

2 Ergebnisse

2.1 Oligomerisierung der GNE

Hinderlich et al. reinigten 1997 erstmals die GNE aus Rattenleber. Die Aktivität der GNE muß als Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese sehr gut reguliert werden. Eine Möglichkeit der Regulation besteht über die Oligomerisierungszustände des Enzyms. Um einen detaillierteren Einblick in die Interaktion von Epimerase- und Kinasedomänen während der Oligomerisierung zu bekommen, wurden insgesamt 14 verschiedene *bait*- und *prey*-Konstrukte für die paarweise Interaktion in einem Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-System generiert (Abb. 5).

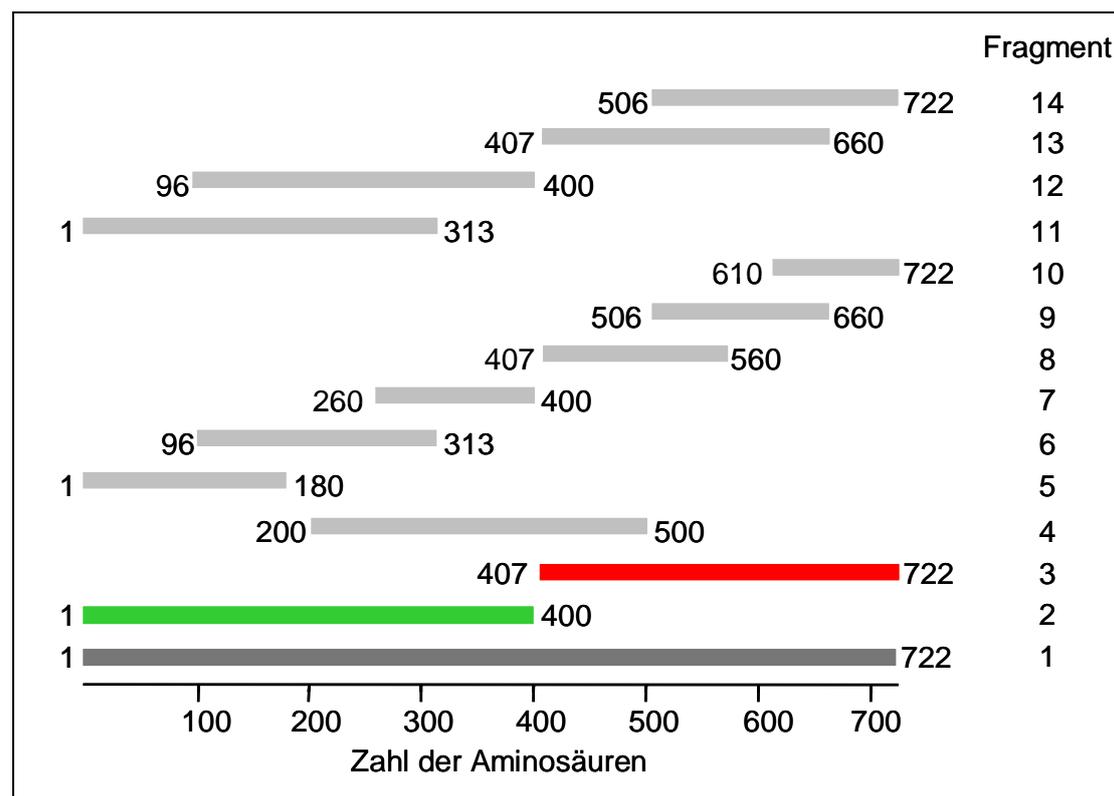


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fragmente der GNE, die im Y2H verwendet wurden.

Bei einem Y2H-System werden zwei Polypeptidketten als Fusionsproteine in Hefen exprimiert, die dann aufgrund ihrer Interaktion zur Expression von Reportergenen führen, die wiederum die Selektion der positiven Interaktion ermöglichen. Dabei wird

ein Fusionsprotein mit einer Aktivierungsdomäne (AD) und das andere mit einer DNA-bindenden Domäne (DNA-BD) exprimiert. Das DNA-BD-Fusionsprotein bindet an eine Erkennungssequenz upstream der Reportergene und nur die Interaktion mit dem AD-Fusionsprotein führt zur Transkription dieser Reportergene. Für dieses Experiment wurde die UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase sowie 13 verschiedene deletierte Varianten jeweils in den AD-Vektor (*prey*) bzw. DNA-BD-Vektor (*bait*) kloniert. Daraus resultieren 196 Kombinationen für eine Interaktionsmatrix, die in einem automatisierten Verfahren, in Kooperation mit Dr. U. Stelzl von der Arbeitsgruppe Prof. E. Wanker (MDC, Berlin), durchgeführt wurde. Dafür wurde jedes AD-Konstrukt in einen haploiden Hefestamm (MAT α) transferiert und jedes DNA-BD-Konstrukt in einen anderen haploiden Hefestamm (MATa) vom entgegengesetzten Paarungstyp. Beide Hefestämme wurden gemischt und eine Paarung der Stämme und daraus resultierende diploide Hefen durch Wachstum auf Selektionsmedium detektiert. Für die Durchführung des Screenings ist es sehr wichtig, dass sowohl *bait* als auch *prey* keine Autoaktivität besitzen, d.h. die Konstrukte dürfen zu keiner unspezifischen Aktivierung der Reportergene führen. Für diesen Test wurde zunächst das *bait*-Konstrukt allein bzw. *bait*-Konstrukt und *prey*-Plasmid (Leervektor) in Hefen transformiert und getestet, ob die Reportergene aktiviert wurden, denn das *bait*-Konstrukt darf nicht unspezifisch mit der AD-Domäne interagieren. Das gleiche gilt für das *prey*-Konstrukt. Es darf nicht unspezifische an BD binden. Deshalb wurde auch das *prey*-Konstrukt allein bzw. mit dem *bait*-Plasmid (Leervektor) in Hefen transformiert und auf Aktivierung der Reportergene getestet. Keines der 28 Konstrukte zeigte Autoaktivität, so dass alle Konstrukte für ein Screening eingesetzt werden konnten. Eine Interaktion/Oligomerisierung der Fusionsproteine in den Hefen wurde durch die Aktivierung von *HIS3*- und *URA3*-Reportergenen durch Wachstum auf Minimalmedium (Abb. 6 A) detektiert. Zusätzlich wurde simultan die Aktivität der *HIS3*, *URA3* und des *lacZ*-Reportergens in einem β -Galaktosidase-Assay (Abb. 6 B) untersucht.

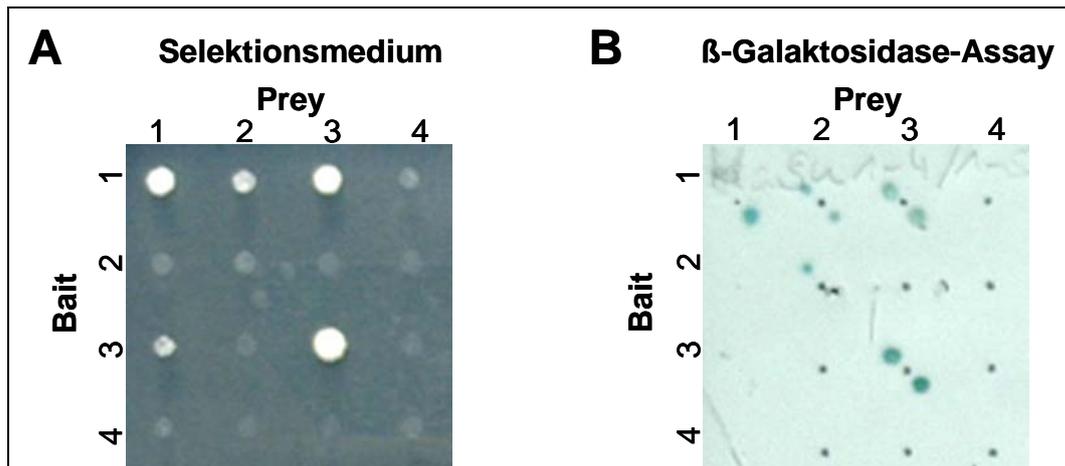


Abbildung 6: In A ist ein Ausschnitt aus der Selektionsplatte gezeigt. Die auf dem Selektionsmedium wachsenden Hefeklonen sind als weiße Kolonien erkennbar. In B ist ein Ausschnitt eines Filter-Lift-Assays dargestellt. Die positiven Klone, bei denen das *LacZ*-Gen (β -Galaktosidase) exprimiert wird, reagieren auf dem Filter mit dem Substrat X-Gal blau. Es wurden immer zwei gleiche Klone diagonal auf den Filter gestempelt.

