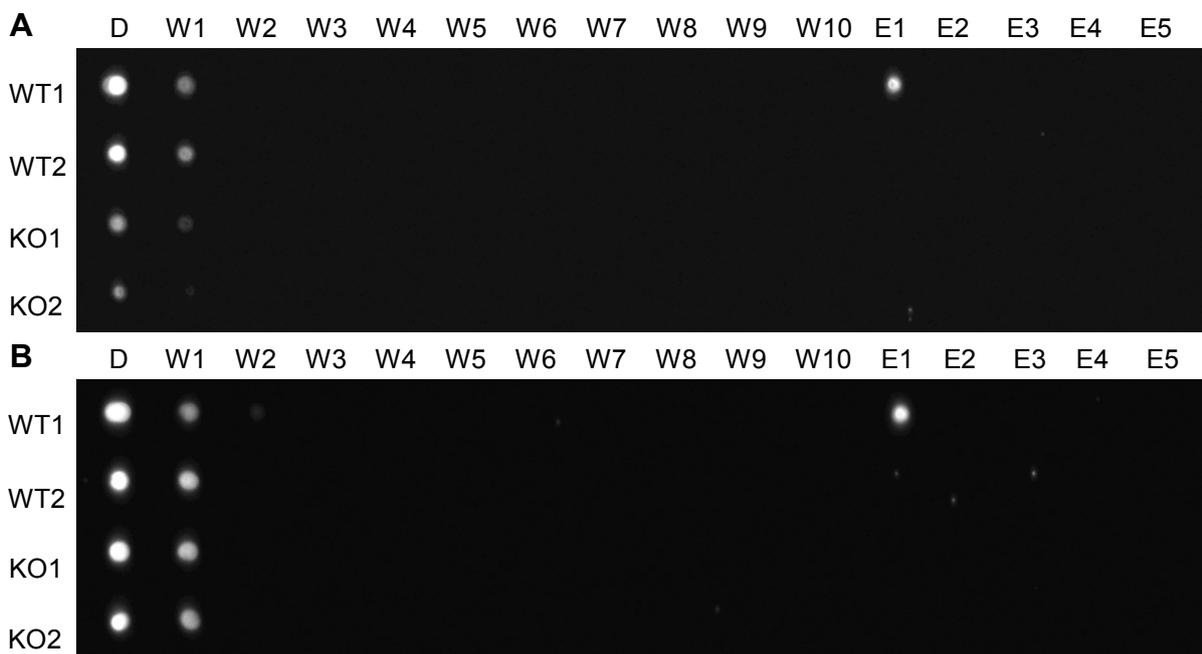


Abbildung 5.3 Dot-Blot der Fraktionen von Lungenproteinen nach Zellaufschluss und Lektinaffinitätschromatographie (D: Durchfluss, W1-W10: Waschfraktionen, E1-E5: Elutionsfraktion) gefärbt mit AAL (A), bzw. mit ConA (B). Aufgetragen wurden jeweils 1/1500stel des Volumens des 1. (WT/KO1) bzw. 2. Laufs (WT/KO2).

Betrachtet man sich dagegen die in Abbildung 5.4 aufgeführten Dot-Blots der aus kultivierten MEF-Zellen gewonnenen Proteine, ist festzustellen, dass hier in den Durchfluss- und Waschfraktionen zunächst gar keine Signale von der AAL-Färbung zu erkennen sind. Erst und einzig in der Elutionsfraktion 1 der $Slc35c1^{+/+}$ -Zellen ist

ein Spot zu sehen. Dies lässt vermuten, dass alle aufgetragenen fukosylierten Proteine an die Säule gebunden haben.

Wie bereits bei den Proben aus der Lunge zu sehen war, ist auch bei den MEF-Proben in den Durchfluss- und Waschfraktionen ein vergleichbares Bild zwischen Wildtyp und Knockout mit ConA zu erkennen. Jedoch sind hier bis zu den Waschfraktionen 3 bzw. 4 noch schwache Spots zu sehen.

Im Gegensatz zu den aus Gewebe extrahierten und aufgereinigten Proteinen ergab die MS-Analyse der Proteine aus MEF-Zellen nach der Validierung nur eine geringe Anzahl an eindeutig angereicherten und somit fukosylierter Proteine, sodass diese nicht weiter in die Auswertung eingeflossen sind.

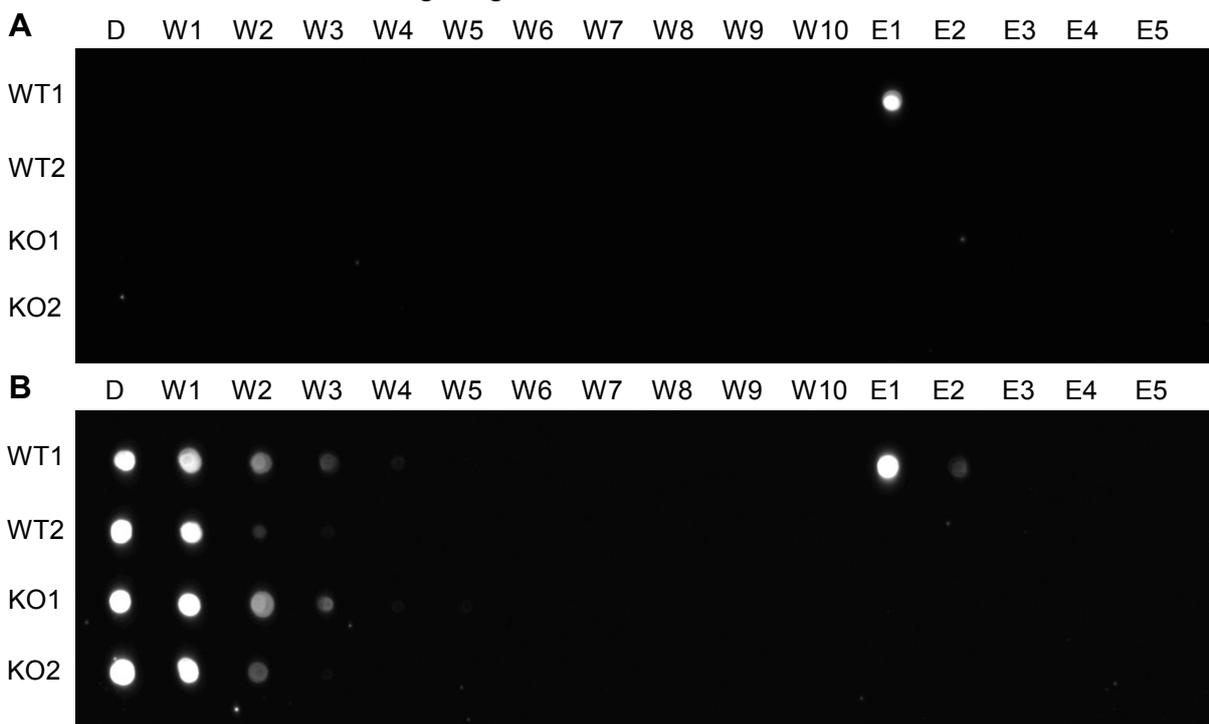


Abbildung 5.4 Dot-Blot der Fraktionen von MEF-Proteinen nach Zellaufschluss und Lektinaffinitätschromatographie (D: Durchfluss, W1-W10: Waschfraktionen, E1-E5: Elutionsfraktion) gefärbt mit AAL (**A**), bzw. mit ConA (**B**). Aufgetragen wurden jeweils 1/1500tel des Volumens des 1. (WT/KO1) bzw. 2. Laufs (WT/KO2).

5.2. Identifizierung fukosylierter Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Lektinaffinitätschromatographie und anschließender Massenspektroskopie 784 verschiedene Proteine aus Lunge und Niere identifiziert. Zusätzlich wurden die 64 von Frau Dr. Diana Popovici im Hippocampus identifizierten Proteine für die weitere Analyse mit einbezogen. Daraus ergibt sich eine Gesamtzahl von 825 unterschiedlichen Proteinen, die vermeintlich fukosyliert sind. Die Verteilung der Proteine auf die drei Gewebe und die Schnittmengen sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Eine Liste mit allen 825 Proteinen und ihrer Verteilung befindet sich im Anhang in Abschnitt 8.2

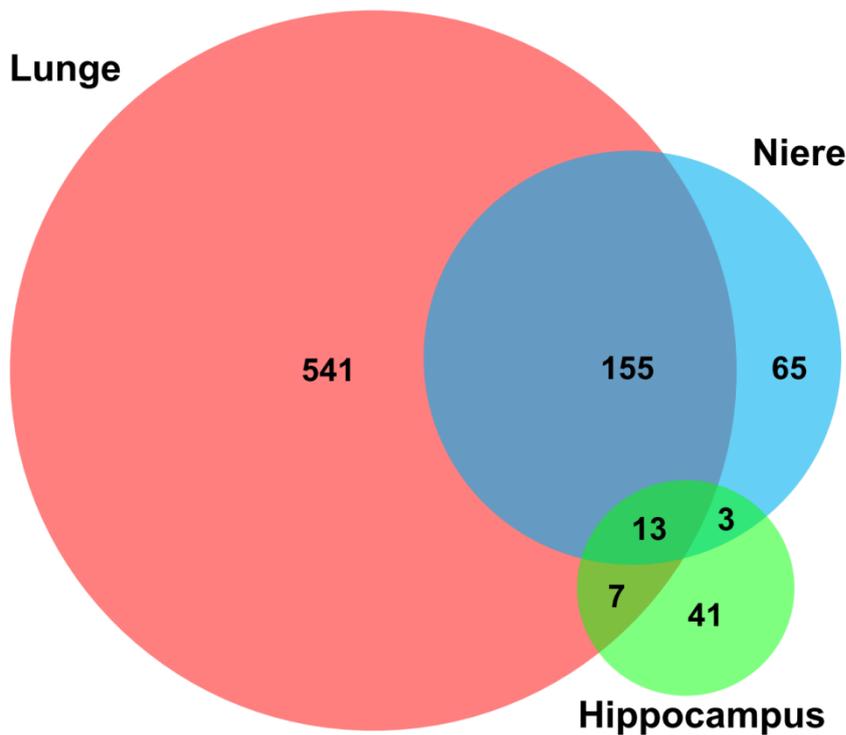


Abbildung 5.5 Quantitative Darstellung der in den jeweiligen Organen identifizierten Proteine. Die Zahlen geben die Anzahl von Proteinen in den jeweiligen Teil- bzw. Schnittmengen an.

Um speziell die Rolle der Fukose im Rahmen der N-Glykosylierung genauer zu untersuchen, wurden die 825 Proteine mit einer Gruppe von insgesamt 2654 N-Glykosylierten Proteinen verglichen, die 2010 von Zielinska et al. veröffentlicht wurde [14]. Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, wurden 647 der 825 Proteine (78,4%) als N-Glykosylierte Proteine identifiziert. Diese Proteine werden hier als Gruppe I, die restlichen fukosylierten Proteine als Gruppe II bezeichnet.

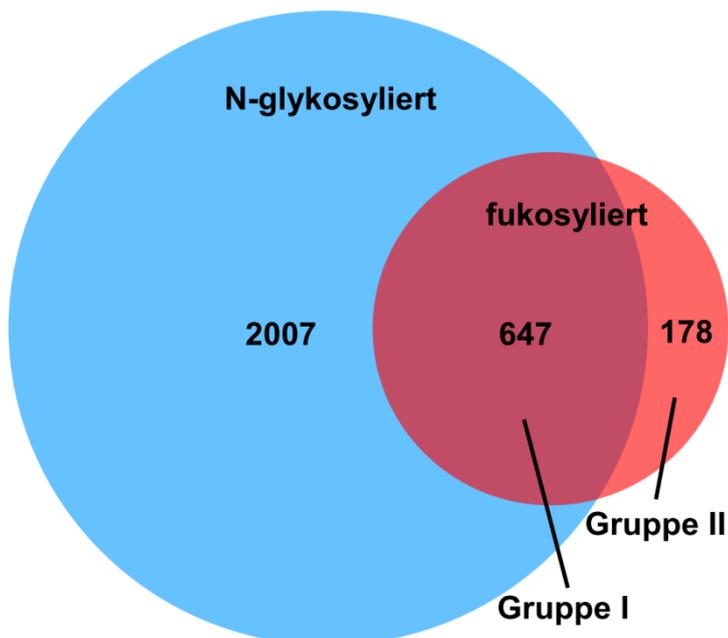


Abbildung 5.6 Quantitative Darstellung der als fukosyliert identifizierten Proteine im Vergleich zu denen von Zielinska et al. (2010) als N-glykosyliert identifizierten Proteine [14].

Da durch die Anreicherung über das *Aleuria Aurantia* Lektin auch Fukosereste angereichert werden, die aus O-Glykanen stammen könnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Proteine der Gruppe II, die nicht oder noch nicht als N-Glykosyliert identifiziert wurden, um O-glykosylierte Proteine mit Fukose handelt. Daher werden diese Gruppen bei der weiteren Analyse teilweise getrennt voneinander betrachtet. Es ist auch möglich, dass bei Proteinen aus der Gruppe I auch N-glykosylierte Proteine ohne N-Fukose aber mit O-Fukose vorhanden sind. Die weitere Analyse der Proteine aus Gruppe I+II mit dem NetNGlyc 1.0 Server ergab, dass 141 Proteine, also 17,1% nicht die häufigste N-Glykosylierungs-Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (mit Xaa ungleich Prolin) aufweisen. In der Gruppe I trifft dies aber nur für 14,2 % der Proteine zu. In Gruppe II dagegen auf 27,8 %.

5.2.1. Gene Ontology

Die 825 angereicherten und identifizierten Proteine wurden bioinformatisch bezüglich der drei Gene Ontology Gruppen Molecular Function (MF), Cellular Component (CC) und Biological Process (BP) näher untersucht. Dazu wurden diese mit den 2654 N-glykosylierten Proteinen verglichen. In allen drei Gene Ontology Gruppen (MF, CC und BP) gab es Termini, die in beiden Proteinlisten oder nur in einer der beiden Listen auftauchen. Abbildung 5.7 veranschaulicht die Aufteilung der Terme auf die drei Kategorien und die drei Gruppen N-glykosyliert (blauer Kreis), fukosyliert Gruppe I (roter Kreis) und fukosyliert Gruppe II (roter Kreis, Strich-Punkt). Wie die Abbildung zeigt, verändert Gruppe II nur gering die Termverteilung.

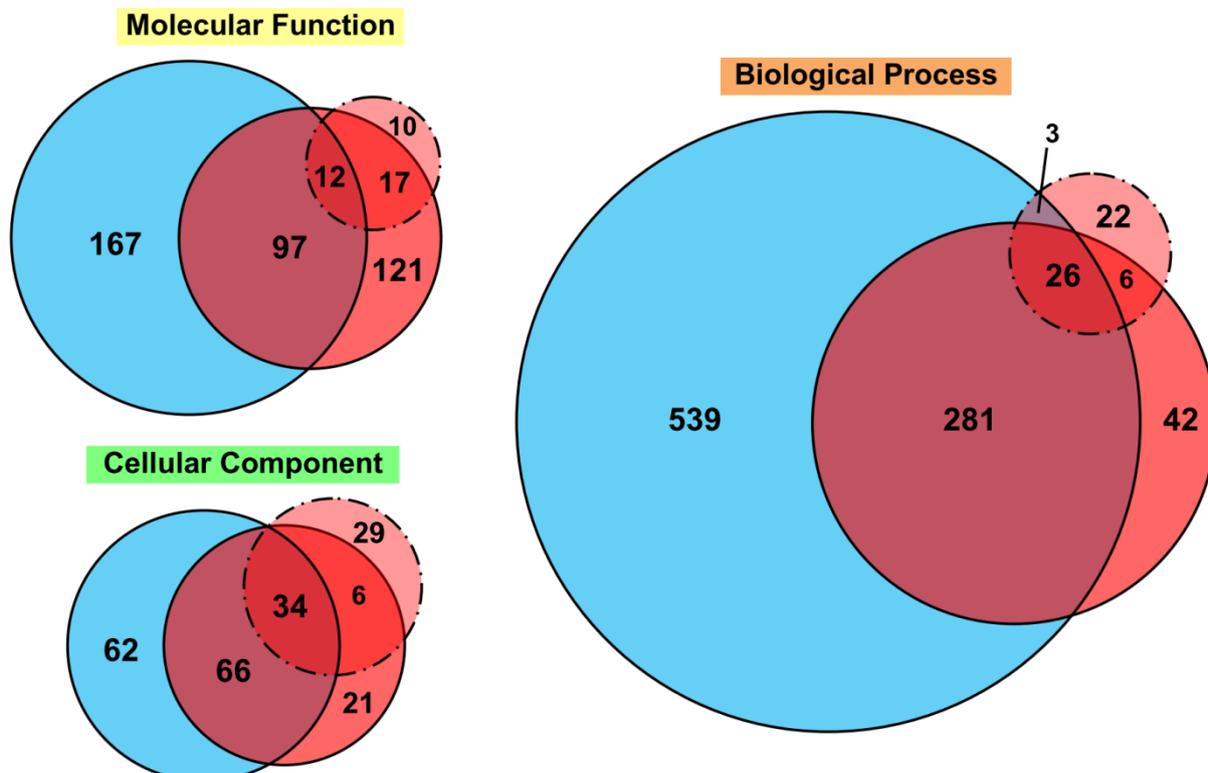


Abbildung 5.7 Quantitative Darstellung der Termverteilung zwischen der Gruppe N-glykosylierter Proteine (blau), fukosylierter Proteine der Gruppen I (rot, geschlossen) und der Gruppe II (rot, Strich-Punkt) in den drei Kategorien Molecular Function, Cellular Component und Biological Process.

5.2.1.1. Termini fukosylierter und N-glykosylierter Proteine

Abbildung 5.8 zeigt graphisch die gemeinsamen Termini der jeweiligen Gene Ontology Gruppen als Scatterplot, wobei jeder Terminus entsprechend der Anzahl der enthaltenen Proteine einen Rang in der jeweiligen Liste bekommen hat, woraus sich die Koordinaten eines jeden Punktes bzw. Terms ergeben.

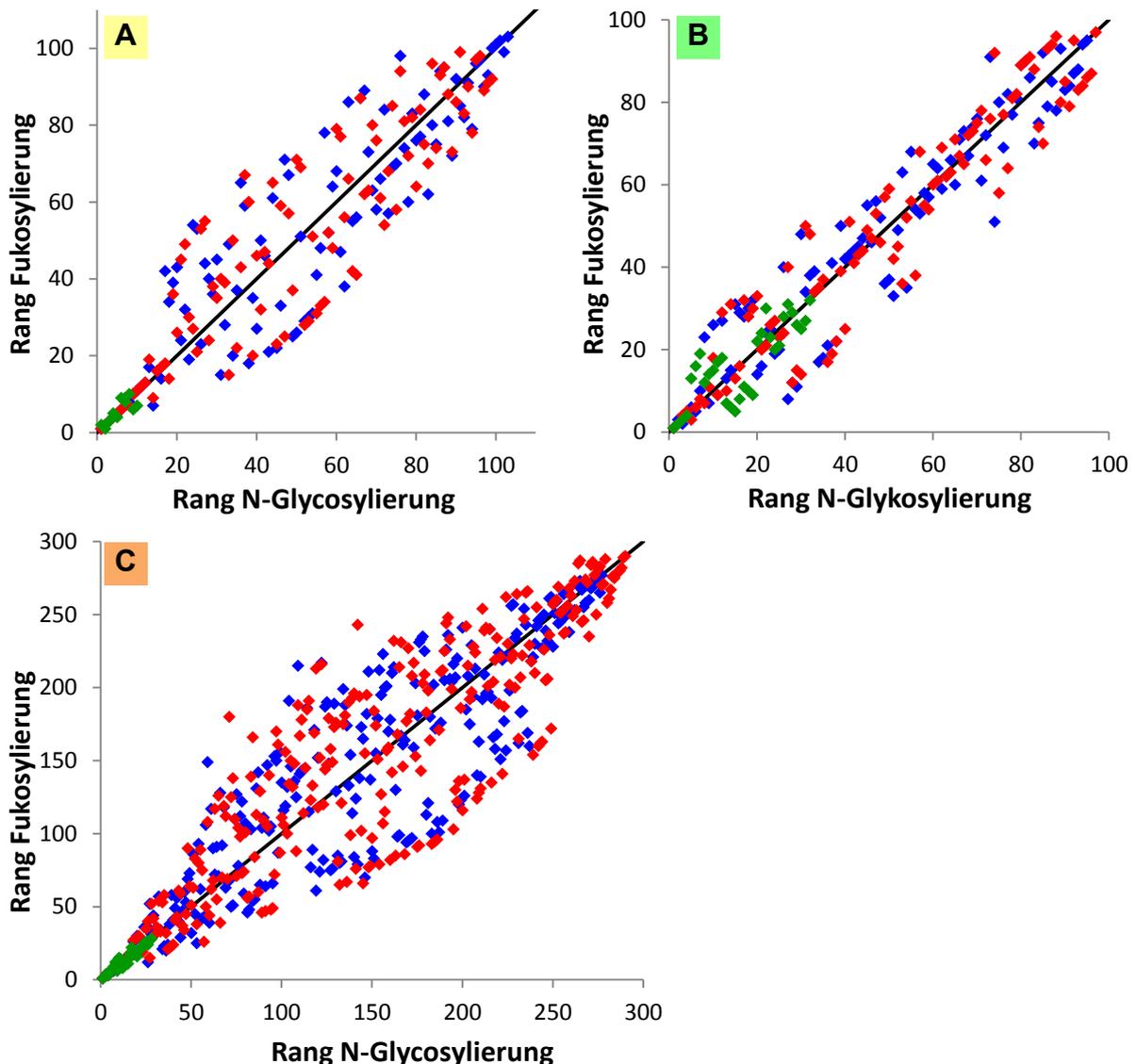


Abbildung 5.8 Scatterplots der Gene Ontology Molecular Function (A), Cellular Component (B) und Biological Process (C). Aufgetragen sind die Termini, die sowohl in der Gruppe der N-glykosylierten, als auch in der Gruppe der fukosylierten Proteine vorkommen, geordnet nach der Anzahl der Proteine (Rang). Abgebildet sind jeweils die Plots N-glykosylierter Proteine vs. fukosylierte Proteine der Gruppe I+II (blau), Gruppe I (rot) bzw. Gruppe II (grün).

In allen drei Scatterplots der Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass die Punkte um die Identitätslinie (schwarz) streuen. Das Streuungsmuster der blauen Punkte (Gruppe I+II) unterscheidet sich dabei unwesentlich von dem Muster der roten Punkte (nur Gruppe I). Die Zahl der Termini, die sowohl in der Gruppe der N-glykosylierten Proteine als auch in der Gruppe II vorkommen und grün dargestellt sind, ist im Vergleich sehr begrenzt, weshalb deren Bild keine eindeutige Aussage zulässt. Allen drei Gruppen gemein ist jedoch, dass die Punkte mit sehr niedrigem Rang sehr nahe an der Identitätslinie liegen.

Tabelle 5.1 Liste der Gene Ontology Terms der Kategorie Molecular Function unterteilt in drei Gruppen: geringster Abstand zur Diagonalen, größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe fukosylierter Proteine und größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe N-glykosylierter Proteine. Die Liste ist nach Abstand und Rang sortiert.

MF	Terminus	Rang	
		fuko-syliert	N-glyco-syliert
geringster Abstand	protein binding	1	1
	catalytic activity	2	2
	ion binding	3	3
	cation binding	4	4
	metal ion binding	5	5
	hydrolase activity	6	6
	transporter activity	8	8
	exopeptidase activity	51	51
	RPTP-like protein binding	103	103
	transmembrane transporter activity	10	9
größter Abstand fukosyliert	coenzyme binding	18	38
	oxidoreductase activity; acting on the aldehyde or oxo group of donors; NAD or NADP as acceptor	62	83
	oxidoreductase activity; acting on CH-OH group of donors	21	43
	oxidoreductase activity; acting on the CH-OH group of donors; NAD or NADP as acceptor	22	45
	hydrolase activity; acting on acid anhydrides; catalyzing transmembrane movement of substances	29	52
	ATPase activity; coupled to transmembrane movement of substances	30	53
	ATPase activity; coupled to movement of substances	31	54
	primary active transmembrane transporter activity	25	49
	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	26	50
	ATPase activity; coupled to transmembrane movement of ions	38	62
größter Abstand N-glykosyliert	heparin binding	59	37
	extracellular matrix binding	89	67
	vitamin transporter activity	98	76
	polysaccharide binding	43	20
	L-amino acid transmembrane transporter activity	86	63
	carboxylic acid transmembrane transporter activity	71	47
	secondary active transmembrane transporter activity	42	17
	glycosaminoglycan binding	53	25
	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	65	36
	symporter activity	54	24

Tabelle 5.2 Liste der Gene Ontology Terms der Kategorie Cellular Component unterteilt in drei Gruppen: geringster Abstand zur Diagonalen, größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe fukosylierter Proteine und größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe N-glykosylierter Proteine. Die Liste ist nach Abstand und Rang sortiert.

CC	Terminus	Rang	
		fuko-syliert	N-glyco-syliert
geringster Abstand	membrane	1	1
	plasma membrane	4	4
	insoluble fraction	13	13
	basement membrane	46	46
	clathrin-coated vesicle	58	58
	sarcolemma	72	72
	intercalated disc	94	94
	proton-transporting ATP synthase complex; catalytic core F(1)	95	95
	cytoplasmic part	2	3
	membrane part	3	2
größter Abstand fukosyliert	organelle inner membrane	21	36
	envelope	12	28
	mitochondrial inner membrane	22	38
	mitochondrial envelope	17	34
	mitochondrial membrane	18	35
	organelle envelope	11	29
	mitochondrial matrix	33	51
	mitochondrial part	8	27
	mitochondrial lumen	35	54
	respiratory chain	51	74
größter Abstand N-glykosyliert	extracellular space	29	16
	endomembrane system	32	19
	cell soma	68	55
	cell junction	40	26
	endoplasmic reticulum	23	8
	integral to plasma membrane	27	12
	intrinsic to plasma membrane	26	10
	Golgi apparatus	31	15
	endoplasmic reticulum part	48	30
	presynaptic membrane	91	73

Tabelle 5.3 Liste der Gene Ontology Terms der Kategorie Biological Process unterteilt in drei Gruppen: geringster Abstand zur Diagonalen, größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe fukosylierter Proteine und größter Abstand zur Diagonalen mit niedrigerem Rang in der Gruppe N-glycosylierter Proteine. Die Liste ist nach Abstand und Rang sortiert.

BP	Terminus	Rang	
		fuko- syliert	glyco- syliert
geringster Abstand	cellular process	1	1
	localization	2	2
	transport	4	4
	establishment of localization	3	3
	developmental process	5	5
	carbohydrate metabolic process	22	22
	cellular lipid metabolic process	38	38
	lipid catabolic process	115	115
	alditol metabolic process	251	251
	L-phenylalanine catabolic process	277	277
größter Abstand fukosyliert	ribonucleotide biosynthetic process	94	169
	glucose catabolic process	126	201
	electron transport chain	70	146
	hexose catabolic process	123	199
	acetyl-CoA metabolic process	160	237
	carboxylic acid catabolic process	108	186
	monosaccharide catabolic process	120	198
	organic acid catabolic process	109	189
	ATP biosynthetic process	100	183
	cellular respiration	101	187
größter Abstand N-glykosyliert	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	187	124
	B cell mediated immunity	211	148
	adaptive immune response	190	125
	learning or memory	199	134
	humoral immune response	223	156
	sulfur metabolic process	186	114
	protein maturation	191	104
	glycoprotein metabolic process	149	59
	protein maturation by peptide bond cleavage	217	122
neurotransmitter transport	215	109	

Die vorangehenden Tabellen 5.1 bis 5.3 listen einige Termini des Vergleichs der N-glykosylierten Proteine und der aus Gruppe I+II im Detail auf. Gelistet sind die zehn Termini mit dem geringsten Abstand zur Identitätslinie und mit dem größten Abstand in Richtung Fukosylierung bzw. N-Glykosylierung.

Bei den Termini mit dem geringsten Abstand zur Identitätslinie handelt es sich überwiegend um solche mit einem sehr hohen *level of abstraction*, die in den Ancestor Charts weit oben stehen. Allgemein betrachtet haben beide Gruppen an

Proteinen offensichtlich ähnliche Eigenschaften bezüglich der Gene Ontology-Einteilung, die sich aber mit größer werdenden *level of detail* spezialisieren. Bezogen auf die *Molecular Function* der fukosylierten Proteine sieht man einen Trend in Richtung Cofaktoren und ATPase-Aktivität. Die Proteine tauchen laut *Cellular Component* vermehrt in den Mitochondrien auf und sind an Prozessen des Energiestoffwechsels beteiligt (*Biological Process*).

5.2.1.2. Termin, die nur bei fukosylierten bzw. N-glykosylierten Proteinen vorkommen

Weiteren Aufschluss über unterschiedliche Eigenschaften der fukosylierten Proteine gegenüber Proteinen mit N-Glykanen gibt die Betrachtung jener Termini, die ausschließlich in einer der beiden Gruppen vorkommt (siehe Tabelle 5.4). Die Gruppe der fukosylierten Proteine umfasst hier auch wieder die Gruppen I+II. Auffällig in der Kategorie *Molecular Function* ist das gehäufte Vorkommen von Binfunktionen, welche die Nukleinsäuren betreffen und nach der Kategorie *Cellular Component* befindet sich ein Großteil der fukosylierten Proteine intrazellulär bzw. in Organellen. Bezogen auf die biologischen Prozesse scheinen fukosylierte Proteine gegenüber N-glykosylierten Proteinen deutlich häufiger an metabolischen Prozessen beteiligt zu sein.

Tabelle 5.4 Auflistung der Gene Ontology Terms, die in nur einer Gruppe vorkommen, getrennt nach den drei Kategorien (MF, CC, BP). Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil an Proteinen innerhalb des Terminus relativ zur Gesamtzahl der Proteine in der Gruppe.

