

Aus der Abteilung Biochemie II
(ehem. Leiter: Prof. em. Dr. med. K. von Figura)

im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Herstellung zweier Gene-Targeting-Vektoren
zur Generierung von Mausmodellen für CDG-Ia
mit den Mutationen F115L und R137H im *PMM2*-Gen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan Rindermann

aus

Göttingen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. em. Dr. med. von Figura

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dr. med. Steinfeld

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlicher Prüfung: 12. Dezember 2012

1	Einleitung	5
1.1	Glykosylierung von Proteinen	5
1.2	Biosynthese der Glykoproteine	5
1.3	Defekte der N-Glykosylierung	9
1.4	CDG-Ia	14
1.4.1	Klinische Präsentation der CDG-Ia-Patienten	14
1.4.2	Biochemie und Genetik von CDG-Ia	16
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	EDV	20
2.1.3	Verbrauchsmaterial	21
2.1.4	Chemikalien	22
2.1.5	Puffer und Stammlösungen	23
2.1.6	Medien zur Anzucht prokaryontischer Zellen	23
2.1.7	Zellkulturmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	24
2.1.8	Enzyme, Standards und Antibiotika	24
2.1.9	Oligonukleotide	25
2.1.10	Kits zur Bearbeitung von DNA	25
2.1.11	Radioaktive Substanzen	25
2.1.12	Vektoren	26
2.1.13	Bakterienstämme	26
2.1.14	Embryonale Stammzellen	26
2.1.15	Embryonale Mausfibroblasten (Feeder)	26
2.1.16	Mausstämme	26
2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1	Genmanipulation	27
2.2.1.1	„gene targeting“ durch homologe Rekombination in murinen ES-Zellen	28
2.2.1.2	Knock-Out-Maus	29
2.2.1.3	Hypomorphes Mausmodell	29
2.2.2	Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie	30
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
2.2.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	32
2.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.7	Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor	33
2.2.8	Amplifikation von Plasmid-DNA im Prokaryontensystem	34
2.2.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	34
2.2.8.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung	35
2.2.8.3	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien	35
2.2.8.4	Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien	36
2.2.9	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen	37
2.2.10	Präzipitation von DNA mit Ethanol	38
2.2.11	Markierung einer DNA-Sonde mit α -[³² P]dCTP	38
2.2.12	Transfer von DNA auf Hybond N-Filter (Southern-Blot)	38
2.2.13	Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten Sonden	40
2.2.14	Polymerase-Ketten-Reaktion	41
2.2.14.1	Primer-Design	41
2.2.14.2	Standard-PCR	42
2.2.14.3	PCR mit dem AccuPrime™-Taq-DNA-Polymerase-System und dem HotStar-Taq-DNA-Polymerase-System	43

2.2.14.4	<i>In-vitro</i> -Mutagenese mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.....	43
2.2.15	Sequenzierung von DNA	44
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	45
2.3.1	Gelatinisieren der Flaschen und Platten	45
2.3.2	Trypsinieren von Zellen.....	45
2.3.3	Präparation von primären Neo-resistenten Fibroblasten.....	45
2.3.4	Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten	46
2.3.5	Kultivierung von embryonalen Stammzellen	46
2.3.6	Kryokonservierung von Zellen.....	48
2.3.7	Revitalisierung von Zellen	48
2.3.8	DNA-Transfer in ES-Zellen durch Elektroporation.....	48
2.3.9	Selektion von ES-Zell-Klonen nach Elektroporation.....	49
2.3.10	Isolierung von ES-Zell-Einzelklonen	49
2.3.11	Ausschneiden der geflochten Neo-Kassette	50
2.3.12	Vorbereitung von ES-Zellen für die Mikroinjektion	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Generierung der Gene-Targeting-Vektoren (GTV)	51
3.1.1	Integration der Neo-Kassette.....	51
3.1.2	Einbringen der Mutation F115L bzw. R137H.....	55
3.1.3	Zusammenfügen der Fragmente für GTV-F115L und GTV-R137H.....	56
3.1.4	Vorbereitung der zwei GTV zur Elektroporation	59
3.2	Homologe Rekombination in ES-Zellen.....	60
3.2.1	Elektroporation der ES-Zellen.....	60
3.2.2	Southern-Blot-Analyse der selektierten Klone.....	60
3.3	Mikroinjektion der ES-Zellen	65
4	Diskussion.....	66
4.1	CDG-Ia	66
4.2	Therapieansätze	67
4.3	Pmm2-Knock-Out.....	68
4.4	Mutation R141H und F119L	69
4.5	Effizienz der Transfektionen.....	71
4.6	Isoenzym PMM1	71
5	Zusammenfassung und Ausblick	73
6	Anhang.....	75
6.1	Abkürzungsverzeichnis	75
6.2	Primer-Sequenzen	78
7	Literaturverzeichnis.....	80

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung von Proteinen

Neben Genom und Proteom nimmt das Glykom, die Gesamtheit der Zuckerstrukturen eines Organismus, eine immer wichtiger werdende Rolle im Verständnis der molekularen Biochemie ein. Je nach Spezies ist das Glykom 10 bis 10^4 mal größer als das gesamte Proteom (Freeze, 2006).

Ein großer Teil dieser Zuckerstrukturen wird durch Glykoproteine gestellt. Die Glykosylierung von Proteinen stellt eine der häufigsten co- und posttranslationalen Proteinmodifikationen dar (Spiro, 1973). Glykoproteine kommen sowohl in eukaryontischen Zellen, als auch in Archaeobakterien und Viren vor. Überwiegend handelt es sich um sezernierte Proteine und Membranproteine. Beispielhaft hierfür sind Immunglobuline, Transportmoleküle, Enzyme und Hormone. Viele komplexe Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden von glykosylierten Strukturproteinen wie Kollagen und Rezeptoren vermittelt. Dabei sind die Kohlenhydratseitenketten essentiell für die korrekte Faltung, Löslichkeit und Proteaseresistenz und damit für die biologische Aktivität der Proteine. Zudem sind sie mitverantwortlich für den intra- und interzellulären Transport von Proteinen (Varki, 1993). Ihre Relevanz zeigen Oligosaccharidseitenketten bei interzellulären Prozessen wie der Fertilisation (Gabijs, 1987), der Embryogenese (Lennarz, 1993) und der Zelladhäsion. In den letzten Jahren hat das medizinische Interesse an der Proteinglykosylierung sowohl durch Beobachtungen der veränderten Glykan-Expression auf Krebszellen während des Vorgangs der Transformation (Fukuda, 1996) als auch durch Identifizierung immer neuer vererbter Glykosylierungsdefekte beim Menschen stark zugenommen.

1.2 Biosynthese der Glykoproteine

Die primären Schritte der Glykoproteinbiosynthese im ER stellen einen hoch konservierten Vorgang dar (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die Synthese beginnt mit der Bereitstellung Nukleotid-aktiverter Zucker im Zytosol. Die Synthesewege

dieser Zucker sind eng miteinander verknüpft (Kean, 1991). Bis auf die CMP-Sialinsäure, die im Zellkern synthetisiert wird (Münster et al., 1998), werden die restlichen Zucker wie z.B. GDP-Mannose (GDP-Man), GDP-Fucose, UDP-Galaktose, UDP-Glukose (UDP-Glc) im Zytoplasma generiert. Zunächst wird UDP-aktiviertes N-Acetylglukosamin auf ein phosphoryliertes Dolichol übertragen, welches als Lipid-Anker in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist (Abb.:1). Diese UMP freisetzende Reaktion findet auf der zytosolischen Seite des ER mit Hilfe der UDP-GlcNAc:GlcNAc-1-Phosphotransferase statt. Darauf wird ein zweiter N-Acetylglukosaminrest (GlcNAc) gebunden (Dol-P-P-GlcNAc₂). Nachfolgend werden schrittweise fünf Mannosereste vom Donor GDP-Mannose auf Dol-P-P-GlcNAc₂ übertragen, so dass ein biantennärer Man₅-GlcNAc₂-P-P-Dol-Komplex entsteht. Die weitere Assemblierung des Oligosaccharides geschieht innerhalb des ER. Eine sogenannte "Flippase" (Rft1) überführt das Intermediat in das Lumen des ER (Helenius et al., 2002). Vier weitere Mannose- und drei Glukosereste werden nun nacheinander durch spezifische Mannosyl- und Glukosyltransferasen auf das lipidverknüpfte Oligosaccharid bis zur vollständigen Struktur Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃ übertragen. Die Mannosereste werden dazu zuvor im Zytoplasma von GDP-Mannose auf Dolichol-Phosphat transferiert und an diesem Lipidcarrier (LEC35 protein) ins Lumen des ER transportiert. Die Glukosereste gelangen über einen vergleichbaren Mechanismus in das Lumen, nachdem sie von UDP-Glukose auf Dolichol-Phosphat übertragen worden sind (Hirschberg et al., 1998; Anand et al., 2001).

Im Anschluss erfolgt die cotranslationale covalente Übertragung des vollständigen GlcNAc₂Man₉Glc₃-Oligosaccharids unter Freisetzung von Dolicholpyrophosphat auf ein naszierendes Protein. Dieser Schritt wird durch einen Oligosaccharyltransferase-Komplex katalysiert, der die Amidgruppen von Asn-Resten in der Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr (wobei X jede beliebige Aminosäure außer Pro und Asp repräsentiert) als unmittelbaren Akzeptor nutzt.

Noch im Lumen des ERs setzen sogenannte „Trimming“-Schritte durch die Glukosidasen I und II ein, die die drei terminalen Glukosereste abspalten und Teile der Protein-Qualitätskontrolle sind. Die korrekte Faltung des Glykoproteins wird durch ein Wechselspiel zwischen der UDP-Glukose-Glykoproteintransferase und dem ER-ständigen membrangebundenen Chaperon Calnexin mit seinem löslichen

Homologon Calreticulin sowie der α II-Glukosyltransferase kontrolliert (Tatu und Helenius, 1997). Eine α -Mannosidase entfernt einen ersten Man-Rest des Glykoproteins, bevor es als Dol-P-P-GlcNAc₂-Man₈ vesikulär zum Golgi weiter transportiert wird. Im Golgi folgen weitere Strukturveränderungen. Andere α -Mannosidasen verkürzen das Oligosaccharid zum Man₅-GlcNAc₂-Rest.