In beiden Assays konnten nur zwischen den Konstrukten 1 (komplettes Protein), 2 (Epimerase-Domäne) und 3 (Kinase-Domäne) Interaktionen gefunden werden (Tabelle 1). Starke Interaktionen, die durch ein starkes Signal im β -Galaktosidase-Assay hindeuteten, wurden für alle Konstrukte gefunden, die die Kinase-Domäne in beiden Fusionsproteinen besaßen (1 vs. 1, 1 vs. 3, 3 vs. 1 and 3 vs. 3). Auf Selektionsmedium konnten auch schwache Interaktionen der Epimerase-Domäne (2) mit dem gesamten Enzym (1) bzw. mit der Kinase-Domäne (3) detektiert werden. Kleinere deletierte Varianten der GNE zeigten keine Interaktion im Y2H-Assay, was darauf hindeutet, dass jeweils die ganzen Domänen für die Interaktion benötigt werden.

Tabelle 1: Ausschnitt der Interaktionsmatrix der *bait*- bzw. *prey*-Konstrukte. Intensität der Interaktion basierend auf der positiven Blaufärbung im β -Galaktosidase-Assay. – keine Interaktion, -/+ sehr schwache Interaktion, + schwache Interaktion, ++ starke Interaktion, +++ sehr starke Interaktion.

<i>bait</i>	<i>prey</i>													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	++	-/+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.2 Identifizierung von GNE-interagierenden Proteinen

Versuche eine GNE-defiziente Maus (KO-Maus) zu generieren, zeigten frühe embryonale Lethalität bei diesen Mäusen (Schwarzkopf et al.). Dagegen waren die heterozygoten Mäuse überlebensfähig und zeigten keinerlei phänotypische Veränderungen. Dieses frühe Absterben der KO-Mäuse läßt vermuten, dass die Biosynthese von Sialinsäuren essentiell für die Embryogenese ist. Da aber eine Aufnahme von Silainsäuren über die Placenta auch wahrscheinlich ist, könnte theoretisch das Defizit an Sialinsäuren im Embryo durch die Mutter ausgeglichen werden. Trotzdem sterben KO-Mäuse an Tag 8,5. Die Vermutung liegt nahe, dass die GNE noch eine andere wichtige Rolle während der Entwicklung spielen könnte. Um das herauszufinden, wurde nach Interaktionspartnern der GNE gesucht. Zur Identifizierung noch unbekannter GNE-interagierender Proteine wurde ebenfalls das Y2H-System eingesetzt. Das Screening verlief dabei wie bereits beschrieben. Allerdings mit dem Unterschied, dass jeweils in den *prey*-Vektor 3600 cDNA-Fragmente einer humanen Genbank aus fötalem Hirn und 2000 full-length-ORFs kloniert wurden. Somit bestand die Möglichkeit eines vollautomatischen Screenings einer GNE-Protein Interaktionsmatrix von mehr als 5600 humanen Proteinen. Auch bei diesem Screening gab es Interaktionen nur mit den Konstrukten 1 (komplettes

Enzym), 2 (Epimerase-Domäne) und 3 (Kinase-Domäne), wobei 3 am besten funktionierte gefolgt von 1. Alle anderen deletierten Konstrukte zeigten keine Interaktion. *bait* 1 interagiert am stärksten mit den *preys* 299b (ZNF145) und 452b (RIF1), wohingegen *bait* 3 mit den *preys* 132a (CRMP1) und 419b (CRMP1) interagiert (Tabelle 2). Weiterhin fand auch eine Interaktion zwischen *bait* 3 und *prey* 16E09 (KIAA1549) statt. Die *preys* die bei diesem Screening gefunden wurden, sind so genannte *hubs*, d.h. sie sind in dem Netzwerk der Protein-Protein Interaktionsmatrix der AG Wanker als *preys* mit vielen Wechselwirkungen identifiziert worden (Stelz et al. 2005). Die Interaktion von *bait* 3 und CRMP1 konnte zweimal unabhängig voneinander mit leicht unterschiedlichen CRMP1-Klonen dargestellt werden (Tabelle 2). Die Klone im Y2H bestanden nicht aus dem kompletten CRMP1 Protein, was aus 572 Aminosäuren besteht. Im Y2H wurde nur ein C-terminaler Teil des Proteins exprimiert. Der Klon 132a beinhaltet die Aminosäuren 390-572 und Klon 419b schloß die Aminosäuren 345-572 ein. Auch das PLZF Protein wurde im Y2H nicht als komplettes Protein exprimiert, sondern ebenfalls nur ein C-Terminaler Teil von Aminosäure 380-673.

Tabelle 2: Interaktionspartner der GNE, die im Y2H identifiziert wurden. + schwache Interaktion, ++ starke Interaktion, AS-Aminosäuren

Bait	Prey-Klon (Protein)	Swiss-Prot.	SD- Medium	β-Galakt.- Assay	AS des Swiss-Prot.
1	299b (PLZF)	ZBT16_human	++	+	380-673
1	452b (RIF1)	RIF1_human	++	+	455-739
3	132a (CRMP1)	DPYL1_human	++	+	390-572
3	419b (CRMP1)	DPYL1_human	++	++	345-572
3	16E09 (KIAA1549)	Q5BJD6_human	++	+	1-110

2.3 Nachweis der Interaktion mittels immunchemischer Methoden

Die Ergebnisse des Y2H-Screenings sind erste Hinweise darauf, daß die GNE tatsächlich mit anderen Proteinen interagiert, jedoch sind weitere Methoden notwendig, um diese Interaktionen zu bestätigen. Dafür wurden Co-Immunpräzipitationen und *pull down*-Assays durchgeführt.

2.3.1 Spezifität des Anti-GNE-Antikörpers

In unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals ein Anti-GNE-Antikörper generiert. Dazu wurde humane GNE als Fusionsprotein mit His-Tag exprimiert und gereinigt und als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Der Antikörper wurde dann aus dem Kaninchenserum gereinigt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten mal dieser Antikörper in Assays eingesetzt. Zuerst wurde die Spezifität des Anti-GNE-Antikörpers überprüft, indem die GNE aus Cytosol von murinen WT- und KO-ES-Zellen präzipitiert wurde. Die KO-ES-Zellen sind GNE-defizient und dienen somit als sehr gute Negativkontrolle (Abb. 7 A). Es konnte im Immunoblot (IB) im Präzipitat der WT-ES-Zellen eine GNE-Bande (ca. 70 kDA) detektiert werden. Im KO-Präzipitat konnte dagegen erwartungsgemäß keine Bande dargestellt werden. Da die GNE nur sehr schwach in den Zellen exprimiert wird, konnte sie mittels direkten Immunoblot in Zellysaten nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurden HL60-Zellen mit GNE transfiziert, um zu überprüfen, ob überexprimierte GNE in Zellysaten detektierbar ist. Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass sowohl in Präzipitaten als auch in den Lysaten der transfizierten HL60-Zellen GNE detektierbar war (Abb. 7 B).

2.3.3 Überprüfung der Interaktion von GNE und PLZF mittels Co-Immunpräzipitation und GST-pull down

Das PLZF konnte nicht in den Präzipitaten der Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Interessanterweise war in den Lysaten der Zellen im Western-Blot nur eine ca. 50 kDa große Bande erkennbar (nicht dargestellt). Laut Antikörperhersteller und der Proteindatenbank SwissProt sollte die Proteinbande des PLZF jedoch zwischen 75 und 90 kDa groß sein. Auch in den als Positivkontrolle angegebenen HL60-Zellen konnte nur eine 50 kDa-Proteinbande detektiert werden.