MF	Terminus	%
Vorkommen nur bei Fukosylierung	binding	78,34
	nucleotide binding	21,00
	purine nucleotide binding	17,44
	ribonucleotide binding	15,32
	purine ribonucleotide binding	15,32
	nucleoside binding	13,34
	purine nucleoside binding	13,34
	adenyl nucleotide binding	13,34
	adenyl ribonucleotide binding	11,23
	ATP binding	11,10
Vorkommen nur bei N-Glykosylierung	signal transducer activity	17,71
	molecular transducer activity	17,71
	receptor activity	16,71
	peptidase activity	5,65
	peptidase activity; acting on L-amino acid peptides	5,57
	receptor binding	5,49
	hydrolase activity; acting on ester bonds	4,49
	endopeptidase activity	4,13
	channel activity	3,89
	passive transmembrane transporter activity	3,89

CC	Terminus	%
Vorkommen nur bei Fukosylierung	intracellular	66,05
	intracellular part	65,52
	cytoplasm	60,37
	organelle	56,54
	intracellular organelle	56,54
	organelle part	29,19
	intracellular organelle part	28,93
	macromolecular complex	21,14
	mitochondrion	21,00
	protein complex	15,19
Vorkommen nur bei N-Glykosylierung	intrinsic to membrane	54,85
	integral to membrane	52,36
	synapse	4,05
	synapse part	2,84
	anchored to membrane	2,72
	Golgi apparatus part	2,36
	endoplasmic reticulum membrane	1,80
	nuclear envelope-endoplasmic reticulum network	1,80
	Golgi membrane	1,72
	ion channel complex	1,56
BP	Terminus	%
Vorkommen nur bei Fukosylierung	metabolic process	51,12
	catabolic process	11,36
	macromolecule localization	9,64
	protein localization	7,79
	cellular component biogenesis	7,53
	cellular catabolic process	7,40
	cellular localization	6,47
	establishment of protein localization	6,21
	establishment of localization in cell	6,08
	protein transport	5,94
Vorkommen nur bei N-Glykosylierung	protein metabolic process	16,15
	cellular developmental process	11,58
	cell differentiation	11,14
	nervous system development	8,17
	positive regulation of cellular process	8,17
	proteolysis	6,49
	immune system process	6,13
	cell development	5,37
	tissue development	5,21
	cell communication	4,89

5.2.1.3. Gene Ontology-Unterschiede zwischen den Gruppen I und II

Um spezifischer auf die Unterschiede innerhalb der fukosylierten Proteine zwischen Proteinen der Gruppe I und der Gruppe II einzugehen, wurden diese noch einmal bezüglich der Gene Ontology direkt miteinander verglichen. Die zehn Terms mit den meisten Proteinen in der jeweiligen Gene Ontology-Kategorie aus Gruppe I bzw. Gruppe II sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Neben den bereits aufgeführten Unterschieden zwischen Proteinen mit genereller N-Glykosylierung und Fukosetragenden Glykoproteinen in den drei Gene Ontology-Kategorien zeichnen sich auch signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen der fukosylierten Proteinen ab. So sind die im Gegensatz zu den N-glykosylierten Proteinen vermehrten Nukleinsäure-assoziierten Bindefunktionen offensichtlich auf die fukosylierten Proteine der Gruppe II zurückzuführen, während die Proteine der Gruppe I vermehrt an der Ionenbindung beteiligt sind. Auch bei der Proteinlokalisierung sind Proteine der Gruppe I wohl tendenziell in der Zellmembran und extrazellulär lokalisiert, die Gruppe II-Proteine dagegen vermehrt intrazellulär und in den Organellen anzutreffen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den unterschiedlichen biologischen Prozessen der beiden Gruppen. Extrazelluläre Proteine oder Zellmembranproteine sind demnach u. a. an multizellulären Entwicklungsprozessen beteiligt und intrazelluläre eher an Prozessen, welche die Organellen und die Translation betreffen. Als Beispiele für Proteine, die jeweils in den Ersten Termini der drei Kategorien vertreten sind, sein hier aus der Gruppe I Nidogen 2 und die β 1-Untereinheit der Natrium-Kaliumpumpe zu nennen, bzw. die in Gruppe II zu findenden Proteine Septin und β 5 Tubulin.

Tabelle 5.5 Gene Ontology-Vergleich der Gruppen I und II bezüglich exklusiver Termini.

MF	Terminus	%
Vorkommen nur in Gruppe I	ion binding	30,39
	cation binding	29,77
	metal ion binding	27,91
	transporter activity	12,56
	transmembrane transporter activity	10,08
	substrate-specific transporter activity	9,92
	substrate-specific transmembrane transporter activity	8,84
	ion transmembrane transporter activity	7,44
	active transmembrane transporter activity	6,36
	cofactor binding	6,05
Vorkommen nur in Gruppe II	ribonucleotide binding	27,22
	purine ribonucleotide binding	27,22
	GTP binding	13,61
	guanyl nucleotide binding	13,61
	guanyl ribonucleotide binding	13,61
	GTPase activity	9,47
	antigen binding	2,96
	phospholipid binding	2,96
	calcium-dependent phospholipid binding	2,96
	rRNA binding	1,78

CC	Terminus	%
Vorkommen nur in Gruppe I	membrane	59,69
	membrane part	52,56
	intrinsic to membrane	40,78
	integral to membrane	38,76
	extracellular region	19,22
	extracellular region part	12,09
	membrane-enclosed lumen	10,08
	organelle lumen	9,46
	intracellular organelle lumen	9,30
	endoplasmic reticulum	9,15
Vorkommen nur in Gruppe II	intracellular	81,07
	intracellular part	79,88
	organelle	71,60
	intracellular organelle	71,60
	membrane-bounded organelle	52,66
	intracellular membrane-bounded organelle	52,66
	non-membrane-bounded organelle	26,63
	intracellular non-membrane-bounded organelle	26,63
	protein complex	20,71
cytoskeleton	15,38	
BP	Terminus	%
Vorkommen nur in Gruppe I	metabolic process	51,47
	developmental process	20,93
	multicellular organismal development	19,84
	response to stimulus	19,22
	anatomical structure development	17,36
	system development	17,05
	cell adhesion	13,02
	biological adhesion	13,02
	organ development	13,02
	positive regulation of biological process	12,09
Vorkommen nur in Gruppe II	organelle organization	11,24
	translation	10,06
	protein transport	8,88
	establishment of protein localization	8,88
	macromolecular complex subunit organization	7,69
	cellular macromolecular complex subunit organization	7,10
	cellular macromolecular complex assembly	7,10
	cytoskeleton organization	6,51
small GTPase mediated signal transduction	5,33	
regulation of phosphate metabolic process	4,73	

5.2.1.4. Gene Ontology-Analyse mit „GORilla“

Die weitere Analyse mit dem GOrilla-Tool [58] ermöglichte darüber hinaus auch die Visualisierung der Hierarchie innerhalb der jeweiligen Gene Ontology-Verzweigungen. Die Gruppen I+II wurden zusammen betrachtet und aus Gründen der Übersichtlichkeit liegt der Grenzwert für die angezeigten Termini bei $<10^{-6}$ (MF und CC) bzw. $<10^{-9}$ (BP). Vergleiche dieser Verzweigungen, wie sie in Auszügen in den Abbildungen 5.9 bis 5.11 zu sehen sind, mit den Ergebnissen aus Tabelle 5.4 zeigen, dass die gelisteten Top zehn Termini fukosylierter Proteine bis auf zwei Ausnahmen auch von GOrilla als angereicherte Termini zu finden sind. Auch für die jeweils zehn Termini, die in beiden Gruppen von Proteinen vertreten sind und den Scatterplots nach dem Ranking eine bessere Bewertung auf Seiten der fukosylierten Proteine haben, werden bei GOrilla neun aus zehn (*Molecular Function*) bzw. sechs von zehn (*Cellular Component*) als signifikant angereicherte Termini angegeben. Aus der Gruppe *Biological Process* jedoch nur drei der zehn Terme.

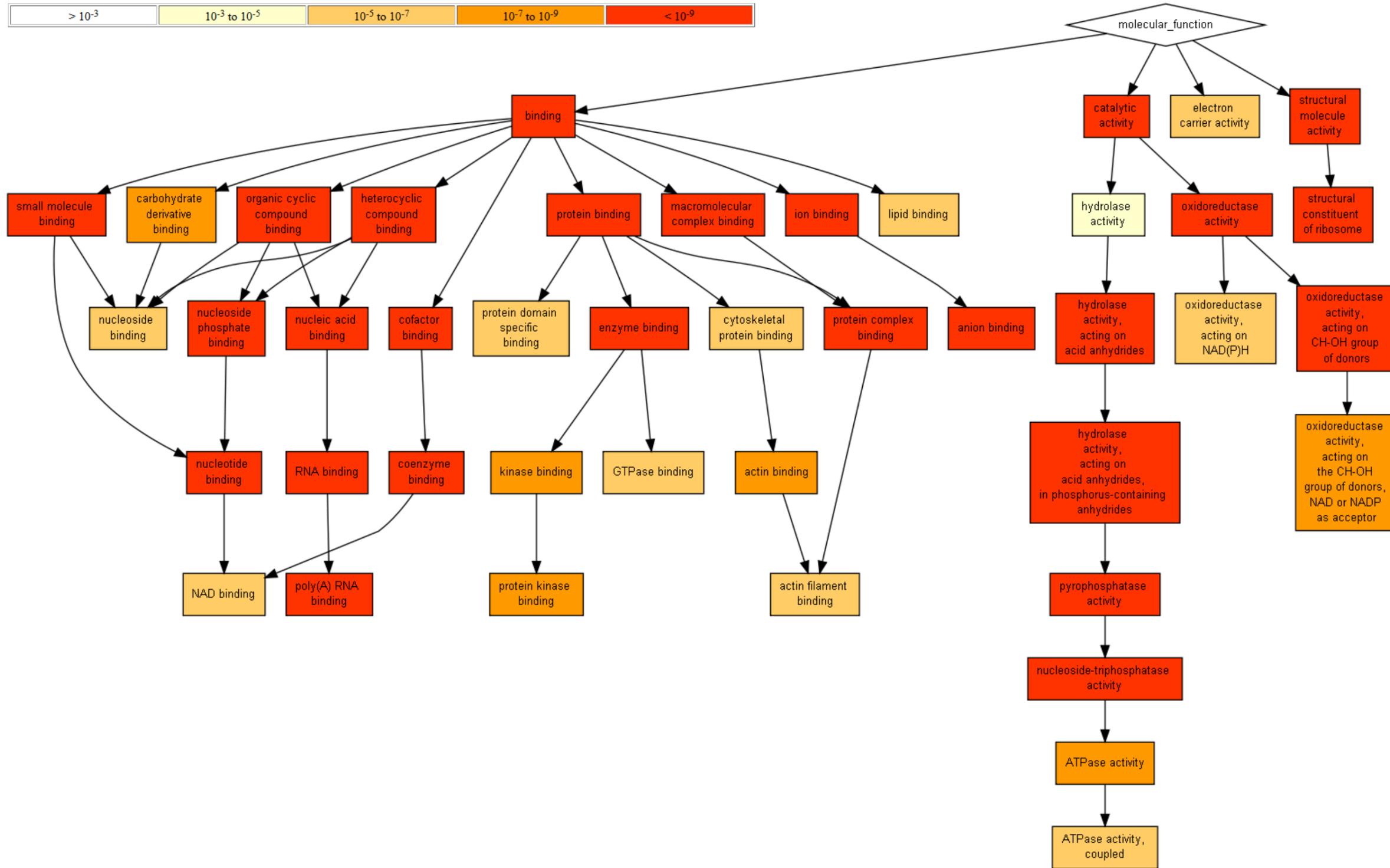


Abbildung 5.9 GOrilla-Grafik zur Anzeiger durch fukosylierte Proteine angereicherter GO-Terme in der Ancestor-Chart *Molecular Function* mit N-glykosylierten Proteinen als Hintergrund. Der Cutoff zur Anzeige liegt bei einem p-Wert der Terme von $<10^{-6}$.

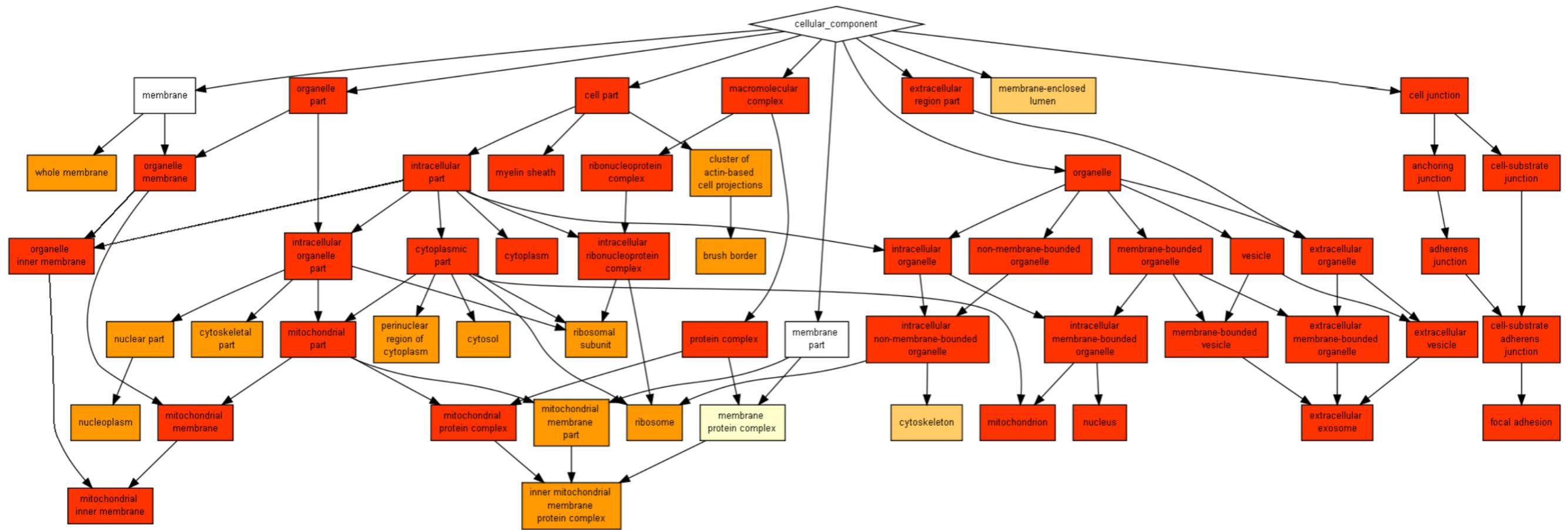
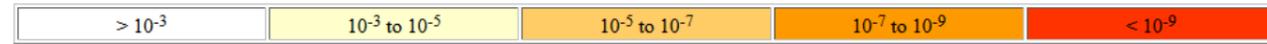


Abbildung 5.10 GO-Orilla-Grafik zur Anzeiger durch fukosylierte Proteine angereicherter GO-Terme in der Ancestor-Chart *Cellular Component* mit N-glykosylierten Proteinen als Hintergrund. Der Cutoff zur Anzeige liegt bei einem p-Wert der Terme von $<10^{-6}$.

5.2.2. Untersuchungen in der Lunge

Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

Bei der bioinformatischen Auswertung der Proteinliste von vermeintlich fukosylierten Lungenproteinen in den Slc35c1^{+/+}-Mäusen wurde unter dem Term *extracellular matrix organization* eine Gruppe von fünf Proteinen gefunden (siehe Tabelle 5.6). Darunter befindet sich auch das 106 kDa große Protein Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs – kurz RECK. Da RECK direkt die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 regulieren kann [59, 60] wurde es für weitere Untersuchungen bezüglich des Lungenphänotyps herangezogen.

Tabelle 5.6 Auflistung der aus Lungengewebe angereicherten Proteine mit dem Term *extracellular matrix organization* nach Analyse mit DAVID.

Uniprot Accession	Protein	Gen
Q59IW6	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	Abi3bp
Q08879	Fibulin-1	Fbln1
Q9Z0J1	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs	Reck
P19324	serine (or cysteine) peptidase inhibitor clade h member 1	Serpinh1
P10493	Nidogen-1	Nid1

Bei Vorversuchen zur Spezifität des verwendeten Reck-Antikörpers in Westernblots wurde eine veränderte Größe des Zielproteins sowohl in Wildtyp- als auch in Knockoutproben in unterschiedlichen Geweben festgestellt. Auf der zu erwartenden Höhe von 106 kDa wurde kein Signal detektiert, jedoch bei ca. 60 kDa (siehe Abbildung 5.12).

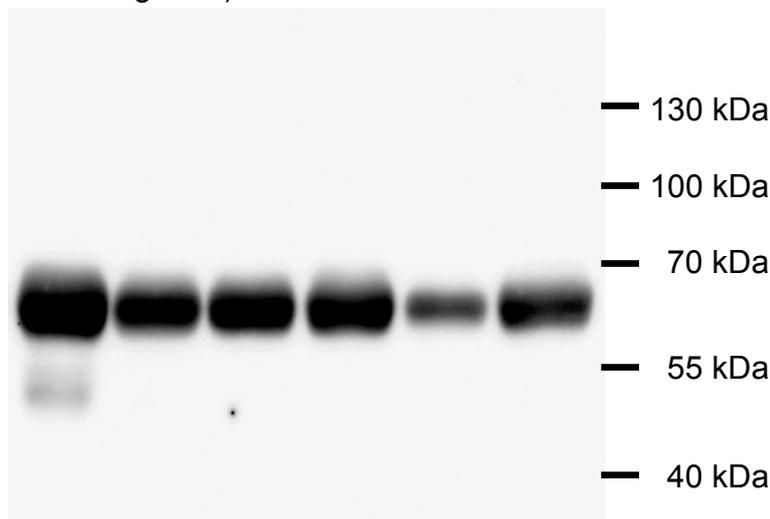


Abbildung 5.12 Westernblot von Gesamtprotein aus verschiedenen Geweben eines Wildtyp-Tieres und eines Knockout-Tieres mit Reck Antikörper (1:2.000). Auftragung v.l.n.r.: Wildtyp (Lunge, Leber, Niere) und Knockout (Lunge, Leber, Niere)

Weitere Untersuchungen mit cDNA aus Lunge und Niere verschiedener Genotypen zeigten nach Nested-PCR kleinere (ca. 1300 bp) Banden nach der Gelelektrophorese statt der erwarteten 2992 bp. Zwei diese Banden wurden aus dem

Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtssequenzierung beider Fragmente zeigten einen Verlust von 1709 bp im codierenden Bereich des Reck-Gens zwischen den Positionen 189 und 1898.

Um eine Beteiligung des RECK-Proteins am Umbau von extrazellulärer Matrix (ECM) weiter zu untersuchen, wurden quantitative PCRs mit cDNA aus Knockout- und Wildtypproben von Lungengewebe durchgeführt. Hierzu wurde die Expression von den drei Typ 5 Kollagenen α -1, α -2 und α -3 der Matrixmetalloproteinase 9, die jene Kollagene abbaut, sowie dem Reck-Protein und dem Metalloproteinase-Inhibitor 1 (TIMP-1), die beide MMP-9 regulieren können.

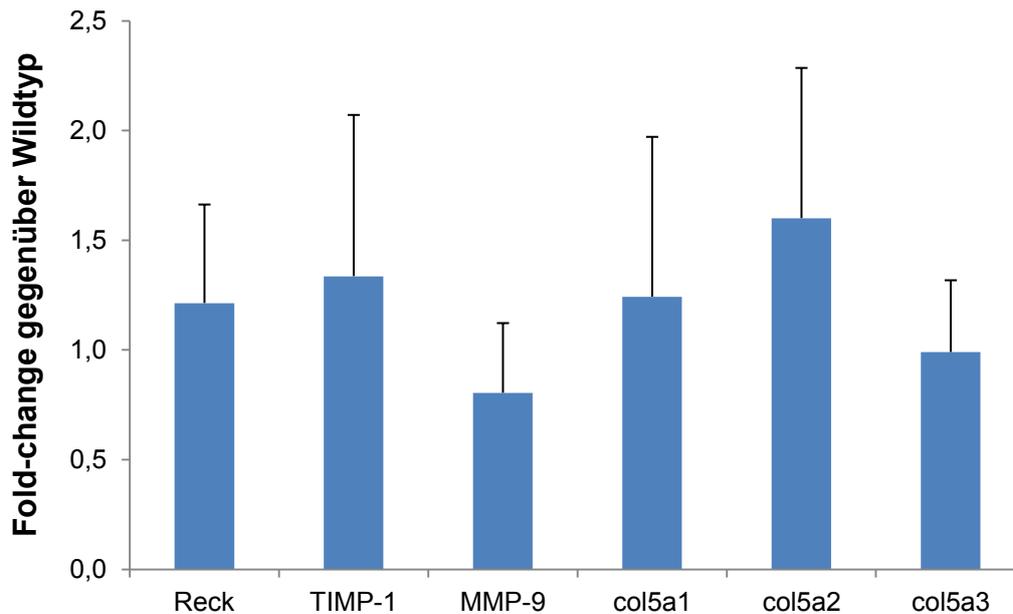


Abbildung 5.13 Relativ zum Wildtyp dargestellte Expressionsraten der Proteine Reck und TIMP-1, die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9), die von beiden reguliert wird, sowie drei Typ 5 Kollagene (α -1 bis α -3), die von MMP-9 degradiert werden können. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR (siehe Abbildung 5.13) zeigen in den ausgewählten Proteinen der ECM keine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zu den Wildtypproben. Gleiches gilt auch für die ECM abbauende Matrixmetalloproteinase 9 und deren Regulatoren RECK und TIMP-1.

Nach Abschluss der Untersuchungen am RECK-Protein wurden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung mit den Sequenzierungsergebnissen des Reck-Gens verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass 10 von 18 unterschiedlichen und identifizierten RECK-Peptiden innerhalb des Bereichs liegen, der laut Sequenzierung im fehlenden Bereich des Gens codiert wird. Offenbar liegt bei einem Teil der Mäuse innerhalb der verwendeten Linie eine Mutation des Gens vor.

5.2.3. Weitere Untersuchungen im Hippocampus

Die im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Popovici gesammelten Daten über fukosylierte Proteine im Hippocampus wurden hier weiterführend ausgewertet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den identifizierten Proteinen und den beobachteten Verhaltensauffälligkeiten herzustellen. Dazu wurde die Liste der Hippocampusproteine mit der Bioinformatik-Software DAVID und darin mit dem Tool *Functional Annotation Clustering* nach Gruppen (Clustern) zusammengefasst, die eine ähnliche Funktion haben. Mit den Standardeinstellungen von DAVID ergaben sich damit 21 Cluster, von denen drei einen neuronalen Bezug aufweisen. Diese sind in Abbildung 5.14 dargestellt und enthalten 28 von 63 der als fukosyliert identifizierten Proteine.

Dieses Verfahren diente der Einschränkung der Proteine, zu denen im nächsten Schritt die Literatur nach möglichen vergleichbaren Phänotypen bei Knockout-Mausmodellen gesucht wurde. Ähnlich beobachtete Verhaltensauffälligkeiten nach Modifikation von Proteinen aus dieser Gruppe werden im Abschnitt 6.6 ausführlich diskutiert.

	neuron development	neuron differentiation	cell morphogenesis involved in neuron differentiation	cell morphogenesis involved in differentiation	cell morphogenesis	cellular component morphogenesis	cell projection organization	axonogenesis	neuron projection development	neuron projection morphogenesis	cell projection morphogenesis	cell part morphogenesis	neural cell adhesion molecule-like protein										
Neural cell adhesion molecule 1																							
Neurofascin														Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2									
Neural cell adhesion molecule L1														Excitatory amino acid transporter 2									
Neural cell adhesion molecule L1-like protein														Ras-related protein Rab-3A									
Activated leukocyte cell adhesion molecule														Synaptophysin									
Ras-related protein Rab-3A														Neuroplastin									
Syntaxin-binding protein 1														Syntaxin-binding protein 1									
2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase														Glutamate receptor 2									
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2														Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2									
Excitatory amino acid transporter 2														Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1									
Thy-1 membrane glycoprotein														Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2									
	transmission of nerve impulse	synaptic transmission	cell-cell signaling	synapse	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	membrane-bounded vesicle	vesicle	synapse part	synaptic vesicle	clathrin-coated vesicle	coated vesicle	cell junction	synapse	neurotransmitter transport	synaptic vesicle membrane	clathrin coated vesicle membrane	coated vesicle membrane	cytoplasmic vesicle membrane	regulation of neurotransmitter levels	neurotransmitter secretion	cytoplasmic vesicle	presynaptic membrane	
Synaptotagmin-1																							
Synaptic vesicle glycoprotein 2B																							
synapsin-2																							
Synaptophysin																							
Glutamate receptor 2																							
Synaptic vesicle glycoprotein 2A																							
Ras-related protein Rab-3A																							
Synaptosomal-associated protein 25																							
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2																							
Syntaxin-binding protein 1																							
Syntaxin-1B																							
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1																							
2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase																							
Calnexin																							
4F2 cell-surface antigen heavy chain																							
Neuronal cell adhesion molecule																							
Neuroplastin																							
Excitatory amino acid transporter 2																							
Neural cell adhesion molecule L1																							
Cell adhesion molecule 3																							

Abbildung 5.14 Darstellung der drei Cluster mit neuronalem Bezug nach functional annotation clustering der im Hippocampus gefundenen fukosylierten Proteine. Übereinstimmungen von Proteinen und Termini sind mit einem schwarzen Feld gekennzeichnet.

Zwischen *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen und Rab3a-Knockoutmäusen wurde ein vergleichbares Verhaltensmuster wie ein längerer Aufenthalt im ungeschützten Bereich während des O-Maze-Tests und vermindertes Freezing beim *cued fear conditionings* [61, 62] festgestellt. Da Rab3a durch Lektinaffinitätschromatographie im Hippocampus angereichert wurde, wurde dessen Expression, sowie einige der durch das Fehlen von Rab3a regulierter Gene, wie Yang et al. berichteten [62], untersucht.

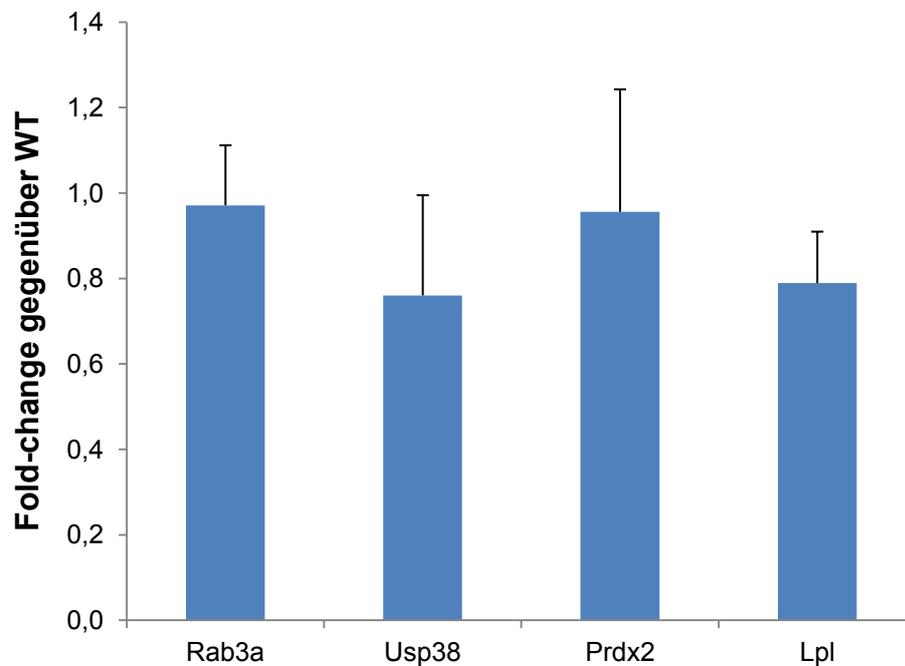


Abbildung 5.15 Expressionsrate von Rab3a und durch Knockout von Rab3a stark regulierte Gene im Gehirn von *Slc35c1* Knockout-Mäusen relativ zum Wildtyp. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Ergebnisse der quantitativen PCRs, wie sie in Abbildung 5.15 dargestellt sind, zeigen jedoch keine signifikanten Änderungen in der Expression des Gens Rab3a, sowie der Gene Usp38, Prdx2 und Lpl, die bei Rab3a-Knockoutmäusen fehlreguliert sind. Ein Zusammenhang zwischen dem *Slc35c1*^{-/-}-Phänotyp und dem Rab3a^{-/-}-Phänotyp scheint demnach nicht zu bestehen. Für mögliche weitere Untersuchungen bezüglich des Verhaltens sei an dieser Stelle auf Abschnitt 6.6 verwiesen.

5.3. Histologie Lunge und Niere

5.3.1. Histologie der Lunge

Alveolendilatation

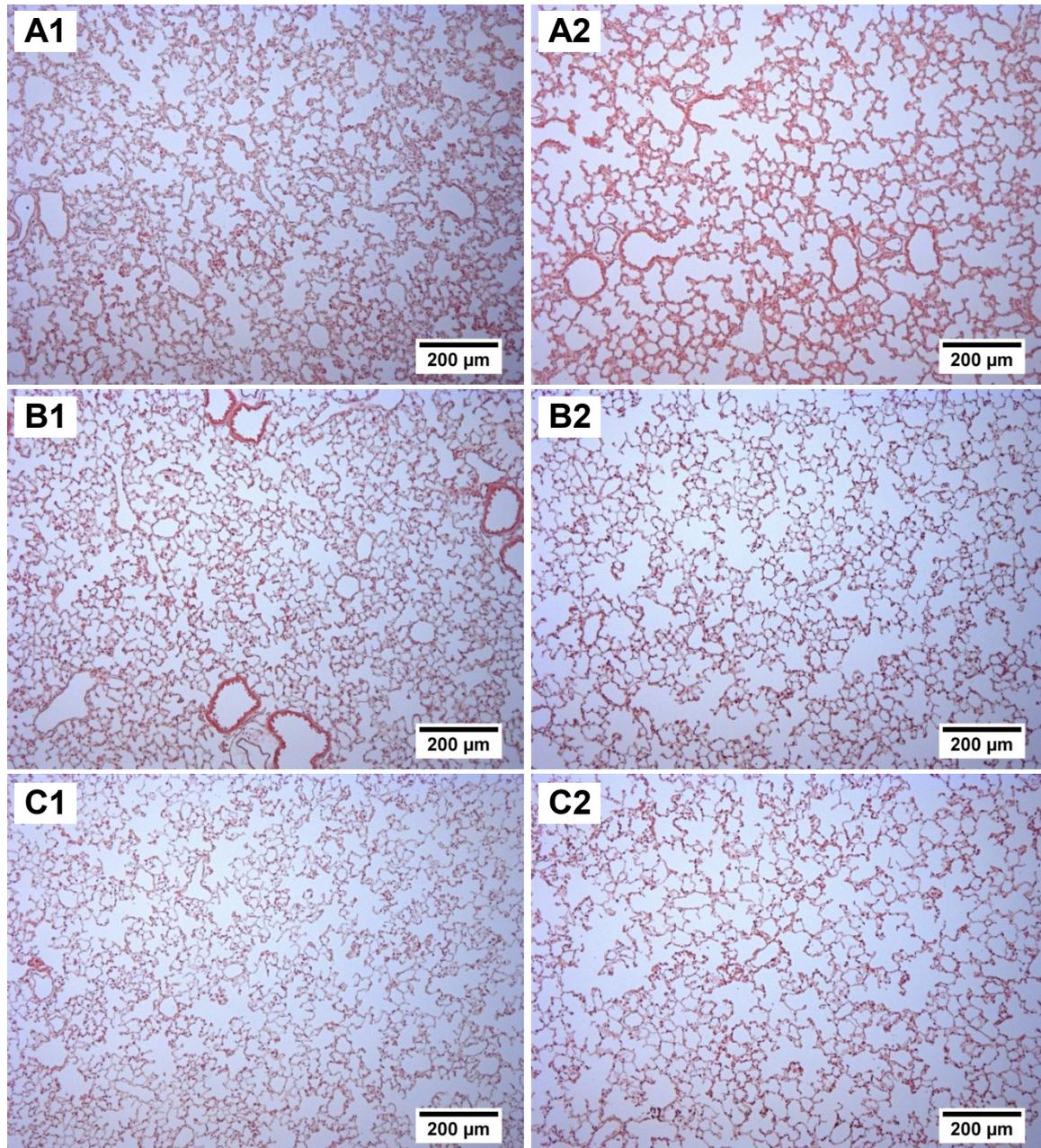


Abbildung 5.16 HE-Färbung von Lungen $Slc35c1^{+/+}$ (1) und $Slc35c1^{-/-}$ (2) Mäuse im Alter von einer (A), drei (B) und 18 Wochen (C).