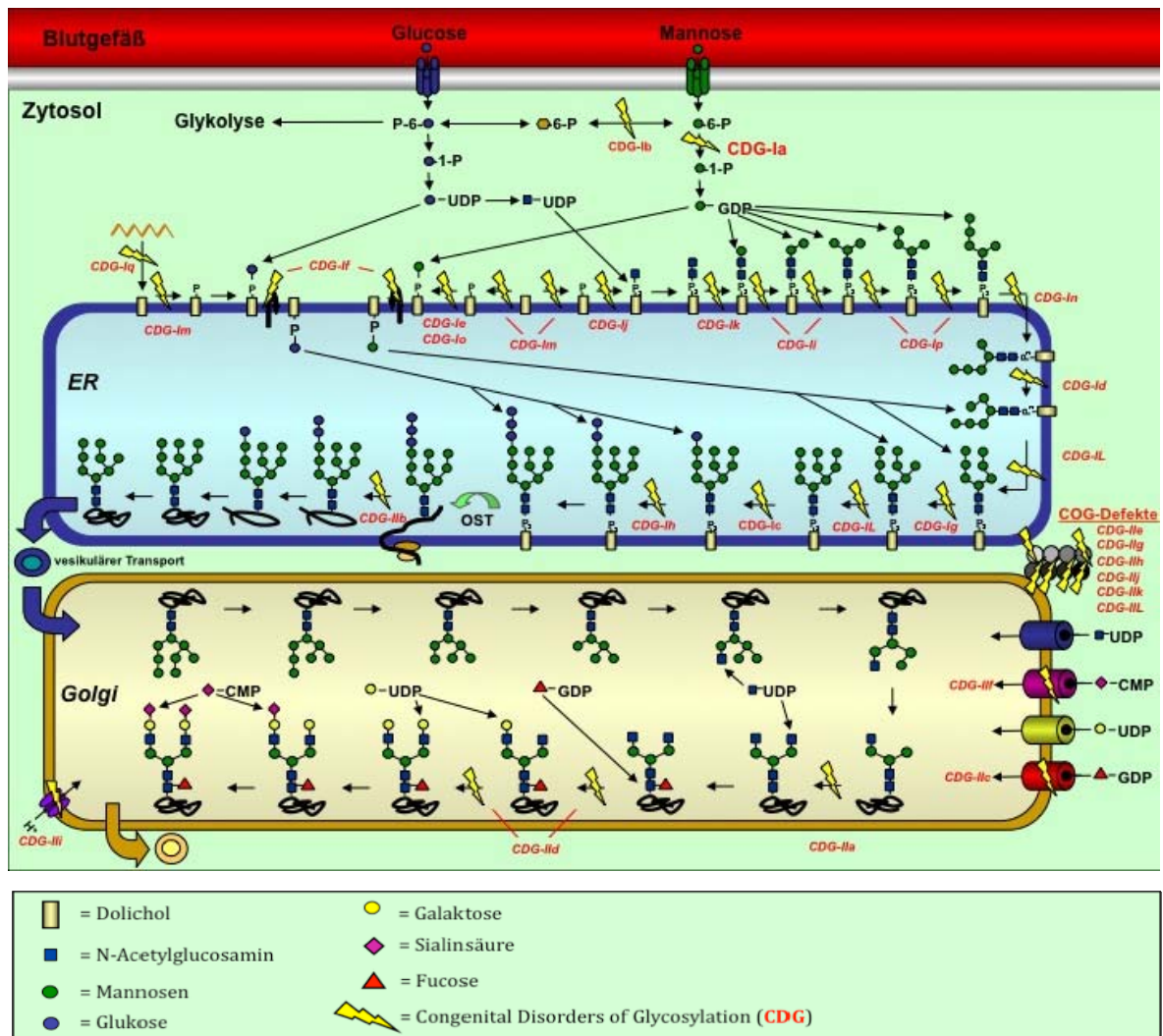


Abb. 1: Biosynthese der Glykoproteine mit Darstellung der bislang entdeckten Glykosylierungsdefekte CDG-Ia bis -Iq und CDG-IIa bis -IIL (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Körner, Heidelberg, www.klinikum.uni-heidelberg.de/1-Die-Glykoproteinbiosynthese.9504.0.html).

Im Golgi wird dann anhand weiterer Trimming und Elongationsschritte, die durch die Aminosäuresequenz des jeweiligen Glykoproteins vorgegeben sind, entschieden, ob das synthetisierte Oligosaccharid später dem komplexen, hybriden oder mannosereichen Typ zugeordnet wird (Abb.: 2).

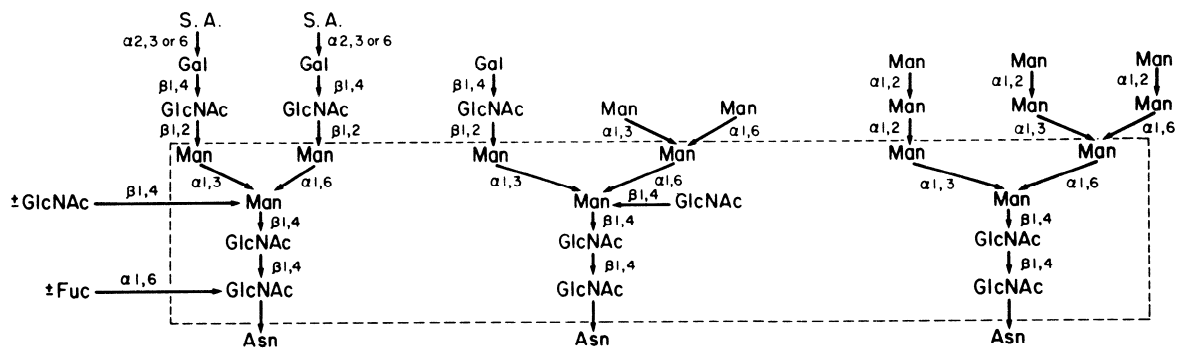


Abb. 2: Dargestellt sind die drei Typen der synthetisierten Oligosaccharide. Der komplexe, der hybride und der mannosereiche Typ. Gemeinsam ist den drei Typen die Kernregion in der gestrichelten Fläche.

Allen N-glykosidischen verknüpften Oligosaccharidseitenketten gleich ist die Kernregion $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$. Am häufigsten findet sich bei Vertebraten extrazellulär das N-Glykan vom komplexen Typ. Durch spezifische Glykosyltransferasen werden im medialen und trans-Golgi-Komplex die für jedes Protein typischen peripheren Saccharidreste wie drei N-Acetylglucosamin-, drei Galaktose-, einen Fucose- oder auch drei Sialinsäurereste übertragen. Es entstehen Oligosaccharide mit großer Diversität in Bezug auf die einzelnen Saccharidreste, als auch in der Anzahl der Verzweigungen des Oligosaccharides (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Zusammenfassend kann der Prozess der N-Glykosylierung in drei Schritte unterteilt werden; die Synthese des lipidverknüpften Oligosaccharides $\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_9\text{Glc}_3$ im ER, die cotranslationale Übertragung auf Asparaginreste eines Proteins und die Modifikation des Glykoproteins im Golgi.

1.3 Defekte der N-Glykosylierung

Defekte der Glykoproteinbiosynthese sind erst seit kurzem bekannt (Jaeken et al., 1980, 1984), obwohl über 300 verschiedene Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Transportproteine an dem komplexen Vorgang der Glykoproteinbiosynthese beteiligt sind und über 1% des menschlichen Genoms diese Proteine kodieren (Freeze, 1998). Der belgische Kinderarzt Jaak Jaeken bezeichnete diese Erkrankung, die er bei einem eineiigen Zwillingsspaar mit psychomotorischen Retardierungen beobachtet hatte, zunächst als „Carbohydrate Deficient Glykoprotein Syndrom“ (CDGS) (Jaeken et al., 1980). Die biochemische Ursache war ihm noch nicht bekannt und wurde erst 15 Jahre später aufgeklärt (van Schaftingen und Jaeken, 1995). Inzwischen wurde eine Vielzahl genetischer Defekte in der Glykoproteinbiosynthese identifiziert und auch Defekte anderer Glykokonjugate wie z.B. Glykolipide wurden bereits beschrieben. Auf dem „First International Workshop on CDGS“ (Leuven, Belgien, 12./13. November 1999) wurde deshalb eine Umbenennung der Krankheitsgruppe von CDGS in das allgemeinere „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) beschlossen (Aebi et al., 1999). Dabei werden diese autosomal rezessiv vererbten Defekte je nach Lokalisation in zwei Gruppen unterteilt: In der Gruppe I werden alle Defekte eingeordnet, welche die Synthese der dolicholverknüpften Oligosaccharide einschließlich ihres Transfers auf das neusynthetisierte Protein betreffen, und in der Gruppe II alle Erkrankungen, deren Ursache Fehler in den nachfolgenden Modifikationen des Glykoproteins darstellen. In der zeitlichen Reihenfolge der Aufklärung ihrer molekularen Ursachen erfolgt die Untergruppierung durch kleine Buchstaben.