Da die Interaktion der GNE und dem PLZF in der Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden konnte, wurde ein GST-pull down-Experiment durchgeführt. Dabei wurde PLZF als ein GST-Fusionsprotein (GST-PLZF) in Insektenzellen zusammen mit der GNE als His-Fusionsprotein (His-GNE) coexprimiert und anschließend über eine Glutathion-Säule präzipitiert. Das GST-Fusionsprotein sollte über seine Affinität zu Glutathion an die Säule binden. Interagiert die GNE mit dem PLZF, so kann auch dieses im Präzipitat mittels Antikörper nachgewiesen werden. In Abbildung 9 ist das Ergebnis des *pull down* dargestellt. Sowohl PLZF als auch GNE konnten im Immunoblot nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten in Insektenzellen coexprimiertes GST und His-GNE bzw. coexprimiertes GST-His und GST-PLZF. In beiden Kontrollen konnte keine GNE nachgewiesen werden (Abb. 9 B). Da GST in der Lage ist Dimere zu bilden, ist auch in der Kontrolle 3 (Coexpression von GST-PLZF und His-GST) PLZF nachweisbar (Abb. 9 A).

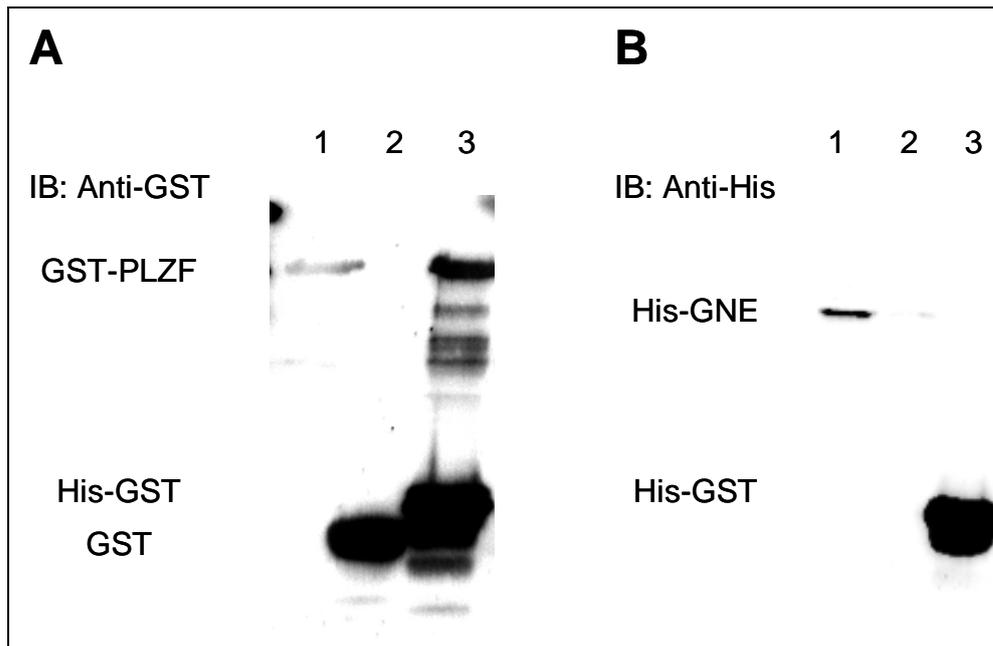


Abbildung 9: In A ist der Anti-GST-Immunoblot des GST-pull downs dargestellt. PLZF wurde als GST-Fusionsprotein (GST-PLZF) und die UDP-GlcNAc 2 Epimerase/ManNAc Kinase als His-Fusionsprotein (His-GNE) exprimiert. In B ist der Anti-His-Immunoblot des GST-pull downs dargestellt. 1-Coexpression von GST-PLZF und His-GNE, 2-Coexpression von His-GNE und His-GST, 3-Coexpression von GST-PLZF und His-GST.

2.3.4 Studien zu posttranslationalen Modifikationen der GNE

2003 konnten Xu et al. zeigen, dass die BTB/POZ-Domäne des PLZF an Cullin3 bindet. Cullin 3 ist eine so genannte E3-Ligase und ist innerhalb eines großen Proteinkomplexes (SCF-Komplex) an der Ubiquitinylierung von Substratproteinen beteiligt. Durch die Konjugation von mindestens 4 Ubiquitinen werden die Substratproteine dem Abbau über das Proteasom zugeführt. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von PLZF und der GNE zur Ubiquitinylierung des Proteins führt, wurden sowohl PC12-Zellen als auch HL60-Zellen mit einem Proteasom-Inhibitor (MG132) behandelt. Dabei wurde die Ubiquitinylierung der Proteine nicht gestört, sondern es wurde nur der Abbau über das Proteasom inhibiert, so dass eine Anreicherung ubiquitinylierter Proteine in der Zelle erfolgte (Abb. 10). Da endogene GNE in PC12- und HL60-Zellen nur sehr schwach exprimiert wurde, wurden die Zellen zuvor mit GNE transfiziert. Mittels Immunoblot wurde nach einem Größenshift der GNE-Proteinbande nach Behandlung mit dem Inhibitor gesucht. Die Spur des Blots wurde vertikal in zwei Hälften geschnitten, so dass exakt die gleiche

Probe mit zwei Antikörpern (Anti-GNE und Anti-Ubiquitin) entwickelt werden konnte. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen, die wie die transfizierten Zellen behandelt wurden. Würde die GNE monoubiquitinyliert werden, müsste ihr Molekulargewicht um 8,5 kDa steigen, bei 4 oder mehr konjugierten Ubiquitinen um 34 kDa oder mehr. Die Inhibition des Proteasoms war erfolgreich, was im Gegensatz zu den Kontrollen an der deutlich positiven Reaktion mit dem Anti-Ubiquitin-Antikörper im Immunoblot zu erkennen ist (Abb. 10). Diese Reaktion ist bei den Proben der transfizierten PC12-Zellen nicht so stark, weil nach der Transfektion weniger Zellen vorhanden waren und nur weniger Protein als bei den nicht transfizierten Zellen aufgetragen werden konnte. Trotzdem ist zu erkennen, dass im Immunoblot die Reaktion mit dem Anti-Ubiquitin-Antikörper in den Proben mit Inhibitor stärker ist als die der Kontrollen. Es konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen in den PC12-Zellen keine Ubiquitinylierung der GNE nachgewiesen werden. Der Immunoblot der HL60-Zellen ist nicht dargestellt, aber auch in diesem Zellsystem konnte keine Ubiquitinylierung der GNE gefunden werden.

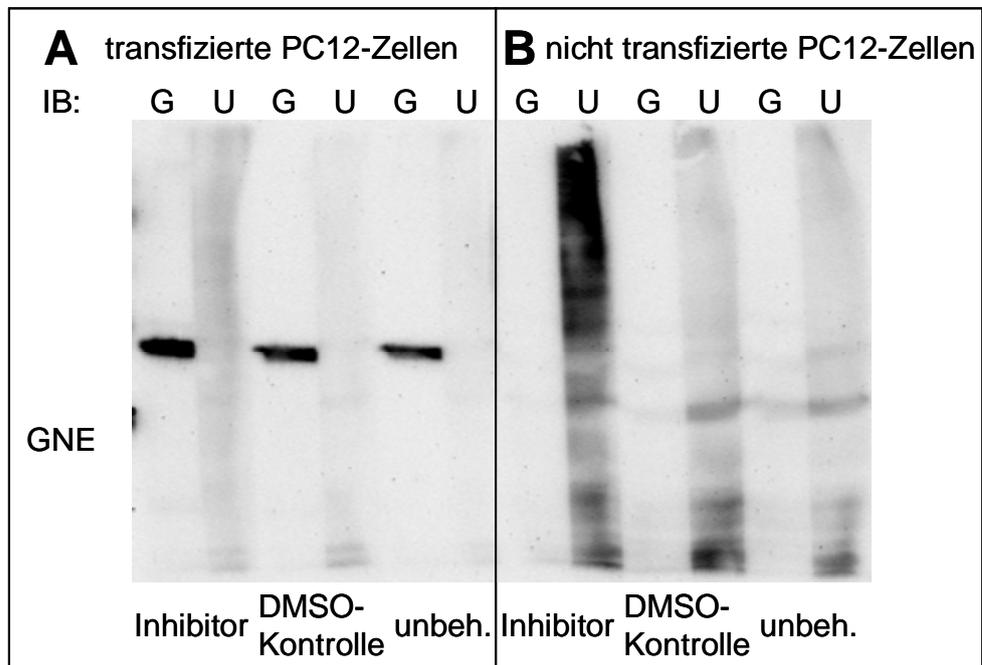


Abbildung 10: Gesamtzelllysate von PC12-Zellen wurden im Immunoblot auf einen Größenshift der GNE untersucht. Die PC12-Zellen wurden mit GNE transfiziert (A) als Kontrolle dienten nicht transfizierte (B) PC12-Zellen. G= Anti-GNE-Antikörper, U= Anti-Ubiquitin-Antikörper.