Der auffällige Phänotyp von $Slc35c1$ Knockoutmäusen in Form einer Alveolendilatation wurde bereits bei der ersten Veröffentlichung von Hellbusch et al. beschrieben [21]. Spätere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wiesen die Dilatationen auch bei Jungtieren im Alter von drei Wochen nach. Mittlerweile wurde eine leichte Veränderung im genetischen Hintergrund der Mäuse vorgenommen. Die vergangenen Messungen fanden in Knockout- und Wildtypen der F2-Generation von heterozygoten Sv129 Mäusen und Bl6 Wildtypen statt. Nach Umstellung auf die F1-Generation mit heterozygoten Elterntieren wurden daher die Messungen

wiederholt. Alveolen bei den fukosedefizienten Tieren sind hier im Durchschnitt um 13 % größer ($p=0,012$). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Alveolendilatation bereits bei neonatalen *Slc35c1*^{-/-}-Tieren im Alter von einer Woche zu beobachten ist (siehe Abbildung 5.16), was auf einen Defekt in der späten Embryonalentwicklung der Lunge hinweisen könnte.

Die Lektinfärbung mit *Aleuria Aurantia* Lektin in Abbildung 5.17 zeigt bei allen untersuchten Altersstufen der Tiere die Hypofukosylierung der Knockout-Mäuse im Lungengewebe. Während bei den Wildtyptieren eine Fukosylierung aller Strukturen zu erkennen ist, können bei *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen quasi keine Fukosereste detektiert werden.

Hypofukosylierung des Lungengewebes

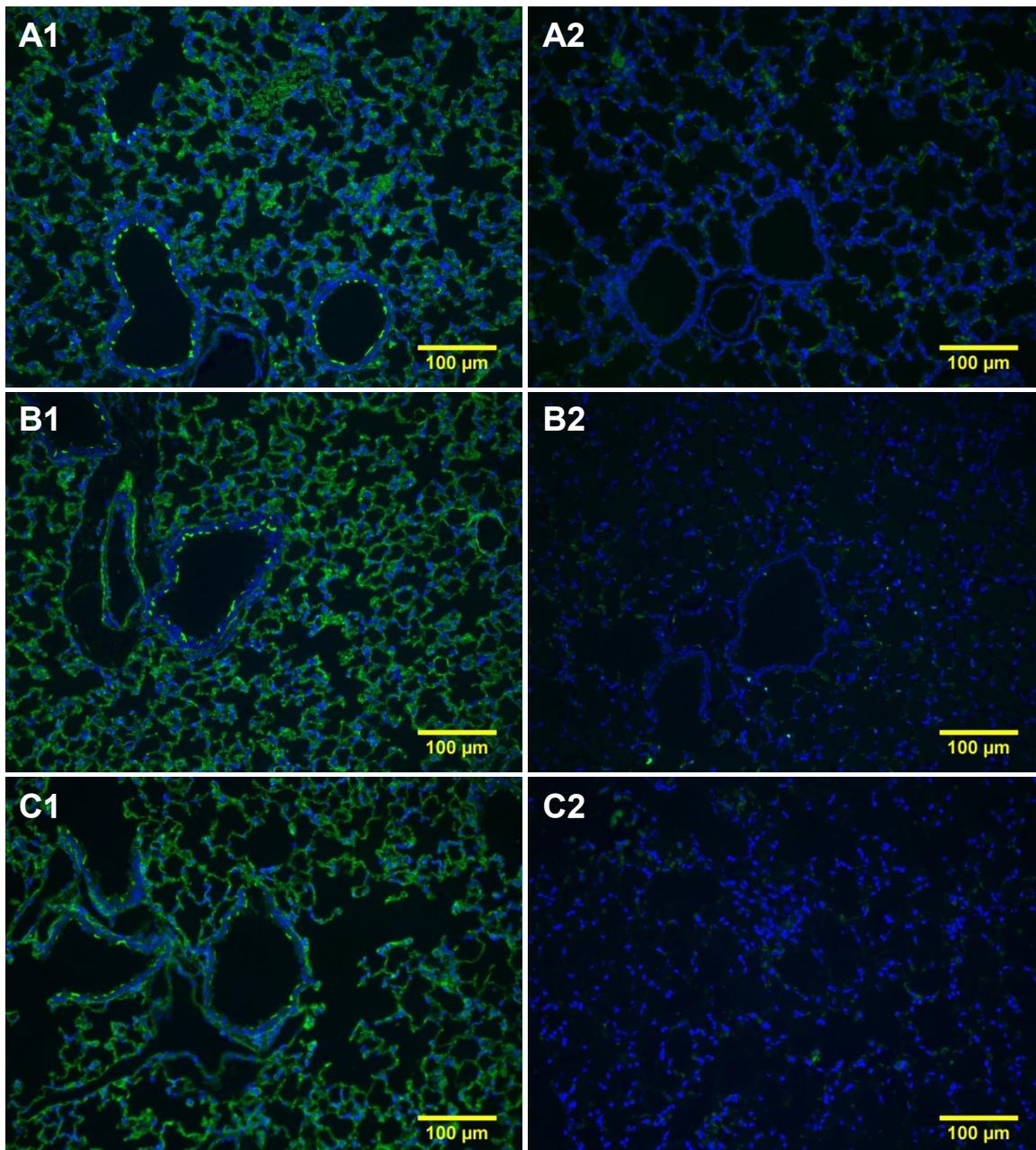


Abbildung 5.17 Lektinfärbung mit AAL (grün) von Lungen *Slc35c1*^{+/+} (1) und *Slc35c1*^{-/-} (2) Mäuse im Alter von einer (A), drei (B) und 18 Wochen (C). Zellkerne sind blau gefärbt.

5.3.2. Histologie der Niere

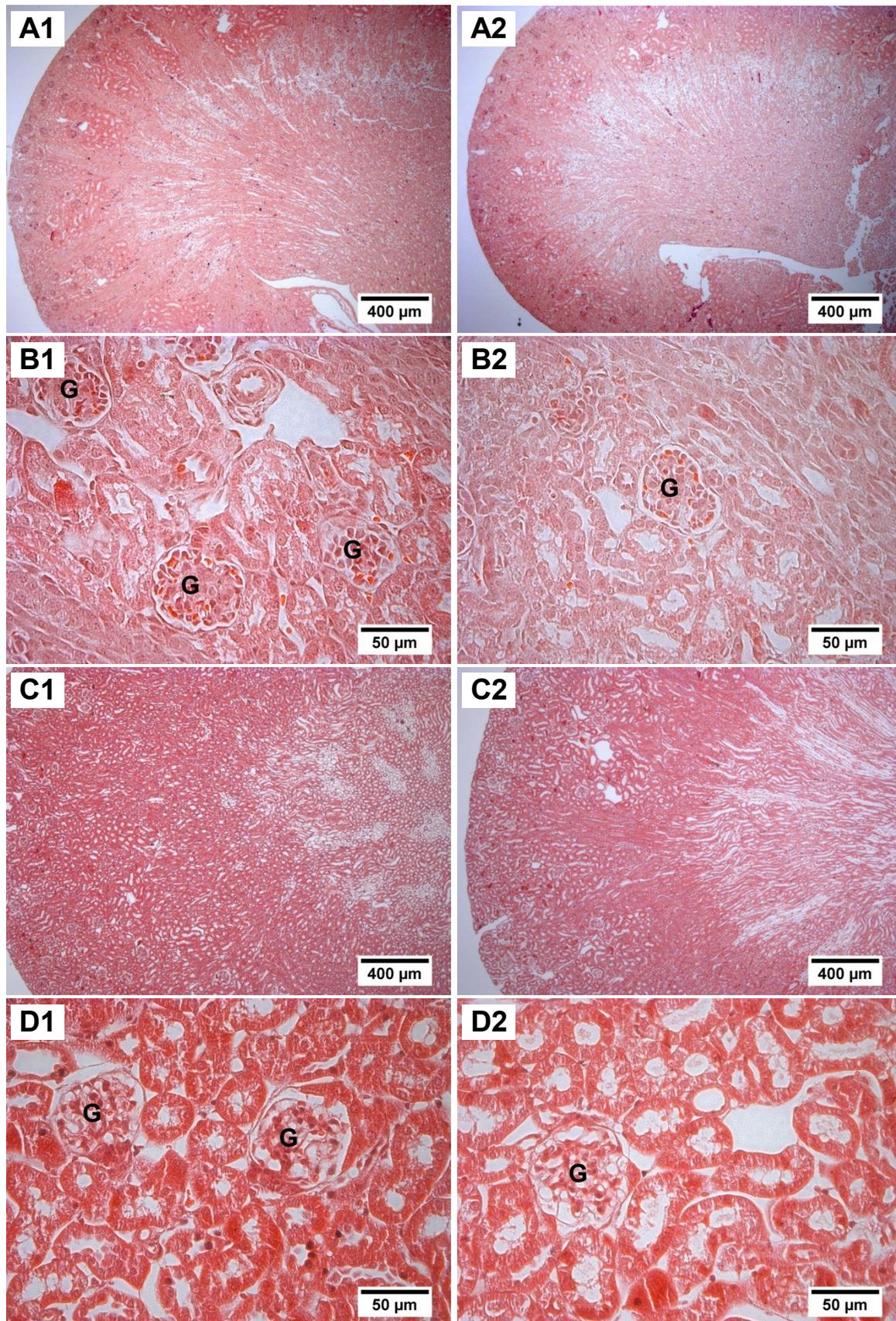


Abbildung 5.18 HE-Färbung von Nieren *Slc35c1*^{+/+} (1) und *Slc35c1*^{-/-} (2) Mäuse im Alter von einer (A, B) und 18 Wochen (C, D). Aufgenommen mit 5 (A, C) bzw. 40-facher Vergrößerung (B, D). G: Glomerulus.

Lektinfärbung mit AAL

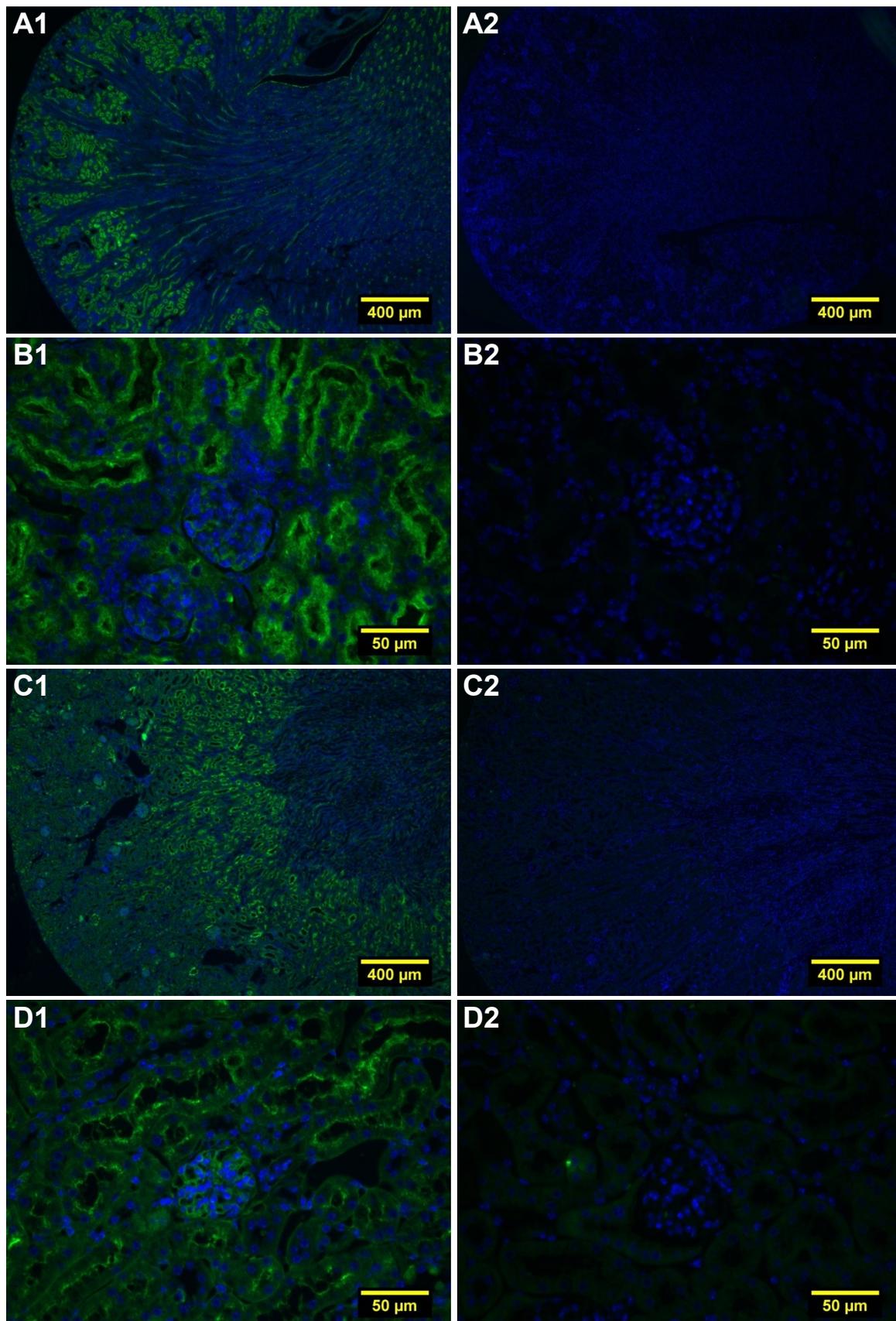


Abbildung 5.19 Lektinfärbung mit AAL (grün) von Nieren Slc35c1^{+/+} (1) und Slc35c1^{-/-} (2) Mäuse im Alter von einer (A, B) und 18 Wochen (C, D). Zellkerne sind blau gefärbt. Aufgenommen mit 5 (A, C) bzw. 40-facher (B, D) Vergrößerung.

Lichtmikroskopische Untersuchungen von HE-gefärbten Schnitten der Niere von *Slc35c1^{-/-}*-Mäusen, wie sie in Abbildung 5.18 dargestellt sind, wiesen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistertieren keine morphologischen Auffälligkeiten wie beispielsweise vergrößerte Glomeruli auf. Die fukosespezifischen Lektinfärbungen mit AAL in Abbildung 5.19 zeigen wie bei den analog in der Lunge durchgeführten Färbungen eine Hypofukosylierung des Gewebes, bei dem in den Schnitten der *Slc35c1*-Knockouttiere quasi keine Anfärbung von fukosylierten Strukturen möglich ist. Bei den Schnitten der *Slc35c1^{+/+}*-Mäuse ist aber festzustellen, dass fukosylierte Strukturen primär im Nephron und weniger im Mark der Niere zu finden sind.

5.4. TGF- β und BMP Pathway Untersuchungen

Vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe in *Slc35c1*-Knockoutmäusen haben Auffälligkeiten wie ein erhöhter Albuminspiegel im Urin oder die Alveolendilatation in den Lungen aufgezeigt, die im Zusammenhang mit einem veränderten TGF- β -Pathway stehen könnten, weshalb dieser auf RNA-Ebene mittels qPCR in Lunge und Niere untersucht wurde.

5.4.1. qPCR Lunge und Niere

Das verwendete PAMM-035C-12 RT² Profiler PCR Array erlaubte die Analyse von 84 Genen des TGF- β / BMP-Signalwegs und umfasst Cytokine der TGF- β -Superfamilie, Rezeptoren, Smad, Smad-Zielgene, regulierende Proteine des Signalwegs der TGF- β -Superfamilie, Adhäsions- und extrazelluläre Moleküle, Transkriptionsfaktoren und Gene, die in die zellulären und Entwicklungsprozessen involviert sind.

Die Auswertung der quantitativen PCR mit dem Array ergab bei den untersuchten Proben aus Lungen- und Nierengewebe jedoch keine signifikanten Änderungen der Expressionsmuster in den *Slc35c1*-defizienten Mäusen verglichen mit deren Wildtypgeschwistern. Lediglich bei dem Gen *Tgfbrap1* wurde im Lungengewebe von Knockouttieren eine auf 79% verminderte Expression festgestellt ($p < 0,05$). Eine detaillierte Auflistung der gesamten qPCR Ergebnisse des Arrays befindet sich im Anhang in Abschnitt 8.3.

5.4.2. TGF- β -Aktivierung in Lunge und Gehirn

Zusätzliche Untersuchungen auf Proteinebene fokussierten wir auf die TGF- β -Rezeptoraktivierung durch TGF- β , was in der Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 resultiert [63]. Quantifizierungen der Westernblots von Lungengewebe mit Antikörpern gegen Proteine des TGF- β -Pathways, wie sie in Abbildung 5.20 zu sehen sind, ergaben, dass in den Knockouttieren die Konzentration von pSmad2/3 im Schnitt um 30 % verringert ist ($p = 0,009$), während die Konzentration an TGF- β 1 in *Slc35c1^{-/-}*-Mäusen um 12 % erhöht ist ($p = 0,04$). Signalunterschiede bezüglich des TGF- β Rezeptors II, sowie von Smad2/3 waren nicht signifikant. Es gibt jedoch in beiden Fällen Tendenzen in Richtung einer erhöhten Expression beider Proteine bei den fukosedefizienten Mäusen.

Bei den gleichen Untersuchungen im Gehirngewebe von *Slc35c1*-Knockout- und Kontrolltieren (siehe Abbildung 5.21) konnten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Lediglich eine Tendenz bezüglich

eines ebenfalls verminderten Signals von pSmad2/3 in den Proben der *Slc35c1*^{-/-}-Tiere war zu beobachten. Die Detektion von TGF- β 1 im Gehirn war mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich.

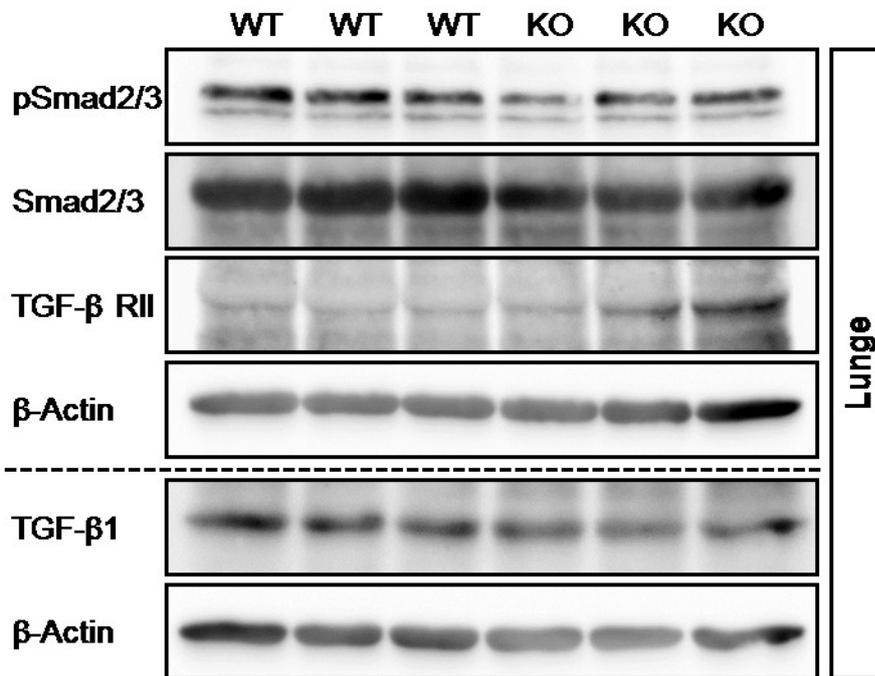


Abbildung 5.20 Westernblot von Lungengewebe aus *Slc35c1* Wildtyp- (WT) und Knockout-Mäusen (KO) zur Untersuchung des TGF β -Pathways

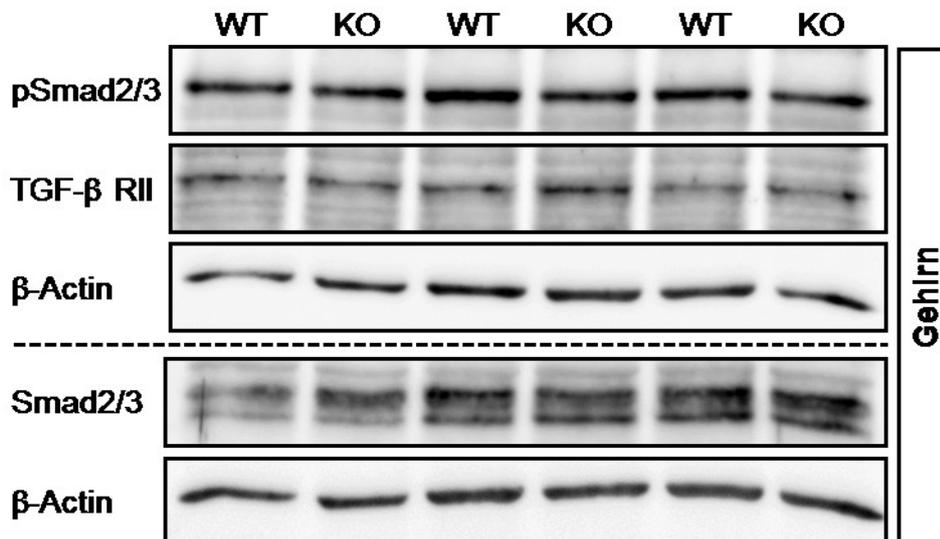


Abbildung 5.21 Westernblot von Gehirngewebe aus *Slc35c1* Wildtyp- (WT) und Knockout-Mäusen (KO) zur Untersuchung des TGF β -Pathways

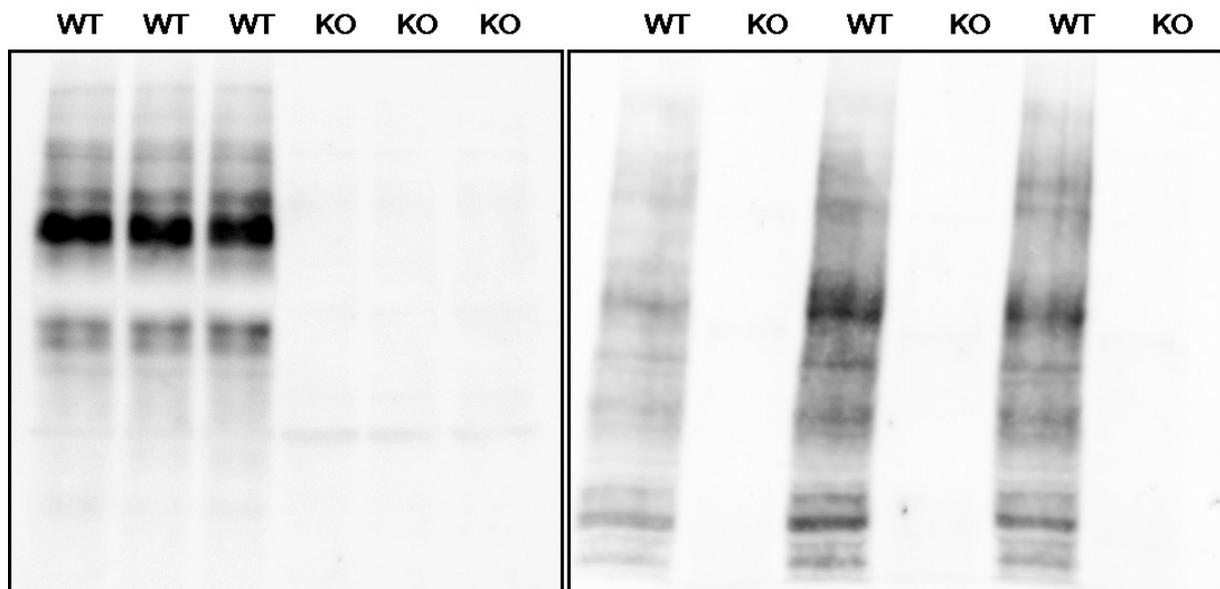


Abbildung 5.22 Westernblot von Lungengewebe (links) und Gehirngewebe (rechts) aus *Slc35c1* Wildtyp- (WT) und Knockout-Mäusen (KO) mit AAL gegen fukosylierte Strukturen.

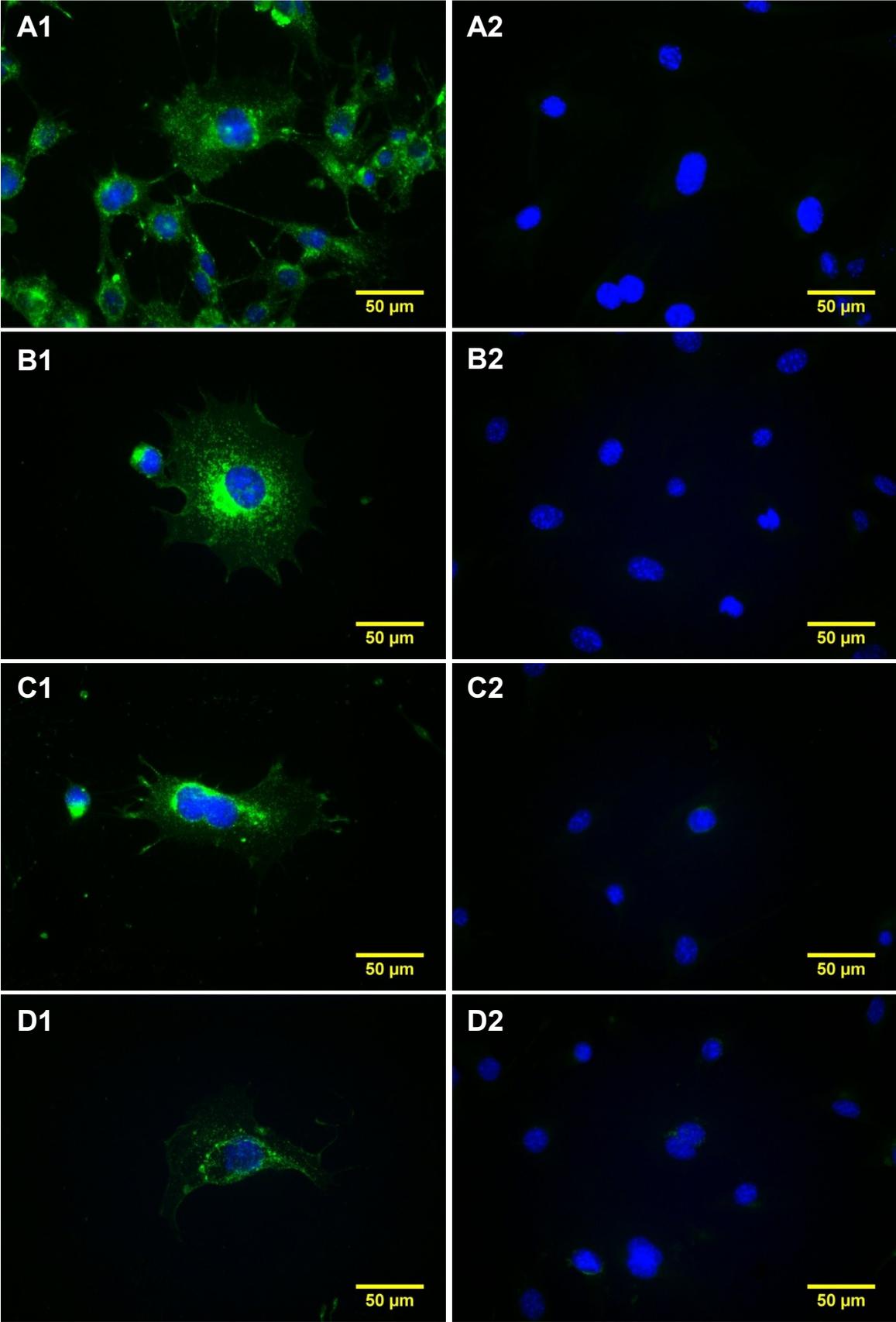
Die Markierung fukosylierter Proteine im Westernblot mit *Aleuria Aurantia* Lektin in Abbildung 5.22 zeigt bei dieser Methode ebenfalls die deutliche Hypofukosylierung der Proteine im *Slc35c1*^{-/-}-Mausmodell gegenüber den Kontrolltieren.

5.5. Alternativer Golgi-GDP-Fukose-Transporter

Die bisherigen Erkenntnisse über die Fukosetherapie bei SLC35C1-CDG-Patienten und in der Zellkultur mit Fibroblasten des Mausmodells zu dieser Erkrankung weisen auf einen alternativen Transportmechanismus hin, durch welchen GDP-Fukose in das Golgi Lumen gelangt, wenn extrazellulär eine hohe Konzentration an Fukose vorhanden ist.

5.5.1. Fukoserettung von murinen embryonalen Fibroblasten

Da bei der Untersuchung eines möglichen alternativen Transporters dieser mittels siRNA herunterregelt werden soll, um zu prüfen, ob dadurch eine Rettung von Fibroblasten mit Fukose unterbunden werden kann, wurde bei der verwendeten Methode, die Zellen für 24 Stunden mit fukosehaltigem Medium zu inkubieren, die minimal wirksame Konzentration an Fukose im Medium bestimmt. Hierdurch sollten Effekte, die die Fukosylierung betreffen, bei späteren Knockdown-Versuchen möglichst sensitiv erfasst werden.



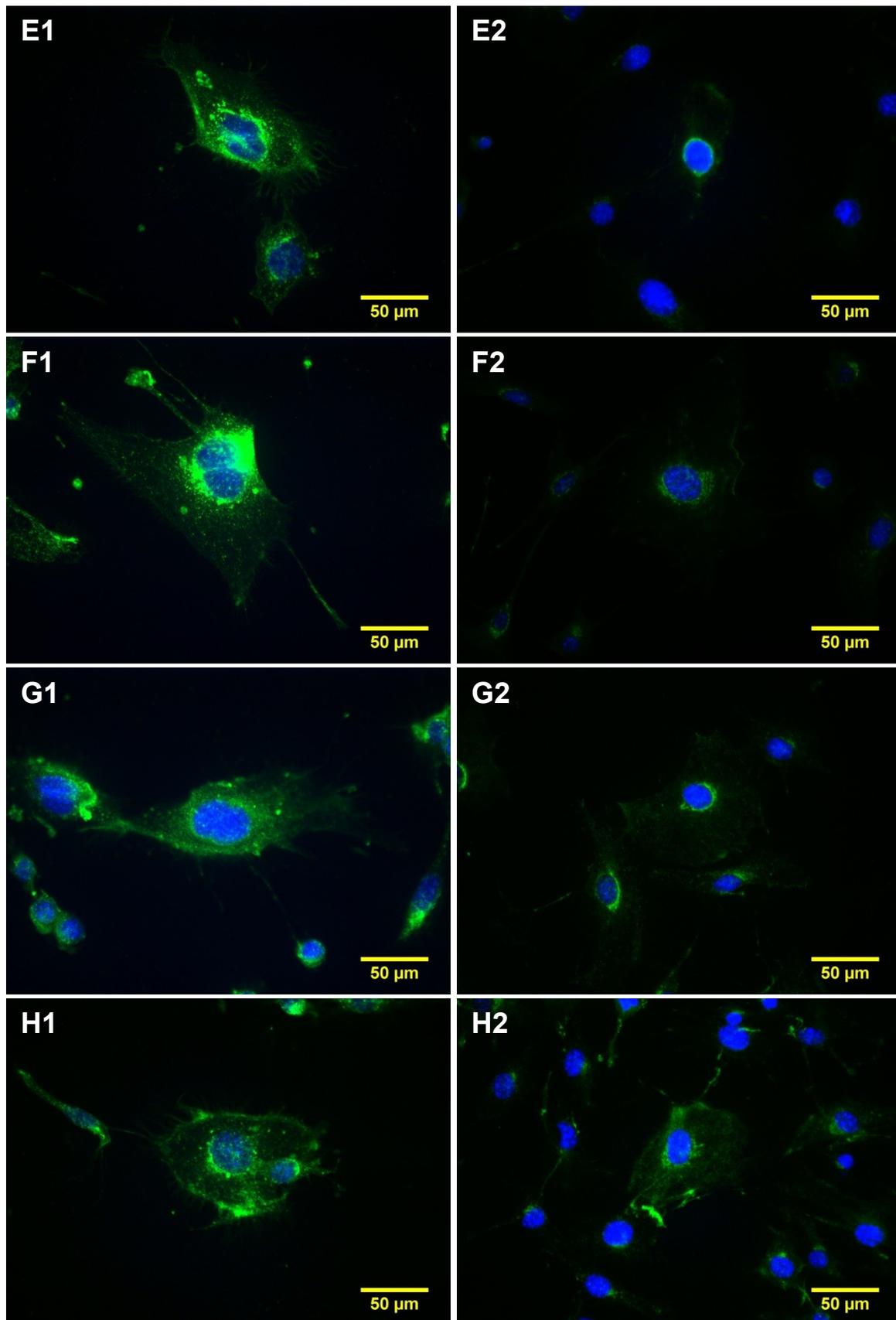


Abbildung 5.23 Fukosebehandlung von MEF-Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Fukosekonzentrationen im Medium (Reihe A: 0,0 mM; B: 0,1 mM; C: 0,2 mM; D: 0,5 mM; E: 1,0 mM; F: 2,0 mM; G: 5,0 mM; H: 10 mM) mit Slc35c1^{+/+}-MEF (Spalte 1) und Slc35c1^{-/-}-MEF (Spalte 2). Die Zellkerne sind in blau und die mit AAL markierten fukosylierten Strukturen in grün dargestellt.