Tab. 1: Aktuelle Liste veröffentlichter CDG-Typen identifizierter Patienten.
(*OMIM = online Mendelian inheritance in man)

CDG-Typ	betroffenes Gen	Enzym	Referenz	*OMIM	Anzahl bisher bekannter Fälle
la	<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase II	van Schaftingen und Jaeken, 1995	212065	>700
lb	<i>PMI</i>	Phosphomannose Isomerase	Niehues et al., 1998	602579	≥ 20
lc	<i>hALG6</i>	Dol-P-Glc:Man ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol- α -1,3-Glukosyltransferase	Körner et al., 1998; Burda et al., 1998; Imbach et al., 1999	603147	≥ 30
ld	<i>hALG3</i>	Dol-P-Man:Man ₅ GlcNAc ₂ -P-P-Dol- α -1,3-Mannosyltransferase	Körner et al., 1999	601110	≥ 8
le	<i>DPM1</i>	Dol-P-Man-Synthase I	Kim et al., 2000; Imbach et al., 2000	603503	≥ 7
lf	<i>MPDU1</i>	Man-P-Dol-utilisation1/Lec35	Kranz et al., 2001; Schenk et al., 2001	609180	≥ 5
lg	<i>hALG12</i>	Dol-P-Man:Man ₇ GlcNAc ₂ -P-P-Dol- α -6-Mannosyltransferase	Thiel et al., 2002; Chantret et al., 2002; Grubenmann	607143	≥ 7

			et al., 2002		
Ih	<i>hAlg8</i>	Dol-P-Glc:GlcMan ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol- α -3-Glukosyltransferase	Chantret et al., 2003; Schollen et al., 2004	608104	≥ 4
Ii	<i>hALG2</i>	GDP-Man: ManGlcNAc ₂ -P-P-Dol-Mannosyltransferase	Thiel et al., 2003	607906	≥ 1
Ij	<i>DPAGT1</i>	UDP-GlcNAc-Dol-P-N-Acetylglukosamin	Wu et al., 2003	608093	≥ 1
Ik	<i>ALG1</i>	Beta-1,4-Mannosyltransferase	Schwarz et al., 2004; Kranz et al., 2004	608540	≥ 4
II	<i>ALG9</i>	Mannosyltransferase Dol-P-Man: Man ₆ - und Man ₈ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol-Mannosyltransferase	Frank et al., 2004; Weinstein et al., 2005	608776	≥ 2
	<i>TMEM15</i>	Dolichol-Kinase	Kranz et al., 2007a	610768	≥ 4
In	<i>RFT1</i>	Man ₅ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Flippase	Hauptle et al., 2008	612015	≥ 1
	<i>DPM3</i>	Dolichol-Phosphat-Mannosyltransferase subunit 3	Lefebvre et al., 2009	612937	≥ 1
Ip	<i>ALG11</i>	GDP-Man:Man ₃ GlcNAc ₂ -PP-dolichol-alpha1,2-Mannosyltransferase	Rind et al., 2010	613666	≥ 2
Iq	<i>SRD5A3</i>	Steroid-5alpha-Reduktase Typ 3	Cantagrel et al., 2010.	612379	≥ 19
Ila	<i>MGAT2</i>	GlcNAc-Transferase 2	Jaeken et al., 1994; Tan et al., 1996	212066	≥ 3

IIb	<i>GCS1</i>	α -1,2-Glukosidase I	de Praeter et al., 2000	606056	≥ 1
IIc	<i>FUCT1</i>	GDP-Fucose-Transporter	Lübke et al., 1999; Lübke et al., 2001; Lühn et al., 2001	266265	≥ 5
IId	<i>B4GALT1</i>	UDP-Gal:GlcNAc- β -1,4-Galaktosyltransferase I	Hansske et al., 2002; Peters et al., 2002;	607091	≥ 1
IIe	<i>COG7</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 7	Wu et al., 2004	608779	≥ 8
IIf	<i>SLC35A1</i>	CMP-sialic acid transporter	Willig et al., 2001; Martinez-Duncker et al., 2005	603585	≥ 1
IIg	<i>COG1</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 1	Foulquier et al., 2006	611209	≥ 3
IIh	<i>COG8</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 8	Foulquier et al., 2007; Kranz et al., 2007b	611182	≥ 2
IIi	<i>COG5</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 5	Paesold-Burda et al., 2009	613612	≥ 1
IIj	<i>COG4</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 4	Reynders et al., 2009	613489	≥ 3
III	<i>COG6</i>	Conserved oligomeric golgi complex subunit 6	Lübbehusen et al., 2010		≥ 1

Da Glykoproteine an sehr vielen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt sind, äußern sich Störungen in ihrer Biosynthese zumeist multisystemisch. Übergreifend auf alle Subtypen des CDG-Syndroms leiden die meisten Patienten unter schweren Entwicklungsstörungen, psychomotorischen Retardierungen, Muskelhypotonie, Hirnatrophien und Krampfanfällen. 1987 beschrieben Jaeken et al. neben dem für CDG-Patienten typischen Phänotyp auch die verminderte Anzahl der Glykoproteine und die fehlenden Sialinsäure-, Galaktose- und N-Acetylglukosaminreste in Serum-Glykoproteinen. Verdachtspatienten werden routinemäßig auf veränderte Glyko-Strukturen ihres Serum-Transferrins hin untersucht. Transferrin ist ein in der Leber gebildetes Plasmaprotein, welches freies Eisen bindet und transportiert. Es trägt an den Asparaginresten 413 und 611 zwei biantennäre sialylierte Oligosaccharide vom komplexen Typ (Spik et al. 1975). Die jeweiligen Sialinsäurereste sind an ihrem Ende negativ geladen, so dass Transferrin in seiner Tetrasialoform vier negative Ladungen trägt (MacGillivray et al., 1983) (Abb.: 3).

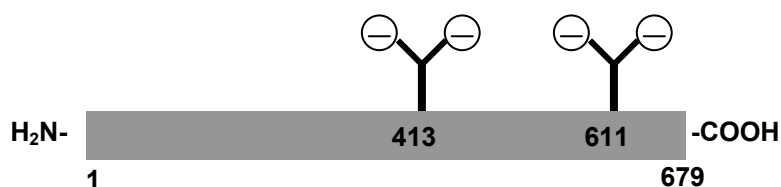


Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen Serum-Transferrins. Das Serum-Transferrin ist an den Asparaginresten 413 und 611 jeweils mit einem biantennären N-Glykan vom komplexen Typ verknüpft und trägt vier terminale negativ geladene Sialinsäurereste (mit freundlicher Genehmigung von Dr. C. Thiel, Heidelberg).

Fehlen wie bei CDG-I-Typen eine oder beide N-Glykanseitenketten, verschiebt sich aufgrund des damit verbundenen Verlustes der negativ geladenen Sialinsäurereste der isoelektrische Punkt des Transferrins. In der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zeigen sich damit neben einer vermindert ausgeprägten Tetrasialoform auch disialo- und asialo-Formen. Bei CDG-Ia liegt der Grund hierfür in Mutationen im Gen für das Enzym Phosphomannomutase II, welches im Zytosol

die Umsetzung von Man-6-P zu Man-1-P katalysiert. Die verminderte Aktivität des Enzyms resultiert in einer Reduktion des GDP-Mannose-Pools (van Schaftingen und Jaeken, 1995; siehe Seite 14).

1.4 CDG-Ia

1.4.1 Klinische Präsentation der CDG-Ia-Patienten

Patienten mit CDG-Ia zeigen ein heterogenes Bild verschiedenster Symptome mit unterschiedlich starker Ausprägung. Dieses ist vor allem abhängig von der Restaktivität der Phosphomannomutase II, dem genetischen familiären Hintergrund sowie auch dem Lebensalter. Sinnvoll ist die Einteilung der Symptome nach einzelnen Organsystemen:

NEUROLOGISCHE MANIFESTATIONEN:

Bei Neugeborenen fällt frühzeitig eine axiale Hypotonie der Muskulatur auf. Hinzu können später eine periphere Muskelatrophie mit Verlust der tiefen Sehnenreflexe kommen (Kjaergaard et al., 2001). Die Nervenleitgeschwindigkeit ist ab dem sechsten bis achten Monat besonders an den unteren Extremitäten vermindert (Kristiansson et al., 1989; Jaeken und Stibler, 1989). Psychomotorische und mentale Retardierung, Dysarthrie, Ataxie sowie eine cerebelläre Hypoplasie sind übliche Befunde. Es wird auch von supratentoriellen Atrophien berichtet (Kjaergaard et al., 2001). Bei einigen Kindern bildet sich eine Epilepsie aus, die sowohl generalisierter als auch fokaler Natur sein kann (Kjaergaard et al., 2001). Ophthalmologisch findet man Nystagmen und einen Strabismus convergens. Später kann sich eine Retinopathia pigmentosa mit progressiver Blindheit entwickeln (Andréasson et al., 1991).

Auch können schlaganfallsartige Symptome mit Hemiplegie und/oder Koma auftreten, die sich aber meist vollständig zurückbilden (Jaeken und Stibler, 1989).

GASTROINTESTINALE SYMPTOME:

Es fällt im Allgemeinen eine Schwierigkeit bei der Nahrungsaufnahme auf. Die Kinder erhalten hochkalorische Ernährungszusätze, manche müssen durch Nasen- oder Magensonde ernährt werden. Besondere Probleme können durch

Erbrechen, Diarrhoe, Steatorrhoe und Anorexie entstehen, woraus häufig eine Entwicklungsstörung resultiert (Petersen et al., 1993).

LEBER-DYSFUNKTIONEN:

Häufig läßt sich eine Hepatomegalie mit erhöhten Serum-Transaminasen nachweisen, die sich aber im weiteren Lebensverlauf meist normalisieren (Freeze 2001; Damen et al., 2004). Prothrombin, Antithrombin III, Protein C und S sowie auch die Konzentrationen von weiteren Faktoren der Gerinnungskaskade und Albumin sind meist erniedrigt (Van Geet und Jaeken, 1993). Daraus resultierende Blutgerinnungsstörungen können sowohl zu Blutungen als auch zu Thrombosen führen (Kjaergaard et al., 2001; Krasnewich et al., 2007).

KARDIALE BETEILIGUNG:

Echokardiographisch sieht man in vielen Fällen Perikardergüsse (Kjaergaard et al., 2001). Unter Umständen kann sich auch schnell nach der Geburt eine hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) entwickeln (Clayton et al., 1992).

ENDOKRINOLOGISCHE SYMPTOME:

Bei weiblichen Patienten findet man einen hypergonadotropen Hypogonadismus, wodurch sie nicht in die Pubertät gelangen können. Die inneren Genitalien sind hypoplastisch und nur durch eine Östradiol-Therapie konnte bei einigen Mädchen eine Entwicklung der Brustdrüsen und Pubesbehaarung induziert werden (Kjaergaard et al., 2001). Auch bei den männlichen Patienten können minderentwickelte Hoden beobachtet werden.