Außer Ubiquitin existieren weitere kleine Peptide, die posttranslational an Substratproteine gebunden werden und so ihre Funktion beeinflussen. Zu den kleinen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen zählt auch das SUMO (Small Ubiquitin like Modifier). SUMO wird ähnlich dem Ubiquitin durch mehrere enzymatische Schritte an Substratproteine gebunden und moduliert so die Funktion des Substratproteins. Im Gegensatz zur Ubiquitinylierung ist bei der SUMOylierung das Signal zur Modifikation des Proteins in der Proteinsequenz enthalten. In der Proteinsequenz der GNE der Ratte gibt es vier potentielle SUMOylierungsstellen, drei befinden sich sehr nahe dem N-Terminus des Proteins in der Epimerase-Domäne und eine befindet sich in der Kinase-Domäne (Tabelle 3).

Tabelle 3: Für den SUMOplot wurde die Proteinsequenz der GNE der Ratte verwendet. SUMOplot™ <http://abgent.com/doc/sumoplot>

Nummer	Position	Gruppe	Wahrscheinlichkeit
1	K33	PIMFG IKTE PAFPE	0,94
2	K103	DVLNR LKPD IMIVH	0,91
3	K94	VGLAL VKLP DVLNR	0,82
4	K427	VAIVS MKGE IVKKY	0,80

In mehreren Veröffentlichungen (Saitoh und Hinchey, 2000; Bossis und Melchior 2006) wurde gezeigt, dass durch oxidativen Stress die SUMOylierung von Proteinen gesteigert werden kann. Zu den transfizierten HL60-Zellen wurde nach 24 h 100 mM H₂O₂ gegeben, um oxidativen Stress auszulösen und so die SUMOylierung zu steigern. Im Immunoblot wurde dann wie bei den Ubiquitinylierungsversuchen nach einem Größenshift der GNE geschaut. Auch bei diesem Experiment konnte keine Modifikation der GNE mit SUMO nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

2.4 Isolierung muriner GNE-defizienter ES-Zellen

Schwarzkopf et al. (2002) haben gezeigt, dass es möglich ist, GNE-defiziente ES-Zellen aus Blastocysten zu isolieren und anschließend *in vitro* zu kultivieren. Möchte man GNE-defiziente (KO) ES-Zellen mit Wildtyp (WT) ES-Zellen vergleichen, so

müssen diese aus ein und derselben Maus isoliert werden. Da keine KO- und WT-ES-Zellen aus ein und derselben Maus zur Verfügung standen, wurden in dieser Arbeit neue ES-Zellen isoliert. Dazu wurden Mäuse, die bezüglich der GNE heterozygot waren, also nur ein funktionsfähiges Gen auf einem Allel besaßen, miteinander verpaart. Nach 3,5 Tagen wurden die Blastocysten aus den Mäusen isoliert und aus ihnen die ES-Zellen. Diese ES-Zellen wurden anschließend kultiviert und genotypisch charakterisiert. Nach der Mendelschen Verteilung sollte es möglich sein, sowohl WT, heterozygote (HZ) als auch KO-ES-Zellen aus den jeweiligen Blastocysten einer Maus zu isolieren. Da bei den KO-ES-Zellen das Gen der GNE durch ein Neomycinresistenzgen unterbrochen ist, kann man mit spezifischen Primern, die nur im WT-Allel bzw. nur im KO-Allel (in der Neomycinresistenz) ansetzen mittels PCR unterscheiden, welchem Genotyp die ES-Zellen zuzuordnen sind. Dazu wurde die genomische DNA aus den ES-Zellen isoliert und mittels PCR analysiert. Es wurden zwei Isolierungen durchgeführt (16.6. und 20.06.), wobei nicht aus allen Blastocysten die ES-Zellen erfolgreich isoliert werden konnten. In Abbildung 11 sind schematisch das WT- bzw. KO-Allel dargestellt sowie die PCR-Analyse der zweiten Isolierung (20.06.). Das Exon 2 der GNE ist im KO-Allel durch ein Neomycinresistenzgen unterbrochen. Für die PCR-Analyse wurden zwei unterschiedliche Primerkombinationen jeweils für das WT- bzw. KO-Allel gewählt. Werden KO-spezifische Primer verwendet, werden in der PCR mit WT-DNA keine Produkte amplifiziert, umgekehrt werden mit KO-DNA und WT-spezifischen Primern ebenfalls keine PCR-Produkte amplifiziert. Bei heterozygoten ES-Zellen amplifiziert man in beiden Fällen ein PCR-Produkt. Die zweite Isolierung (20.06.) ergab 5 ES-Zelllinien mit folgendem Genotyp: Zelllinie 4 und 11 WT, Zelllinie 10 HZ und Zelllinie 6 KO. Teilweise entstanden bei der PCR unspezifische Produkte, wenn die Primer nicht an der richtigen Stelle ansetzen konnten. Dies war der Fall bei den beiden WT-Zelllinien 4 und 11, als die PCR mit KO-spezifischen Primern durchgeführt wurde. Für weitere Experimente wurden die beiden Zelllinien 4 (WT) und 6 (KO) der zweiten Isolierung vom 20.06. ausgewählt.

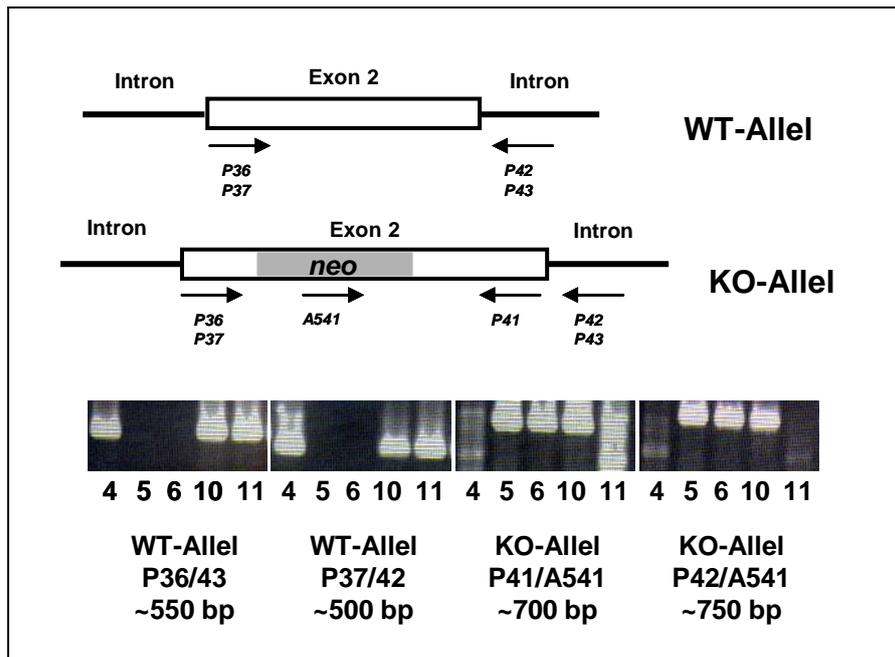


Abbildung 11: Genotypische Charakterisierung der ES-Zellen. Im oberen Teil der Abbildung sind schematisch WT- und KO-Allel dargestellt. Das Exon 2 der GNE ist im KO-Allel durch ein Neomycinresistenzgen unterbrochen. Die Primer P36 und P37 setzen jeweils am Anfang des Exon 2 an, die Primer P42 und P43 hinter dem Exon im Intron, der Primer 41 am Ende des Exon 2 und der Primer A541 in der Neomycinresistenz.

2.4.1 Pluripotenz der ES-Zellen

ES-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie in Kultur über einen gewissen Zeitraum pluripotent und in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen in fast alle Zelltypen zu differenzieren. Jedoch verlieren sie nach ca. 40 Passagen ihre Keimbahnfähigkeit und sie neigen zur Differenzierung. Deshalb ist es wichtig, während der Kultivierung der ES-Zellen diese auf ihre sogenannten Stammzellmarker zu überprüfen. Murine ES-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das Antigen SSEA-1, was spezifisch ist für pluripotente Zellen und nicht auf differenzierten Zellen zu finden ist. Des Weiteren exprimieren sie den Transkriptionsfaktor Oct-3/4, der ebenfalls nur in Stammzellen vorhanden ist, und sie zeigen eine erhöhte Aktivität der alkalische Phosphatase (AP). Die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-3/4 wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern konnte dann ein PCR-Fragment des Oct-3/4 amplifiziert werden. Als interner Standard wurde HPRT (Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyl-transferase) verwendet. In Abbildung 12 sind jeweils für WT und KO die RNA sowie die RT-PCR dargestellt.