Die Fluoreszenzaufnahmen der mit Fukose behandelten Fibroblasten in Abbildung 5.23 zeigt bei den Wildtypzellen eine unabhängig von der Fukosekonzentration gleichverteilte Intensität der AAL-Färbung. Intrazellulär ist dagegen zu beobachten, dass unmittelbar um den Zellkern die höchsten Intensitäten zu beobachten sind. Im Gegensatz dazu ist bei den Slc35c1^{-/-}-Zellen ohne Fukose zunächst keine Anfärbung mittels AAL möglich. Erst ab einer Konzentration von etwa 1,0 mM Fukose über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden sind Signale zu erkennen. Auch diese sind wie bei den Slc35c1^{+/+}-Zellen verstärkt um die Zellkerne zu beobachten.

5.5.2. Screening nach möglichen Transportern innerhalb der SLC35-Familie

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen die Aufnahme von radioaktiv-markierte GDP-Fukose zusammen mit anderen nukleotidaktivierten Zuckern in Golgi-angereicherten Vesikeln untersucht wurde, ergaben keine Auffälligkeiten in Bezug auf eine veränderte Aufnahmerate, sodass ein alternativer und bislang unbekannter GDP-Fukosetransporter von uns in der Gruppe der SLC35-Transporter mit bisher unbekanntem Substrat/unbekannter Funktion vermutet wird. Um diese Gruppe an Transportern für weitere Untersuchungen weiter einzugrenzen, wurde ein anderes GDP-Fukose bindendes Protein für einen Vergleich hinzugezogen. Proteine, an denen neben dem SLC35C1-Transporter ebenfalls GDP-Fukose bindet, sind die Fukosyltransferasen (FUT). Eine von Kötzler et al. in ihrer Funktion gut beschriebene Fukosyltransferase ist die α 1,6-Fukosyltransferase (FUT8) [64]. In Tabelle 5.7 sind die beobachteten Wechselwirkungen zwischen FUT8 und GDP-Fukose aufgelistet. Überträgt man die beteiligten Aminosäuren auf die gesamte Sequenz von FUT8, ergeben sich vier Bereiche, in denen mehrere dieser Aminosäuren beieinanderliegen (siehe Abbildung 5.24). Diese Bereiche sind die Aminosäuren (AS) 19-22 und AS 469-471 (Phosphatbindung), AS 363-367 (Guanosin- und Fukosebindung) und AS 449-453 (Guanosinbindung).

Tabelle 5.7 Durch molekulardynamische Simulation beobachtete Wechselwirkungen zwischen Atomen von FUT8 und seinem Substrat GDP-Fukose. Aus Kötzer et al. (2012) [64].

Residue	Atom	GDP-Fuc atom	Type of interaction	Average distance [Å]	Fraction of frames with distance < 3.6 Å
Asp453	O γ	N-1	H-bond	2.9 ± 0.3	96%
Asp453	O γ	N-2	H-bond	2.9 ± 0.3	99%
Gly449	CO	N-2	H-bond	4.0 ± 0.4	19%
His363	N ϵ	O-6	H-bond	3.0 ± 0.4	93%
His363	N ϵ	N-9	H-bond	3.5 ± 0.4	68%
Val471	C γ	C-1'	Hydrophobic	4.5 ± 0.2	0%
Tyr250	O η	O-2'	H-bond	3.8 ± 0.4	32%
Gly221	NH	O-3'	H-bond	3.3 ± 0.3	81%
Tyr250	O η	O-3'	H-bond	4.3 ± 0.4	3%
Cys222	NH	P α O-1	H-bond	3.3 ± 0.2	86%
Gly221	NH	P α O-1	H-bond	3.3 ± 0.2	86%
Tyr220	NH	P α O-1	H-bond	3.3 ± 0.2	88%
Gly219	NH	P α O-2	H-bond	2.9 ± 0.2	100%
Gly221	NH	P α O-2	H-bond	4.4 ± 0.3	0%
Arg365	N ϵ	P β O-1	H-bond	2.7 ± 0.1	100%
Ser469	O γ	P β O-1	H-bond	2.7 ± 0.1	100%
Gln470	NH	P β O-2	H-bond	2.8 ± 0.1	100%
Gln470	N ϵ	P β O-2	H-bond	2.8 ± 0.2	100%
Arg365	N η	O-1''	H-bond	2.6 ± 0.1	100%
Gln470	N ϵ	O-2''	H-bond	3.1 ± 0.2	96%
Arg365	N η	O-4''	H-bond	4.8 ± 0.3	0%
Arg365	N η	O-5''	H-bond	3.3 ± 0.3	87%
Thr367	C γ	C-6''	Hydrophobic	4.5 ± 0.6	1%

```

MRPWTGSRW IMLILFAWGT LLFYIGGHLV RDNDHPDHSS RELSKILAKL ERLKQQNEDL 60
RRMAESLRIP EGPIDQGPAL GRVRVLEEQL VKAKEQIENY KKQTRNGLGK DHEILRRRIE 120
NGAKELWFFL QSELKKLKNL EGNELQRHAD EFLLDLGHHE RSIMTDLYYL SQTGAGDWR 180
EKEAKDLTEL VQRRTYTLQN PKDCSKAKKL VCNINKGC GY GCQLHHVVYC FMIAYGTQRT 240
LILESQNWR Y ATGGWETVFR PVSETCTDRS GISTGHWSGE VKDKNVQVVE LPIVDSLHPR 300
PPYLPLAVPE DLADRLVRVH GDPAVVWVSQ FVKYLIRPQP WLEKEIEEAT KKLGFKHPVI 360
GVHVRRTDKV GTEAAFHPIE EYMVHVEEHF QLLARRMQVD KKRVLATDD PSLLEAKTK 420
YPNYEFISDN SISWSAGLHN RYTENSLRGV ILDIHFLSQA DFLVCTFS SQ VCRVAYEIMQ 480
TLHPDASANF HSLDDIYYFG GQNAHNQIAI YAHQPRTADE IPMEPGDIIG VAGNHWDGYS 540
KGVNRKLGRT GLYPSYKVRE KIETVKYPTY PEA EK 575

```

Abbildung 5.24 Aminosäuresequenz von FUT8 Isoform a. In Grün markiert sind die Aminosäuren, bei denen eine Wechselwirkung, wie in Tabelle 5.7 aufgelistet ist, beobachtet wurde.

Für ein mögliches Screening-Verfahren wurden die beschriebenen vier Bereiche zu den vier Sequenzmotiven HVRRT, SQV, GYGC und GVILD zusammengefasst. Das an Position 250 alleinstehende Tyrosin wurde dabei nicht mitberücksichtigt. Ein Sequenz-Alignment der vier Motive erfolgte zunächst mit der Sequenz des Slc35Cc1-Transporters, um festzustellen, ob gleiche oder ähnliche Motive überhaupt in dem bekannten GDP-Fukose-Transporter vorhanden sind (siehe Tabelle 5.8, hellblaue Markierung). Dabei wurde eine hohe Homologie zwischen dem Motiv HVRRT und der Aminosäureabfolge EMQKT in der Transportersequenz entdeckt. Da dieser Abschnitt mit einem Bereich überlappt, der nach Zhang et al. (2012) entscheidend für die Transporteraktivität ist, wurde der Abschnitt ebenfalls in die Liste der Motive aufgenommen [47].

Tabelle 5.8 Ergebnisse des Sequenzvergleichs mit den bekannten Motiven aus hFUT8 und den Slc35 Transportern mit unbekanntem Substrat, sowie dem Slc35c1 Transporter. Exakte Übereinstimmungen der Aminosäuren (AS) sind in Rot gekennzeichnet, AS mit hoher Ähnlichkeit in Dunkelgrün und mit niedriger Ähnlichkeit in Hellgrün. AS ohne Ähnlichkeiten sind in Blau dargestellt. Ein Stern (*) kennzeichnet jeweils eine Lücke von einer AS in der Transportersequenz. Wurde ein Motiv nicht in der Sequenz gefunden, ist dies durch Striche (--) gekennzeichnet.

	HVRRT (Fuk, Gua)	SQV (Pi)	GYGC (Pi)	GVILD (Gua)	EMQKT (Aktiv.)
Slc35a4	HVD*RV YLQRY	S**QV SQA	--	GVLLN GLLMS	--
Slc35a5	--	AQV	--	GIVFN	ELERL
Slc35b1	RVDRT	TQV AKI	--	GILFT	--
Slc35c1	EMQKT	SRI TKV THL	--	GVIIG	
Slc35c2	YLRRV	ARV TQI	--	GLLLW	D*LRRV
Slc35d3	--	SDV	--	GVVFN	--
Slc35e1	--	SRI TKV	--	KVILS	--
Slc35e2	HLQSV	TEI	--	GVLLY	SLKNV TVKHA
Slc35e3	QLAKA	S**QV VRI	--	GLLFN GVILN	QLAKA
Slc35e4	--	AEA ARV AQL	GFGR	--	ELRAP
Slc35f1	HVRVA	AQV	GMGC	--	RIRKV QFRNP
Slc35f2	HAR*KV NLQET	SDV SNV	--	--	NLQET
Slc35f3	KVRKK	TRV SQI	--	GIVMM	KVRKK
Slc35f4	R*VERQ	TQI SRI	--	G**IILS	--
Slc35f5	DLREA	TQV	GY**AC LYGC	GVVLV	DLREA EIRQL
Slc35g1	FVKKV QIEKA	GQI	--	GVILI	ELREP QIEKA
Slc35g2	EMRRK NVRRE	SGM SKV	--	--	EMRRK NVRRE
Slc35g3	TVRK*S	SEV SDI	--	--	DVR*RA

Der Vergleich der fünf Motive mit den 18 Transportersequenzen zeigt, dass in 14 von 18 Fällen ein oder zwei dem Fukose und Guanodin bindenden Motiv HVRRT ähnliche Sequenzabschnitte gefunden wurden. In sieben Fällen tauchten diese Abschnitte auch wieder bei dem Vergleich mit dem Motiv EMQKT auf. Insgesamt wurden dabei 17 Homologien in 12 Transportern gefunden. Ebenfalls viele Homologien (13 von 18 Fällen) wurden für das Motiv GVILD entdeckt, deren Glycin und Asparaginsäure in FUT8 an das Guanodin der GDP-Fukose binden. Das Motiv GYGC, das bei FUT8 mit allen vier Aminosäureresten an den Phosphatteil des Substrats bindet, wurde dabei lediglich in drei Sequenzen in ähnlicher Form

gefunden. Dagegen taucht das ebenfalls mit allen Resten an das Phosphat bindende Motiv SQV in abgewandelter Form in allen der untersuchten Slc35-Sequenzen auf. Homologien sowohl mit den zwei Substratspezifischen Motiven (HVRRT und GVILD) als auch mit dem aus dem Slc35c1-Transporter bekannten Motiv EMQKT wurden bei sechs Slc35-Transportern gefunden: Slc35c2, e2, e3, f3, f5 und g1.

5.5.3. Expressionsänderung durch Fukosesupplementation

Aufgrund der Ergebnisse des Sequenzvergleichs der Transporter mit den fünf gewählten Motiven in Tabelle 5.8 wurden für die weiteren Expressionsuntersuchungen die Transporter Slc35e2, Slc35e3, Slc35f3, Slc35f5, Slc35g1 und Slc35g2 ausgewählt. Des Weiteren wurde der Transporter Slc35c2, der als möglicher GDP-Fukosetransporter des Endoplasmatischen Retikulums gehandelt wird [65], mit in die Untersuchungen einbezogen.

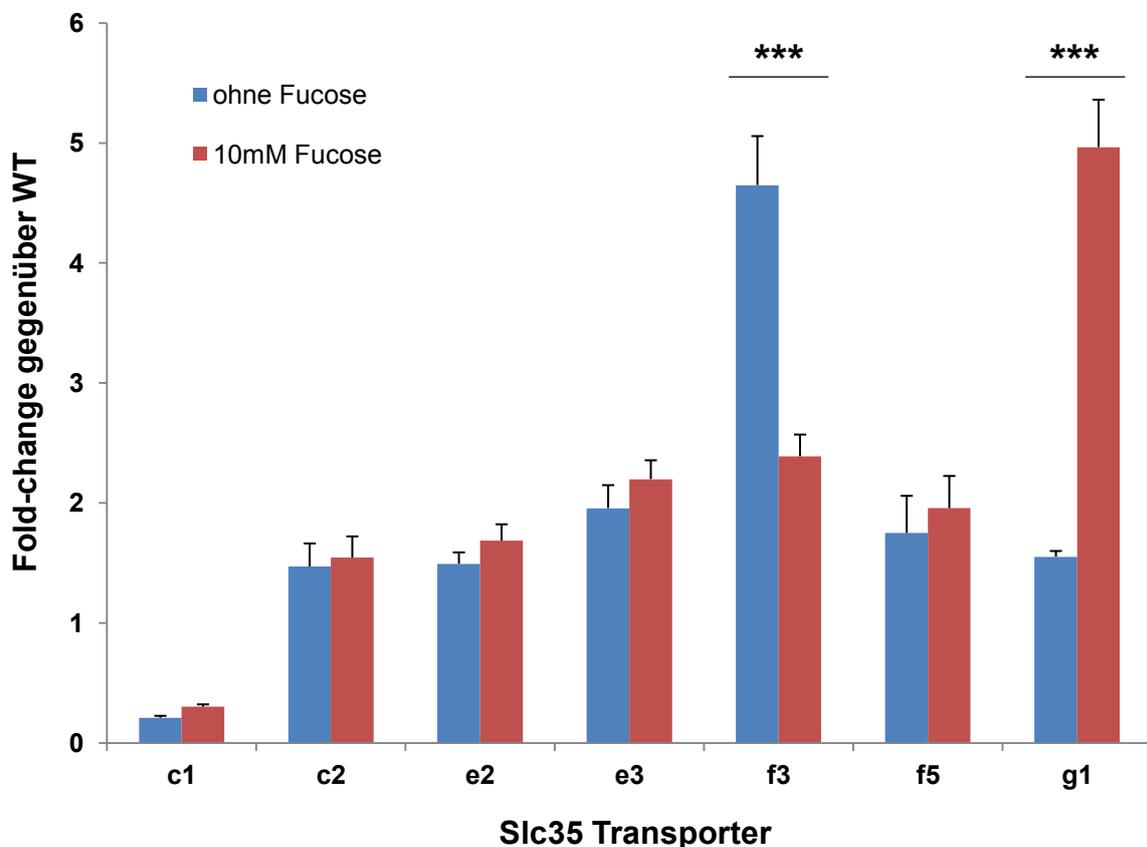


Abbildung 5.25 Expressionsrate der untersuchten Slc35-Transporter in Knockout-Zellen relativ zu Wildtyp-Kontrollen. Die Ergebnisse der unbehandelten Zellen sind in blau dargestellt, in rot dargestellt sind die Ergebnisse, bei denen die Zellen für 24 Stunden mit 10 mM Fukose im Medium inkubiert wurden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR, wie sie in Abbildung 5.25 dargestellt sind, zeigen, dass, mit Ausnahme des Slc35c1-Transporters, der im Knockout-Tier ausgeschaltet ist, die untersuchten Transporter der Slc35-Familie alle eine erhöhte Expressionsrate in der Slc35c1^{-/-}-Maus in Relation zur Slc35c1^{+/+}-Maus aufweisen (Fold-change > 1). Bei den Slc35-Transportern c2, e2, e3 und f5 liegen die Expressionsraten im Knockout durchschnittlich zwischen 1,47 und 1,96 und innerhalb der Transporter ist keine signifikante Expressionsänderung nach Fukosegabe zu

beobachten ($p \geq 0,11$). Jedoch ist bei dem Slc35f3-Transporter im Knockout eine $4,6 \pm 0,4$ -fach höhere Expression zu beobachten, die nach der 24 stündigen Behandlung mit Fukose auf einen Wert von $2,39 \pm 0,18$ absinkt ($p=0,001$). Dem entgegengesetzt verhält sich die Expression des Transporters Slc35g1, dessen Expressionslevel von zunächst $1,55 \pm 0,05$ nach Fukosegabe auf $4,9 \pm 0,4$ steigt ($p=0,0001$).

5.5.4. Knockdown mittels siRNA

Nach Analyse der Ergebnisse aus den Versuchen zur fukoseabhängigen Expressionsänderung der ausgewählten Slc35c1-Transporter wurden die durch Fukose regulierten Transporter Slc35f3 und Slc35g1, sowie der Transporter Slc35c2 für die Knockdownexperimente herangezogen. Zur Kontrolle der Expressionsverminderung auf RNA-Ebene wurden mit einem Teil der Zellen qPCR-Experimente durchgeführt. Wie die Abbildung 5.26 zeigt, konnte die Expression der Slc35c2-RNA auf 8 % (± 3 %, $p=0,002$) reduziert werden. Von den fukoseregulierten Transportern konnte der Slc35g2-Transporter auf ein Expressionslevel von durchschnittlich 17 % (± 21 %, $p=0,015$) gesenkt werden. Die Expression des Slc35f3-Transporters konnte nach den durchschnittlich gemessenen 53 ± 40 % nicht signifikant vermindert werden, so dass über den Einfluss dieses Transporters bezüglich der Fukoserettung keine Aussage getroffen werden kann.

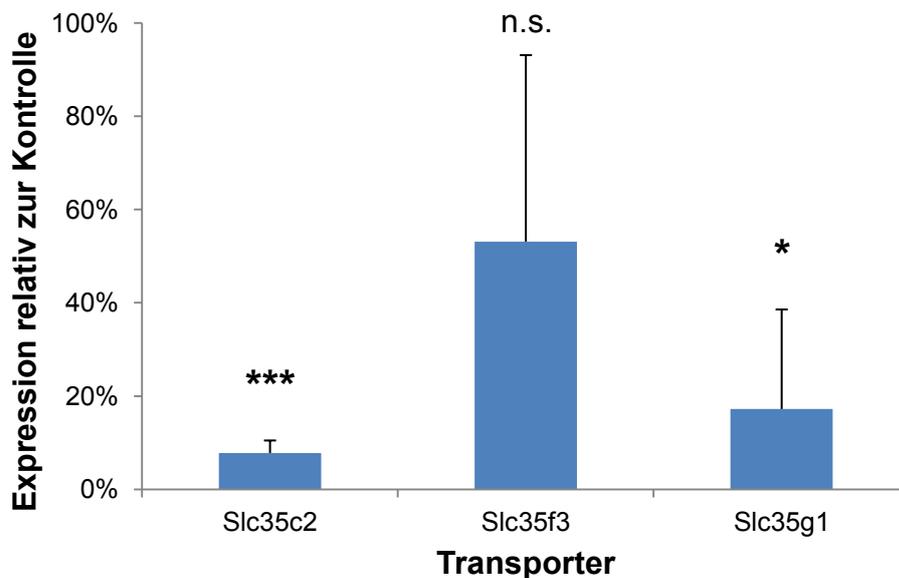


Abbildung 5.26 Expression der SLC-Transporter nach Zugabe von siRNA gegen den jeweiligen Transporter und normiert auf die Expression mit Kontroll-siRNA.

In der Abbildung 5.27 sind repräsentative Ausschnitte der Zellen, die mit siRNA behandelt wurden, dargestellt. Wie der Vergleich der Aufnahmen in der linken Spalte zeigt, ist keine erkennbare Abnahme der Färbung mit *Aleuria Auratia* Lektin in Relation zu der Kontrolle (ganz unten) zu erkennen. Dagegen ist eine deutliche Rettung der Slc35c1-Knockoutzellen mit 2,0 mM Fukose im Medium zu erkennen, wie der Vergleich der Aufnahmen mit der rechten Spalte, den Zellen ohne Fukosesupplementation, zeigt.

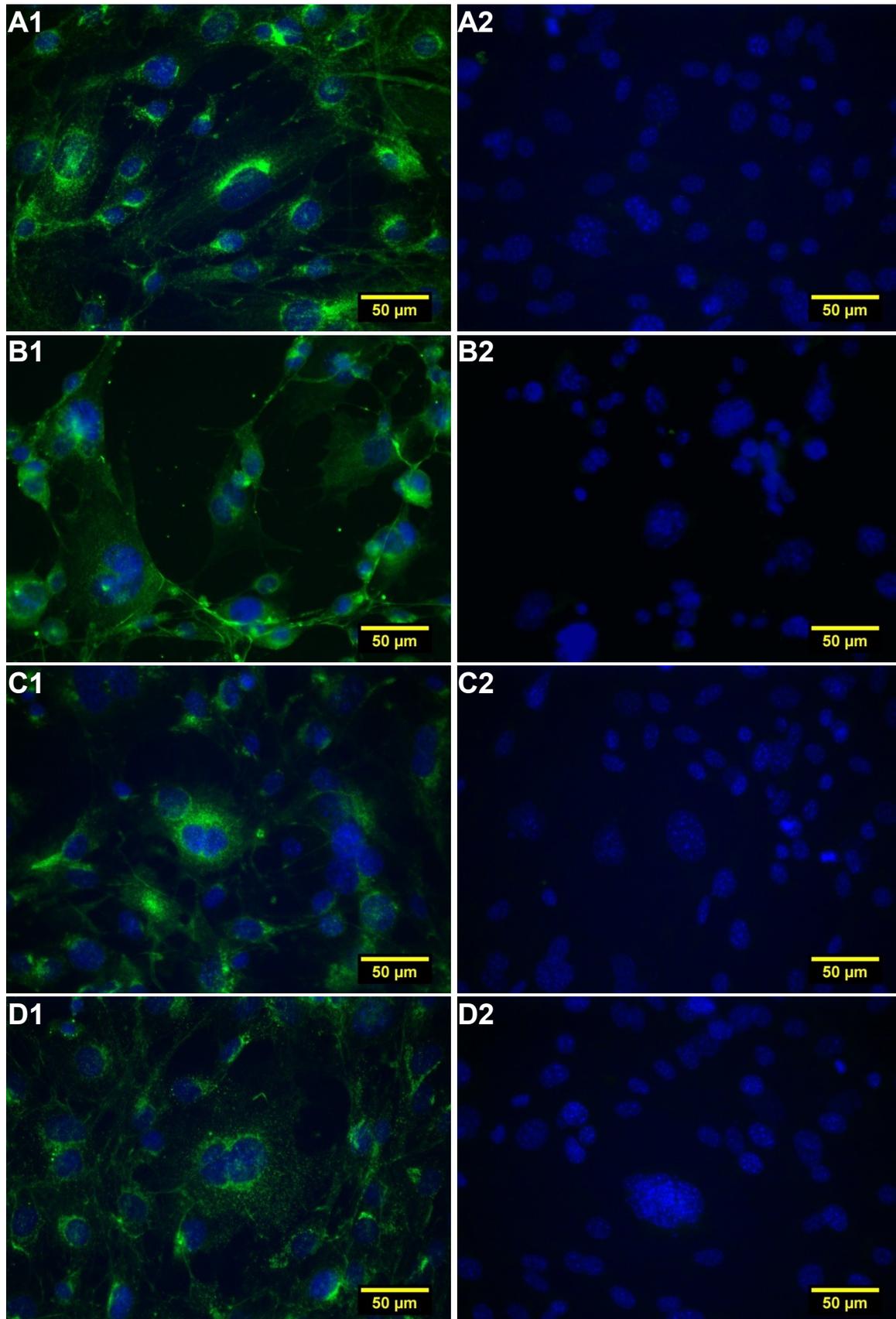


Abbildung 5.27 Lektinfärbung mit AAL von *Slc35c1*^{-/-}-MEF nach Behandlung mit siRNA gegen *Slc35c2* (A), *Slc35f3* (B), *Slc35g2* (C) und Kontroll-siRNA (D) mit 2,0 mM Fukose(1) bzw. ohne Zugabe von Fukose (2).

5.5.5. Untersuchungen zum Salvage-Pathway in Patientenzellen

Neben den Untersuchungen in den *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen wurden auch Versuche mit Zellen des Patienten Y.W. durchgeführt, der ebenfalls an SLC35C1-CDG erkrankt ist, aber nicht auf die Fukosetherapie anspricht [42]. Hintergrund der Untersuchungen mit diesen Zellen ist, dass Patient Y.W. möglicherweise zusätzlich zur T308R-Mutation auf Grund der homozygoten Punktmutation des SLC35C1-Gens (siehe Abbildung 5.28) auch eine Mutation im alternativen Transportmechanismus aufweist und daher nicht therapiert werden kann.

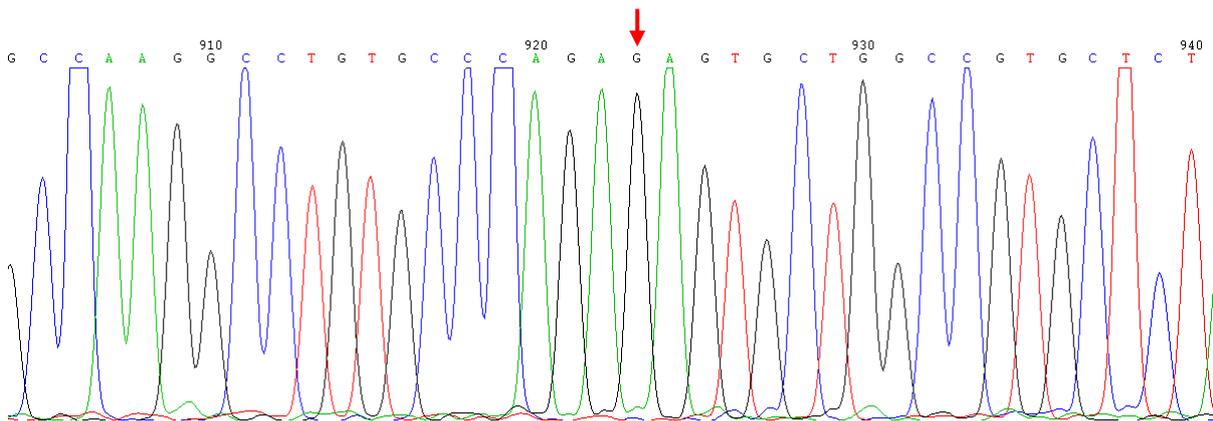


Abbildung 5.28 Sequenzierung des SLC35C1-Gens der Patientenzellen von YW. Die homozygote Punktmutation c.923C>G ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Da die erfolglose Fukosetherapie des Patienten Y.W. auch auf einen möglichen Defekt im Salvage-Pathway zurückzuführen sein könnte, wurde zunächst der Transmembrane Fukoseimport vom Kulturmedium in die Lymphoblasten untersucht. Die Messungen ergaben, dass in den Kontrollzellen durchschnittlich 146 ± 30 Bq/mg Protein der markierten L-Fukose gemessen wurde, während in den Patientenzellen ein Wert von 111 ± 6 Bq/mg Protein detektiert wurde (siehe Abbildung 5.29). Die Menge an aufgenommener Fukose im Patienten ist damit zwar um etwa 23,9 % geringer, als die in den Kontrollzellen, jedoch nicht signifikant ($p=0,11$). Anschließend wurde die Bereitstellung von GDP-Fukose aus L-Fukose gemessen. Die dafür benötigten Enzyme Fukokinase und GDP-Fukose-Pyrophosphorylase stammten jeweils aus dem Lysat von Kontroll- und Patientenzellen. Die Doppelbestimmung ergab, dass das Verhältnis von gebildeter GDP-Fukose zur bereitgestellten Fukose bei den Patientenzellen das 1,24 bzw. 1,25-fache des Verhältnisses betrug, das in den Kontrollen gemessen wurde. Der Salvage-Pathway bei Patient Y.W. ist demnach nicht betroffen.

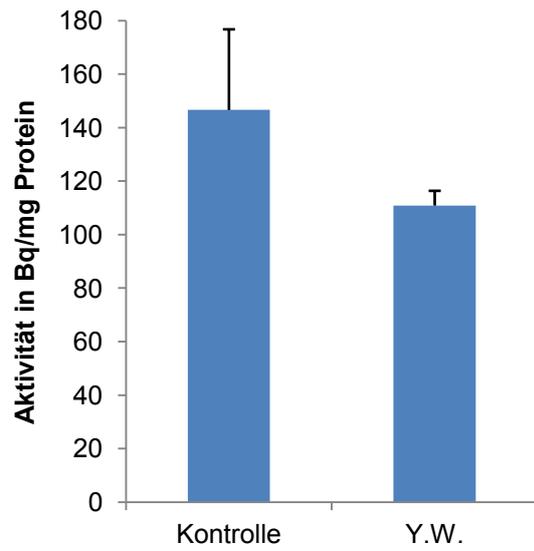


Abbildung 5.29 Messung des Imports von ^3H -Fukose in Kontrollzellen und Zellen des Patienten Y.W. normiert auf den Proteingehalt.