DYSMORPHE ZEICHEN:

Neugeborene können je nach Schweregrad durch charakteristische dysmorphe Zeichen wie invertierte Brustwarzen und ungewöhnliche Fettansammlungen im Oberarm- und Gesäßbereich auffallen (Clayton et al., 1992), die allerdings transient sind (Kristiansson et al., 1989). Hinzu kommen schräg aufsteigende mandelförmige Augenlider und ein prominenter Unterkiefer mit weit voneinander entfernt stehenden bleibenden Zähnen. Auch können sich eine Kyphoskoliose und Osteopenie entwickeln (Kjaergaard et al., 2001).

Die klinischen Symptome bei CDG-Ia-Patienten sind zum Teil sehr heterogen. Einige Patienten zeigen einen sehr leichten Verlauf auch ohne Einbeziehung der inneren Organe, andere wiederum leiden schon früh unter lebensbedrohlichen Komplikationen unterschiedlichster Ursache. Obligat bei allen CDG-Ia-Fällen sind aber axiale Hypotonie, cerebelläre Hypoplasie und Strabismus. Insgesamt liegt die Mortalität in den ersten Lebensjahren wegen schweren Infektionen, Herz- und Leberfunktionsstörungen bei 20% (Jaeken und Carchon, 1993). Im späteren Lebensalter scheint sich die Erkrankung zu stabilisieren (Matthijs et al., 2000; Kjaergaard et al., 2002).

1.4.2 Biochemie und Genetik von CDG-Ia

Van Schaftingen und Jaeken berichteten 1995 über eine auf bis zu 10 % des Normalen gesunkene Aktivität der Phosphomannomutase (PMM) in Fibroblasten von CDG-Ia-Patienten. Im Zytosol setzt dieses Enzym Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat um. Aufgrund der verringerten Aktivität resultiert eine verminderte Konzentration der nachfolgenden Intermediate Mannose-1-Phosphat, GDP-Mannose, GDP-Fucose und Dol-P-Man (Rush et al., 2000). Das Substrat Mannose-6-Phosphat ist dabei nicht erhöht. Während gesunde Fibroblasten überwiegend Dol-P-P-GlcNAc₂-Man₉Glc₃ produzieren, werden in Fibroblasten von CDG-Ia-Patienten durch den Mangel an Intermediaten vor allem verkürzte Dolichol-verknüpfte Oligosaccharide synthetisiert. Diese werden durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex mit geringerer Effizienz übertragen. Im Fall des Markerproteins Transferrin entstehen daher zur Hälfte Glykoproteine mit nur einer der beiden Oligosaccharidketten. Verkürzte Glykanstrukturen kommen nicht vor (Yamashita et al., 1993; Wada et al., 1992, 1994).

Es wurden nachfolgend zwei Isoenzyme für PMM entdeckt, PMM1 und PMM2 (Matthijs et al., 1997a,b), die sich durch ihre Kinetik, Antigenität und Struktur unterscheiden. Bis jetzt konnte aber nur PMM2 (OMIM 601785) mit fast 90 verschiedenen Mutationen in über 400 Familien als Auslöser für CDG-Ia eruiert werden. Krankheitsauslösende Mutationen in PMM1 (OMIM 601786) sind bis jetzt nicht beschrieben worden; auch zeigte ein Pmm1-Knock-Out-Mausmodell keinen

pathologischen Phänotyp (Cromphout et al. 2006), so dass die physiologische Funktion des Proteins bislang unklar ist.

Das Gen für *PMM2* liegt auf Chromosom 16p13 und codiert für ein 246 Aminosäuren langes Protein. Bei den bislang identifizierten Mutationen handelt es sich meistens um Missense-Mutationen, die auf Grund von Basenaustauschen entstehen. Daneben gibt es seltene Mutationen, die zu Frameshift- oder Splice-Varianten führen. Betrachtet man die Verteilung der Mutationen auf dem acht Exons enthaltenden Gen, fällt auf, dass die meisten Mutationen auf den Exons 5 und 8 lokalisiert sind.

Die beiden häufigsten Mutationen sind R141H (422 G>A) und F119L (357 C>A) mit einem Anteil von 35% respektive 13% aller mutierten Allele. Einen interessanten Aspekt stellt die geographische Verteilung dieser beiden Mutationen dar. R141H wurde in allen kaukasischen Populationen gefunden und variiert von 23% in Spanien bis 45% in Belgien. Analysen des Haplotyps weisen für R141H auf eine sehr alte Mutation hin, die sich im Laufe der Zeit sehr weit verbreitet hat (Schollen et al., 2000). Für F119L gibt es einen eindeutigen Schwerpunkt in Süd-Scandinavien. In Dänemark ist diese Mutation mit 48% an allen *PMM2*-Mutationen beteiligt, während sie im Mittelmeerraum noch nicht beobachtet wurde. Nimmt man beide Mutationen zum Genotyp R141H/F119L zusammen, deckt man in Skandinavien 72% der CDG-Ia-Genotypen ab.

Bei dem Genotyp R141H/R141H ist es anders. Obwohl anhand der beobachteten Träger-Frequenz für R141H von $1/72$ (q) in der dänischen und niederländischen Bevölkerung unter Beachtung des Hardy-Weinberg-Gesetzes ($p^2+2pq+q^2=1$) eine Homozygoten-Quote von $1/20.700$ (q^2) zu erwarten wäre und dieser Genotyp demnach zu 45% bis 60% unter den CDG-Ia-Patienten zu finden sein müsste, wurde bis jetzt nicht ein einziger Patient entdeckt (Kjaergaard et al., 1998; Matthijs et al., 1998; Bjursell et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass dieser Genotyp letal ist (Schollen et al., 2000). Unterstützt wird die These durch Untersuchungen an rekombinanten R141H-Proteinen, deren enzymatische Aktivität gegen null geht (Pirard et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigen Mutationen wie F119L und D65Y deutlich höhere Restaktivitäten und konnten auch als homozygoter Genotyp nachgewiesen werden. Homozygotien oder compound-Heterozygotien für

Mutationen, die eine Phosphomannomutase ohne Restaktivität erzeugen, scheinen letal zu sein (Matthijs et al., 2000).

1.5 Zielsetzung

Unter den bisher bekannten CDG-Syndromen ist CDG-Ia die häufigste Erkrankung. Dennoch sind viele Fragen im Bereich Biochemie, Pathophysiologie und Klinik unklar. Bisher unternommene Therapieversuche haben sich bei Patienten als erfolglos erwiesen. Um weiterführende Untersuchungen zu ermöglichen, soll ein Mausmodell generiert werden.

Um einen Phänotyp zu schaffen, der dem Menschen möglichst ähnlich ist und die Probleme einer embryonalen Letalität umgeht, wurden zwei Modelle geplant, welche die entsprechenden humanen Mutationen F119L und R141H tragen. Da das Pmm2-Enzym der Maus etwas kürzer als das menschliche ist, sind die zu generierenden murinen Mutationen F115L und R137H.

Verpaarungen dieser rekombinanten Mäuse würden dann eine phänotypische Bandbreite vom milden bis hin zum schwer ausgeprägten klinischen Bild hervorbringen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung zweier, mittels der Knock-In-Strategie generierten, Gene-Targeting-Vektoren, die zur Transfektion embryonaler Mausstammzellen genutzt werden können. Nach erfolgreichem Einbau dieser Vektoren durch homologe Rekombination sollen die transgenen Stammzellen in Mausembryonen, die sich im Blastozystenstadium befinden, mikroinjiziert werden. Daraus entstandene Chimären könnten nach entsprechenden Verpaarungen Mausmodelle mit den Genotypen F115L/F115L und F115L/R137H erzeugen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaagen Typ M5P und CP3202P	Sartorius, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Brutschrank Typ 2771	Heraeus, Osterode, Köttermann, Häningsen
DNA-Sequenzierer Typ 310	ABI Applied Biosystems, Foster City, USA
Durchlicht-Mikroskop Typ ID03	Zeiss, Oberkochen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstatt des Instituts
Elektroporator Typ Gene Pulser	BioRad, München
Eppendorfschüttler Typ 5402, 5414, 5415D	Eppendorf, Hamburg
Eraser für Phosphorimager-Screens	Raytest, Straubenhardt
Filmentwicklungsmaschine Typ Curix 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Fujix Bio Imaging Analyzer Typ BAS 1000	Fuji, Elmsford, USA
Gefrierschrank -80°C	Colora Messtechnik, Lorch
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, USA
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Handcounter Typ LB122	Berthold, Bad Wildbad
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Typ G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inkubator mit Drehrad	Schütt Labortechnik, Göttingen
Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO ₂ -Atmosphäre	Forma Scientific, Marietta, USA
JA-10/20-Rotoren für Kühlzentrifuge Typ J2-MC	Beckmann, München

Kapazitätserweiterer für Elektroporator	BioRad, München
Kühlzentrifuge Typ J2-MC	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Typ MikroRapid/K	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer Typ Ika-Combimag Reo	Janke & Kunkel, Staufen
Micro-Pipetten (20, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Microprep Zentrifuge	Stat Spin Technologies, Norwood, USA
Mikrowellenherd	Siemens, München
pH-Meter Typ InoLab	WTW, Weilheim
Pipette (10 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Typ Pipet Aid XP	Drummond, Broomall, USA
Schüttelwasserbad	Köttermann, Hüningsen, Göttingen
Spannungsgeräte	Hölzel, München
Spektralphotometer Typ Uvikon 932	Kontron Instruments, Eching
Sterilbank Typ Lamin Air HLB2448	Heraeus, Osterode
Sterilbank Typ SG400	Baker Company, Sanford, USA
Stickstofftank Biosafe Chronos	Messer, Griesheim
Thermomixer Typ compact und 5436	Eppendorf, Hamburg
Typ Tecnoclav 50	Tecnorama, Zürich, Schweiz
Video-Drucker	Intas, Göttingen
Video-Kamera	Intas, Göttingen
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage Typ 1265MP	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wipptisch Typ Rocky	Itf Labortechnik, Wasserburg
Zentrifuge Typ Labofuge	Heraeus, Osterode

2.1.2 EDV

Hardware:

Apple Macintosh Typ Power 7300/200

Apple Macintosh, Cupertino, USA

Apple Laser Writer Typ 16/600 PS
Scanner Typ CanoScan D660U

Apple Macintosh, Cupertino, USA
Canon, Krefeld

Software:

Adobe-Photoshop 6.0
DNASStar (MegAlign, MapDraw,
Protean, EditSeq)
Windows 98
Windows Office 98 (Word, Power
Point)
Image Reader
Image Gauge 3.0
ClarisWorks

Adobe, San Jose, USA
DNASStar, Madison, USA
Microsoft, Bellevue, USA
Microsoft, Bellevue, USA
Fuji, Elmsford, USA
Fuji, Elmsford, USA
Claris Corporation, Santa Clara,
USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

6- bzw. 24-Napf-Zellkulturplatten
Einfrierkästen
Elektroporationsküvetten
Gewebekulturschalen (3, 6, 10, 15 cm)
Glaskolben
Hybond-N Filter (82 mm, 132 mm)
Kryoröhrchen
Parafilm
Pasteurpipetten
PCR-Gefäße Multiply-Pro (0,2 ml)
Phosphoimager-Screen
Pipettenspitzen
Plastikpipetten, steril (2, 5, 10, 25 ml)
Plastik-Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)
Plastikröhrchen (10, 15, 50 ml)
Plastik-Spritzen Ecoject, steril (10 ml)

Greiner, Nürtingen
National Lab, Mölln
Biorad, München
Greiner, Nürtingen
Schott, Mainz
Amersham, Braunschweig
Nunc, Wiesbaden
American National, Chicago, USA
Schütt, Göttingen
Sarstedt, Nümbrecht
Fuji, Elmsford, USA
Sarstedt, Nümbrecht
Greiner, Nürtingen
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Dispomed Witt, Gelnhausen

Röntgenfilme XAR-5	Kodak, Stuttgart
Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman-Vertrieb, Göttingen
Zentrifugenbecher (JA 10/20 Polypropylen)	Beckmann, München

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Difco, Detroit, USA; Merck, Darmstadt; Pharmacia, Freiburg; Sigma, Deisenhofen und Serva, Heidelberg im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

Agar	Sigma
Agarose	Sigma
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Dextransulfat	Pharmacia
EDTA-Na ₂ x H ₂ O	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Sigma
H ₂ O HPLC-Reinheitsgrad	Merck
IPTG	Sigma
Natriumacetat	Merck
NaCl	Merck
SDS	Sigma
NaOH	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Serva
HCl	Merck
Tris	Merck
X-Gal	Sigma

2.1.5 Puffer und Stammlösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschriften aus dem Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) angesetzt. Das verwendete Wasser wurde zuvor doppelt destilliert.

1 M Tris/HCl	121,1 g Tris wurden in 800 ml H ₂ O gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf Werte zwischen 7,2 und 9,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l eingestellt und autoklaviert.
20 x SSC	175,3 g NaCl und 88,2 g Na-Citrat wurden in H ₂ O gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.
50 x Denhardts	1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidon und 1 % BSA in H ₂ O
0,5 M EDTA	181,1 g EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O wurden in 800 ml H ₂ O gelöst, der pH-Wert mit 20 g NaOH oder konzentrierter Natronlauge auf 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Weitere spezielle Lösungen sind bei der entsprechenden Methode aufgeführt.

2.1.6 Medien zur Anzucht prokaryontischer Zellen

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 800 ml H₂O bidest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, mit H₂O bidest. auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Zur selektiven Bakterienanzucht wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt.

Zur selektiven Bakterienanzucht auf Agarplatten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und einer Abkühlung auf 50°C wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt. Die Agarlösung wurde in 9-cm-Petrischalen gegossen, bei RT abgekühlt und anschließend bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

2.1.7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

Medien, Medienzusätze und Lösungen wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim; Gibco BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg und Sigma, München bezogen.

BSA	Serva
β-Mercaptoethanol, 14 M	Sigma
DMSO	Merck
DMEM, Knock-Out	Gibco BRL
FKS, (ES-Cell tested)	Hyclone,
LIF	Chemicon
L-Glutamin	Gibco BRL
MEM/HEPES	Gibco BRL
Mitomycin C	Sigma
Na-Pyruvat	Gibco BRL
non-essential amino acids	Gibco BRL
PBS	Gibco BRL
Trypsin-EDTA, (0.25% und 0.05%)	Gibco BRL

Weitere spezielle Medien und Lösungen sind bei der entsprechenden Methode aufgeführt.

2.1.8 Enzyme, Standards und Antibiotika

1-kb-Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Calbiochem, Frankfurt
Geneticin® (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, USA; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia, Freiburg

2.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma IBA-Naps, Göttingen bezogen.

2.1.10 Kits zur Bearbeitung von DNA

ABI PRISM Dye Terminator	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
AccuPrime™- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Hot-Star- <i>Taq</i> -PCR-Kit	Qiagen, Hilden
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange in-vitro-Mutagenese-Kit	Stratagene, Heidelberg
RediPrime II DNA Labeling Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
T4-Cloning Kit	New England Biolabs, Beverly, USA

2.1.11 Radioaktive Substanzen

α -[³² P]-dCTP, Redivue	Amersham-Buchler, Braunschweig
--	--------------------------------

2.1.12 Vektoren

pBlueScript SK II (+/-)

Stratagene, Heidelberg

2.1.13 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von DNA im Prokaryontensystem wurden *Escherichia-coli*-Bakterien des Stamms XL-Blue (Genotyp: F^{'::}Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15/recAI endAI gyrA96(Nal) thi hsdR17 (rKmK+) supE44 relAI lac) verwendet.

2.1.14 Embryonale Stammzellen

Die verwendeten, als E-14.1 bezeichneten Zellen wurden aus Blastozysten von 129/Ola-Mäusen isoliert und von der Arbeitsgruppe von K. Rajewsky, Köln bezogen.

2.1.15 Embryonale Mausfibroblasten (Feeder)

Die embryonalen Stammzellen wurden auf einem Feederrasen aus G418[®](Neomycin)-resistenten mausembryonalen Fibroblasten kultiviert. Diese wurden aus Embryonen transgener Mäuse gewonnen, die eine Resistenz gegen Neomycin besitzen (Müller et al., 1991). Tragende transgene Mäuse dieses Stammes wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe K. Rajewsky, Köln zur Verfügung gestellt.

2.1.16 Mausstämme

Blastozysten wurden nach natürlichen Verpaarungen aus folgendem Mausstamm (*Mus musculus*) isoliert:

C57 BL/6J Inzuchtstamm, schwarz BRL, Basel, Schweiz (eigene Weiterzucht)

Als Ammen-Mütter dienten Mäuse des folgenden Stammes:

B6/CBF₁ agouti eigene F₁-Zucht aus CBA/J-Männchen
(Inzuchtstamm, agouti; BRL, Basel,
Schweiz) und C57BL/6J-Weibchen

Sterile Männchen für die Bereitstellung pseudoträchtiger B6/CBF₁-Weibchen (Foster-Mäuse) wurden durch Vasektomie der Männchen des folgenden Stammes generiert:

Moro Inzuchtstamm, weiß BRL, Basel, Schweiz

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Genmanipulation

Die Möglichkeit, eine Maus als Modell für menschliche, genetisch-bedingte Erkrankungen zu nutzen, wurde durch zwei wichtige Entwicklungen erreicht. 1981 gelang es zwei Laboratorien, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus frühen Maus-Embryonen zu isolieren und zu kultivieren (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981). Diese besaßen die Eigenschaften der Pluripotenz, unbegrenzter Selbst-Erneuerung *in vitro* und die Fähigkeit, sich im Gewebe einer Wirtsblastozyste zu entwickeln (Bradley et al., 1984). Des Weiteren wurde die Fähigkeit von Säuger-Zellen beschrieben, eingebrachte DNA mit eigenen dazu homologen Sequenzen zu rekombinieren (Smithies et al., 1985; Wong und Capecchi, 1986). Später wurde dies auch für ES-Zellen belegt (Thomas und Capecchi, 1987). Im Gegensatz zu früheren Methoden, die chemische und physikalische Mutagenzien benutzten, ist es heute möglich, spezifische und gezielte Änderungen im Genom einer Maus vorzunehmen.

2.2.1.1 „gene targeting“ durch homologe Rekombination in murinen ES-Zellen

Der molekularbiologische Mechanismus der gezielten Änderung des Genoms („gene targeting“) einer Maus durch homologe Rekombination ist noch nicht genau geklärt, scheint aber den „crossing over“-Vorgängen bei der Meiose zu ähneln. Durch Elektroporation lagert sich die in ES-Zellen eingebrachte DNA, z.B. ein „Gene-Targeting-Vector“ (GTV), an homologe DNA Abschnitte des residenten Genoms an. Vermutlich ermöglichen ein Einzel- oder Doppelstrangbruch im Maus-Chromosom und anschließende Reparatur-Mechanismen den Einbau des GTV und somit den Austausch der beiden homologen Gen-Bereiche (Hasty et al., 1992; Ramdas et al., 1991; Aratani et al., 1992; Orr-Weaver und Szostak, 1983; Valancius und Smithies, 1991). Der mittels molekularbiologischer Methoden konstruierte GTV kann erwünschte Modifikationen wie z.B. Punktmutationen enthalten. Da die homologe Rekombination in Säugerzellen ein seltenes Ereignis ist, wird in den GTV zusätzlich ein Selektionsmarker, z.B. eine Neomycin (Neo)-Kassette, eingefügt, welche eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418[®]) vermittelt (Capecchi, 1989). Das Aminoglykosid Geneticin blockiert die Proteinbiosynthese, kann aber durch die bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase, codiert durch die Neomycin-Kassette, inaktiviert werden. Diese Positiv-Selektion ermöglicht das Erfassen von ES-Zellen, die zumindest die Neo-Kassette in ihr Genom aufgenommen haben und die Phosphotransferase exprimieren.

Des Weiteren wird die Effizienz der homologen Rekombination von mehreren Faktoren beeinflusst. Die DNA des verwendeten GTV und die embryonalen Stammzellen sollten gleicher Herkunft sein bzw. dem selben Mausstamm entspringen (te Riele et al., 1992). Ein weiterer wichtiger Faktor sind möglichst lange genomische Homologien zwischen GTV und dem Zielgen (Deng und Capecchi, 1992).