Abbildung 12: RNA der ES-Zellen und RT-PCR. Für die Überprüfung der Oct-3/4 Expression wurde die RNA aus den ES-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Oct-3/4 spezifischen Primern wurde anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Für die Amplifizierung des internen Standards wurden HPRT-spezifische Primer verwendet.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) kann mit einem einfachen Farbassay nachgewiesen werden. Bei diesem Assay färben sich die Zellen rot, wenn sie eine hohe AP-Aktivität aufweisen. Als negative Kontrolle wurden differenzierte Keratinocyten verwendet, die sich nicht färbten. In Abbildung 13 ist das Ergebnis solch eines AP-Assays dargestellt. Die WT-ES-Zellen scheinen stärker gefärbt zu sein als die KO-ES-Zellen, dies liegt aber an der Dichte der Zellen, die an einigen Stellen etwas höher war als bei den KO-ES-Zellen.

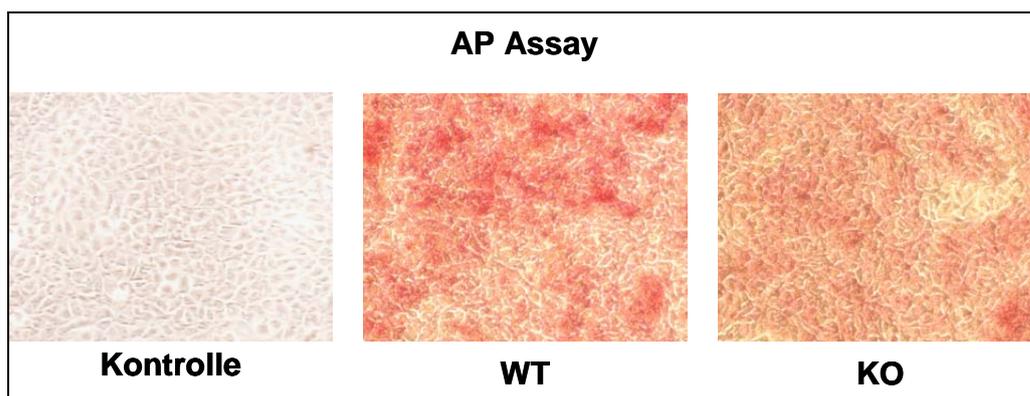


Abbildung 13: Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP) mittels Farbtest. Bei hoher AP-Aktivität färben sich die Zellen rot. Differenzierte Keratinocyten dienen als Negativ Kontrolle.

Die Expression des Oberflächenmarkers SSEA-1 wurde mittels FACS-Analyse und einem spezifischen Anti-SSEA-1-Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 14 ist beispielhaft solch eine Analyse dargestellt. Sowohl WT- als auch KO-ES-Zellen

zeigen eine deutliche SSEA-1-Expression auf ihrer Zelloberfläche. Dazu wurden die lebenden Zellen mit einem Anti-SSEA-1-Antikörper inkubiert. Mit einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt ist und an den primären Antikörper bindet, konnte die Fluoreszenz im FACS gemessen werden.

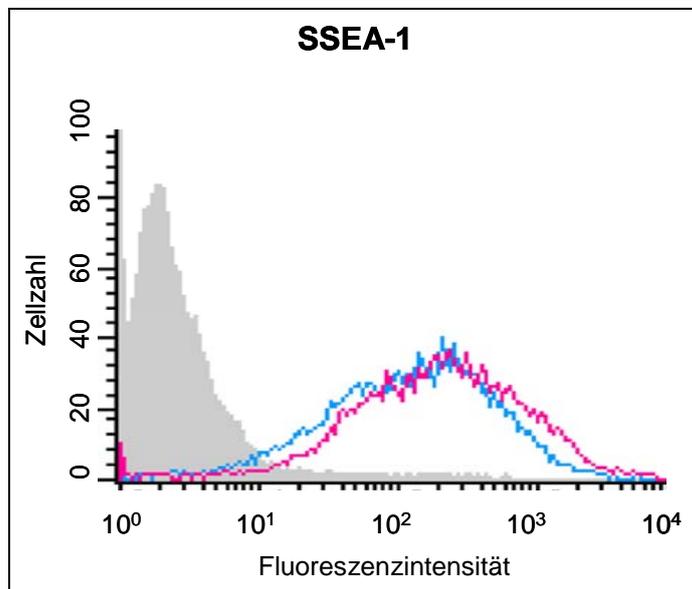


Abbildung 14: FACS-Analyse der ES-Zellen mit einem spezifischen Anti-SSEA-1-Antikörper. WT- und KO-ES-Zellen exprimieren etwa gleich gut das SSEA-1-Antigen auf ihrer Oberfläche. WT FCS —, KO FCS —, Kontrolle ■.

2.5 Charakterisierung muriner GNE-defizienter ES-Zellen

2.5.1 UDP-GlcNAc 2-Epimerase-Aktivität

Mit Hilfe eines radioaktiven Enzymtests wurde die Epimerase-Aktivität in den Zelllysaten der ES-Zellen gemessen. Indem den Lysaten radioaktiv markiertes Substrat (UDP-¹⁴C-GlcNAc) zugesetzt wurde und das entstandene Produkt von den anderen Komponenten mittels Papierchromatographie abgetrennt wurde und anschließend die Radioaktivität des Produktes bestimmt wurde, konnte daraus die Aktivität der Epimerase berechnet werden (Abb. 15). Da die KO-ES-Zellen keine funktionsfähige GNE exprimieren, entsprach auch die Aktivität im Assay der Hintergrund-Aktivität dieses Tests (ca. 5-10 μ U/mg Protein). Die WT-ES-Zellen hingegen zeigten deutliche Epimerase-Aktivität (bis ca. 60 μ U/mg Protein). Die ES-

Zellen wurden zusätzlich in einem so genannten Serumersatzmedium, bei dem das FCS durch ein Serum-Replacement (SR) ersetzt wurde, kultiviert. Dieses SR besitzt im Gegensatz zum FCS nur sehr wenig gebundene Sialinsäuren. Freie Sialinsäuren sind im FCS als auch im SR nicht detektierbar. Die spezifische Aktivität der Epimerase war in WT-ES-Zellen, die in Serumersatzmedium kultiviert wurden, um ca. 10 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein höher als im FCS-haltigem Medium.

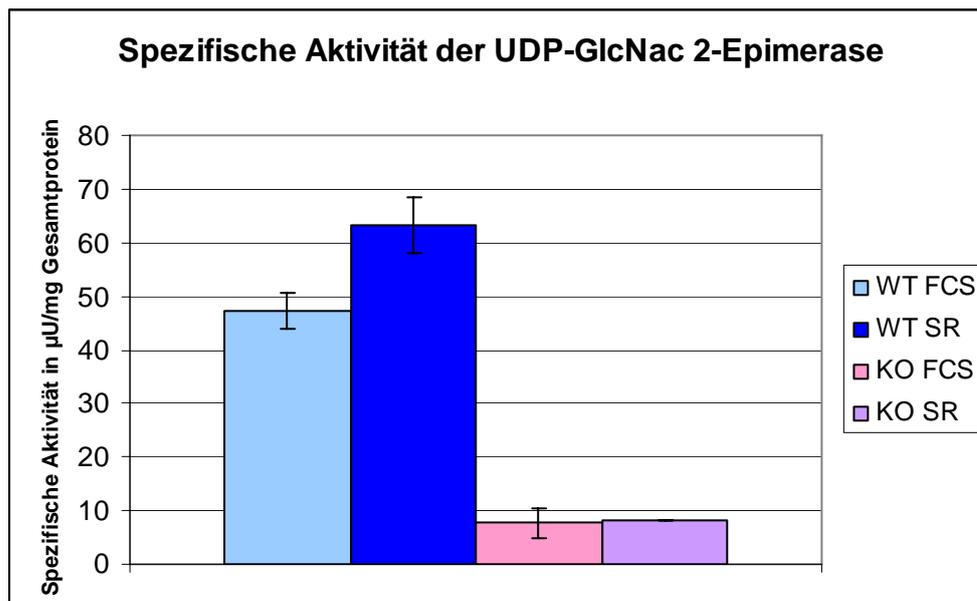


Abbildung 15: Diagramm zur Darstellung der spezifischen Epimerase-Aktivität in WT- und KO-ES-Zellen. Die Zellen wurden sowohl in serumhaltigem (FCS) Medium als auch in Serumersatzmedium (SR) kultiviert. Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Gesamtprotein dargestellt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Messungen durchgeführt.