6. Diskussion

6.1. Isolierung und Identifizierung von fukosylierten Proteinen

Bei Betrachtung der Dot-Blots nach Lektinaffinitätschromatographie von Lungengewebe, das mit AAL gefärbt wurde (Abbildung 5.3), scheint ein großer Teil der fukosylierten Proteine nicht an das Säulenmaterial gebunden zu haben. Eine Überladung der Säule ist unwahrscheinlich, da laut Herstellerangaben eine Bindungskapazität der Säule von >4 mg fukosylierter Glycoproteine pro ml Agarose-Beads angegeben wird und die Säulen jeweils mit maximal 9 mg Gesamtprotein bei 3 ml Säulenmaterial verwendet wurden. Auch wäre zu erwarten, dass bei erneuter Auftragung des Durchflusses eine merkliche Abnahme des Signals in der zweiten Durchflussfraktion zu erkennen wäre. Da das *Aleuria Aurantia*-Lektin sowohl als aktives Säulenmaterial, als auch für den Nachweis auf dem Dot-Blot verwendet wurde, scheint vielmehr die Kopplung von AAL an das Trägermaterial der Säule die Bindung zu den Fukoseresten negativ zu beeinflussen. Denkbar wäre eine aufgrund der Kopplung mit der Agarose schlechte sterische Orientierung bzw. Zugänglichkeit des fukosebindenden Teils des Lektins. Dies würde bedeuten, dass einige Proteine, auch wenn sie Fukosereste tragen, per se auf Grund ihrer Sekundärstruktur nicht an die Säule binden und somit eine ungewollte zusätzliche Selektion bei der Aufarbeitung stattfindet. Als Alternative bei nachfolgenden Versuchen könnte man daher die Proteine zunächst mit Trypsin verdauen und anschließend die Peptide auf die Säule laden. Dadurch wäre eine bessere Zugänglichkeit zu den Glykanstrukturen möglich. Auf der anderen Seite stehen für die spätere massenspektrometrische Analyse der Peptide eben nur jene fukosylierten Peptide zur Verfügung und nicht alle Peptide der fukosetragenden Proteine. Die Analytik muss also mit weniger Material arbeiten und die für eine eindeutige Identifizierung nötigen Unique-Peptides fehlen womöglich. Auch müsste die Methode der Aufarbeitung überarbeitet werden. Bisher wurden die an die Säule gebundenen Proteine mit Fukose eluiert und die Fukose mittels Dialyse wieder entfernt. Die Auswertung einer massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, die nach der in Abschnitt 4.3.3.4 beschriebenen Methode aufgearbeitet wurden, ergab Proteingrößen zwischen 15,8 und 518,9 kDa. Die zugehörigen Peptide dagegen waren mit 810 bis 4212 Da deutlich kleiner. Um die Fukose, die ein Molekulargewicht von 164,16 Da hat, abtrennen zu können, wären daher Membranen mit einem Cutoff in der Größenordnung von 200 bis 500 Da erforderlich und es müsste ein Volumen von mehreren Millilitern dialysiert werden, was bei der Größe der auf dem Markt befindlichen Membranen mit besagtem Cutoff ein nicht leicht umzusetzendes Verfahren erfordert. Eine weitere Möglichkeit ist, sich an der Methode von Zielinska et al. [14] zu orientieren. Hier wurden die Peptide nicht mit Fukose eluiert, sondern die Peptide mit PNGase F von den lektinengebundenen Glykanen abgespalten. Jedoch ist auch hier mit den oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Analyse von Peptiden zu rechnen. Denkbar wäre daher auch eine Kombination beider Verfahren. Wenn man davon ausgeht, dass freies bzw. biotinyliertes Lektin, wie es in den Dotblots verwendet wurde und nicht an die Säule gebundene fukosylierte Proteine noch gebunden hat, alle oder zumindest deutlich

mehr fukosylierte Proteine bindet, kann eine Proteinlösung zunächst mit biotinyliertem Lektin inkubiert werden und anschließend an eine feste Phase mit Streptavidin gebunden werden, von der die fukosylierten Proteine nach einigen Waschschrritten entweder mit Fukose oder durch Abspaltung mittels PNGase F von der festen Phase gelöst werden. Nachteil dieser Methode ist jedoch der Verbrauch an Lektin, da dieses an der festen Phase verbleibt. Auch gilt es abzuwägen, ob die Proteine mit einem teuren Enzym (PNGase F) oder mit dem günstigeren Zucker (Fukose) von der festen Phase gelöst werden, wobei letzteres einen weiteren Aufreinigungsschritt (Dialyse) erfordert, bei dem immer mit Verlusten zu rechnen ist. Die Ergebnisse der Aufarbeitung und Identifizierung der Proteine aus MEF-Zellen ist auf Grund der geringen Zahl an angereicherten Proteinen zwar nicht in die Auswertung mit einbezogen worden, die Dot-Blots in Abbildung 5.4 aus der Aufarbeitung zeigen aber, dass im Vergleich zu Abbildung 5.3 bei gleicher Proteinmenge der Anteil an fukosylierten Proteinen deutlich geringer sein muss, da hier lediglich in der E1-Fraktion ein Spot zu detektieren war. Gleichzeitig war die Kontrollfärbung mit ConA deutlich stärker bei den MEF-Proben, was dafür spricht, dass die Menge an Glykoproteinen erhöht ist. Unklar ist jedoch, ob dies am Gewebetyp (Fibroblasten) liegt, Zellen in Kultur weniger fukosylierte Proteine exprimieren oder der Ernteprozess mit Trypsin und Waschen der Zellen zum Verlust von den meisten fukosetragenden Proteinen wie z. B. in der Extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche führt.

Die Aufarbeitung der Proteine aus Lunge und Niere hat im Gegensatz zu den MEF-Zellen zur Identifizierung eine große Anzahl an angereicherten Proteinen geführt. Man beachte jedoch, dass z. B. bei der Lunge insgesamt acht Probenpärchen aus Knockout- und Wildtypgewebe verwendet wurden und in der Ergebnisliste der letzten Auswertung 16,8 % dieser Proteine noch nicht in den vorherigen sieben Läufen gefunden wurden. Daher ist davon auszugehen, dass eine nicht unbedeutende Menge an fukosylierten Proteinen in der Lunge hier noch nicht identifiziert worden ist. Gleiches gilt analog auch für die Niere. Das hier verwendete *Aleuria Aurantia* Lektin ist zwar in der Lage α 1-2, α 1-3, α 1-4 und α 1-6 verknüpfte Fukosereste zu binden [66, 67], jedoch könnte der parallele Einsatz weiterer fukosespezifischer Lektine wie *Ulex europaeus* Agglutinin I, *Lens Culinaris* Agglutinin oder *Lotus tetragonolobus* Lektin [8, 68] die Ausbeute an Proteinen erhöhen, ohne dass das experimentelle Setup geändert werden müsste.

Die Ausweitung dieser Analyse auf weitere Organe und Optimierung des Verfahrens würde dazu beitragen, das besonders in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Biowissenschaften gerückte Feld der Glykomanalyse zu erweitern [69]. Vergleichbar mit den Daten von Zielinska et al. für N-glykosylierte Proteine [14] oder dem von Cohen und Varki vorgestellten „Sialom“ [70] würde so ein weiterer Datensatz über das „Fukosylom“ entstehen.

6.2. Gene Ontology Auswertung

Auch wenn die Zahl der N-fukosylierten Proteine (825) deutlich kleiner als die Anzahl der zum Vergleich herangezogenen N-glykosylierten Proteine (2654) ist, so zeigt sich doch bei der Verteilung der Gene Ontology-Terme zwischen den beiden Gruppen, dass deren Verteilung deutlich gleichmäßiger ausfällt (siehe Abbildung 5.7), was darauf schließen lässt, dass beide Gruppen an Glykoproteinen durch eine repräsentative Anzahl an Proteinen vertreten sind und eine damit eine kritische Analyse erlauben.

Bei der Selektierung fukosylierten Proteine mittels AAL ist es jedoch nicht möglich, zwischen N- und O-verknüpften Fukoseresten zu unterscheiden. Da aber etwa zweidrittel aller N-Glykane an der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr mit dem Protein verknüpft sind und der Anteil an Proteinen ohne jene Konsensussequenz in der Gruppe II, der Gruppe von Proteinen, die nicht von Zielinska et al. als N-Glykosyliert identifiziert wurden, im Vergleich zu den Proteinen der Gruppe I auf das 1,5-fache erhöht ist, hat in der Gruppe II vermutlich eine Anreicherung von O-fukosylierten Proteinen stattgefunden. Ausgehend von dieser Annahme lässt sich für die Beurteilung der Gene Ontology-Verteilung sagen, dass O-fukosylierte und N-fukosylierte Proteine offenbar mehr Gemeinsamkeiten haben, als N-glykosylierte Proteine mit N-fukosylierten Proteinen.

Die Scatterplots der Termini, die in beiden Proteingruppen vertreten sind, zeigen in allen drei Gene Ontology-Kategorien eine Streuung um die Identitätslinie. Die geringen Unterschiede im Streuungsmuster zwischen der Gruppe I+II und der Gruppe I können einerseits auf den relativ geringen Anteil an Termini zurückgeführt werden, den jeweils die Gruppe II ausmacht und andererseits auch darauf, dass, wie die Abbildung 5.7 zeigt, die Anzahl an gemeinsamen Termini lediglich in der Kategorie *Biological Process* (um gerade ein mal drei Termini) erweitert wird. Die Gruppe II-Proteine können also nur bezüglich der Gewichtung eines Terms Einfluss auf das Ranking nehmen. Aber auch in der Kategorie *Cellular Component*, bei der ein Drittel der Termini aus Gruppe I und II stammt, sind keine auffälligen Unterschiede im Streuungsmuster zu erkennen, was dahingehend interpretiert werden kann, dass bei den gemeinsamen Termini N- und O-fukosylierte Strukturen ähnliche Aufgaben haben.

Wie aus den Tabellen 5.1 bis 5.3 bereits hervorgeht, liegen gerade die Termini mit einem niedrigen Rang (hohe Anzahl an Proteinen assoziiert mit dem Terminus) sehr nahe an der Identitätslinie. Da es sich dabei um Termini mit einem hohen Level of abstraction handelt und im Gegenzug Termini, die weit von der Linie entfernt liegen ein hohes Level of details haben, kann ferner angenommen werden, dass N-glykosylierte und fukosylierte Proteine gleiche bzw. ähnliche Aufgaben haben (von einem hohen Level of abstraction aus gesehen), diese sich im Detail jedoch voneinander unterscheiden.

Die direkte Gegenüberstellung exklusiv in Gruppe I bzw. Gruppe II vorkommender Termini, wie in Tabelle 5.5 dargestellt, zeigt auch zwischen den beiden fukosylierten Proteingruppen klare Unterschiede, die, wenn man alle drei Gene Ontology-Kategorien zusammen betrachtet, ein schlüssiges Bild beider Gruppen wiedergibt.

So würde man Proteine mit Transporteraktivität auch in der Membran lokalisiert vermuten. Gleiches gilt für die in Gruppe I aufgeführten biologischen Prozesse, wie z. B. multizelluläre Entwicklung, Reaktion auf Reize, Zelladhäsion und Organentwicklung, die alle in einer gewissen Form eine Interaktion mit der Umgebung der Zelle erfordern. Betrachtet man sich dagegen die Termini der Gruppe II, findet man eine Vielzahl an Bindeprozessen, die die Nucleinsäuren betreffen und daher intrazellulär zu suchen sind. Entsprechende Termini finden sich in der Liste *Cellular Component* der Gruppe II. Dies deckt sich auch mit dem Prozess der Translation an zweiter Stelle der biologischen Prozesse. Aber auch die Organisation von Organellen, der Proteintransport und die weiteren aufgeführten Prozesse finden intrazellulär statt.

Betrachtet man sich die signifikanten Termini ($p < 10^{-9}$) der Abbildungen 5.9 bis 5.11, findet man in der Gruppe *Cellular Component* einen Pfad, der von *cell junction* bis runter zu *focal adhesion* verläuft. Ein Beispiel für die Rolle der Fukose bei dem Zell-Zell-Kontakt ist das Fehlen der Sialyl-Lewis X Strukturen auf der Zelloberfläche, wodurch das Leukozytenrollen auf dem Endothel verhindert wird [30] und die ursprüngliche Bezeichnung „Leukozyten Adhäsions Defizienz II“ von SLC35C1-CDG herrührt. Neben dieser bekannten Rolle der Fukose sind aber auch GO-Termini anderer Zellorganellen wie das Exosom, dem Nukleus und dem Mitochondrium zu finden. Auch in der Gruppe *Molecular Function* mit dem weit verzweigten Terminus *binding* sind neben Funktionen zur Cofaktor- Protein- und Ionenbindung auch Gruppen zur Bindung von Nukleotiden und RNA anzutreffen. Bei der Aktivität von Nukleosidtriphosphatase hat die Fukose möglicherweise ebenso eine entscheidende Rolle. Des Weiteren tauchen in der Gruppe *Biological Process* im unteren Bereich (high level of detail) der metabolischen Prozesse Termini zur Translation und auch zum Metabolismus organischer Säuren auf. Zusammenfassend scheint demnach die Fukosylierung von Proteinen gerade im Bereich des Nukleus und bei der Bindung von Nukleotiden bzw. bei der Translation von RNA eine wichtige Rolle zu spielen. Ferner liefert die Analyse Hinweise auf einen möglicherweise veränderten Energiestoffwechsel bezüglich des Metabolismus von organischen Säuren in den Mitochondrien der betroffenen Zellen. So bleibt festzuhalten, dass unter den gefundenen Proteinen auch vier Enzyme des Zitronensäurezyklus gefunden wurden (Citrat-Synthase, Isocitrat-, Succinat- und Malat-Dehydrogenase) und der Zitronensäurezyklus von GOrilla ebenfalls als enriched Term ($p < 10^{-5}$) angegeben wird. Veränderungen der Mitochondrien betreffen vorwiegend Organe mit einem hohen Energiebedarf wie z.B. das Gehirn, Muskeln und Herz, jedoch kann prinzipiell jedes Gewebe betroffen sein [71]. Effekte können unterschiedlich starke Ausprägungen haben und umfassen unter anderem multisystemische Störungen, neurologische Schäden, Bewegungsstörungen, Kardiomyopathie und Myopathie oder auch Nierenfehlfunktion [71, 72]. Eine veränderte Fukosylierung dieser Proteine könnte daher möglicherweise Ursache für die verminderte Kraft der Slc35c1 Knockout-Mäuse im Grip Strength-Test vergangener Untersuchungen sein. Um darüber allerdings eine eindeutige Aussage zu treffen, sollten Messungen der Metaboliten des Zitronensäurezyklus wie etwa ATP/ADP, NAD(P)(H), Acetyl- und Succinyl-CoA sowie organische Säuren wie Succinat, Malat, Fumarat und Isocitrat in

Knockout- und Wildtypmäusen (vorzugsweise in Gewebe mit hohem Energiebedarf) vorgenommen und verglichen werden.

Das hier genutzte Verfahren, eine Auswertung der Daten mittels Gene Ontology, gibt Hinweise für mögliche Ursachen des Slc35c1^{-/-}-Phänotyps und für weitere Untersuchungen mit diesem Mausmodell. Letztlich wurden dafür nur die hier als fukosyliert identifizierten Proteine verwendet. Es sollte jedoch auch mit berücksichtigt werden, dass auf Grund der Hypofukosylierung eines oder mehrerer Proteine in einem Signal- oder Stoffwechselweg andere nichtglycosylierte Proteine einer veränderten Expression unterliegen, die wiederum direkt für den zu beobachtenden Phänotyp verantwortlich sind und dieser Zusammenhang alleine durch Betrachtung der fukosylierten Proteine nicht ersichtlich ist. Von daher wäre es für eine weitere Untersuchung zur Rolle der Fukose interessant, auch die Expression anderer Proteine zu untersuchen. Damit könnten möglicherweise auch bis dato noch nicht bekannte regulatorische Zusammenhänge aufgeklärt werden. Auf Proteinebene könnte daher ein ähnliches Verfahren angewendet werden, wie es hier zur Identifizierung der fukosylierten Proteine genutzt wurde, jedoch ohne die Selektion über eine Affinitätschromatographie, sondern der direkte quantitative Vergleich von Slc35c1^{+/+}- und Slc35c1^{-/-}-Proben.

Die Unterteilung der hier als fukosyliert gefundenen Proteine in die zwei Gruppen I und II und deren getrennte Analyse hat gezeigt, dass es im Detail Unterschiede bezüglich der Anreicherung in einigen Gene Ontology-Termini kommt. Da diese Einteilung auf den identifizierten N-glykosylierten Proteinen von Zielinska et al. beruht und in Gruppe II der Anteil der klassischen Konsensussequenz (Asn-Xaa-Ser/Thr) vermindert ist, wäre es sinnvoll, in weiteren Untersuchungen eine genaue Trennung zwischen N- und O-fukosylierten Strukturen vorzunehmen. Unterschiede bezüglich der GO-Klassifizierung könnten dadurch möglicherweise noch detailliertere herausgearbeitet werden. Dies könnte so realisiert werden, dass bei der Lektinaffinitätschromatographie, nach Bindung von fukosylierten Glykanen, zunächst Proteine/Peptide mit N-Glykanen durch PNGase F-Behandlung von der Säule getrennt werden und anschließend erst die O-fukosylierten Proteine/Peptide. Um dabei auch Proteine/Peptide mit O-Fukose, die direkt an Ser/Thr gekoppelt ist, zu gewinnen, empfiehlt sich hier die Elution mit Fukose statt mit spezifischeren O-Glykosidasen [73].

6.3. Einfluss von RECK auf die extrazelluläre Matrix

Die emphysemähnlichen Veränderungen mit der Alveolendilatation der Slc35c1^{-/-}-Mäuse, wie sie bereits bei der ersten Beschreibung der fukosedefizienten Mäuse von Hellbusch et al. in adulten Mäusen beschrieben wurde [21] und auch hier bei adulten und jungen Mäusen festgestellt wurden, sind Hinweise auf ein mögliches Ungleichgewicht zwischen Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen – kurz TIMP [74]. Da neben den TIMPs auch RECK ein Negativregulator von Matrixmetalloproteinasen (speziell MMP-9) ist [59, 60, 75] und RECK im Rahmen der Identifizierung von fukosylierten Proteinen in der Lunge gefunden wurde, war es naheliegend, sich dieses Protein näher anzuschauen. Reck ist ein membranständiges Glykoprotein [59, 60] mit fünf möglichen

Glykosylierungsstellen an den Positionen 39, 86, 200, 297 und 352 in der Aminosäuresequenz, von denen die letzten vier von Takagi et al. als glykosyliert beschrieben werden. Des Weiteren konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass durch den alleinigen Aminosäureaustausch an Position 297 von Asparagin nach Glutamin eine Reduzierung des MMP-9-Levels durch RECK nicht mehr möglich war [60]. Offenbar trägt die Glykosylierung an Position 297 entscheidend zur Aktivität bezüglich der MMP-9-Regulierung bei.

Wie die Untersuchungen zu RECK in Abschnitt 5.2.2 gezeigt haben, ist das *Reck*-Gen und das translatierte Protein zumindest bei einigen unserer Mäusen verkürzt, was sowohl den Wildtyp, als auch den *Slc35c1*-Knockout betrifft. Dabei muss es sich aber um unterschiedliche Varianten handeln. Bei der cDNA, die sequenziert wurde, kommt es auf Grund des deletierten Bereichs zu einem Frameshift innerhalb des codierenden Bereichs, wodurch es zu mehreren Stopcodons kommt und das resultierende Protein weder die richtige Größe der im Westernblot detektierten Proteine, noch die Erkennungssequenz des Antikörpers enthält, die ferner wegen des Frameshifts auch nicht mehr korrekt abgelesen werden könnte. Laut der Ensembl-Datenbank gibt es insgesamt drei Spleißvarianten, von denen jedoch nur eine zu einem Protein transkribiert wird. Vermutlich handelt es sich bei denen im Westernblot nachgewiesenen Proteinen um das RECK-Protein mit verändertem offenen Leserahmen (ORF). Entsprechend der cDNA des *Reck*-Gens (NCBI: NM_016678.2) gibt es innerhalb der Sequenz vier ORFs, die auch für das Antikörper-Epitop codieren und ein Protein zwischen 61,1 und 64,5 kDa ergeben. Alle vier Sequenzen enthalten jedoch keine der bekannten Glykosylierungsstellen.

Sowohl mRNA als auch Proteine liegen offenbar in verschiedenen Formen vor. Mindestens eine Form enthält offensichtlich aber auch eine der bekannten N-Glykosylierungsstellen, da das Protein über die Affinitätschromatographie angereichert wurde. Nichtsdestotrotz scheint die Fukosylierung von RECK zumindest keinen so weitreichenden Einfluss auf die extrazelluläre Matrix zu nehmen, als dass es für den Lungenphänotyp verantwortlich sein könnte. Geht man etwa davon aus, dass verkürzte Formen dieses Proteins, wie sie in Abbildung 5.11 in beiden Genotypen nachgewiesen wurden, zufällig verteilt sind und RECK für den Phänotyp verantwortlich ist, hätte die Alveolendilatation auch bei einigen Wildtypkontrollen auftreten müssen.

6.4. Alveolendilatation in *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen

Ein Phänotyp der fukosedefizienten Mäuse, der bereits bei den ersten Untersuchungen des Mausmodells beobachtet wurde, ist die Alveolendilatation in den Lungen der *Slc35c1*^{-/-}-Tiere [21]. Dies ist offensichtlich auf eine fehlende Septierung der Alveolen zurückzuführen. Betrachtet man sich die Entwicklung der murinen Lunge, so beginnt diese mit der ersten von insgesamt fünf Phasen am Tag E9,5-E10,5. Jedoch ist die Septierung der Lunge erst Teil der letzten Phase, die postnatal bei der Maus am Tag P5 einsetzt [76]. Dass die hier beobachtete Alveolendilatation zwar noch immer vorhanden ist, aber in ihrem Ausmaß kleiner als bei früheren Untersuchungen der Mäuse ausfällt, könnte dabei mit dem leicht veränderten Hintergrund der Mäuse zusammenhängen. Ferner kann aber auch nicht

ausgeschlossen werden, dass unbemerkte Abweichungen in der Methode zur Lungenfixierung zu derartigen Artefakten geführt hat.

Da morphologisch in der Lunge sonst keine weiteren Auffälligkeiten zu beobachten sind, ist es naheliegend, dass es sich um einen Defekt in dieser letzten Entwicklungsphase der Lunge handelt. Eine Fehlregulierung der bzw. durch Wachstumsfaktoren in der Frühentwicklung der Lunge wie beispielsweise durch FGF10, BMP4, WNT, DKK1 oder SHH erscheinen daher als unwahrscheinlich [77, 78]. Von einigen deregulierten Wachstumsfaktoren während der späten embryonalen bzw. frühen postnatalen Entwicklungsphase muriner Nachkommen sind dagegen Phänotypen bekannt, die dem Lungenphänotyp der *Slc35c1*^{-/-}-Mäuse ähneln.

Weinstein et al. berichteten von Mäusen, bei denen die FGF-Rezeptoren 3 und 4 ausgeschaltet wurden. Während das äußere Erscheinungsbild der Lungen von den Doppelmutanten unauffällig war, konnten emphysemartige Veränderungen in der Lunge beobachtet werden. Die Alveolen der untersuchten Lungen waren nicht korrekt ausgebildet. Das Einsetzen dieses Phänotyps konnten sie auf den Zeitraum P2 bis P9 eingrenzen. Zusätzlich wurde ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet. Die Doppelmutanten wogen beim Abstillen 10 % weniger als deren Geschwistertiere. Ferner wurde festgestellt, dass vor und während der Alveogenese die Elastinexpression von Knockout- und Kontrolltieren zwar normal war, aber bei den Mäusen mit ausgeschaltete Rezeptoren im adulten Stadium die Expression nicht wie üblich herunterreguliert wurde [79].

Ein Ausbleiben der primären Septierung der Lunge in der späten embryonalen Phase von Mäusen konnte von Yamamoto et al. bei Tieren mit ausgeschaltetem VEGF-A Signalweg festgestellt werden. Erste Veränderungen in Form einer beginnenden Dilatation der Tubuli wurden im Stadium E16,5 beobachtet. Bei der Geburt wiesen die Lungen deutliche Dilatationen und dünnere Wände der Alveolarsäcke auf. Dabei wurde auch eine verminderte Expression der Endothel-Zellmarker Flk-1 und Pecam-1 festgestellt. Den Rückgang der ebenfalls reduzierten Expression des Wachstumsfaktors HGF führten sie auf die schwächere Entwicklung der Endothelzellen zurück. Ein vergleichbarer Phänotyp erzielte dieselbe Gruppe durch Ausschalten lediglich des Hgf-Rezeptors in Mäusen [80].

Ein dritter Signalweg, der ursächlich für den Lungenphänotyp der *Slc35c1*^{-/-}-Mäuse sein könnte, aber auch die Wachstumsretardierung erklären könnte, betrifft den PDGF-A-Pathway. PDGF-A Knockoutmäuse weisen eine hohe embryonale Letalität auf. Die Embryos sind in der späten Phase der Schwangerschaft 10 bis 20 % kleiner gegenüber gesunden Geschwistertieren und mit vier Wochen nur halb so groß wie die Wildtypgeschwister. Histologische Untersuchungen der Lungen von zwei Wochen alten Tieren zeigte Lungenemphyseme bei PDGF-A^{-/-}-Mäusen. Eine Septierung der Alveolen hatte nicht stattgefunden. Bostrom et al. konnten bei neonatalen Mäusen im Stadium P4 noch keine Unterschiede im Lungenphänotyp feststellen. Dieser setzt bei den untersuchten Mäusen mit beginnender Alveogenese (P10-P14) ein. Die Expression von PDGF-A, sowie des PDGF-A-Rezeptors war jedoch im Stadium E14,5 sehr hoch und konnte ab dem Stadium E18,5 nicht mehr nachgewiesen werden [81].

Die Suche nach vergleichbaren Phänotypen in der Lunge, wie sie bei den fukosedefizienten *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen zu finden sind, hat ergeben, dass Fehler in den Signalwegen der Wachstumsfaktoren FGF3/4, VEGF-A oder PDGF-A als mögliche Ursache der Alveolendilatation in Betracht gezogen werden sollten. Ein Abgleich mit der Liste der in dieser Arbeit identifizierten fukosylierten Proteine zeigt, dass die beiden Proteine PDGF-Rezeptor alpha und beta angereichert wurden. Andererseits kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Signalproteine oder Rezeptoren des FGF- oder VEGF-Pathways fukosyliert sind oder die Hypofukosylierung anderer Proteine eine Fehlregulierung des FGF- oder VEGF-Pathways verursachen. Weiterführende Untersuchungen zum Lungenphänotyp sollten sich daher auf diese drei Signalwege konzentrieren. Zur Abklärung einer fehlerhaften FGF3/4 Signalkaskade wäre ein Vergleich der Elastinexpression bei adulten *Slc35c1*-Knockout und Wildtypmäusen naheliegend, da diese, wie bereits erwähnt, bei ausbleibenden FGF3/4-Signalweg dereguliert ist [79]. Experimente zum VEGF-A und PDGF-A-Pathways sollten dagegen in der embryonalen Phase zum Zeitpunkt der jeweiligen Expression am Tag E16,5 bzw. E14,5 durchgeführt werden. Im Falle von VEGF-A könnte zunächst die Expression der Endothelzellmarker Flk-1 und Pecam-1 untersucht werden. Im weiteren Verlauf bietet es sich auch an, den VEGF-A-abhängigen HGF-Signalweg mit einzubeziehen, da dieser alleine auch einen entsprechenden Phänotyp bei Deregulierung auslösen kann [80]. Um eine veränderte Signalkaskade bei PDGF-A nachzuweisen, kann auf die Ergebnisse von Chen et al. (2004) zurückgegriffen werden. Sie identifizierten Zielgene, deren Transkription von PDGF beeinflusst wird. Im Falle von PDGF-A bieten sich hier u. a. die Gene *Arid5b*, *Jade1* oder *Slc2a2* an [82].

6.5. Veränderungen der Niere

Wie die histologischen Untersuchungen der Niere in Abschnitt 5.3.2 gezeigt haben, konnten lichtmikroskopisch keine morphologischen Veränderungen in den Nieren von fukosedefizienten Mäusen gegenüber ihren Wildtypgeschwistern festgestellt werden. Aus früheren Experimenten in unserer Arbeitsgruppe mit diesem Mausmodell ist jedoch bekannt, dass *Slc35c1*^{-/-}-Mäuse erhöhte Albuminwerte im Urin aufweisen und die Zahl der Erythrozyten im Blut erniedrigt war. Ursachen für diese Albuminurie wurden in möglichen Defekten der Filtrationsbarriere vermutet.

Das bereits in Abschnitt 6.4 als Ursache für den Lungenphänotyp diskutierte VEGF-A könnte auch für die erhöhten Albuminwerte im Urin der Knockoutmäuse verantwortlich sein. VEGF-A spielt eine wichtige Rolle bei der Fenestrierung des Endothels im Glomerulus der Niere. So führte die VEGF-A-Deletion in mehreren Studien zu Proteinurie bei Mäusen [83].

Betrachtet man sich ferner den Aufbau der Niere, deren zentrale Aufgabe es ist, kleine wasserlösliche Abfallprodukte aus dem Plasma zu entfernen, damit sie mit dem Urin ausgeschieden werden können und andererseits Makromoleküle wie Albumin zurückzuhalten, wird eine spezielle Filtrationsbarriere benötigt. Diese Barriere gliedert sich in drei Schichten: das innere fenestrierte vaskuläre Endothel, die glomerulären Basalmembran und den harnseitigen Podozyten [84]. Von der glomerulären Basalmembran ist bekannt, dass diese neben Kollagen auch aus

Laminin, Nidogen und Chondroitinsulfat aufgebaut ist [84-86]. Die drei zuletzt genannten Proteine wurden in dieser Arbeit als fukosylierte Proteine angereichert und von Laminin ist bekannt, dass es wichtig für die Zelldifferenzierung und -Adhäsion ist und in der Basalmembran ein eigenes strukturiertes Netzwerk bildet [84]. Strukturelle Veränderungen in der Membran auf Grund einer Hypofukosylierung sind daher für die Proteinurie denkbar. Bei Mäusen mit einer Laminin β 2-Defizienz wurde bereits eine Albuminurie festgestellt. Diese ging mit einer schweren Desorganisation der glomerulären Basalmembran einher [86].

Neben der Filterung von Makromolekülen in Abhängigkeit ihrer Größe findet auch eine ladungsabhängige Selektion statt. Verantwortlich hierfür sind Proteoglykane wie Perlecan und Agrin. Wegen ihrer zahlreichen Heparansulfat-Reste sind sie negativ geladen, wodurch die Selektivität zustande kommt [84]. Bei der AAL-Affinitätschromatographie wurde zum einen Agrin identifiziert und zum anderen die Enzyme Heparan N-sulfatase, Heparansulfate 2-O-sulfotransferase 1 und die bifunktionale Heparansulfat N-deacetylase/N-sulfotransferase 1. Fehler in der Fukosylierung von Agrin oder der Heparansulfat modifizierenden Enzyme könnten daher auch die Funktionalität der Filtrationsbarriere beeinträchtigen. Bei Versuchen an Ratten haben Raats et al. bereits einen Zusammenhang zwischen der Agrinexpression und Proteinurie diskutiert [87].

Ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Filtrationsbarriere sind die Podozyten mit ihrem Fußfortsatz, die die Schlitzmembran bilden. Das strukturgebende Vimentin und die besonders in den Fußfortsätzen vorkommenden Proteine α -Actinin-4, Talin und Vinculin konnten ebenfalls als fukosetragende Proteine in dieser Arbeit identifiziert werden. Änderungen in der Struktur der Podozyten sind auch Ursache für Proteinurie und Reorganisationen im Aktin-Netzwerk führen zu Podozytenablösung mit den gleichen Folgen [84, 88]. Das hier auch angereicherte Podocalyxin ist ein stark O-glykosyliertes Membranprotein, das besonders von Podozyten apikal exprimiert wird. Es ist wichtig für die korrekte Filtration an den Podozyten, da es durch Ladungsabstoßung die ineinandergreifenden Fußfortsätze auf eine gewisse Distanz hält. Fehlt dieses Protein, kann die typische Form der Podozyten nicht ausgeprägt werden und es kommt stattdessen zu Zell-Zell-Verknüpfungen [89, 90]. In wie weit das Fehlen von Fukoseresten hier Einfluss auf die Funktion der Podozyten hat, ist unklar, jedoch ist bekannt, dass in Endothelzellen der Lymphgefäße Podocalyxin als Ligand für L-Selectin der Lymphozyten dient [90]. Ein Ausbleiben dieser Interaktion bei fehlender Fukose, wie es für P- und E-Selectin bekannt ist, kann daher vermutet werden.