ES-Zellen, die durch G418[®] selektioniert wurden und in denen die homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte, werden durch Mikroinjektion in Mausembryonen des Blastozystenstadiums gebracht. Wandern diese Zellen nun in den Embryonalpool der Blastozyste ein, entsteht eine chimäre Maus. Falls diese ES-Zellen sich an der Entwicklung der Keimzellen beteiligt haben, können

Verpaarungen dieser Chimären Nachkommen hervorbringen, die das mutierte Genom vollständig übernommen haben (Bradley et al., 1984).

2.2.1.2 Knock-Out-Maus

Mit Hilfe der oben genannten Techniken ist es möglich, ein Gen gezielt auszuschalten. Ein etabliertes Verfahren, um diese sogenannten „Knock-Out“-Mäuse zu generieren, ist das Einbringen eines Selektionsmarkers, wie z.B. eine Neo-Kassette, in ein Exon des entsprechenden Gens. Der Leserahmen des Gens wird dadurch unterbrochen und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Funktionsverlust herbeigeführt (Capecchi, 1989).

2.2.1.3 Hypomorphes Mausmodell

Eine Möglichkeit einen vollständigen Funktionsverlust eines Gens zu vermeiden und lediglich das Gen dahingehend zu verändern, dass eine eingeschränkte Funktion des codierenden Proteins resultiert (hypomorphes Allel), ist das Cre/loxP-Rekombinations-System. Das Cre-Protein gehört in die Gruppe der DNA-Rekombinasen und wurde in dem Bakteriophagen P1 entdeckt (Sternberg und Hamilton, 1981; Hoess et al., 1982; Argos et al., 1986). Die Cre-Rekombinase erkennt und bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, genannt loxP. Befinden sich zwei dieser loxP-Sequenzen auf dem gleichen DNA-Molekül und besitzen beide dieselbe Orientierung, so wird der dazwischen liegende DNA-Bereich herausgeschnitten und abgebaut. Diese Erkenntnis kann man dazu nutzen, „saubere“ Mutationen, z.B. eine Punktmutation, im Mausgenom zu generieren („Knock-In“). Dazu wird ein GTV verwendet, der zusätzlich zu dieser Punktmutation eine Selektionskassette besitzt, die von zwei loxP-Sequenzen eingeschlossen ist und in einem Intron liegt. Nach der Cre-Rekombinase-Reaktion liegt neben der eingebrachten Punktmutation lediglich eine loxP-Sequenz mit der Länge von 34 Basenpaaren als Artefakt im Genom vor. Diese Reaktion kann

sowohl auf der Ebene der ES-Zellen per Elektroporation, als auch später durch Verpaarung der Maus mit einer genetisch manipulierten „Cre-Maus“, die das Cre-Rekombinase-Gen in ihrem Genom enthält, durchgeführt werden. Zudem gibt es Möglichkeiten, die Cre-Rekombinase mittels Viren organspezifisch zu exprimieren.

2.2.2 Standardbedingungen und –methoden der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden und unter Beachtung der jeweiligen Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Reagenzien und Proben für enzymatische Reaktionen wurden in der Vorbereitung auf Eis gekühlt. Nicht käuflich erworbene Medien, Puffer und sonstige Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert.

Die im Folgenden beschriebenen Methoden und Vorschriften wurden dem Laborhandbuch „Molecular cloning“ (Sambrook et al., 1989) entnommen, sofern es nicht anders angegeben ist.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde photometrisch ermittelt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in einer Quarzküvette. $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Verunreinigung der DNA/RNA-Probe durch Protein wurde anschließend bei 280 nm gemessen. Hierbei sollte sich für reine DNA ein Wert von $OD_{260}:OD_{280}$ von 1,8 ergeben.

2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Lehrach und Frischauf, 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Um sicherzustellen, dass der Verdau quantitativ abläuft, wurde die Enzymmenge und die Inkubationszeit verdoppelt. Der Verdau genomischer DNA erfolgte über Nacht.

Reaktionsansatz:	x µg	DNA
	2 µl	10x Puffer (nach Angaben der Hersteller)
	2 µl	10x BSA (falls nach Angaben der Hersteller erforderlich)
	2 U	Restriktionsendonuklease
	ad 20 µl	H ₂ O.

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C (bzw. dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms) inkubiert und anschließend im Agarosegel analysiert. Präparative Verdauungen wurden in größeren Volumina und mit entsprechend größerer Enzymmenge durchgeführt.

Die Reaktionspuffer wurden gemäß dem New England Biolab (NEB)- bzw. dem MBI Fermentas-Puffersystem verwendet. Diese Puffer werden von den Herstellern zusammen mit den Enzymen geliefert.

Das NEB-Puffersystem besteht neben enzymespezifischen Puffern aus vier Basispuffern:

NEB 1:	10 mM Bis-Tris Propan/HCl (pH 7,0) + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM DTT
NEB 2:	10 mM Tris/HCl (pH 7,9) + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM DTT + 50 mM NaCl
NEB 3:	50 mM Tris/HCl (pH 7,9).+ 10 mM MgCl ₂ + 1 mM DTT + 100 mM NaCl
NEB 4:	20 mM Tris/Ac (pH 7,9) + 10 mM MgAc ₂ + 1 mM DTT + 50 mM KAc

Das MBI-Puffersystem besteht neben enzymespezifischen Puffern aus fünf Basispuffern:

B ⁺ :	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl ₂ + 0,1 mM BSA
------------------	--

- G⁺: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 0,1 mM BSA + 50 mM NaCl
 O⁺: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 0,1 mM BSA + 100 mM NaCl
 R⁺: 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) + 10 mM MgCl₂ + 0,1 mM BSA + 100 mM KCl
 Y⁺: 33 mM Tris/Ac (pH 7,9) + 10 mM MgAc₂ + 0,1 mM BSA + 66 mM KAc

Alle angegebenen Konzentrationen sind 1x-Konzentrationen; die Puffer wurden in 10x-Konzentrationen geliefert.

2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet, deren Agarosekonzentration sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente richtete:

Agarosekonzentration [%]	Trennbereich [kb]
0,6	1-20
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3

Die erforderliche Agarosemenge wurde in 400 ml 1x-TAE im Mikrowellenherd aufgeköcht und nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 0,5 µg/ml). Die Lösung wurde in eine Gelform gegossen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 1x-TAE gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (10%ige Zusammensetzung) versetzt und in die vorgeformten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3-4 V/cm² durchgeführt. Durch das in die DNA-Doppelhelix interkalierende Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht mit 260 nm Wellenlänge sichtbar, so dass das Gel auf dem UV-Transilluminator analysiert werden konnte. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (QIAquick Gel Extraction Kit, Handbuch, 1999)

Lösungen: Die Zusammensetzung der Puffer wird von Qiagen nicht angegeben. Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht (UV-Handlampe) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Nach Zugabe von 3 Volumen QG-Puffer wurde die Agarose durch Inkubation über 10 min bei 50°C aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine QIAquick-Zentrifugationssäule aufgebracht und für eine Minute bei 13000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, wobei die DNA an die Säule bindet. Nach Waschschrritten mit 500 µl QG-Puffer und 700 µl PE-Puffer wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 30 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

2.2.7 Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor

Über Ligation können DNA-Fragmente in einen Vektor integriert werden. Dazu wurden die DNA und der Vektor in getrennten Ansätzen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Der Vektor wurde dabei im Klonierungsabschnitt (multiple cloning site, MCS) geöffnet. Um die Wahrscheinlichkeit des gewünschten Ligationereignisses zu erhöhen, wurde dem Restriktionsansatz des Vektors Alkalische Phosphatase hinzugefügt. Dadurch wird der Vektor an seinem 5'-Terminus dephosphoryliert und kann nun nicht mehr in seiner ursprünglichen Form, sondern nur unter Integration eines fremden Fragmentes ligiert und somit rezikularisiert werden.

Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach folgendem Schema:

Ligationsansatz:	x µl	Vektor-DNA
	y µl	DNA-Fragment (3-5 molarer Überschuss)
	1 µl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer (400 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 5 mM ATP)

1 μ l	PEG 4000 (50 % (w/v); bei blunt end-Ligationen)
z μ l	T4-DNA-Ligase (1 u/ μ l; 2 u bei sticky ends, 5 u bei blunt ends)
ad 10 μ l	H ₂ O.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei RT. Anschließend wurde die Ligase durch 15 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.2.8 Amplifikation von Plasmid-DNA im Prokaryontensystem

2.2.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

(Qiagen Handbuch: The QIAexpressionist, 2001)

Zunächst wurden 4 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 99 ml LB-Medium mit 1 - 2 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis abgekühlt, in ein JA-20-Röhrchen überführt und danach bei 4°C für 5 min bei 4000 x g im JA-20-Rotor zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 4 ml kaltem TFB2-Puffer. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 μ l und 200 μ l aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert.

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, mit KOH auf pH 6,8 eingestellt, sterilfiltriert.

2.2.8.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA durch Hitzeschockbehandlung

50 µl kompetente *E. coli* XL-Blue wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (z.B. nach Ligation, siehe Seite 30) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 1,5 min bei 42°C unterzogen und 2 min auf Eis wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 30 min im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. In dieser Phase wurde die während des Hitzeschocks aufgenommene DNA exprimiert und somit die auf dem Plasmid codierte Antibiotika-Resistenz ausgebildet. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Das Zellpellet wurde in 200 µl LB-Medium resuspendiert und (entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids) auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden auf der Platte zuvor 20 µl IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid; 100mM in H₂O) und 40 µl X-Gal (4 % in N'-N'-Dimethylformamid) ausgestrichen.

Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit den darauf gewachsenen weißen Kolonien wurden jeweils 4 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin angeimpft.

2.2.8.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien (QIAprep Miniprep Handbuch, 1999)

Lösungen: Die Zusammensetzung der Puffer wird von Qiagen nicht angegeben. 4 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin wurden mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 1 min in der Eppendorfszentrifuge bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl kaltem P1-Puffer resuspendiert, mit 250 µl P2-Puffer lysiert und mit 350 µl N3-Puffer neutralisiert.