2.5.2 Vergleich der Gesamtsialylierung von WT- und KO-ES-Zellen mittels Periodat-Resorcinol-Assay

Dann wurden die ES-Zellen auf ihren Sialinsäuregehalt untersucht. Dazu wurden die Zellen ebenfalls wieder in serumhaltigem Medium und Serumersatzmedium kultiviert. Für die Untersuchung wurden Gesamtzelllysate verwendet, um alle Sialinsäuren (freie und gebundene des Cytoplasmas und an Glykokonjugate der Membranen gebundene Sialinsäuren) zu erfassen. Es wurden für jede einzelne Messung jeweils 2 Millionen Zellen verwendet. Im ersten Schritt wurden die Sialinsäuren zunächst mit Periodat oxidiert und reagierten dann mit dem Resorcinol-

Reagenz zu einem blauen Farbstoff. Dieser Farbstoff konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen werden. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Sialinsäurekonzentration. Erwartungsgemäß besaßen die WT-ES-Zellen mehr Sialinsäuren als die KO-ES-Zellen (Abb. 16). Die in verschiedenen Medien kultivierten WT-ES-Zellen zeigten keinerlei Unterschied in ihrer Sialinsäurekonzentration. Dagegen zeigten die in serumhaltigen Medium (FCS) kultivierten KO-ES-Zellen im Vergleich zum WT eine signifikante Abnahme der Sialinsäuren. Jedoch enthielten KO-ES-Zellen, die in Serumersatzmedium (SR) kultiviert wurden weniger Sialinsäuren, als KO-ES-Zellen, die in serumhaltigen Medium (FCS) inkubiert wurden.

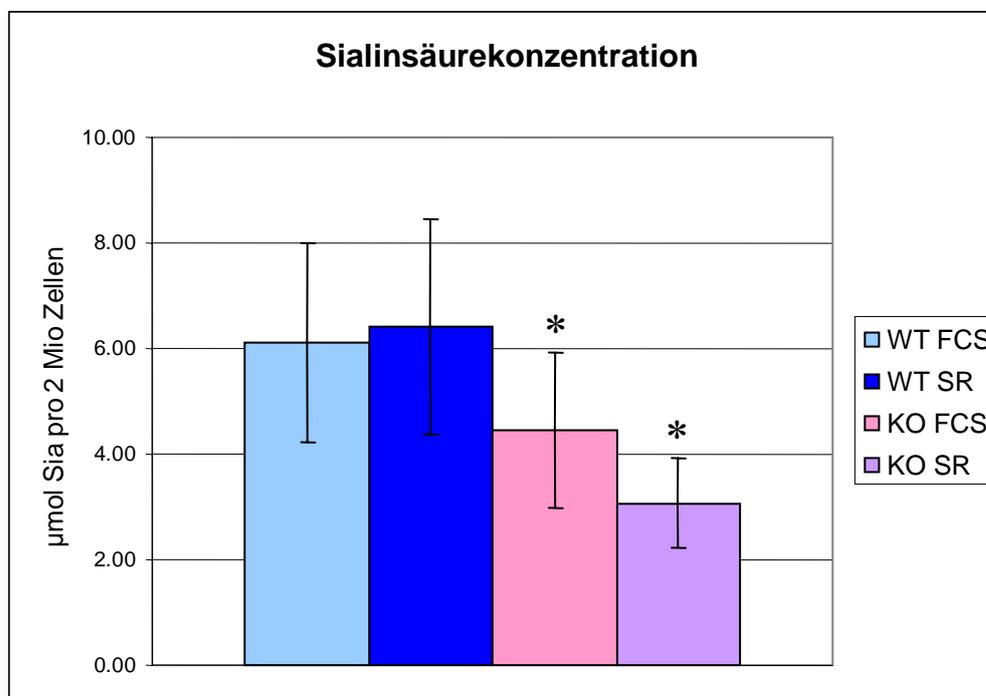


Abbildung 16: Diagramm zur Darstellung des Gesamtsialinsäuregehalts von WT- und KO-ES-Zellen. Die Zellen wurden in serumhaltigem Medium (FCS) und Serumersatzmedium (SR) kultiviert. Für den Assay wurden jeweils 2 Millionen Zellen verwendet. Die Sialinsäurekonzentration ist in μmol Sialinsäuren pro 2 Millionen Zellen dargestellt. Die Anzahl der Stichproben der WT-ES-Zellen betrug $n=12$ und die der KO-ES-Zellen $n=9$. Die Unterschiede zwischen den WT-ES-Zellen in serumhaltigen Medium und KO-ES-Zellen in serumhaltigen sowie Serumersatzmedium sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (*) signifikant verschieden (t-Test).

2.5.3 Supplementierung der KO-ES-Zellen mit *N*-Acetylmannosamin

Sialinsäuren sowie der Vorläufer ManNAc können von den Zellen aufgenommen werden und für die Sialylierung ihrer Glykokonjugate verwendet werden. Um zu ermitteln, ob durch die Gabe des Sialinsäurevorläufers ManNAc eine Steigerung des Sialinsäuregehalts in den KO-ES-Zellen erreicht werden kann, wurden diese mit unterschiedlichen ManNAc-Konzentrationen für 2 Tage inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen 1 und 3 mM ManNAc ausreichen, um einen Sialinsäuregehalt vergleichbar mit dem der WT-ES-Zellen zu erreichen (Abb. 17).

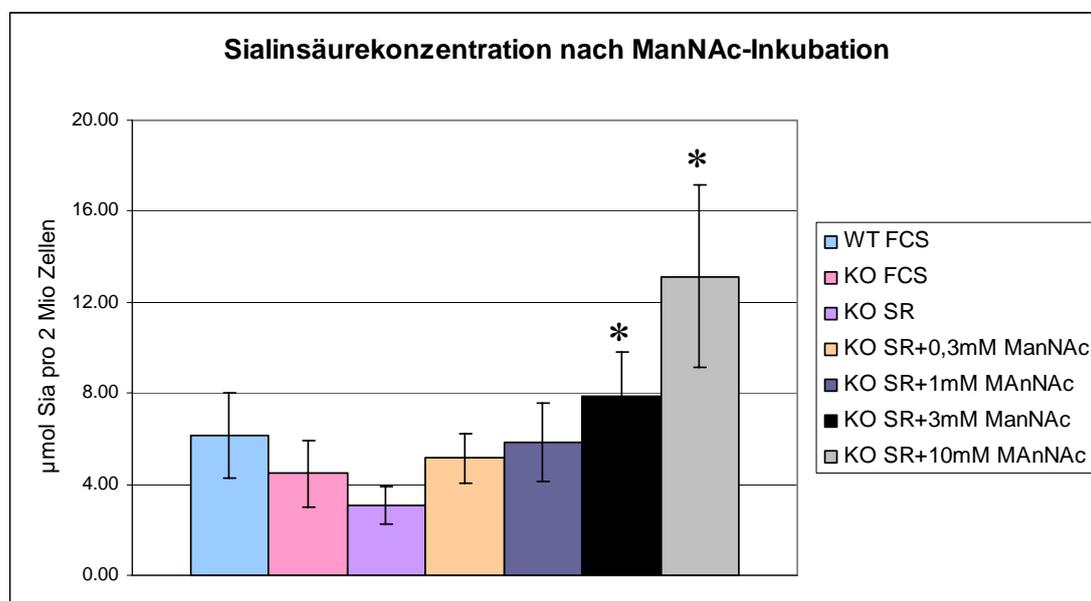


Abbildung 17: Diagramm zur Darstellung des Gesamtsialinsäuregehalts von WT- und KO-ES-Zellen. Die Zellen wurden in serumhaltigem Medium (FCS), Serumersatzmedium (SR) bzw. Serumersatzmedium mit ManNAc (SR + ManNAc) kultiviert. Für den Assay wurden jeweils 2 Millionen Zellen verwendet. Die Sialinsäurekonzentration ist in μmol Sialinsäuren pro 2 Millionen Zellen dargestellt. Die Anzahl der Stichproben der WT-ES-Zellen betrug $n=12$ und die der KO-ES-Zellen $n=9$. Die Unterschiede zwischen KO-ES-Zellen in SR-Medium und den KO-ES-Zellen SR-Medium mit 3 mM bzw. 10 mM ManNAc sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (*) signifikant verschieden (t-Test).