Der Abgleich der hier identifizierten Proteine mit Proteinen der Filtrationsbarriere zeigt mehrere mögliche Proteine auf, die ursächlich für die beobachtete Proteinurie der Slc35c1-Knockoutmäuse sein könnten. Dabei können die Defekte in allen drei Schichten der Filtrationsbarriere, vom vaskulären Endothel über die Basalmembran bis zur Schlitzmembran, die von den Podozyten gebildet wird, liegen. Um sich ein besseres Bild von dieser Filtrationsbarriere bei den fukosedefizienten Mäusen und deren Wildtypkontrollen zu machen, sollten für weitere Untersuchungen zunächst elektronenmikroskopische Aufnahmen des Glomerulus mit Fokus auf besagte Filtrationsbarriere gemacht werden. Diese könnten möglicherweise bereits darüber

Aufschluss geben, in welchem der drei Bereiche es zu strukturellen Anomalien kommt.

6.6. Fukosylierte Hippocampusproteine

Die mit dem $Slc35c1^{-/-}$ -Genotyp einhergehenden Verhaltensänderungen, die von Frau Diana Popovici beobachtet wurden, umfassen u. a. eine verminderte Muskelkraft, verringertes exploratives Verhalten (weniger gelaufene Strecke, weniger Aufenthalt im hellen Bereich des Dark/Light-Tests) und ein vermindertes konditioniertes Furchtverhalten. An dieser Stelle wird nun ein möglicher Zusammenhang des beobachteten Phänotyps und den identifizierten fukosylierten Proteinen des Hippocampus an Hand von vergleichbaren Verhaltensuntersuchungen mit Mäusen diskutiert.

Das Protein Rab3a gehört zur Gruppe der Rab Proteine, von denen 60 verschiedene in Säugetieren beschrieben sind. Rab3a ist dabei das im Gehirn am häufigsten vorkommende Protein dieser Gruppe und spielt eine Rolle bei der Fusion synaptischer Vesikel und der Neurotransmitterfreisetzung [61]. D'Adamo et al. untersuchten das Verhalten von $Rab3a^{-/-}$ -Mäusen. Dabei stellten sie zwar bei den Knockoutmäusen ein leicht verringertes Freezing der Tiere fest, dies war jedoch nicht signifikant. Während des Open Field Tests zeigten die $Rab3a$ -defizienten Tiere im Gegensatz zu den $Slc35c1^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Aktivität aufgrund der längeren zurückgelegten Strecke. Auch während des dark/light Box Tests verhielten sich die $Rab3a$ -Knockouttiere anders als die $Slc35c1$ -Knockoutmäuse, da erstere den dunklen Bereich signifikant weniger bevorzugten als die Kontrollmäuse. Der O-Maze Test wiederum ergab, dass sich die $Rab3a^{-/-}$ -Tiere signifikant länger im ungeschützten Bereich aufhielten und ihren Kopf häufiger aus dem geschützten Bereich herausstreckten als die Kontrolltiere, was mit den Beobachtungen der fukosedefizienten Mäuse korreliert [61]. Die von D'Adamo et al. veröffentlichten Ergebnisse decken sich also nur teilweise mit den Verhaltensuntersuchungen der fukosedefizienten Mäuse. D'Adamo et al. geben aber auch zu bedenken, dass bei diesen Untersuchungen immer der genetische Hintergrund der Mäuse mit berücksichtigt werden muss (D'Adamo et al. verwendeten Mäuse mit einem C57Bl/6J-Hintergrund) [61]. Yang et al., die ebenfalls $Rab3a$ -Knockoutmäuse und Mäuse mit einer Punktmutation dieses Gens untersuchten, weisen jedoch darauf hin, dass bereits Hensbroek et al. in 2003 bei $Rab3a^{-/-}$ -Mäusen im Gegensatz zu D'Adamo et al. ein verringertes exploratives Verhalten festgestellt haben. Des Weiteren bestätigen sie, dass der genetische Hintergrund der von ihnen untersuchten Mäuse einen bedeutenden Einfluss auf z.B. das Expressionsmuster der in diesem Zusammenhang untersuchten Gene hat [62]. Das ebenfalls von Yang et al. untersuchte Angst-Lernverhalten zeigte dagegen ein vom Hintergrund unabhängiges Ergebnis in den beiden untersuchten Gruppen (Punktmutation und Knockout von $Rab3a$). Die Tiere zeigten jeweils im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant vermindertes Freezing nach dem Auslösereiz während des *cued fear conditionings*, jedoch nicht während des *contextual fear conditionings*. Die Ergebnisse führen sie daher nicht auf ein verändertes Hippocampus-abhängiges Lernen, sondern vielmehr auf ein von der Amygdala-abhängiges Lernen zurück. Im Rotarod-Test waren beide

Gruppen, wie die *Slc35c1*^{-/-}-Mäuse unauffällig und bei den Mäusen mit Punktmutation konnte im O-Maze Test ebenfalls ein signifikant erhöhter Aufenthalt in den offenen Bereichen festgestellt werden [62]. Auf Grund der Daten von Yang et al. wurden in dieser Arbeit neben der Expression von Rab3a die mit am stärksten regulierten Gene *Usp38*, *Prdx2* und *Lpl* untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Änderungen in der Genexpression festgestellt. Abschließend lässt sich dabei aber keine Aussage über den Einfluss der Fukosylierung von Rab3a machen, da, wie bereits beschrieben, der genetische Hintergrund einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse nimmt. Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte die Verhaltens- und Expressionsuntersuchungen mit unserem Mausmodell auf demselben Hintergrund (C57BL/6J) wiederholt werden.

Ein weiteres Protein ist das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 der Immunglobulin-Superfamilie. Das transmembrane Glykoprotein ist in die neuronale Migration und Differenzierung, sowie der axonalen Wegfindung involviert [91]. Man findet es im adulten Hippocampus und Dentate gyrus [92]. Mutationen, die zu einem Mangel an L1 führen, haben schwere Veränderungen in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems zur Folge. Dazu zählen beim Menschen unter anderem mentale Retardierung, Aphasie, ein flacher Gang und herangezogene Daumen [91]. Law et al. untersuchten hierzu Mäuse, bei denen das *L1*-Gen nach Abschluss der wichtigsten Entwicklungsereignissen im adulten Tier (*L1^{fy+}*) ausgeschaltet wurde. Größe und Zytoarchitektur unterschieden sich bei diesen Tieren nicht von den Kontrolltieren, jedoch zeigten diese im Open Field Test eine höhere Fortbewegung und reduzierte Thigmotaxis. Letzteres wurde ebenfalls bei den *Slc35c1*-Knockoutmäusen beobachtet. Genauso wie die geringere Latenzzeit beim Betreten der offenen Bereiche, die bei den *L1^{fy+}* Mäusen im Elevated Plus Maze Test festgestellt wurden [91]. Weitere Verhaltensuntersuchungen an *L1*^{-/-}-Mäusen zeigten beim Wire Suspension Test zur Prüfung der Muskelkraft keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyptieren, während bei den fukosedefizienten Mäusen eine geringere Muskelkraft im Grip-Strenght Test festgestellt wurde [93]. Dagegen decken sich die Ergebnisse von Demyanenko et al., die eine verminderte Zellzahl im Hippocampus von L1-defizienten Mäusen ausgemacht haben [94], mit dem bei unseren Mäusen verkleinerten Hippocampus. Als weitere histologische Phänotypen wurden ein vergrößertes ventrikuläres System im Gehirn sowie eine Dysgenese des Corpus Callosum bei den *L1*^{-/-}-Mäusen diagnostiziert [94]. Ob dieser Phänotyp auch bei den *Slc35c1*^{-/-}-Mäusen vorliegt und somit ein Hinweis für die Bedeutung der Fukosylierung von L1 für dessen Aktivität ist, könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen dieses Mausmodells sein.

Ebenfalls identifiziert wurde das L1-ähnliche Protein CHL1, das bei Mäusen vor allem während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung (E18 bis P7) exprimiert wird. Allgemeine morphologische Untersuchungen des Gehirns *CHL1*-defizienter Mäuse zeigten jedoch keine Auffälligkeiten. Im Bereich des Hippocampus wurde dagegen eine veränderte Orientierung der Moosfasern festgestellt [95]. Bezogen auf das Verhalten wurde bei *CHL1*^{-/-}-Mäusen im Open Field Test ebenfalls beobachtet, dass sich diese Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren häufiger im Zentrum aufhalten [95, 96]. Auch im Elevated Plus Maze verweilten die Knockouttiere länger

in den offenen Bereichen als deren Kontrollen [95], was mit dem Verhalten der Slc35c1^{-/-}-Mäusen vergleichbar ist.

Das bei unseren Mäusen zu beobachtende Freezing in Verbindung mit dem Angst-Lernverhalten war auch Gegenstand der Untersuchung von Nithianantharajah und Murphy in Kontrollmäusen. In ihrer Arbeit sagen sie, dass die Amygdala ein wichtiger Bestandteil bei der Angstkonditionierung ist und Läsionen im basolateralen Komplex der Amygdala zu Defiziten in der Angstkonditionierung führen. Untersuchungen der Synaptophysinkonzentrationen in der Amygdala zeigten, dass bei Mäusen, die zuvor einer solchen Konditionierung unterzogen wurden, die Konzentrationen an Synaptophysin signifikant erhöht sind [97]. Die Hypofukosylierung dieses Proteins könnte daher im Zusammenhang mit dem verminderten Freezing-Verhalten der Slc35c1-defizienten Mäuse stehen.

Die Bedeutung des Glutamaterezeptor 2 (Gria2) wurde bereits von Mead und Stephens im Rahmen einer Pawlowschen Konditionierung untersucht. Signifikante Unterschiede in der Reaktion auf einen konditionierten Stimulus konnten bei Gria2-Knockoutmäusen dabei allerdings nicht festgestellt werden. Jedoch wiesen diese deutliche motorische Defizite im Rotarod-Test auf [98]. Weiterhin berichten Medvedev et al., dass Glutamaterezeptor 2-defiziente Mäuse keine signifikanten Unterschiede bezüglich Struktur und Volumen des Hippocampus auf [99]. Beide Publikationen legen daher nahe, dass eine fehlende Fukosylierung des Glutamaterezeptors nicht zu den beobachteten Phänotypen der Slc35c1^{-/-}-Mäuse führt.

Auch das in der Freisetzung von Neurotransmittern involvierte synaptische Vesikelprotein 2A (SV2A) wurde identifiziert. Heterozygote SV2A^{+/-}-Mäuse (Mäuse mit komplettem Knockout sind nur wenige Wochen lebensfähig) weisen zwar auch ein vermindertes Körpergewicht auf, sind aber deutlich ängstlicher, da sie im Elevated Plus Maze-Test wesentlich weniger Zeit in den offenen Bereichen verbringen, als dies bei Kontrolltieren der Fall war. Zusätzlich konnte ein gelerntes aversives Verhalten der SV2A^{+/-}-Mäuse in einem weiteren Test beobachtet werden. Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass diese Tiere sporadisch an einem Tremor litten und einen proepileptischen Phänotypen aufwiesen [100]. Auch diese Ergebnisse legen nahe, dass das synaptische Vesikelprotein 2A nicht mit unserem Phänotyp in Verbindung steht.

Von der Natrium/Kalium-transportierenden ATPase wurden die beiden Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ als fukosylierte Proteine identifiziert. Mäuse mit homozygotem Knockout für die Untereinheiten sind embryonal oder neonatal letal, doch auch hier weisen bereits heterozygote Mäuse Verhaltensauffälligkeiten auf [101, 102]. Beide Proteine werden besonders während der Embryonalentwicklung (E9,5-10,5) im Gehirn der Tiere exprimiert [101]. Bei Mäusen mit homozygotem Knockout der $\alpha 2$ Untereinheit wurde im Stadium E18,5 bis P0 ein starker Verlust der Nervenzellen im Bereich der Amygdala und des periformen Cortex, sowie vermehrt apoptotische Zellen festgestellt, während der Hippocampus unauffällig erschien [101]. Untersuchungen von Ikeda et al. und Mosely et al. bescheinigen den $\alpha 2$ ^{+/-}-Mäusen ein signifikant verstärkt ängstlicheres Verhalten. Die Beobachtungen beim Dark/Light-Test decken sich mit den Ergebnissen der Slc35c1^{-/-}-Mäuse. Die Tiere

verbrachten mehr Zeit im Dunklen und legten im hellen Bereich weniger Strecke zurück als Kontrolltiere [101]. Jedoch hielten sie sich im Elevated Zero Maze-Test weniger häufig in den offenen Bereichen auf [102] und auch bei den Untersuchungen zur Angstkonditionierung wurde bei den Mäusen, die heterozygot für den $\alpha 2$ -Knockout sind, ein verstärktes Freezing-Verhalten beobachtet [101].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Mäusen, bei denen Proteine gezielt komplett oder teilweise ausgeschaltet wurden, die bei unseren Mäusen als fukosylierte Hippocampusproteine identifiziert wurden, zum Teil ähnliche Verhaltensauffälligkeiten registriert wurden. Um einen direkten Zusammenhang zwischen Hypofukosylierung und den Verhaltensauffälligkeiten herstellen zu können, sollten daher bei weiteren Versuchen die korrekte Funktion von Proteinen wie Rab3a, L1, CHI1, Synaptophysin oder ATP1A1 untersucht werden. Auf Grund der veränderten Angstkonditionierung sollte neben dem Hippocampus auch die Amygdala in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden [97].

6.7. TGF- β Pathway

Die Untersuchung des TGF- β Signalwegs wurde durchgeführt, da ein Zusammenhang mit der Alveolendilatation in der Lunge und der Albuminurie durch Veränderungen in der Niere vermutet wurden. Aus beiden Geweben wurden daher von Slc35c1-Knockout und Wildtypmäusen Proben für quantitative PCR-Studien mit dem kommerziellen PAMM-035C-12 RT² Profiler PCR Array entnommen und analysiert.

Den Lungenphänotyp, wie ihn die Slc35c1^{-/-}-Mäuse aufweisen, wurde auch von Wang et al. in ihrem Fut8^{-/-}-Mausmodell beschrieben. Durch Knockout der Fukosyltransferase 8 wurde die Corefukosylierung der N-Glykane unterbunden. Den Phänotyp führten sie auf eine Fehlregulierung der extrazellulären Matrix abbauenden Proteinen, den MMPs, zurück, die durch eine verminderte TGF- β Signalkaskade wegen der fehlenden Corefukosylierung des TGF- β -Rezeptors verursacht wird [103]. Bei der Lungenentwicklung der Maus werden alle drei Formen von TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) exprimiert. TGF- β 1 findet man ab dem Embryonaltag elf im Lungengewebe und ist vermutlich entscheidend für die Verzweigung der Lunge. Das Signal von TGF- β 2 ist am stärksten in der späten Phase der Entwicklung und man findet es ausschließlich im endodermen Epithel der Bronchiolen. Die TGF- β 3 Expression findet schließlich vom Stadium E12,5 bis E15,5 statt. Im Gegensatz zu Untersuchungen zu TGF- β 1 ist von TGF- β 2 bekannt, dass das Ausschalten des Gens zum Versagen der Atmung führt und die Mäuse bei der Geburt versterben. Dabei wurden aber keine strukturellen Auffälligkeiten in der Lunge beobachtet. Dagegen weisen Mäuse mit TGF- β 3-Knockout ebenfalls einen neonatal lethalen Phänotyp auf, jedoch mit fehlender Septierung der Alveolen [104].

Bezugnehmend auf die hier gewonnenen Ergebnisse konnte jedoch weder bei dem TGF- β /BMP PCR-Array ein veränderter Signalweg, noch bei den bereits in Abschnitt 5.2.2 durchgeführten Untersuchungen zu Reck eine auffällige Deregulation von MMP-9 festgestellt werden, wie es laut den Angaben von Wang et al. zu erwarten gewesen wäre. Auf der anderen Seite konnte auf Proteinebene eine signifikant verringerte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 in den Lungen von

fukosedefizienten Mäusen nachgewiesen werden, obwohl TGF- β 1 leicht erhöht war und die Menge an TGF- β -Rezeptor II und Smad2/3 insgesamt nicht signifikant verändert war. Dies wiederum spräche für eine verminderte Signaltransduktion im TGF- β Pathway wie es auch im Falle von Smad2 von Wang et al. beschrieben wurde.

Zuvor wurde im Abschnitt 6.4 schon über mögliche Ursachen des Phänotyps in der Lunge der Slc35c1^{-/-}-Mäuse diskutiert. Die dort aufgeführten Signalwege, deren eventuelle Deregulierung auf Grund der Hypofukosylierung die Ursache für die Alveolendilatation sein könnte, sollten um den TGF- β Pathway ergänzt werden. Zwar lassen die Ergebnisse nur zum Teil auf eine Deregulierung schließen, aber die Experimente wurden mit Proben aus adulten Mäusen durchgeführt, bei denen die Konzentration an TGF- β im Vergleich zur Embryonalentwicklung viel geringer ist [104]. Auf Grund der Ähnlichkeiten im Phänotyp sollte man sich bei weiteren Untersuchungen daher auf die TGF- β 3-Exprimierung im Zeitraum E12,5 bis E15,5 konzentrieren. Diese Untersuchungen werden aktuell durchgeführt.

In der Niere kann der TGF- β -Signalweg über TGF- β 1 und die Phosphorylierung von Smad3 zur Ausbildung einer Nierenfibrose führen [105], welche sich wiederum in einer Proteinurie manifestiert [106]. Des Weiteren reprimiert TGF- β in der Niere miR-30s, was zur Schädigung des Zytoskeletts und Apoptose der Podozyten führt [107]. TGF- β kann aber auch die Expression von mitochondrialem Nox4 erhöhen, was ebenfalls die Apoptose von Podozyten bewirkt [108]. In allen beschriebenen Fällen wäre hierzu eine Verstärkung des TGF- β -Signalweges erforderlich. Es konnten in der Niere mit dem verwendeten TGF- β /BMP PCR-Array jedoch keine signifikante Änderung in der Expression der untersuchten Gene festgestellt werden. Auf Grund der fehlenden Corefukosylierung des TGF- β -Rezeptors wäre daher sogar eine Dämpfung der Signalkaskade zu erwarten [109], wodurch sogar ein protektiver Effekt in Bezug auf eine Fibrose erzielt werden könnte [109, 110]. Ferner konnte bei den histologischen Untersuchungen der Niere keine für eine Fibrose typischen Merkmale wie tubuläre Atrophie und Dilatation festgestellt werden [111]. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die Proteinurie der Slc35c1^{-/-}-Mäuse durch einen fehlregulierten TGF- β -Signalweg verursacht wird.

6.8. Alternativer GDP-Fukose-Transporter

Der Transport von nukleotidaktivierten Zuckern in das Endoplasmatische Retikulum bzw. in den Golgi Apparat erfolgt durch substanzspezifische Transporter. Ein direkter Übertritt in die jeweiligen Zellkompartimente der aktivierten Saccharide durch die Lipidmembran ist nicht möglich [46]. Die Untersuchungen am humanen GDP-Fukosetransporter durch Helmus et al. konnten zeigen, dass die zehnte Transmembrandomäne des Transporters essentiell für dessen korrekte Lokalisation im Golgi Apparat ist [29] und Zhang wiesen den C-Terminus des Proteins als entscheidendes Element für die Transporteraktivität nach [47]. Aus der Literatur ist ferner bekannt, dass bei der brasilianischen Patientin und bei dem pakistanischen Patient eine Therapie mit Fukose angeschlagen hat, obwohl die zehnte bzw. sogar die letzten vier Transmembrandomänen des Transporters fehlen [29, 38]. Darüber hinaus ist es auch bei dem von Hellbusch et al. generierten und hier verwendetem

Mausmodell, bei dem der Openreadingframe durch eine Neomycinresistenzkassette unterbrochen wurde, möglich eine Refukosylierung von Zellen durch Fukosesupplementation zu erzielen [21]. Demzufolge könnte die Fukoserettung, die sowohl bei den meisten Patienten als auch im Mausmodell zu beobachten ist, nicht auf eine etwaige Restaktivität des humanen bzw. murinen Transporters, sondern auf einen alternativen, unbekanntem Transportmechanismus zurückzuführen sein.

6.8.1. Salvage-Pathway

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, weshalb einige der SLC35C1-CDG-Patienten nicht auf die Fukosetherapie ansprechen. Eine Vermutung war ein Defekt des salvage Pathways, der dazu führt, dass die aufgenommene Fukose von den Zellen nicht in GDP-Fukose umgewandelt werden kann. Da etwa 90 % der Fukose über den de novo Pathway bereitgestellt werden, würden Mutationen im salvage-Pathway vermutlich zu keinerlei Beschwerden bei gesunden Menschen führen und blieben so unbemerkt. Erst bei einer Erkrankung wie SLC35C1-CDG, die mit Fukose behandelt werden soll, würde dieser Defekt zum Tragen kommen.

Da sowohl der Import von radioaktiver Fukose in das Zytosol als auch deren weitere Umsetzung zu GDP-Fukose durch die Enzyme Fukokinase und GDP-Fukose-Pyrophosphorylase zu keiner signifikanten Abweichung von Kontrollzelllinien geführt hat (76% bzw. 125%), kann ein Defekt innerhalb des salvage-Pathways als Ursache für das Nichtansprechens auf Fukose bei diesem Patienten ausgeschlossen werden. Am naheliegendsten ist wohl ein zusätzlicher Defekt eben jenes alternativen Transportweges, der bislang ungeklärt ist. Nachfolgende Untersuchungen konzentrierten sich daher auf Analysen zum alternativen Transporter in MEFs des Knockout-Mausmodells.

6.8.2. Untersuchungen in Mausfibroblasten

Vergangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konzentrierten sich zunächst auf einen möglichen Cotransport von GDP-Fukose in das Golgi-Lumen durch Transportern, die sonst andere nukleotidaktivierte Zucker als primäres Substrat haben. Die Ergebnisse dieser Analysen gaben jedoch keinerlei Hinweise auf einen Cotransport durch SLC35-Transporter mit bekanntem Substrat. Betrachtet man sich die Transporter der SLC35-Familie, deren Substrate bekannt sind, stellt man fest, dass die Transporter SLC35A2, SLC35B4 und SLC35D1 durchaus in der Lage sind, zwei unterschiedliche Substrate zu transportieren. Allen Zuckern gemeinsam bei diesen drei Transportern ist jedoch, dass diese mit Uridindiphosphat aktiviert sind [44]. Es erscheint daher naheliegend, dass eine Substraterkennung seitens des Transporters besonders auf die Erkennung des aktivierten Nukleotids zurückzuführen ist. Im Falle der aktivierten Fukose ist dies Guanosindiphosphat. GDP-Fukose wird neben dem SLC35C1-Transporter auch von den Fukosyltransferasen (FUT) erkannt, von denen FUT8 bezüglich der Substratbindung gut charakterisiert ist.

Basierend auf den Daten von Kötzer et al. [64] wurden die Aminosäuren, die bei FUT8 die GDP-Fukose binden, entsprechend ihrer Position in der Sequenz von FUT8 zu Motiven zusammengefasst. Die so entstandenen vier Motive konnten weiterhin in Gruppen unterteilt werden, die spezielle Bereiche des Substrats binden.

Diese sind: Guanosin, Fukose mit Guanosin und zwei Motive, die an Phosphat binden. Die Suche nach diesen bzw. homologen Motiven in der Gruppe der SLC35-Transporter zeigte dabei bei allen untersuchten Transportern Homologien mit dem in FUT8 phosphatbindenden Motiv „SQV“. Bedenkt man, dass es sich bei der Gruppe der SLC35-Transporter um Transporter für nukleotidaktivierte Zucker handelt, die phosphorylierte Gruppen tragen, so ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Interessanterweise ergab der Abgleich des in FUT8 fukose- und guanosinbindenden Motivs „HVRRT“ (AS 363-367) eine hohe Homologie zu dem Motiv „EMQKT“ (AS 344-348) in der Sequenz des Slc35c1-Transporters, die genau in jenem Abschnitt liegt, der von Zhang et al. als notwendig für die korrekte Funktion des GDP-Fukosetransporters ausgemacht wurde [47].

Bei den Versuchen zur Expressionsänderung der ausgewählten Slc35-Transporter wurde bei allen Transportern, mit Ausnahme des ausgeschalteten c1-Transporters, bei den MEF-Zellen aus Knockouttieren ohne Fukosegabe bereits eine erhöhte Expression festgestellt, die mindestens bei dem 1,5-fachen des Expressionslevels der Kontrollzellen lag. Es wäre daher denkbar, dass die Gruppe der Slc35-Transporter generell einem gewissen Expressionsmechanismus unterliegt, der durch die Hypofukosylierung der Slc35c1^{-/-}-Mäuse dereguliert ist. Nichtsdestotrotz sind die Unterschiede der Expression in Abhängigkeit von Fukose im Medium bei den Transportern Slc35f3, einem putativen Thiamintransporter [112], und Slc35g1 am auffälligsten. Bei dem Slc35g1-Transporter steigt die Expression erheblich nach der Fukosebehandlung. Dieses Ergebnis könnte man von einem spezifischen Transporter erwarten, dessen Expression durch das Substrat (hier GDP-Fukose) erhöht wird. Im Falle des Slc35f3-Transporters, bei dem es sich genau umgekehrt verhält, ist zu klären, wieso dieser Transporter, der laut Song et al. eigentlich nur im Cerebellum exprimiert ist [44], hier in den Slc35c1^{-/-}-MEF 4,6-mal stärker exprimiert wird und nach Fukosesupplementation nur noch etwa halb so stark, wie vor der Fukosegabe. Man könnte daher eine Feedback-Inhibition auf Expressionsebene vermuten. Dabei ist aber nicht geklärt, was Ursache und was Wirkung ist. Einerseits ist es möglich, dass die Fukose bzw. GDP-Fukose eine Expressionsänderung hervorruft und (angenommen Slc35g1 sei der alternative Transporter) dadurch die zu beobachtende Refukosylierung verursacht oder aber durch die unbekanntere Fukoserettung und damit verbundener Refukosylierung bestimmter Proteine wird die Expression von Slc35f3 und Slc35g1 reguliert. Zusätzlich gilt es zu beachten, dass hier nach einem alternativen Transporter gesucht wird, dessen primäres Substrat nicht GDP-Fukose zu sein scheint und daher womöglich gar nicht durch selbige reguliert wird. So gibt es Hinweise, dass Slc35c2 ein weiterer GDP-Fukosetransporter ist, der jedoch im Endoplasmatischen Retikulum und *cis*-Golgi lokalisiert ist und für die O-Fukosylierung von Notch1 wichtig ist [65]. Slc35c2 wird nach den hier erhaltenen Ergebnissen aber nicht durch GDP-Fukose reguliert.

Die weiteren Knockdown-Experimente mit siRNA ergaben für Slc35c2 eine Expressionsabnahme auf 8 % des ursprünglichen Levels und Refukosylierung der Zellen. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die Refukosylierung von Proteinen nicht durch GDP-Fukose verursacht wird, die zunächst mittels Slc35c2-Transporter in das ER oder den *cis*-Golgi gelangt und dann weiter über Vesikel die späteren Golgi-

Kompartimente erreicht, wo sie in die Glykanstruktur der Glykoproteine eingebaut wird. Des Weiteren konnte mit siRNA gegen den Slc35g1-Transporter dessen Expression auf durchschnittlich 17 % signifikant vermindert werden. Da die anschließende Fukosesupplementation mit einer Konzentration nahe der minimal wirksamen Konzentration durchgeführt wurde, erscheint die beobachtete Fukoserettung durch den Slc35g1-Transporter ebenfalls unwahrscheinlich. In wie weit der Transporter Slc35f3 an einem alternativen GDP-Fukosetransport beteiligt ist, kann auf Grund der mangelnden Knockdown-Effizienz an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Hierzu wäre ein stabilerer Knockdown erforderlich.

Mit den bisher durchgeführten Experimenten war es noch nicht möglich, den alternativen Transportweg der GDP-Fukose aufzudecken. Als Schlussfolgerung der bereits oben aufgeführten Diskussion zur Abhängigkeit der Transporterexpression durch Fukose muss man für weitere Untersuchungen auch die Transporter mit einbeziehen, die nicht durch die Fukose reguliert worden sind. Um die Problematik des Knockdowns mittels siRNA zu umgehen, könnte ferner in einer Slc35c1-Knockout-Zelllinie, anstatt diese mit siRNA zu transfizieren, über das CRISPR/Cas-System weitere zu untersuchende Transporter ausgeschaltet werden.

Die bisherige Herangehensweise zur Aufklärung des alternativen Transportmechanismus beschränkte sich auf die Auswahl möglicher Transporter durch gewisse Ausschlusskriterien (Slc35-Familie, ähnliche Motive wie die des Slc35c1-Transporters, Regulation durch Fukose) und des anschließenden Knockdowns. Wenn ein Transporter in der Lage ist, GDP-Fukose als Substrat für den Transport zu akzeptieren, müsste dieser zumindest auch in einem gewissen Maße GDP-Fukose binden können. Basierend darauf könnte man GDP-Fukose über die Aminogruppe des Guanosins oder einer der über das Molekül verteilten Hydroxylgruppen an eine festen Phase immobilisieren und versuchen den Transporter an die immobilisierte GDP-Fukose zu binden und so zu isolieren. Da dieser Transporter im Golgi-Apparat zu suchen ist, würde man für diese Affinitätschromatographie Proteine verwenden, die aus zuvor mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Golgi-Fractionen stammen. Bei der anschließenden Identifizierung der so erhaltenen Proteine wären auch der Slc35c1-Transporter (sofern Kontrollzellen verwendet werden) und Fukosyltransferasen zu erwarten. Diese könnten gleichzeitig als Positivkontrolle der Isolierung dienen.

7. Literaturverzeichnis

1. Taylor, M.E. and K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*. 2011: OUP Oxford.
2. Schwarz, F. and M. Aebi, *Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation*. *Curr Opin Struct Biol*, 2011. **21**(5): p. 576-82.
3. Aebi, M., et al., *N-glycan structures: recognition and processing in the ER*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(2): p. 74-82.
4. Cummings, R.D., *The repertoire of glycan determinants in the human glycome*. *Mol Biosyst*, 2009. **5**(10): p. 1087-104.
5. Lauc, G., et al., *Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1alpha as a master regulator of plasma protein fucosylation*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(12): p. e1001256.
6. Khoury, G.A., R.C. Baliban, and C.A. Floudas, *Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database*. *Sci Rep*, 2011. **1**.
7. Thiel, C. and C. Korner, *Mouse models for congenital disorders of glycosylation*. *J Inherit Metab Dis*, 2011. **34**(4): p. 879-89.
8. Varki, A., et al., *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. 2009: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Goreta, S.S., S. Dabelic, and J. Dumic, *Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation*. *Biochem Med (Zagreb)*, 2012. **22**(2): p. 156-70.
10. Freeze, H.H., et al., *Neurology of inherited glycosylation disorders*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(5): p. 453-66.
11. Chandra, N.C., M.J. Spiro, and R.G. Spiro, *Identification of a glycoprotein from rat liver mitochondrial inner membrane and demonstration of its origin in the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(31): p. 19715-21.
12. Wei, X., C. Dulberger, and L. Li, *Characterization of murine brain membrane glycoproteins by detergent assisted lectin affinity chromatography*. *Anal Chem*, 2010. **82**(15): p. 6329-33.
13. Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn, *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(7): p. 448-62.
14. Zielinska, D.F., et al., *Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints*. *Cell*, 2010. **141**(5): p. 897-907.
15. Stanley, P., *A method to the madness of N-glycan complexity?* *Cell*, 2007. **129**(1): p. 27-9.
16. Freeze, H.H., et al., *Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways*. *Am J Hum Genet*, 2014. **94**(2): p. 161-75.
17. Becker, D.J. and J.B. Lowe, *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*. *Glycobiology*, 2003. **13**(7): p. 41R-53R.
18. Vanhooren, P.T. and E.J. Vandamme, *L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1999. **74**(6): p. 479-497.
19. Marquardt, T., et al., *Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose*. *Blood*, 1999. **94**(12): p. 3976-85.
20. Ma, B., J.L. Simala-Grant, and D.E. Taylor, *Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes*. *Glycobiology*, 2006. **16**(12): p. 158R-184R.