Darauf folgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde auf eine QIAprep-Säule gegeben und eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und

anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 50 µl H₂O.

2.2.8.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

(QIAprep Midiprep Handbuch, 1999)

Es wurden 100 ml einer Bakterienkultur bei 6000 x g im JA-10-Rotor abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml P1 resuspendiert, in JA-20-Röhrchen überführt, mit 4 ml P2 versetzt, vorsichtig durch Rollen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml kaltem P3 wurde neutralisiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert.

Die Suspension wurde 30 min im JA-20-Rotor bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und bei 5000 rpm und 4°C in der Labofuge für 45 min zentrifugiert. Das weiße Pellet wurde zweimal mit je 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

P1:	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A.
P2:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS.
P3:	3 M	KAc, pH 5,5.
QBT-Puffer:	750 mM	NaCl

	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Ethanol
	0,15 %	Triton X-100.
QC-Puffer:	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Ethanol.
QF-Puffer:	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
	15 %	Ethanol.

2.2.9 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Die Zellen wurden von den Zellkulturplatten abgeschabt, pelletiert und in 0,3 ml Lysispuffer überführt. Dieser Ansatz wurde mit 30 µl frisch angesetzter Proteinase K-Stammlösung (10 mg/ml Proteinase K in Lysispuffer) versetzt und über Nacht bei 56°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proteinase K sorgte für die Inaktivierung endogener Nukleasen, so dass die DNA intakt blieb. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge wurde zum Überstand 1 ml Ethanol gegeben. Die dabei ausgefallene DNA wurde mit einer Glaspipette mit abgerundeter Spitze aufgenommen, in 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und danach in 200 µl Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Lysispuffer:	50 mM	Tris, pH 8,0
	50 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	0,5 %	SDS.

2.2.10 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Nach Bestimmung des Volumens der DNA-Lösung wurden entsprechend 1/5 des Volumens 3M NaAc-Lösung (pH 5,2) zugefügt. Dies dient der Bereitstellung der zur Präzipitation erforderlichen Kationen. Zudem wurde 100%iges Ethanol im Fünffachen des Ausgangsvolumens dazu gegeben und gemischt. Die DNA wurde durch 20 min Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 20 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde nach der Trocknung bei RT je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.2.11 Markierung einer DNA-Sonde mit α -[³²P]dCTP

25 ng der zu markierenden DNA-Sequenz wurden in 45 μ l H₂O verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu einem Aliquot des RediPrime II Labeling Lyophilisats (Amersham Pharmacia) gegeben, welches vorsichtig darin gelöst wurde. Auf die Zugabe von 5 μ l ³²P-dCTP (50 μ Ci) folgten 15 min Inkubation bei 37°C. Um die markierte Sonde von freien Nukleotiden zu trennen, erfolgte eine Aufreinigung über eine QIAquick-Mini-Säule. Dazu wurde der Ansatz mit 250 μ l PN-Puffer versetzt auf eine QIAquick-Mini-Säule gegeben. Darauf folgten eine kurze Zentrifugation, zwei Waschschrte mit jeweils 500 μ l PE-Puffer und die Elution der Sonde mit 200 μ l EB-Puffer.

2.2.12 Transfer von DNA auf Hybond N-Filter (Southern-Blot) (Southern, 1975; Alwine et al., 1977)

Nach einem geeigneten Restriktionsverdau und der Auftrennung im Agarosegel wurde die zu analysierende DNA denaturiert. Dazu wurde das Gel zweimal 15 min in Denaturierungs-Lösung und anschließend zweimal 15 min in Neutralisierungs-Lösung auf einem Wipptisch geschwenkt. Nach 10 min Äquilibrieren in 20x SSC erfolgte der Transfer über Nacht mit 20x SSC als Transferpuffer mit dem in Abb. 4 dargestellten Aufbau. Der Pfeil zeigt die Richtung des Flüssigkeitsstromes an,

durch den die DNA aus dem Agarosegel auf den darüberliegenden Hybond-Nylon-Filter (Membran) übertragen wird.

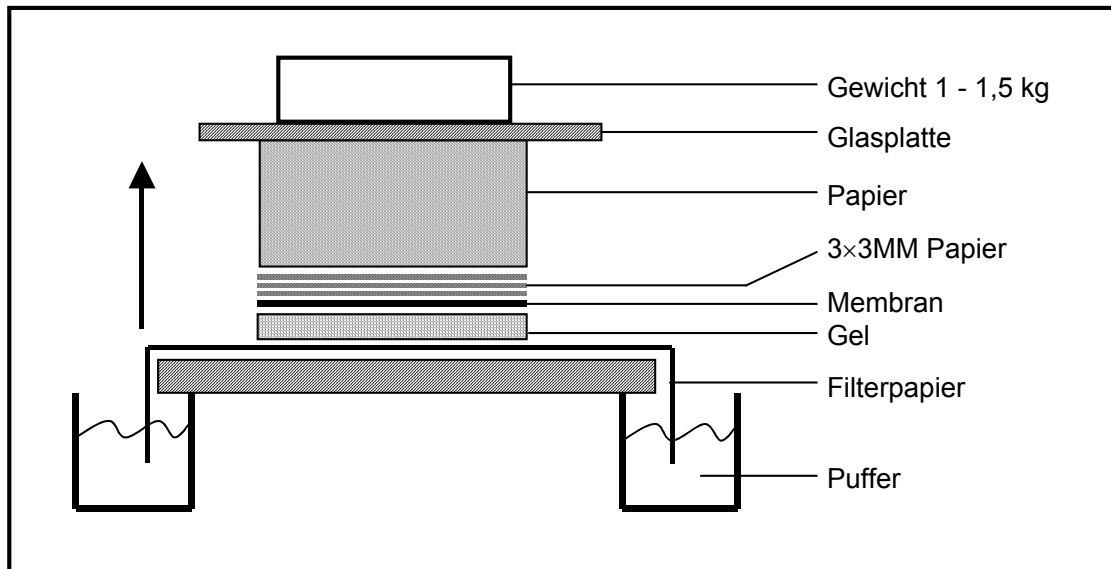


Abb. 4: Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Hybond N-Filter.

Der Filter wurde im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet und die DNA-Seite markiert. Durch 15 Sekunden UV-Bestrahlung (260 nm) der DNA-Seite auf dem UV-Transilluminator wurde die DNA fest an die Filteroberfläche gebunden.

Denaturierungs-Lösung:	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH.
Neutralisierungs-Lösung:	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris/HCl, pH 7,2
	1 mM	EDTA.

2.2.13 Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten Sonden

Zur Hybridisierung wurde der Filter mit dem Hybridisierungsmix (1 ml/10 cm²) in einem Plastikröhrchen vorinkubiert. Nach ca. 10 min wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde, die vorher zusammen mit der Lachssperma-DNA (Endkonzentration 100 µg/ml) 5 min bei 95°C denaturiert worden war, zum Filter in den Hybridisierungsmix pipettiert. Es wurden 1-2x10⁶ cpm DNA-Sonde/ml Hybridisierungsmix eingesetzt.

Der Filter wurde über Nacht in der Hybridisierungslösung bei 42°C inkubiert, indem das Plastikröhrchen im Wärmeschrank gerollt wurden.

Anschließend wurde der Filter aus dem Röhrchen mit der radioaktiven Hybridisierungslösung genommen und zunächst mit 2x SSC / 0,1 % SDS 10 min bei RT, dann mehrfach mit 0,2x SSC / 0,1 % SDS 10 min bei 65°C im Schüttelwasserbad gewaschen, bis mit dem Handcounter nach Möglichkeit weniger als 40 cpm messbar waren.

Der Filter wurde feucht in Folie eingeschweißt und mit einem Phosphoimager-Screen und einem Kodak-XAR-5-Röntgenfilm autoradiographiert.

Lachssperma-DNA: Die Lachssperma-DNA wurde mit einer sterilen Schere zerkleinert und in H₂O gelöst (10 mg/ml). Nach 10 min Ultraschallbehandlung wurde die Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht und nochmals mit Ultraschall behandelt. Die so gelöste DNA wurde in 2-ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

Hybridisierungsmix:	72 ml	Formamid
	36 ml	20x SSC
	1,5 ml	Tris/HCl 1 M, pH 7,5
	1,5 g	SDS
	3 ml	50x Denhardts
	30 ml	50%iges Dextransulfat.

15 g Dextransulfat wurden mit H₂O auf 30 ml aufgefüllt und bei 80°C gelöst. Anschließend wurden die anderen Substanzen zugesetzt und das Volumen mit H₂O auf 150 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion

(Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können. Sie basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

- 1) Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- 2) Annealing: Bindung von Oligonukleotiden (Primer) an beide Einzelstränge
- 3) Extension/Elongation: Synthese der DNA durch die Polymerase, ausgehend von den gebundenen Primern

Auswahl und Konzentration der Primer, Qualität (genomisch, Plasmid, lineares Fragment) und Menge des Templates, Pufferbedingungen, Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte beeinflussen die Synthese der DNA.

2.2.14.1 Primer-Design

(Qiagen Handbuch: HotStar-Taq-PCR, 1999)

Das Design von Primer-Paaren ist für die PCR von entscheidender Bedeutung und wurde nach folgenden Grundregeln durchgeführt: Die Länge eines Primers sollte zwischen 17 und 27 Basen liegen. Die Schmelztemperaturen T_m beider Primer eines Primer-Paares sollten nach Möglichkeit identisch sein. Die Kenntnis von T_m ist für die Festlegung der Annealing-Temperatur T_{ann} , bei der ein Primer spezifisch mit einer DNA-Matrize hybridisiert, notwendig. T_m eines Primers in einer PCR ist von den Salz- und Tris-HCl-Konzentrationen im Reaktionspuffer sowie von der Länge, der Konzentration und der Sequenz des Primers abhängig. Als Faustregel zur vereinfachten Berechnung diente folgende Formel:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Dabei stehen G, C, A und T für die Anzahl der jeweiligen Base im Primer.

T_{ann} sollte 5 bis 10°C unter T_m liegen und die Synthesetemperatur der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase (68-72°C) nicht überschreiten.