Anhand einer Eichgeraden konnte genau berechnet werden, wie viel Sialinsäuren pro Zelle vorhanden waren (Tab. 4). Die WT-ES-Zellen besaßen durchschnittlich ca. 3 pmol Sialinsäuren pro Zelle. Die KO-ES-Zellen, die in serumhaltigen Medium kultiviert wurden, besaßen nur etwa 70 % Sialinsäuren im Vergleich zum WT und die KO-ES-Zellen, die in dem Serumersatzmedium kultiviert wurden, sogar nur noch die

Hälfte. Mit Applikation unterschiedlicher Konzentrationen des Sialinsäurevorläufers ManNAc konnte der Gesamtsialinsäuregehalt auch in den KO-ES-Zellen sukzessiv gesteigert werden. Die Inkubation der Zellen mit 10 mM ManNAc führte sogar zu einer mehr als 200 %igen Steigerung im Sialinsäuregehalt im Vergleich zu den WT-Zellen. Zusammenfassend sind alle Daten in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Resorcinol-Assays zur Bestimmung der Sialinsäurekonzentration. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in serumhaltigen Medium (FCS), in Serumersatzmedium (SR) bzw. in Serumersatzmedium mit unterschiedlichen ManNAc-Konzentrationen (SR+ManNAc). Für den Assay wurden jeweils 2 Millionen Zellen verwendet.

Sialinsäure- konzentration	WT	WT	KO	KO	KO			
	FCS	SR	FCS	SR	SR + ManNAc			
					0,3 mM	1 mM	3 mM	10 mM
pmol/Zelle	3,06	3,21	2,23	1,53	2,57	2,92	3,93	6,57
Prozent	100	105	73	50	84	95	129	215

2.5.4 Analyse der Oberflächensialylierung mittels FACS

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die aufgenommenen Sialinsäuren auch in die Oberflächenglykokonjugate eingebaut werden. Die Änderung der Oberflächensialylierung nach ManNAc-Supplementierung wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Dazu wurden das Lektin von der Gartenschnecke *Limax flavus* (LFA), welches Sialinsäuren erkennt, und ein Anti-SiaLe^x Antikörper verwendet. In Abbildung 18 ist exemplarisch jeweils für LFA als auch für Anti-SiaLe^x eine solche FACS-Analyse dargestellt. Es wurden mindestens drei unabhängige Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen mit dem Lektin LFA zeigten, dass die in serumhaltigen und in Serumersatzmedium kultivierten WT-ES-Zellen keine Unterschiede in ihrer Oberflächensialylierung aufwiesen. Dagegen zeigten die KO-ES-Zellen, wie erwartet eine geringere Oberflächensialylierung als die WT-ES-Zellen. Die KO-ES-Zellen aus dem serumhaltigem Medium wiesen eine höhere Sialylierung als die KO-ES-Zellen in Serumersatzmedium auf (Abbildung 18 linkes oberes Bild). Nach Supplementierung mit 3 mM bzw. 10 mM ManNAc ist eine deutliche Zunahme der Oberflächensialylierung nachweisbar (Abbildung 18 rechtes

oberes Bild). Die gleichen Analysen wurden auch mit einem Anti-SiaLe^x-Antikörper (KM93) durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt spezifisch die Struktur Siaα2→3Galβ1→4[Fuc α1→3]GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1-Ceramid (Dohi et al. 1993). Auf KO-ES-Zellen, die in Serumersatzmedium kultiviert wurden, konnte kein SiaLe^x nachgewiesen werden. In serumhaltigen Medium war annähernd gleich viel SiaLe^x auf der Zelloberfläche von WT- und KO-ES-Zellen meßbar (Abbildung 18 linkes unteres Bild). Auch in diesem Experiment konnte die Oberflächenexpression von SiaLe^x durch ManNac-Supplementierung gesteigert werden (Abbildung 18 rechtes unteres Bild). Die Expression von SiaLe^x war sowohl auf WT- als auch auf KO-ES-Zellen gering.

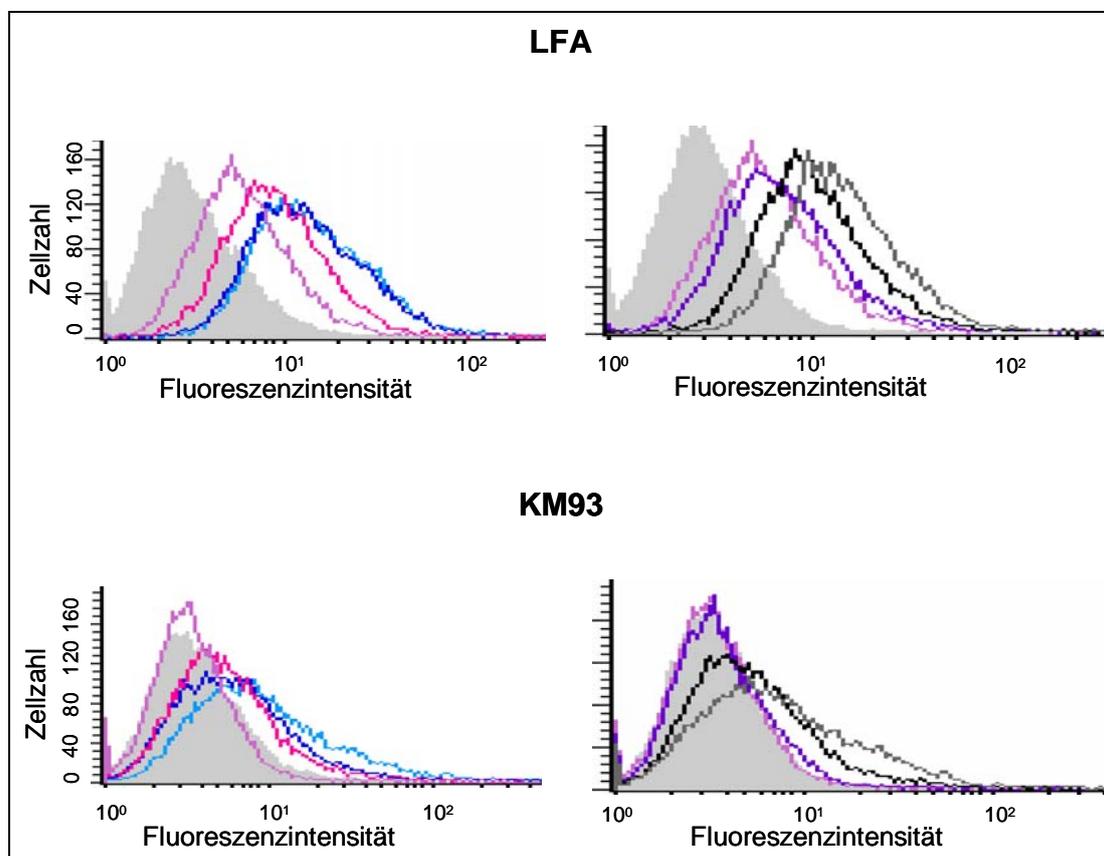


Abbildung 18: FACS-Analyse der ES-Zellen. Die Analyse wurde jeweils mit dem Lektin LFA (oben) und einem Anti-SiaLe^x Antikörper (unten) durchgeführt. Links ist jeweils die Analyse von WT- und KO-ES-Zellen in serumhaltigen sowie in Serumersatzmedium dargestellt. Rechts ist die Analyse von KO-ES-Zellen in Serumersatzmedium nach ManNac-Supplementierung dargestellt. WT FCS —, WT SR —, KO FCS —, KO SR —, KO SR + 1 mM ManNac —, KO SR + 3 mM ManNac —, KO SR + 10 mM ManNac —, Kontrolle ■.