21. Hellbusch, C.C., et al., *Golgi GDP-fucose transporter-deficient mice mimic congenital disorder of glycosylation IIc/leukocyte adhesion deficiency II*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10762-72.
22. Staudacher, E., et al., *Fucose in N-glycans: from plant to man*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 216-36.
23. Sparks, S.E. and D.M. Krasnewich, *Congenital Disorders of N-linked Glycosylation Pathway Overview*. 1993-2016: University of Washington, Seattle.
24. Wolfe, L.A. and D. Krasnewich, *Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability*. Dev Disabil Res Rev, 2013. **17**(3): p. 211-25.
25. Thiel, C., et al., *Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life*. J Inherit Metab Dis, 2013. **36**(5): p. 887-92.
26. Van Scherpenzeel, M., E. Willems, and D.J. Lefeber, *Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation*. Glycoconj J, 2016.
27. Dorre, K., et al., *A new case of UDP-galactose transporter deficiency (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach*. J Inherit Metab Dis, 2015. **38**(5): p. 931-40.
28. Park, J.H., et al., *SLC39A8 Deficiency: A Disorder of Manganese Transport and Glycosylation*. Am J Hum Genet, 2015. **97**(6): p. 894-903.
29. Helmus, Y., et al., *Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3959-66.
30. Marquardt, T., et al., *Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism*. J Pediatr, 1999. **134**(6): p. 681-8.
31. Gazit, Y., et al., *Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up and review of the literature*. J Clin Immunol, 2010. **30**(2): p. 308-13.
32. Sturla, L., et al., *Impairment of the Golgi GDP-L-fucose transport and unresponsiveness to fucose replacement therapy in LAD II patients*. Pediatr Res, 2001. **49**(4): p. 537-42.
33. Etzioni, A. and M. Tonetti, *Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3641-3.
34. Cagdas, D., et al., *A novel mutation in leukocyte adhesion deficiency type II/CDGIIc*. J Clin Immunol, 2014. **34**(8): p. 1009-14.
35. Frydman, M., et al., *Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype*. Am J Med Genet, 1992. **44**(3): p. 297-302.
36. Wild, M.K., et al., *Leukocyte adhesion deficiency II: therapy and genetic defect*. Cells Tissues Organs, 2002. **172**(3): p. 161-73.
37. Etzioni, A., et al., *Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency*. N Engl J Med, 1992. **327**(25): p. 1789-92.
38. Hidalgo, A., et al., *Insights into leukocyte adhesion deficiency type 2 from a novel mutation in the GDP-fucose transporter gene*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1705-12.
39. Dauber, A., et al., *Congenital disorder of fucosylation type 2c (LADII) presenting with short stature and developmental delay with minimal adhesion defect*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(11): p. 2880-7.
40. Karsan, A., et al., *Leukocyte Adhesion Deficiency Type II is a generalized defect of de novo GDP-fucose biosynthesis. Endothelial cell fucosylation is not required for neutrophil rolling on human nonlymphoid endothelium*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2438-45.

41. Etzioni, A., et al., *Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(2): p. 323-4.
42. Lubke, T., et al., *Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 73-6.
43. Luhn, K., et al., *The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 69-72.
44. Song, Z., *Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 590-600.
45. Xu, Y.X., A. Ma, and L. Liu, *Transforming growth factor beta signaling upregulates the expression of human GDP-fucose transporter by activating transcription factor Sp1*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74424.
46. Ishida, N. and M. Kawakita, *Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35)*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 768-75.
47. Zhang, P., et al., *Identification of functional elements of the GDP-fucose transporter SLC35C1 using a novel Chinese hamster ovary mutant*. Glycobiology, 2012. **22**(7): p. 897-911.
48. The Gene Ontology Consortium, *Gene ontology: tool for the unification of biology*. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
49. The Gene Ontology Consortium, *Creating the gene ontology resource: design and implementation*. Genome Res, 2001. **11**(8): p. 1425-33.
50. The Gene Ontology Consortium, *The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D331-5.
51. Huntley, R.P., et al., *QuickGO: a user tutorial for the web-based Gene Ontology browser*. Database (Oxford), 2009. **2009**: p. bap010.
52. The Gene Ontology Consortium, *Gene Ontology Consortium: going forward*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D1049-56.
53. The Gene Ontology Consortium, *Gene Ontology annotations and resources*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D530-5.
54. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
55. Tegha-Dunghu, J., et al., *EML3 is a nuclear microtubule-binding protein required for the correct alignment of chromosomes in metaphase*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 10): p. 1718-26.
56. Boersema, P.J., et al., *Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 484-94.
57. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
58. Eden, E., et al., *GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 48.
59. Chang, C.K., W.C. Hung, and H.C. Chang, *The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6b): p. 2781-9.
60. Takagi, S., S. Simizu, and H. Osada, *RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1502-8.
61. D'Adamo, P., et al., *Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(7): p. 1895-905.

62. Yang, S., et al., *Biochemical, molecular and behavioral phenotypes of Rab3A mutations in the mouse*. Genes Brain Behav, 2007. **6**(1): p. 77-96.
63. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
64. Kotzler, M.P., et al., *Donor substrate binding and enzymatic mechanism of human core alpha1,6-fucosyltransferase (FUT8)*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(12): p. 1915-25.
65. Lu, L., et al., *Slc35c2 promotes Notch1 fucosylation and is required for optimal Notch signaling in mammalian cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 36245-54.
66. Yamashita, K., et al., *Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin*. J Biol Chem, 1985. **260**(8): p. 4688-93.
67. Weimar, T. and T. Peters, *Aleuria-aurantia-Agglutinin erkennt unterschiedliche Konformationen des Disaccharids α -L-Fuc-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-OMe*. Angewandte Chemie, 1994. **106**(1): p. 79-82.
68. Debray, H., et al., *Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins*. Eur J Biochem, 1981. **117**(1): p. 41-55.
69. Hart, G.W. and R.J. Copeland, *Glycomics hits the big time*. Cell, 2010. **143**(5): p. 672-6.
70. Cohen, M. and A. Varki, *The sialome--far more than the sum of its parts*. Omics, 2010. **14**(4): p. 455-64.
71. Wallace, D.C., W. Fan, and V. Procaccio, *Mitochondrial energetics and therapeutics*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 297-348.
72. Cardaci, S. and M.R. Ciriolo, *TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 161837.
73. Koutsoulis, D., D. Landry, and E.P. Guthrie, *Novel endo-alpha-N-acetylgalactosaminidases with broader substrate specificity*. Glycobiology, 2008. **18**(10): p. 799-805.
74. Frankenberger, M., et al., *All trans-retinoic acid selectively down-regulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human bronchoalveolar lavage cells*. Mol Med, 2001. **7**(4): p. 263-70.
75. Oh, J., et al., *The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis*. Cell, 2001. **107**(6): p. 789-800.
76. Nguyen, N.M. and R.M. Senior, *Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal*. Dev Biol, 2006. **294**(2): p. 271-9.
77. Warburton, D., et al., *The molecular basis of lung morphogenesis*. Mech Dev, 2000. **92**(1): p. 55-81.
78. Warburton, D., et al., *Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis*. Pediatr Res, 2005. **57**(5 Pt 2): p. 26r-37r.
79. Weinstein, M., et al., *FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung*. Development, 1998. **125**(18): p. 3615-23.
80. Yamamoto, H., et al., *Epithelial-vascular cross talk mediated by VEGF-A and HGF signaling directs primary septae formation during distal lung morphogenesis*. Dev Biol, 2007. **308**(1): p. 44-53.
81. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. Cell, 1996. **85**(6): p. 863-73.
82. Chen, W.V., et al., *Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 304-12.

83. Ballermann, B.J., *Glomerular endothelial cell differentiation*. *Kidney Int*, 2005. **67**(5): p. 1668-71.
84. Tryggvason, K. and J. Wartiovaara, *Molecular basis of glomerular permselectivity*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001. **10**(4): p. 543-9.
85. McCarthy, K.J., et al., *Basement membrane proteoglycans in glomerular morphogenesis: chondroitin sulfate proteoglycan is temporally and spatially restricted during development*. *J Histochem Cytochem*, 1993. **41**(3): p. 401-14.
86. Jarad, G., et al., *Proteinuria precedes podocyte abnormalities in Lamb2-/- mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2272-9.
87. Raats, C.J., et al., *Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(5): p. 1749-65.
88. Kastner, J., *Die Rolle von Lmx1b bei der Aufrechterhaltung der podozytären Struktur*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät III*. 2011, Universität Regensburg: Regensburg. p. 207.
89. Doyonnas, R., et al., *Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin*. *J Exp Med*, 2001. **194**(1): p. 13-27.
90. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *The role of podocalyxin in health and disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(8): p. 1669-76.
91. Law, J.W., et al., *Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1*. *J Neurosci*, 2003. **23**(32): p. 10419-32.
92. Bliss, T., et al., *Long-term potentiation in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1*. *Curr Biol*, 2000. **10**(24): p. 1607-10.
93. Fransen, E., et al., *L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(6): p. 999-1009.
94. Demyanenko, G.P., A.Y. Tsai, and P.F. Maness, *Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice*. *J Neurosci*, 1999. **19**(12): p. 4907-20.
95. Montag-Sallaz, M., M. Schachner, and D. Montag, *Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(22): p. 7967-81.
96. Pratte, M., et al., *Mice deficient for the close homologue of the neural adhesion cell L1 (CHL1) display alterations in emotional reactivity and motor coordination*. *Behav Brain Res*, 2003. **147**(1-2): p. 31-9.
97. Nithianantharajah, J. and M. Murphy, *Auditory specific fear conditioning results in increased levels of synaptophysin in the basolateral amygdala*. *Neurobiol Learn Mem*, 2008. **90**(1): p. 36-43.
98. Mead, A.N. and D.N. Stephens, *Involvement of AMPA receptor GluR2 subunits in stimulus-reward learning: evidence from glutamate receptor *gria2* knock-out mice*. *J Neurosci*, 2003. **23**(29): p. 9500-7.
99. Medvedev, N.I., et al., *The glutamate receptor 2 subunit controls post-synaptic density complexity and spine shape in the dentate gyrus*. *Eur J Neurosci*, 2008. **27**(2): p. 315-25.
100. Lamberty, Y., et al., *Behavioural phenotyping reveals anxiety-like features of SV2A deficient mice*. *Behav Brain Res*, 2009. **198**(2): p. 329-33.

101. Ikeda, K., et al., *Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice.* J Neurosci, 2003. **23**(11): p. 4667-76.
102. Moseley, A.E., et al., *Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice.* J Neurosci, 2007. **27**(3): p. 616-26.
103. Wang, X., et al., *Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15791-6.
104. Bartram, U. and C.P. Speer, *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease.* Chest, 2004. **125**(2): p. 754-65.
105. Cao, Y., et al., *Protective Effect of Triptolide against Glomerular Mesangial Cell Proliferation and Glomerular Fibrosis in Rats Involves the TGF- beta 1/Smad Signaling Pathway.* Evid Based Complement Alternat Med, 2015. **2015**: p. 814089.
106. Sautter, J., *Die Rolle Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle bei UUO-induzierter Nierenfibrose,* in *Fachbereich Medizin.* 2010, Philipps-Universität Marburg Marburg. p. 119.
107. Liu, L., et al., *TGF-beta induces miR-30d down-regulation and podocyte injury through Smad2/3 and HDAC3-associated transcriptional repression.* J Mol Med (Berl), 2015.
108. Das, R., et al., *Transforming Growth Factor beta1-induced Apoptosis in Podocytes via the Extracellular Signal-regulated Kinase-Mammalian Target of Rapamycin Complex 1-NADPH Oxidase 4 Axis.* J Biol Chem, 2015. **290**(52): p. 30830-42.
109. Shen, N., et al., *Inhibition of TGF-beta1-receptor posttranslational core fucosylation attenuates rat renal interstitial fibrosis.* Kidney Int, 2013. **84**(1): p. 64-77.
110. Inazaki, K., et al., *Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction.* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 597-604.
111. Strutz, F. and E.G. Neilson, *New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury.* Springer Semin Immunopathol, 2003. **24**(4): p. 459-76.
112. Zhang, K., et al., *Genetic implication of a novel thiamine transporter in human hypertension.* J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(15): p. 1542-55.

8. Anhang

8.1. IBF - SOP Maushaltung (GVT-Zucht)

Die Haltung der Zuchten der genetisch veränderten Tiere (GVT) erfolgt in Doppelunits der IBF unter Barrierebedingungen. Personen betreten die Units über die Zwangsdusche, Materialien werden ausschließlich über Autoklaven (autoklavierbare Materialien) oder durch Materialschleusen (nicht autoklavierbare Materialien) in die Units eingeschleust. Tiere werden in zuvor autoklavierten Aluboxen durch die Materialschleusen in die Units eingeschleust.

Das Tierpflegepersonal wie auch ggf. Nutzer dürfen keine persönlichen Gegenstände in die Barrierebereiche mit hineinbringen. Brillen, Uhren, Ringe etc. werden im Unreinbereich der Schleuse abgelegt (im Spind). Brillenträger des IBF-Personals erhalten IBF-seitig eine Ersatzbrille, die nur in der Unit getragen wird und im Reinbereich der Schleuse (im Spind) verbleibt.

Nutzer können die GVT-Zuchten nur während der Dienstzeiten des Tierpflegepersonals (7:00 – 15:30 Uhr) und nach Ankündigung und Absprache mit der IBF-Leitung aufsuchen. Bevor sie die Unit betreten, erfolgt eine ausführliche Belehrung. Zum Betreten der Unit müssen sie sich der vollständigen Prozedur des Einschleusens über die Zwangsdusche unterziehen (s. auch SOP Personen-Einschleusung in die Barriere). Ansonsten erfolgt die Kommunikation per Telefon, Fax oder E-mail.

Die Abholung von Tieren durch Nutzer erfolgt nach Anforderung per TierBase an die Tierpflege. Diese stellt die Tiere zum vorgegebenen Zeitpunkt im Regal in den Ausgaberräumen (0.45 im EG, 1.06 bzw. 1.44 im 1.OG) bereit. Der Nutzer öffnet die Tür der unreinen Seite mit seiner Zugangskarte und entnimmt die Tiere.

Der Ausgaberaum muss auf der reinen Seite bei Bedarf, mindestens aber einmal wöchentlich mit dem Nass-Trocken-Sauge gereinigt werden. Täglich muss das Regal mit Desinfektionsmittel ausgewischt bzw. abgesprüht werden. Die Reinigung der unreinen Seite erfolgt durch den Putzdienst.

In besonderen Fällen, z.B. bei dringend notwendigen Reparaturen/Wartungen innerhalb der Barriere haben Vertreter von HA3 bzw. Firmen die Möglichkeit, sich über die Handwerkerfunktion einzuschleusen. Dabei wird ein Einmalanzug über die Straßenkleidung übergezogen, Clogs bzw. Einmalüberschuhe werden angezogen, die Hände werden gewaschen und desinfiziert, es sind Handschuhe zu tragen. Die Maßnahme muss bei der Leitung des IBF angemeldet werden, ihre Einhaltung ist durch einen dabei anwesenden IBF-Mitarbeiter sicherzustellen.

Die Obertierpflege (OT) stellt durch arbeitstägliche Kontrolle sicher, dass in der Schleuse Schutzkleidung (OP-Kleidung, Einmalanzüge, -überschuhe, Handschuhe) sowie Badetücher für die Nutzer vorhanden sind; desgleichen Seife und zur Händedesinfektionsmittel Antifekt.

Die reine Seite der Schleuse einschließlich der Waschbecken und Duschkabinen mit den Syphons ist mindestens einmal wöchentlich seitens der Tierpflege zu reinigen. Die Reinigung der unreinen Seite einschließlich Dusche und Waschbecken erfolgt täglich durch den Putzdienst.

Die Maushaltung erfolgt in Makrolonkäfigen des Typs II und III (14 cm hoch); MII sollte 100 g Einstreu, MIII 200 g Einstreu enthalten. Im MII können maximal 4 Mäuse, in MIII 8 Mäuse gehalten werden.

Alle Tiere werden mindestens einmal pro Woche (i.d.R. montags/dienstags/mittwochs) umgesetzt. Muttertiere mit Wurf ab einer Woche Alter werden mindestens zweimal pro Woche umgesetzt und zusätzlich mit pelletiertem Zuchtfutter auf dem Käfigboden versorgt.

Sämtliche Käfige werden per Autoklavivorgang eingeschleust; vor dem Einfahren in den Autoklaven wird ein ca. 10 cm langer Streifen Autoklavierband auf einen Käfigstapel geklebt. Der Autoklavivorgang muss wiederholt werden, wenn sich das Autoklavierband nicht sichtbar verfärbt hat.

Der Futterbestand der Käfige ist einmal wöchentlich zu prüfen und ggf. zu ergänzen. Gefüttert wird ausschließlich das Pelletfutter Rod18 der Fa. Las Vendi, das per Autoklavivorgang eingeschleust wird.

Das Tränkwasser wird mindestens einmal wöchentlich erneuert, bei Müttern mit Wurf zweimal. Dazu werden die Flaschen geleert und erneut mit Brauchwasser (UV-bestrahlt) aufgefüllt. Der gesamte Flaschenbestand einschließlich Tränknippel wird mindestens einmal pro Monat gegen gewaschene und autoklavierte Exemplare ausgetauscht.

Käfigdeckel und Trennbleche werden vierteljährlich (jeweils Anfang Februar, Mai, August und November) gegen gewaschene, autoklavierte Exemplare ausgetauscht.

Der gesamte Tierbestand wird täglich (auch am Wochenende) kontrolliert, besondere Aufmerksamkeit ist dabei Müttern mit Wurf zu schenken. Sichtbar belastete Tiere müssen an den/die Experimentator/in sowie den/die zuständige IBF-Tierarzt/-ärztin gemeldet werden (ggf. Absprache über Tötung o.ä.).

Tragende Weibchen erhalten rechtzeitig, spätestens aber 1 Woche vor dem Wurf, Nestlets, damit sie Nestbauerhalten ausführen können. Weitere Maßnahmen der Umweltbereicherung müssen in jedem Fall mit der Leitung des IBF abgestimmt sein, die die dafür erforderlichen Materialien beschafft.

Die Räume werden täglich trocken mit einem Abzieher gereinigt. Wöchentlich einmal werden jeder Raum sowie die Flure ausgespritzt und das Wasser in den Bodenabfluß geschoben. Anschließend wird eine Desinfektionsmittellösung (0.5% Teralinlösung) auf dem Boden ausgebracht, der Raum/Flur wird vor vollständiger Abtrocknung des Bodens nicht mehr betreten. Das Absaugen der Filter erfolgt ebenfalls einmal wöchentlich. In 2-4 wöchigem Abstand erfolgt eine gründliche manuelle Nassreinigung (Raum leeren, Einschäumen + Einwirken).

Stand: 01.08.2008

http://www.uni-heidelberg.de/md/ibf/info/sop_maushaltung_zucht.pdf (04.03.2015)

8.2. Liste aller gefundenen fukosylierten Proteine

Tabelle 8.1 Auflistung der 825 gefundenen bzw. verwendeten Proteine. Gelistet sind der Genname und der Vermerk, ob das Protein in der Lunge (L), Niere (N) oder im Hippocampus (H) gefunden wurde bzw. zu welcher Gruppe (G) es gehört. War kein Genname bekannt, wurde die UniProt Accessionnummer eingetragen.

Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G
A1bg	1	0	0	I	Aldh3a2	1	0	0	II	Atp6v1b2	0	1	0	I	Cldn11	0	0	1	II
A2m	1	0	0	I	Aldh4a1	1	0	0	I	Atp6v1e1	0	1	0	II	Clec10a	1	0	0	I
Aadat	1	1	0	I	Aldh6a1	1	0	0	I	Atp6v1h	0	1	0	I	Clec14a	1	0	0	I
Aass	1	0	0	II	Aldh8a1	1	0	0	I	B4galnt1	1	0	0	I	Clec1a	1	0	0	I
Abca1	1	0	0	I	Aldoa	1	0	0	I	Bcam	1	1	0	I	Clic4	1	0	0	I
Abca3	1	0	0	I	Aldob	1	0	0	I	Bcat2	1	0	0	II	Clic5	1	0	0	I
Abcb1b	0	1	0	II	Alpl	0	1	0	I	Bche	1	0	0	I	Cltc	1	1	1	I
Abcc2	0	1	0	I	Amn	1	1	0	I	Bdh1	1	1	0	I	Clu	1	0	0	I
Abcd3	1	1	0	I	Angpt1	1	0	0	I	Bphl	1	0	0	I	Cnp	0	0	1	I
Abcg2	1	1	0	II	Angpt2	1	0	0	I	Bsg	1	1	0	I	Cntn1	0	0	1	I
Abi3bp	1	0	0	II	Ano1	1	0	0	I	Btdb17	0	0	1	I	Cntn2	0	0	1	I
Acaa2	1	1	0	I	Anpep	1	1	0	I	C3	1	0	0	I	Col14a1	1	0	0	I
Acadl	1	1	0	I	Anxa1	1	0	0	II	C4bpa	1	0	0	I	Col6a1	1	0	0	I
Acadm	1	1	0	I	Anxa11	1	1	0	II	Ca1	1	0	0	II	Col6a2	1	0	0	I
Acads	1	0	0	I	Anxa2	1	0	0	I	Ca12	0	1	0	I	Colec12	1	0	0	I
Acat1	0	1	0	I	Anxa3	1	0	0	I	Ca2	1	0	0	I	Copa	1	0	0	II
Ace	1	1	0	I	Anxa4	1	1	0	I	Ca3	1	0	0	I	Copb1	1	0	0	I
Ace2	1	1	0	I	Anxa5	1	1	0	II	Cadm1	1	0	0	I	Copg	1	0	0	II
Acly	1	0	0	II	Anxa6	1	1	0	II	Cadm3	0	0	1	I	Coro1c	1	0	0	I
Aco1	1	0	0	I	Anxa7	1	1	0	II	Calcl	1	0	0	I	Cox4i1	0	1	0	II
Aco2	1	1	0	I	Aox3	1	0	0	II	Calr	1	0	0	I	Cox5a	0	1	0	I
Acox1	1	0	0	I	Ap2a2	1	0	0	II	Calu	1	0	0	I	Cp	1	0	0	II
Acox3	1	0	0	I	Ap2m1	1	0	0	I	Cand1	1	0	0	I	Cpm	1	0	0	I
Acp2	1	1	0	I	Apoa1	1	0	0	I	Canx	0	0	1	II	Cpq	1	0	0	I
Acs1	1	0	0	I	Apoa4	1	0	0	I	Cat	1	1	0	II	Cpt1a	0	1	0	I
Acsm2	1	0	0	I	Aqp1	1	1	0	I	Cav1	1	0	0	I	Crot	1	0	0	II
Acsm3	1	0	0	I	Arf4	1	0	0	II	Cbr1	0	1	0	II	Cs	1	0	0	II
Acta2	1	0	0	I	Arhgap1	1	0	0	II	Cbr2	1	0	0	I	Csad	1	0	0	I
Actb	1	1	0	II	Arhgdia	1	0	0	I	Cct3	1	0	0	II	Cse1l	1	0	0	I
Actc1	1	0	0	II	Arhgef2	1	0	0	II	Cct6a	1	0	0	I	Csf1r	1	0	0	I
Actg2	1	0	0	II	Arpc1b	1	0	0	I	Cct8	1	0	0	I	Cspg4	1	0	0	I
Actn1	1	0	0	I	Arsb	1	0	0	I	Cd163	1	0	0	I	Ctbs	1	1	0	I
Actn4	1	0	0	I	Asah1	1	0	0	I	Cd34	1	0	0	I	Ctnna1	1	0	0	I
Actr2	1	0	0	I	Asah2	1	1	0	I	Cd36	1	0	0	I	Ctnna2	1	0	0	II
Actr3	1	0	0	I	Asl	1	0	0	I	Cd38	1	0	0	I	Ctnnb1	1	0	0	I
Acvrl1	1	0	0	I	Ass1	1	1	0	I	Cd47	1	0	0	I	Ctnnd1	1	0	0	I
Acy1	1	0	0	I	Atad3	1	0	0	II	Cd74	1	0	0	I	Ctsb	1	1	0	I
Acy3	1	0	0	I	Atp11a	0	1	0	I	Cd93	1	0	0	I	Ctsz	1	0	0	I
Adam17	1	0	0	I	Atp1a1	1	1	1	I	Cd97	1	0	0	I	Cubn	1	1	0	I
Adamtsl4	1	0	0	I	Atp1a2	0	0	1	I	Cdh13	1	0	0	II	Cyb5a	1	1	0	I
Adh1	1	1	0	I	Atp1a3	0	0	1	I	Cdh16	1	1	0	I	Cyc1	1	1	0	I
Afm	1	0	0	I	Atp1b1	1	1	0	I	Cdh5	1	0	0	I	Cyfp1	1	0	0	I
Ager	1	0	0	I	Atp1b2	0	0	1	I	Cdhr5	0	1	0	I	Cyp2b10	1	0	0	II
Agrn	1	0	0	I	Atp1b3	1	0	0	I	Ces1c	1	0	0	I	Cyp2e1	1	0	0	I
Ahcy	1	0	0	I	Atp2a1	1	0	0	I	Ces1d	1	0	0	I	Cyp2f2	1	0	0	I
Ahsg	1	0	0	I	Atp2a2	1	1	0	II	Cfh	1	0	0	I	Cyp4b1	1	1	0	I
Aifm1	1	1	0	I	Atp2b2	0	0	1	I	Cfp	1	0	0	I	D1Pas1	1	0	0	I
Akr1a1	1	0	0	I	Atp5a1	1	1	1	I	Chdh	1	0	0	I	Dak	1	1	0	I
Akr1b1	1	0	0	I	Atp5b	1	1	1	I	Chi311	1	0	0	II	Dchs1	1	0	0	II
Alad	1	0	0	II	Atp5c1	1	1	1	I	Chi313	1	0	0	II	Ddost	1	1	0	I
Alb	1	1	0	I	Atp5f1	1	1	0	I	Chia	1	0	0	I	Ddx5	1	0	0	II
Alcam	1	1	1	I	Atp5o	1	1	1	I	Chl1	0	0	1	I	Decr1	1	0	0	I
Aldh1a1	1	0	0	I	Atp6v0a1	0	0	1	I	Cisd1	0	1	0	I	Dkk3	1	0	0	I
Aldh111	1	0	0	I	Atp6v0d1	0	1	1	II	Ckap4	1	0	0	I	Dld	1	0	0	I
Aldh2	1	1	0	I	Atp6v1a	1	1	1	I	Cla1	1	0	0	II	Dnm1	0	0	1	I

Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G
Dpep1	1	1	0	I	Fstl1	1	0	0	I	Hnrnp1	1	1	0	I	Kiaa0319l	1	0	0	I
Dpp4	1	1	0	I	Galc	1	0	0	I	Hnrnp2	1	0	0	I	Kit	1	0	0	II
Dpp6	1	0	1	I	Gapdh	1	1	0	I	Hnrmpk	1	0	0	I	Kng1	1	0	0	I
Dpysl2	1	0	0	I	Gba	1	0	0	I	Hnrmpm	1	0	0	II	Krt10	1	0	0	II
Dstn	1	0	0	I	Gc	1	0	0	I	Hnrmpu	1	1	0	II	Krt19	1	0	0	I
Dync1h1	1	0	0	I	Gcnt1	0	1	0	II	Hp	1	0	0	I	Krt2	1	0	0	I
Ece1	1	0	0	I	Gdi1	1	0	0	I	Hpgd	1	0	0	I	Krt6a	1	0	0	II
Eci1	1	1	0	I	Gdi2	1	0	0	I	Hpx	1	1	0	I	Krt7	1	0	0	II
Eef1a1	1	1	0	II	Ggt1	1	1	0	I	Hrg	1	0	0	I	Krt8	1	0	0	II
Eef1a2	1	0	0	I	Gk	1	1	0	I	Hs2st1	1	0	0	I	L1cam	0	0	1	I
Eef2	1	0	0	I	Gla	1	0	0	I	Hsd11b2	1	1	0	I	Lama1	0	1	0	I
Efemp1	1	0	0	II	Glb1	1	0	0	I	Hsd17b10	1	0	0	I	Lama2	1	0	0	I
Egflam	1	0	0	I	Glg1	1	1	0	I	Hsd17b10	0	1	0	II	Lama3	1	0	0	I
Egfr	1	0	0	I	Glod4	1	0	0	I	Hsd17b11	1	0	0	I	Lama4	1	0	0	I
Ehd1	1	1	0	I	Glud1	1	0	0	I	Hsd3b4	0	1	0	I	Lama5	1	0	0	I
Ehd2	1	0	0	II	Gnai	1	0	0	I	Hsp90aa1	1	0	0	II	Lamb1	1	0	0	I
Ehd4	1	1	0	II	Gnai2	1	0	1	II	Hsp90ab1	1	1	0	II	Lamb2	1	0	0	I
Ehhadh	1	1	0	II	Gnas	1	0	0	I	Hsp90b1	1	1	0	I	Lamb3	1	0	0	I
Eif4a1	1	0	0	II	Gnb1	1	0	0	I	Hspa12b	1	0	0	I	Lamc1	1	0	0	I
Eif4a3	1	0	0	I	Gnb2l1	1	0	0	II	Hspa2	1	0	0	II	Lamc2	1	0	0	I
Emi2	1	0	0	I	Gnptab	1	0	0	I	Hspa5	1	1	0	II	Lamp1	1	1	1	I
Eng	1	0	0	I	Gns	1	0	0	I	Hspa8	1	1	0	II	Lamp2	1	1	0	I
Eno1	1	0	0	I	Got1	1	0	0	I	Hspa9	1	1	0	I	Lap3	1	0	0	I
Enpep	1	1	0	I	Got2	1	0	0	I	Hspd1	1	0	0	I	Lcp1	1	0	0	II
Enpp3	1	1	0	I	Gpi	1	0	0	I	Hspg2	1	0	0	I	Ldha	1	1	0	II
Enpp4	1	0	0	I	Gpm6a	1	0	1	I	Hyou1	1	0	0	I	Ldha	1	1	0	I
Entpd2	1	0	0	I	Gpr126	1	0	0	I	Icam1	1	0	0	I	Ldhd	1	1	0	I
Epb4112	1	0	0	II	Gprc5a	1	0	0	I	Icam2	1	0	0	I	Lepr	1	0	0	I
Ephx1	1	0	0	II	Gria2	0	0	1	I	Icam5	0	0	1	I	Lgals3bp	1	0	0	I
Eprs	1	0	0	II	Gsn	1	0	0	II	Idh1	1	1	0	I	Lgals9	1	0	0	II
Erlin2	1	0	0	I	Gsr	1	0	0	I	Idh2	1	1	0	I	Lipa	1	0	0	I
Erp44	1	0	0	I	Gss	1	0	0	I	Idh3a	0	0	1	I	Lmna	1	0	0	I
Etfa	1	1	0	I	Gstm1	1	0	0	I	Igf1r	1	0	0	I	Lmnb1	1	1	0	I
Etfb	1	0	0	II	Gsto1	1	0	0	I	Igf2r	1	1	0	I	Lnpep	1	0	0	I
Etfdh	1	0	0	I	Gstz1	0	1	0	I	Igh-1a	1	0	0	II	Lonp1	1	0	0	I
Ezr Vil2	0	1	0	II	Gusb	1	0	0	I	Igh-6	1	1	0	I	Loxl2	1	0	0	I
F5	1	0	0	I	H1f0	0	1	0	I	Ighg	1	0	0	II	Loxl3	1	0	0	I
Fah	1	0	0	I	H2-Aa	1	0	0	I	Igsf3	1	0	0	I	Lrp1	1	0	1	I
Fam151a	1	1	0	I	H2-Ab1	1	0	0	I	Ilk	1	0	0	I	Lrp2	1	1	0	I
Farp1	1	0	0	II	H2-D1	1	0	0	I	Immt	0	1	0	I	Lrpap1	1	1	0	I
Fasn	1	0	0	I	H2-K1	1	0	0	I	Inmt	1	0	0	I	Lrrc19	0	1	0	I
Fbln1	1	0	0	II	H3f3	1	0	0	II	Insr	1	0	0	I	Lrrc8a	1	0	0	I
Fbln5	1	0	0	I	H6pd	1	0	0	II	Iqgap1	1	0	0	I	Lrrc8c	1	0	0	II
Fbn1	1	0	0	I	Hadh	1	0	0	I	Itfg3	0	1	0	I	Lrrc8d	1	0	0	I
Fbn2	1	0	0	I	Hadha	1	0	0	I	Itga1	1	1	0	I	Lrrn4	1	0	0	I
Fbp1	1	0	0	I	Hadhb	1	0	0	II	Itga2	1	0	0	I	Lsamp	0	0	1	I
Fcgrt	1	1	0	I	Hagh	1	0	0	I	Itga3	1	1	0	I	Lta4h	1	0	0	I
Fermt2	1	0	0	II	Hba	1	1	0	I	Itga4	1	0	0	II	Ltbp1	1	0	0	I
Fetub	1	1	0	I	Hbb-b1	1	1	0	II	Itga5	1	0	0	I	Ltbp2	1	0	0	I
Fgl2	1	0	0	I	Hbb-b2	1	1	0	II	Itga6	1	1	0	I	Ltbp4	1	0	0	I
Fh	1	0	0	I	Heg1	1	0	0	II	Itga8	1	0	0	I	Ly75	1	0	0	I
Fhl1	1	0	0	I	Hexa	1	0	0	I	Itgal	1	0	0	I	M6pr	1	1	0	I
Fkbp10	1	0	0	I	Hexb	1	1	0	I	Itgam	1	0	0	II	Mag	0	0	1	I
Flna	1	1	0	I	Hgd	1	0	0	II	Itgav	1	1	0	I	Man2a1	1	0	0	I
Flnb	1	0	0	I	Hgfac	1	0	0	I	Itgb1	1	1	0	I	Man2a2	1	0	0	I
Fmo1	1	0	0	I	Hist1h2bf	1	0	0	II	Itgb2	1	0	0	I	Man2b1	1	1	0	II
Fmo2	1	0	0	I	Hmcn1	1	0	0	II	Itgb6	1	0	0	I	Man2b2	1	0	0	I
Fn1	1	0	0	I	Hnrnpa3	1	0	0	I	Itm2b	1	0	0	I	Manba	1	0	0	I
Folh1	1	1	0	II	Hnrnpab	1	0	0	II	Ivd	1	0	0	I	Maob	1	0	0	I
Folr1	0	1	0	II	Hnrnpd	1	0	0	I	Jup	1	0	0	II	Marc2	1	1	0	I
Fsip2	1	0	0	I	Hnrnpf	1	0	0	I	Kdr	1	0	0	I	Matn4	1	0	0	I

Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G
Mbl1	1	0	0	I	Nid2	1	0	0	I	Plvap	1	1	0	I	Rps16	1	0	0	II
Mcam	1	0	0	I	Nnt	1	1	0	II	Plxdc2	1	0	0	I	Rps18	1	0	0	II
Mccc1	1	0	0	I	Nono	1	0	0	II	Plxna2	1	0	0	I	Rps19	0	1	0	II
Mccc2	1	0	0	I	Notch2	1	0	0	I	Plxnb2	1	1	0	I	Rps2	1	0	0	I
Mdh1	1	0	0	I	Notch3	1	0	0	I	Plxnc1	1	0	0	I	Rps27a	1	0	0	II
Mdh2	1	1	0	I	Notch4	1	0	0	I	Pm20d1	1	0	0	I	Rps3	1	0	0	II
Me1	1	0	0	I	Npc1	1	0	0	I	Pnp	1	0	0	I	Rps3a	1	1	0	I
Mep1a	1	1	0	I	Npnt	1	0	0	I	Podxl	1	0	0	I	Rps4x	1	0	0	I
Mep1b	1	1	0	I	Npr3	1	0	0	I	Por	1	0	0	I	Rps8	1	1	0	I
Met	1	0	0	I	Nptn	0	1	1	I	Ppap2b	1	0	0	II	Rpsa	1	0	0	II
Mettl7b	0	1	0	II	Nptxr	0	0	1	I	Ppia	1	0	0	I	Rpsa-ps10	1	0	0	II
Mfap4	1	0	0	I	Nrcam	0	0	1	I	Prcp	1	0	0	I	Rtn4	1	0	0	II
Mgam	1	0	0	I	Nsf	0	0	1	II	Prdx1	1	1	0	I	Scn7a	1	0	0	I
Mgat2	1	0	0	I	Nt5e	1	0	0	I	Prdx2	1	1	0	II	Sdha	1	1	0	I
Mme	1	1	0	I	Nudt19	1	0	0	I	Prdx6	1	0	0	I	Sdpr	1	0	0	I
Mmrn2	1	0	0	I	Nup210	1	0	0	I	Prelp	1	0	0	I	Sec61a1	1	0	0	I
Mog	0	0	1	I	Oat	1	0	0	I	Prkar2a	1	0	0	II	Selenbp1	1	0	0	II
Mpc2	1	1	0	II	Ogdh	1	0	0	I	Prodh	1	1	0	I	Selenbp2	1	0	0	I
Mrc1	1	0	0	I	Ogn	1	0	0	I	Prom1	0	1	0	I	Sept2	1	0	0	II
Mrc2	1	1	0	I	Olfm1	0	0	1	I	Prss34	1	0	0	I	Sept7	1	0	0	I
Msn	1	0	0	I	Olfml3	1	0	0	I	Psap	1	0	0	I	Serpina1a	1	0	0	II
Mtch2	1	1	0	II	Oxct1	1	0	0	I	Psm1	1	0	0	I	Serpina1b	1	0	0	I
Mtco2	0	1	0	II	P01806	1	0	0	II	Pter	1	0	0	I	Serpina1c	1	0	0	I
Mtnd5	0	1	0	I	P01807	1	0	0	II	Ptgfrn	1	0	0	I	Serpina1d	1	0	0	I
Muc5b	1	0	0	II	P01808	1	0	0	II	Ptk7	1	0	0	I	Serpina3k	1	0	0	I
Mug1	1	0	0	I	P01812	1	0	0	II	Ptpa	1	0	0	I	Serpina6	1	0	0	I
Mvp	1	0	0	I	P01878	1	0	0	II	Ptpnb	1	0	0	I	Serpinc1	1	0	0	I
Myh10	1	0	0	I	P03987	1	0	0	I	Ptpnj	1	0	0	I	Serping1	1	0	0	I
Myh14	1	0	0	I	P4hb	1	0	0	I	Ptpk	1	1	0	I	Serpinh1	1	1	0	I
Myh4	1	0	0	II	Pc	1	1	0	I	Ptpm	1	0	0	II	Sftpa1	1	0	0	I
Myh6	1	0	0	I	Pcbp1	1	0	0	I	Ptrf	1	0	0	I	Sftpb	1	0	0	I
Myh9	1	0	0	I	Pcca	1	0	0	I	Puf60	1	0	0	I	Sftpd	1	0	0	II
Mylk	1	0	0	I	Pcdh1	1	0	0	II	Pxdn	1	0	0	I	Sfxn1	1	1	0	I
Myo1b	1	0	0	I	Pcdh18	1	0	0	I	Pygb	1	0	0	II	Sfxn3	1	0	0	I
Myo1c	1	0	0	I	Pcdhgc3	1	0	0	I	Q3UNZ8	0	1	0	II	Sgsh	1	0	0	II
Myo1d	1	0	0	I	Pck1	1	0	0	I	Q91V76	1	0	0	I	Siae	1	1	0	I
Myo6	1	0	0	I	Pdgfra	1	0	0	I	Qsox1	1	0	0	I	Sigirr	0	1	0	I
Myof	1	0	0	II	Pdgfrb	1	0	0	II	Rab10	0	1	1	I	Sirpa	1	0	1	I
Naaa	1	0	0	I	Pdhb	1	1	0	I	Rab11a	0	1	0	II	Slc12a1	0	1	0	I
Naalad2	1	0	0	I	Pdia3	1	0	0	I	Rab3a	0	0	1	II	Slc12a6	1	0	0	I
Naga	1	0	0	II	Pdia6	1	0	0	I	Rac1	1	0	0	II	Slc13a3	1	1	0	I
Napsa	0	1	0	I	Pdzk1	1	1	0	I	Ran	1	0	0	II	Slc1a2	0	0	1	I
Ncam1	0	0	1	I	Pebp1	1	0	0	I	Rdx	1	0	0	II	Slc1a3	0	0	1	I
Nceh1	1	0	0	I	Pecam1	1	0	0	I	Reck	1	0	0	I	Slc22a1	0	1	0	I
Ncstn	1	1	0	I	Pfn1	1	0	0	I	Rnh1	1	0	0	I	Slc22a12	1	1	0	I
Ndst1	1	0	0	I	Pgam1	1	0	0	I	Rpl13	1	0	0	I	Slc22a13	0	1	0	I
Ndufa10	1	1	0	I	Pgd	1	0	0	II	Rpl14	1	0	0	I	Slc22a2	0	1	0	I
Ndufa12	0	1	0	I	Pgk1	1	1	0	I	Rpl17	1	0	0	I	Slc22a4	0	1	0	I
Ndufa4	0	1	0	I	Pgm1	1	0	0	I	Rpl19	1	0	0	II	Slc22a6	1	1	0	I
Ndufa8	0	1	0	I	Phb	1	1	0	I	Rpl24	1	0	0	I	Slc22a8	1	1	0	I
Ndufa9	0	1	0	II	Phb2	1	1	0	I	Rpl3	1	0	0	I	Slc23a1	0	1	0	I
Ndufb10	0	1	0	I	Phgdh	1	0	0	II	Rpl31	1	0	0	II	Slc25a10	0	1	0	II
Ndufb9	0	1	0	I	Piezo1	1	0	0	II	Rpl36a	1	0	0	I	Slc25a11	1	1	0	I
Ndufs1	1	1	0	I	Pkm	1	0	0	I	Rpl4	1	0	0	II	Slc25a12	0	1	0	I
Ndufs2	0	1	0	I	Pla2r1	1	0	0	I	Rpl6	1	0	0	I	Slc25a13	1	1	0	I
Ndufs3	0	1	0	II	Pld3	1	0	1	I	Rpl7	1	0	0	I	Slc25a3	1	1	1	I
Ndufs7	0	1	0	II	Pld4	1	0	0	I	Rpl9	1	0	0	II	Slc25a4	1	1	1	I
Ndufv1	0	1	0	I	Plec	1	0	0	I	Rpn1	1	1	0	I	Slc25a5	1	1	1	II
Ndufv2	0	1	0	I	Plg	1	0	0	I	Rpn2	1	1	0	I	Slc27a2	1	1	0	I
Nfasc	1	0	1	I	Pls3	1	0	0	I	Rps11	1	0	0	II	Slc34a1	0	1	0	I
Nid1	1	1	0	I	Pltp	1	0	0	I	Rps13	1	0	0	II	Slc34a2	1	0	0	I

Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G	Gen	L	N	H	G
Slc39a10	1	0	0	I	Stt3a	1	0	0	I	Tmed7	1	0	0	II	Ugt2b17	1	0	0	II
Slc3a1	1	1	0	I	Stx1b	0	0	1	I	Tmed9	1	0	0	I	Ugt3a2	1	1	0	I
Slc3a2	1	1	1	I	Stxbp1	0	0	1	I	Tmem2	1	0	0	I	Umod	1	0	0	I
Slc43a2	0	1	0	I	Sucla2	1	1	0	I	Tmem201	1	0	0	II	Uqcrc1	1	1	0	I
Slc44a2	1	0	0	I	Suc1g2	1	1	0	I	Tmem27	1	1	0	I	Uqcrc2	1	1	0	I
Slc44a4	0	1	0	I	Susd2	1	1	0	I	Tmem30a	1	0	0	I	Vapa	1	0	0	II
Slc47a1	1	0	0	I	Sv2a	0	0	1	I	Tnc	1	1	0	I	Vasn	1	0	0	I
Slc4a1	1	1	0	I	Sv2b	0	0	1	I	Tnr	0	0	1	I	Vcl	1	0	0	I
Slc4a2	1	0	0	II	Svep1	1	0	0	I	Tns2	1	0	0	II	Vcp	1	1	0	I
Slc4a4	1	1	0	I	Syn2	0	0	1	I	Tnxb	1	0	0	II	Vdac1	1	1	0	I
Slc5a10	0	1	0	I	Syng1	0	0	1	I	Tpcn1	1	0	0	II	Vdac2	1	1	0	II
Slc5a2	0	1	0	I	Syng3	0	0	1	I	Tpi1	1	0	0	I	Vdac3	1	0	0	II
Slc5a8	1	1	0	I	Syp	0	0	1	I	Trap1	1	1	0	II	Vil1	1	0	0	I
Slc5a9	0	1	0	I	Syt1	0	0	1	I	Treh	1	1	0	I	Vim	1	0	0	I
Slc9a3r2	1	0	0	I	Tacstd2	1	0	0	I	Trpc6	1	0	0	I	Vnn1	0	1	0	I
Slco1a1	1	0	0	I	Taldo1	1	0	0	I	Tuba1a	1	0	0	I	Vwa8	0	1	0	I
Slco1a6	0	1	0	I	Tardbp	1	0	0	I	Tuba1c	1	1	0	I	Vwf	1	0	0	I
Slco2a1	1	0	0	I	Tcn2	0	1	0	I	Tuba3a	1	0	0	II	Wdr1	1	0	0	I
Snap25	0	0	1	I	Tcp1	1	0	0	I	Tuba4a	1	1	0	I	Xdh	1	0	0	I
Sned1	1	0	0	I	Tf	1	1	0	I	Tubb2a	1	0	0	II	Xpo1	1	0	0	I
Sod3	1	1	0	I	Tfrc	1	0	0	I	Tubb2b	1	0	0	II	Ywhab	1	0	0	I
Sorcs2	1	0	0	I	Tgm2	1	0	0	I	Tubb4b	1	1	0	II	Ywhae	1	0	0	II
Sord	1	0	0	I	Thbs1	1	0	0	I	Tubb5	1	0	0	II	Ywhag	1	0	0	II
Sorl1	1	0	0	I	Thbs3	1	0	0	I	Tufm	1	1	0	II	Ywhah	1	0	0	I
Sort1	1	0	0	I	Thsd7a	1	0	0	I	Uba52	1	0	0	II	Ywhaq	1	0	0	I
Spon1	1	0	0	I	Thy1	0	0	1	I	Ubb	1	0	0	I	Ywhaz	1	0	0	I
Sptan1	1	0	0	I	Tkt	1	0	0	I	Ubc	1	0	0	II	Zyx	1	0	0	I
Sptbn1	1	0	0	I	Tln1	1	0	0	I	Uggt1	1	0	0	I					
St3gal4	1	0	0	I	Tln2	1	0	0	II	Ugt1a2	0	1	0	I					
Stab1	1	0	0	I	Tmed10	1	0	0	I	Ugt1a7c	1	1	0	I					

8.3. TGF- β BMP Signaling Pathway

Tabelle 8.2 Liste der im PAMM-035C-12 RT2 Profiler PCR Array untersuchten Gene und deren Expressionsänderung in Lunge und Niere im Knockout samt p-Werte. Ergebnisse, die nicht ausgewertet werden konnten, sind mit „N/A“ gekennzeichnet.

Gen	Lunge		Niere	
	Fold change	p-Wert	Fold change	p-Wert
Acvr1	1,04	0,876	N/A	N/A
Acvr2a	1,05	0,561	0,78	0,331
Acvr11	0,91	0,531	0,89	0,620
Amh	0,91	0,971	1,03	0,902
Amhr2	0,98	0,935	0,89	0,647
Bambi	1,32	0,562	1,15	0,837
Bglap2	1,54	0,106	0,96	0,687
Bmp1	0,87	0,279	0,58	0,291
Bmp2	0,79	0,298	0,47	0,275
Bmp3	0,85	0,437	0,88	0,467
Bmp4	0,85	0,145	0,75	0,350
Bmp5	0,83	0,280	N/A	N/A
Bmp6	1,05	0,692	0,92	0,451
Bmp7	1,08	0,756	0,72	0,359
Bmper	1,26	0,314	N/A	N/A
Bmpr1a	0,97	0,660	0,84	0,399
Bmpr1b	1,25	0,459	0,93	0,460
Bmpr2	1,05	0,666	0,91	0,388
Cd79a	0,67	0,116	0,39	0,216
Cdc25a	0,88	0,257	0,35	0,073
Cdkn1a	1,13	0,629	0,81	0,447
Cdkn2b	0,79	0,231	0,61	0,379
Chrd	1,15	0,452	N/A	N/A
Col1a1	0,93	0,809	N/A	N/A
Col1a2	1,02	0,892	0,84	0,380
Col3a1	0,99	0,889	1,06	0,671
Dlx2	N/A	N/A	N/A	N/A
Eng	0,99	0,907	1,08	0,576
Evi1	1,17	0,141	0,81	0,400
Fkbp1b	1,03	0,848	0,36	0,254
Fos	0,76	0,840	0,71	0,406
Fst	0,89	0,648	0,75	0,370
Gdf1	0,83	0,190	0,43	0,342
Gdf2	N/A	N/A	N/A	N/A
Gdf3	N/A	N/A	0,61	0,451
Gdf5	0,62	0,235	2,34	0,871
Gdf6	1,49	0,828	0,73	0,450
Gdf7	1,15	0,760	0,60	0,471
Gsc	N/A	N/A	N/A	N/A
Id1	1,10	0,431	0,53	0,302
Id2	0,92	0,606	0,85	0,331
Igf1	1,02	0,781	N/A	N/A
Igfbp3	0,71	0,415	0,67	0,275
Il6	0,72	0,542	N/A	N/A
Inha	1,07	0,740	1,61	0,734
Inhba	N/A	N/A	0,57	0,358
Inhbb	0,96	0,758	0,48	0,238

Gen	Gewebe	Lunge		Niere	
		Fold change	p-Wert	Fold change	p-Wert
Itgb5		0,84	0,435	0,76	0,393
Itgb7		1,01	0,959	0,99	0,562
Jun		1,04	0,860	0,68	0,354
Junb		1,06	0,762	1,15	0,440
Lefty1		0,92	0,674	0,75	0,321
Ltbp1		0,96	0,720	N/A	N/A
Ltbp2		1,09	0,421	0,42	0,345
Ltbp4		0,82	0,227	0,63	0,315
Myc		0,89	0,235	0,60	0,251
Nbl1		0,90	0,626	0,68	0,405
Nodal		0,95	0,673	N/A	N/A
Nog		N/A	N/A	0,63	0,379
Nr0b1		N/A	N/A	N/A	N/A
Pdgfb		1,03	0,868	0,90	0,439
Plat		1,15	0,463	0,98	0,894
Plau		0,88	0,431	1,00	0,806
Runx1		1,17	0,486	0,69	0,567
Serpine1		1,21	0,536	0,67	0,459
Smad1		1,02	0,915	0,81	0,374
Smad2		0,93	0,512	0,84	0,352
Smad3		0,98	0,935	0,99	0,647
Smad4		0,93	0,461	0,82	0,352
Smad5		0,87	0,152	0,98	0,560
Smurf1		0,86	0,065	1,20	0,737
Sox4		0,71	0,130	1,10	0,672
Stat1		0,85	0,233	1,19	0,547
Tdgf1		0,61	0,170	N/A	N/A
Tgfb1		0,92	0,373	0,82	0,402
Tgfb1i1		1,05	0,415	0,62	0,291
Tsc22d1		1,19	0,085	0,70	0,282
Tgfb2		1,00	0,969	0,92	0,747
Tgfb3		0,74	0,072	1,29	0,852
Tgfb1		0,78	0,101	0,65	0,346
Tgfb1		0,96	0,559	0,76	0,341
Tgfb2		0,84	0,230	0,80	0,362
Tgfb3		0,83	0,356	1,17	0,637
Tgfb1		0,79	0,044	0,81	0,388

8.4. Reck-cDNA

```

1 GGGGCCTGGT GCCAGGGGTT GCTACGGCCA GGCTGGGTCC GAGCATCCCG CGGCTTCGGA
61 CCCACCCGGC CCGGACATG CGAGCGTCCG GGCCTCCCCG CGCAGCGCGC TGCTACTTCT
121 GCTGGCCGCG GCGGGGGTCG CGGAGGTGAC GGGGGGCTG GCCCCGGGCA GCGCGGGTGC
181 TGTATGCTGT AATCATTCAA AAGATAACCA AATGTGCCGT GATGTATGTG AGCAGATTTT
241 CTCCTCAAAA AGTGAATCCC GACTGAAAAA TCTGTTGCAG AGAGCCCCAG ATTATTGCCG
301 TGAAACAATG GTTGAAATTT GGAGTTGCAT GAATTCGTCT TTGCCAGGGG TATTTAAGAA
361 GTCCGATGGT TGGGTTGGCT TAGGCTGCTG TGAAGTGGCT ATTGGCTTGG AGTGCCGACA
421 GGCATGCAAG CAGGCATCTT CGAAAAATGA TATTTCCAAA GTTTGCAGGA AAGAATATGA
481 GAATGCTCTT TTCAGTTGCA TTAGCAGAAA TGAAATGGGC TCGGTGTGCT GCAGTTACGC
541 AGGCCATCAC ACCAACTGCC GAGAATTCTG TCAAGCCATT TTTCGAACAG ACTCTTCTCC
601 TGGGCCATCT CAGATCAAAG CAGTGGAAAA TTATTGTGCC TCTATCAGTC CACAGTTGAT
661 ACACTGTGTG AATAATTACA CCCAGTCTTA TCCAATGAGA AACCCAAGT ATAGTTTATA
721 TTGCTGTGAC AGAGCTGAAG ACCATGCTTG CCAAACGCC TGCAAGAGAA TTCTAATGTC
781 TAAGAAAACA GAAATGGAGA TTGTTGATGG TCTCATTGAG GGTGTAAGA CCCAGCCCTT
841 GCCTCAAGAT CCTCTTTGGC AGTGTTTTCT CGAAAGCTCA CAGTCGGTTC ACCCTGGAGT
901 CACTGTGCAC CCTCCTCCCT CAACTGGCCT CGACGGGGCC AAATTGCACT GTTGCTCTAA
961 AGCAAACACT TCAACCTGTA GGAACCTGTG CACCAAACCT TATAGCATGA GCTGGGGAAA
1021 TACACAGAGT TGGCAAGAGT TTGACCGCAT CTGTGAGTAT AATCCGGTGG AAGTGTCAT
1081 GCTGACGTGT CTGGCTGATG TCCGGGAGCC TTGCCAGTTG GGCTGTACAA ACCTGACTTA
1141 CTGTACAAAC TTTAACAACA GGCCAACAGA ACTGTTGAGG AGCTGCACGG CTCAGTCTGA
1201 CCAGGGGGCC ATGAGTGACA TGAAGCTGTG GGAGAAGGGG AGCATCAAGA TGCCCTTCAT
1261 CAGCATCCCT GTCCTAGACA TCAAGACCTG CCAGCCAGAG ATGTGGAAGG CCGTGGCCTG
1321 CTCCCTGCAG ATCAAGCCGT GCCATAGCAA ATCCCGAGGC AGTATTATCT GCAAATCAGA
1381 TTGTGTAGAG ATTCTCAAGA AATGTGGAGA CCAGAATAAA TTCCCTGAAG AACACACAGC
1441 TGAAAGTATC TGTGAGTTTC TGTCCCCTGC AGATGACCTG GAGAGCTGTA TCCCTCTGGA
1501 CACGTACCTC AGGCCAAGTG CTTTAGGAAA CATCATAGAA GAAGTGAUTC ACCCCTGTAA
1561 CCCAAACCCC TGCCAGCCA ACGAGCTCTG TGAAGTGAAC CGGAAGGGGT GTCCGTCTGC
1621 AGATCCCTGC CTTCCATACT CCTGTGTTCA AGGCTGCAAA TTGGGAGAAG CTTCTGACTT
1681 CATCGTCCGC CAGGGGACAC TGATCCAGGT GCCGTCCCTCT GCAGGGGAAG TTGGTTGCTA
1741 CAAGATCTGT TCCTGTGGAC AAAGTGGCCT CTTGGAAAAC TGTATGGAAA TGCAGTGTAT
1801 CGACCTCCAG AAGTCTTGTA TTGTGCGAGG AAAAAGAAAA AGCCACGGAA CATCCTTAC
1861 TATTGACTGC AATGTCTGTT CTTGTTTTGC GGGTAATTTA GTGTGTTCCA CCCGCTGTG
1921 CCTCAGTGAG CACAGTTCAG ACGACGACCG CCGCACCTTC ACAGGTCTGC CCTGTAAGT
1981 CGCAGATCAG TTTGTCCCAG TGTGTGCACA GAATGGACGC ACTTACCCCA GTGCCTGCAT
2041 CGCTCGCTGT GTGGGTCTCC AGGACCATCA GTTTGAGTTT GGACCTTGTA TCTCCAAGAA
2101 TCCCTGTAAT CCTAACCTCT GCCCCAAAAG CCAAAGATGT GTGCCAAAAC CACAAGTCTG
2161 CCTGACGACT TTTGATAAAT TTGGATGTAG CCAATATGAG TGTGTGCCA GACAGCTCAC
2221 CTGTGACCAG GCCCGAGATC CTGTGTGTGA CACAGATCAC ATGGAGCACA GCAACCTCTG
2281 CACTCTGTAC CAAAGAGGGA AAAGCCTGTC TTACAGAGGC CCTTGCCAGC CTTTCTGCAG
2341 AGCCAAGGAG CCTGTCTGTG GGCACAATGG TGAGACATAC AGCAGTGTGT GTGCTGCCTA
2401 CTCAGATCGT GTGGCCGTGG ATTACTACGG GCCCTGCCAG GCTGTCGGCG TCCTCTCGGA
2461 ATACAGTGCT GTGGCTGAGT GTGCTGCTGT CAAGTGTCTT TCCCTCTCAG CCATAGGCTG
2521 CAAACCCATC ATCCCACCAG GGGCTTGCTG TCCACTATGT GCTGGGATGT TACGGGTATT
2581 ATTTGACAAA GAAAACTGG ACACTATTGC TAAGGTGACA AGCAAGAAGC CCATAACCGT
2641 TGTGGAGATT CTTCAGAAGG TCCGCATGCA CGTGTCTGTG CCGCAGTGTG ACGTGTGTTG
2701 ATACTTGAGC ATCGAGTCGG AAATTGTGAT CCTCATTATT CCTGTGGACC ATTACCCAAA
2761 AGCTTTGCAG ATTGAGGCCT GCAATAAGGA GGCAGAGAAA ATCGAGTCCC TCATCAACTC
2821 CGACAGCCCC ACGCTGGCGT CCCACGTCCC ACTCTCGGCC CTCATCATTT CCCAAGTGCA
2881 GGTCTCCAGC AGTCTCCCGT CATCTGCTGT TGTGGGCAGG CCTCTCTTCC ACTCCCTGCT
2941 CCTCCTCCTC AGCCTGGGCC TCACCGTGCA CTTGCTCTGG ACTAGACCCG GACCACCCAC
3001 AACTGGGAGG AACTGCAAAG CCTTCCTCCA CCCAGCCGTC CACCTTGTGA AAGACATTC
3061 GGACTGCTAG CTGGTGACCA AGCAAAGGCA TGTGGCACCT CTTAGCACCA CACAGTATTT
3121 TTTTCACCTG CCAATATTAG GGGGTTTGCC TTGGTTTATA AAATGGTAAA TTAGACTCTC

```

```

3181 CCAATATAAT GAAGATGATG CCTCTTCCTG GTGGATCCCT GGCCAGTTCA CACTCGCTCA
3241 GTAGATGGCC CCCCTTCCCC AAAGCAAATT TAGCATCCCT GATCAATGGC ATGGTCACTT
3301 TATAGGAGGC AGCCCCCTTT GTCCTTGGGT GGGTGCCCTG GTCTCCTCAG AGTTCCTGTG
3361 AGTGCTGAGG CCGCCATGTG CTTGTTTCTG TGTCTGGAGG CTGAGGGCTC AGTGAAAAGC
3421 CGCTACCTGC CATGACAGGG CGGGCCGGAG GAGAAAAACA TCATTGAATT CTCACTAGCT
3481 CATAGGCTGA CTCCATAGAA ATGTAAGGCA GGACTCTACT CTGCTTAGCA AAAGCAAGAC
3541 GACCAAGTGA CACTCGTGCC TGTCTCACAC TTGGGCCTCT CAGCAGTTGT CATTGTGTC
3601 TGTGAGTGGG GCGGCCCCCA CAACATCCAA GCATCTATGT CATGCCTGCC GTGTTGTGTT
3661 AGCCAGATAC ACTCGCCAGT ACTCACCAAG TCCACAGGTT TAAAGGTCAG ACTTTAAACC
3721 ACTTGCTGCT ACTATATAAC TGCCAAAAAG TAAGATTATT AGGAGTTCAT GTAAATAGTA
3781 CATGATTTTT TATTTTATTA TGAAGGTGAA TAGCCATATT TGTA AAAATGA CAATCATGTG
3841 TGTTAGCCCC ATACTTTCAT GAAGACACAT CTGCTTTTTG TAATGTGCAC AGTGTGGATA
3901 AGTGTGTGTC CGACTTTCCT TTGATATAGA ATTATAAAGA ATGTGGTTTA TATATTTAAA
3961 ATATCAGGCT AAATAGTAAA ATGTTTGCAT GTTGTCTAAG AAATTGGATA CTTTGAATGT
4021 TTTACAGTTT GAAATAAGCT ATTAATGTAA TACTTCCTGT TTGTATGCAC CTGAACTTAG
4081 ATTTTACATG AAGTATTTTT CAGTGTTATA TGTACCCTCT GAAATATAGC AATATGCTTA
4141 TTATACCAA ATGTTGTTGA AAGTGGGCAC TTAATGCTTT CAGAGGATCT CAGTGCCGAT
4201 GTCGATGTAC CTCTGTCACA GTTGCCTGTT TCTGTCTAAA TGTTTTCAAC ATACTAGACT
4261 ATATTATATG TATATTCTCT ATATAGTATA CCACAATATA CTATATATAT TCTATATATA
4321 GTATACAGCA CTATACTAGA AAGCCTTCT ATTTTAATAA AAGTAATTTT ATATGATTAT
4381 TTGTACTTCC AAGCAATGTG AACATTGAGA ATGAAACAGT TCCTTACCCT TAAAAAAAAA
4441 AAAAAAAAAA

```

Abbildung 8.1 Sequenz des murinen Reck-Gens laut NCBI (NM_016678.2). Markiert sind das Start- und Stopcodon (grün), der in den *Slc35c1^{+/+}* und *Slc35c1^{-/-}* Mäusen fehlende Bereich (gelb), sowie der für das Epitop des Antikörpers codierende Bereich (blau).