2.5.5 Proliferation von WT und KO ES-Zellen

Die Proliferation der Zellen der inneren Zellmasse einer Blastocyste ist während der Entwicklung von großer Bedeutung. Nach der Implantation der Blastocyste in die Gebärmutter proliferieren diese zunächst stark, bevor sie anschließend mit der Differenzierung beginnen. Da nicht genau geklärt werden konnte, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung (an oder vor E8,5) die Embryonen der KO-Mäuse abstarben, wurde die Proliferation der ES-Zellen untersucht, um herauszufinden, ob das Fehlen der GNE eine veränderte Proliferation verursachen und somit zum Absterben der Embryonen führen könnte. In Abbildung 19 ist die Proliferation der WT- und KO-ES-Zellen in serumhaltigem Medium dargestellt. Die Proliferation wurde mittels eines sogenannten BrdU-Assays gemessen, wobei der Einbau des Pyrimidinanalogs in die DNA mit einem POD-konjugierten Anti-BrdU-Antikörpers in einem ELISA-Reader (Absorption bei 405 nm) sichtbar gemacht und quantifiziert werden konnte. Die Intensität des Farbstoffs, der bei der Peroxidase-Reaktion entsteht, ist proportional zum Einbau des BrdU in die proliferierenden Zellen. Die Zellen wurden dabei zunächst für 24 h in verschiedenen Medien kultiviert. Danach wurde das BrdU zugesetzt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert, bevor der Assay gestopt wurde. Da die Zugabe von Zucker in hohen Konzentrationen zur Veränderung der Osmolarität des Mediums führt, wurden zur Kontrolle jeweils 3 mM ManNAc bzw. GlcNAc dem Medium zugesetzt. Zwischen WT- und KO-ES-Zellen waren keine Unterschiede in der Proliferation messbar. Durch die Zugabe von ManNAc bzw. GlcNAc nahm die Proliferation geringfügig ab, im Vergleich zum Medium ohne Zusatz von ManNAc oder GlcNAc, jedoch war auch hier die Proliferation von WT- und KO-ES-Zellen gleich.

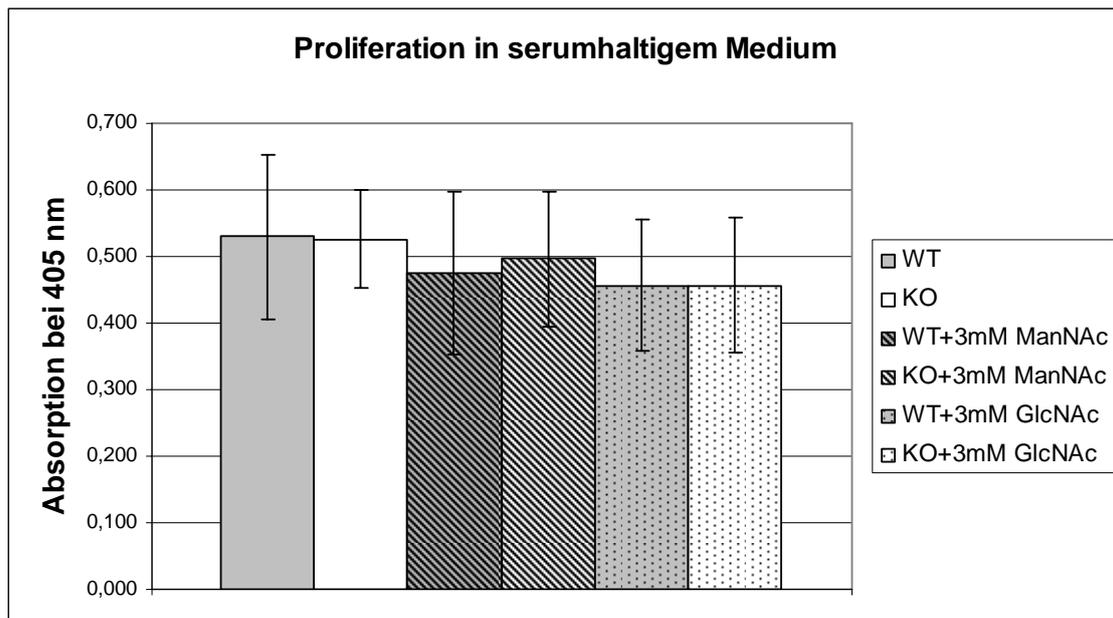


Abbildung 19: Proliferation von WT- und KO-ES-Zellen in serumhaltigen Medium. Dem Medium wurden jeweils 3 mM ManNAc bzw. GlcNAc zugesetzt. Es konnte kein Unterschied in der Proliferation zwischen WT und KO ES-Zellen gemessen werden. Die Anzahl der Stichproben betrug n=40.

Da in serumhaltigem Medium kein Unterschied zwischen WT- und KO-ES-Zellen gemessen werden konnte, wurde anschließend die Proliferation in Serumersatzmedium untersucht. Fehlende Sialylierung können die ES-Zellen über die Aufnahme von Sialinsäuren aus dem Medium wieder ausgleichen, deshalb wurden dem Serumersatzmedium verschiedene ManNAc-Konzentrationen zugesetzt. Als Kontrolle diente auch hier Serumersatzmedium, das mit 3 mM GlcNAc supplementiert war. Die Proliferation der ES-Zellen in Serumersatzmedium ist in Abbildung 20 dargestellt. Auch bei diesem Experiment konnten keine Unterschiede zwischen WT- und KO-ES-Zellen gemessen werden. Eine leichte Abnahme der Proliferation war auch diesmal mit ManNAc bzw. GlcNAc nachweisbar, jedoch zeigte der Vergleich von WT- und KO-ES-Zellen keine Unterschiede in der Proliferation.

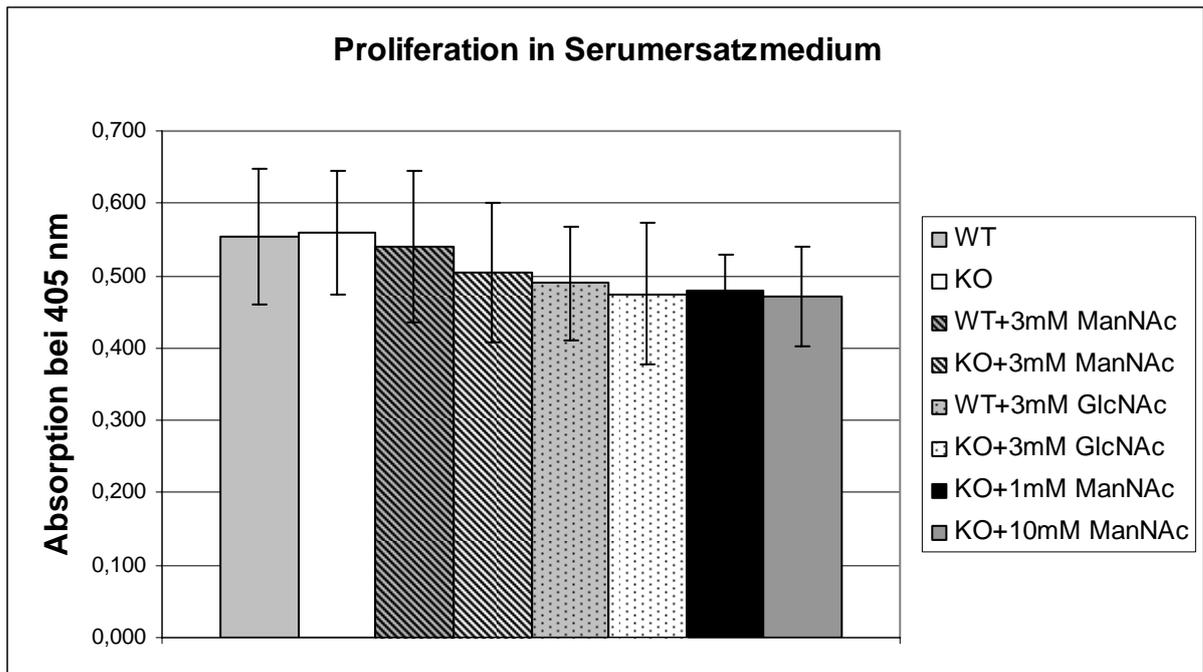


Abbildung 20: Proliferation von WT- und KO-ES-Zellen in Serumersatzmedium. Dem Medium wurden verschiedene ManNAc-Konzentrationen bzw. 3 mM GlcNAc zugesetzt. Es konnte kein Unterschied in der Proliferation zwischen WT und KO ES-Zellen gemessen werden. Die Anzahl der Stichproben betrug n=24.