Weiterhin ist bei dem Design von Primern zu beachten, dass Dimerisierungen durch komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers oder eines Primer-Paares zu vermeiden sind und die Termini zur stabileren Matrix-Bindung möglichst aus einem oder zwei G oder C bestehen sollten.

2.2.14.2 Standard-PCR

Standard-PCR-Anwendungen wurden nach Protokollen aus dem Handbuch von McPherson et al. (1991) durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 oder 100 µl. Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

x ng	Template-DNA
250 nM	sense(5')-Primer
250 nM	antisense(3')-Primer
jeweils 0,2 mM	dNTPs
1x	Reaktionspuffer
0,025 u/µl	Taq-DNA-Polymerase.

Die eingesetzte DNA-Menge variierte, lag aber üblicherweise im Bereich zwischen 50 und 100 ng.

Als Thermocycler-Programm wurden folgende Temperaturen und Zeiten gewählt:

1 min	94°C	} 30 - 35x	Denaturierung der DNA Annealing der Primer Elongation finale Elongation
0,5 min	94°C		
0,5 min	55°C		
1 min pro kb + 2 min	72°C		
10 min	72°C		
∞	4°C		

2.2.14.3 PCR mit dem AccuPrime™-Taq-DNA-Polymerase-System und dem HotStar-Taq-DNA-Polymerase-System

Das AccuPrime™-Taq-DNA-Polymerase-System eignet sich erfahrungsgemäß besonders gut für die Amplifikation von Fragmenten mit genomischer Template-DNA.

Die HotStar-Taq-DNA-Polymerase benötigt einen initialen Aktivierungsschritt von 15 min bei 95°C und eignet sich daher nicht für Amplifikationen von genomischer Template-DNA. Durch die beigefügte Q-Solution (Zusammensetzung wird nicht angegeben) wird jedoch eine äußerst effektive und spezifische Amplifikation erzielt.

Der Ansatz und das Thermocycler-Programm wurden jeweils nach Angaben der Hersteller gestaltet.

2.2.14.4 *In-vitro*-Mutagenese mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

(QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Stratagene, 1996)

Mit Hilfe der *in-vitro*-Mutagenese können ortsspezifisch Punktmutationen oder Deletionen in DNA-Sequenzen erzeugt werden, die zu einem gezielten Austausch von Aminosäuren oder zur Einführung neuer Restriktionsschnittstellen bzw. deren Entfernung führen.

Die Replikation der DNA-Matrize, in die die Mutation eingeführt werden soll, wird von der *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase katalysiert, deren Proofreading-Aktivität die geringste Fehlerrate aller bekannten thermostabilen Polymerasen gewährleistet.

Die einzusetzenden Primer müssen die gewünschte Mutation mittig beinhalten und genau zueinander komplementär sein.

Der Ansatz und das Thermocycler-Programm wurden analog zur Standard-PCR und gemäß der Angaben des Herstellers gestaltet.

Nach Ablauf der Reaktion und Abkühlen des Ansatzes wurde diesem 1 µl des Restriktionsenzym *Dpn* I (10u/µl) zugesetzt, welches die parentale, nicht-mutierte und methylierte DNA verdaute, während die neu synthetisierte, mutierte und nicht-methylierte DNA unverdaut blieb. Der Verdau erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

Direkt nach dem Verdau erfolgte mit 5 µl des Ansatzes eine Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen, welche die DNA wieder zirkularisieren und amplifizieren. Die resultierende Plasmid-DNA konnte nun isoliert werden und der Erfolg der Mutagenese gegebenenfalls durch Sequenzierung oder einen geeigneten Restriktionsverdau überprüft werden.

2.2.15 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde zunächst mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach Protokoll des Herstellers eine spezielle PCR durchgeführt. Als Template dienten entweder PCR-Produkte oder Plasmid-DNA. Das PCR-Produkt wurde mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt, in 25 µl H₂O aufgenommen und in einem kapillarelektrophoretischen Verfahren in einem DNA-Sequencer automatisch sequenziert.

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Gelatinisieren der Flaschen und Platten

Die zuvor sterilisierte Gelatine (1%) wurde mit PBS 1:10 verdünnt und auf die Gewebekulturschalen oder -flaschen gegeben, so dass der Boden bedeckt war. Nach einer Inkubation von mindestens zwei Stunden bei RT wurden die Fibroblasten nach Absaugen der Gelatine auf die Schalen oder Flaschen gegeben.

2.3.2 Trypsinieren von Zellen

Nach Absaugen des Mediums von der Gewebekulturschale wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 15 min mit Trypsin-EDTA 0,25% inkubiert, Fibroblasten hingegen nur 5 min mit Trypsin-EDTA 0.05%. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem entsprechenden Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Dichte auf neue gelatinisierte Gewebekulturschalen ausgesät.

2.3.3 Präparation von primären Neo-resistenten Fibroblasten

Eine trächtige Maus (Tag 12-13 p.c.) wurde schmerzfrei getötet. Das Abdomen wurde eröffnet, der Uterus wurde freipräpariert, entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Die Embryonen wurden aus Uterus und Amnionhöhle herausgelöst und mit PBS gewaschen. Der Kopf wurde abgetrennt, Herz und Leber wurden entfernt. Die Embryonen wurde zerschnitten und wiederum in PBS gespült.

Das Embryonengewebe wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 25 ml 0,25%igem Trypsin und sterilen Glasperlen (\varnothing 4-5 mm) 15 min bei 37°C gerührt, die Trypsinierung durch Zugabe von 25 ml DMEM gestoppt und der Ansatz durch ein Embryonensieb in ein 50-ml-Plastikröhrchen filtriert. Die Zellen wurden

pelletiert, in DMEM resuspendiert, auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und kultiviert. Diese und alle weiteren benutzten Gewebekulturschalen wurden vor der Benutzung gelatinisiert.

Medium für Maus-Embryonen-Fibroblasten (MEF; "Feeder-Zellen"):

500 ml	DMEM (Knock-Out DMEM)
6 ml	MEM non-essential amino acids (100x)
6 ml	L-Glutamin (100x)
3 ml	Penicillin/Streptomycin (100x)
6 ml	β -Mercaptoethanol (7,2 μ l von 14 M Lsg. in 10 ml PBS)
→ diese Lösung vor FKS-Zugabe sterilfiltrieren (0,20 μ m)	
95 ml	FKS (entspr. 15 %).

2.3.4 Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten

Konfluente Mausfibroblasten wurden vor Benutzung als Feederzellen durch Behandlung mit dem Zytostatikum Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Dazu wurde dem Medium in 1:100-Verdünnung Mitomycin C zugesetzt. Nach einer Inkubation über 2,5 h bei 37°C wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und auf neue Gewebekulturschalen ausgesät.

Während einer mindestens 2-stündigen Inkubationszeit setzen sich die mitotisch inaktiven Zellen ab und bilden einen geschlossenen Zellrasen, auf dem ES-Zellen kultiviert werden konnten.

2.3.5 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Sämtliche Methoden lehnen sich an Protokolle an, wie sie in "*Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*" (Robertson, 1987), "*Gene Targeting*" (Joyner, 1993), "*Manipulating the Mouse Embryo*" (Hogan et al., 1994) und "*Gene targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells*" (Mansouri, 1998) beschrieben sind.

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂ bei 37°C auf einem Rasen aus mitotisch inaktivierten Maus-Embryonen-Fibroblasten (MEF; "Feeder-Zellen") kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

Die Arbeiten mit ES-Zellen wurden in einem separaten Zellkulturlabor ausgeführt; es wurde stets mit Kittel und Handschuhen gearbeitet, um die Wahrscheinlichkeit von Infektionen zu senken. Alle Arbeiten wurden mit Einweg-Plastikmaterial (Pipetten, Plastikröhrchen, Gewebekulturschalen) durchgeführt.

Die Zellen wuchsen in abgerundeten, gut abgrenzbaren Kolonien und wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Je nach Ansäuerung durch die ES-Zellen wurde das Medium gewechselt. Diesem wurde u.a. LIF (Leukemia Inhibitor Factor) zugesetzt, welcher eine Differenzierung der ES-Zellen verhinderte.

Eine erneute Passagierung wurde, je nach Dichte der Zellen, alle zwei bis vier Tage durchgeführt. Für optimale Ergebnisse mussten sich die ES-Zellen zum Zeitpunkt von Passagierung, Kryokonservierung oder Elektroporation noch im exponentiellen Wachstum (bis zu 80 % Konfluenz) befinden.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, für 7 min bei 1000 rpm in der Labofuge.

Medium für ES-Zellen:

500 ml DMEM (Knock-Out DMEM)

6 ml MEM non-essential amino acids (100x)

6 ml L-Glutamin (100x)

3 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

6 ml β-Mercaptoethanol (7,2 µl von 14 M Lsg. in 10 ml PBS)

65 µl LIF (Chemicon ESGRO ESG1107)

→ diese Lösung vor FKS-Zugabe sterilfiltrieren (0,22 µm)

95 ml FKS (entspr. 15%; Hyclone, ES-Cell-tested; steril, nicht hitzeinaktiviert).

2.3.6 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und im gewünschten Volumen ES-Medium aufgenommen. Nun wurde tropfenweise unter leichtem Schütteln dieselbe Menge Einfriermedium zugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt, stufenweise auf -80°C über Nacht abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:	60 %	DMEM
	20 %	FKS
	20 %	DMSO.

2.3.7 Revitalisierung von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstoff-Tank wurde es für 1 min bei RT angewärmt und dann im 37°C -Ethanolbad unter Schwenken aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Nun wurde tropfenweise das 3- bis 5-fache Volumen an ES-Medium zugeben und ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um die für die Zellwand schädlichen DMSO-Reste zu entfernen.

2.3.8 DNA-Transfer in ES-Zellen durch Elektroporation

Die ES-Zellen von 2 konfluenten 10-cm-Gewebekulturschalen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert, mit Medium resuspendiert, 7 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und erneut in PBS aufgenommen. $800\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden in eine sterile Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand) gegeben. 20-25 μg linearisierte DNA (Rekombinationskonstrukt) in EB-Puffer wurden der Zellsuspension zugesetzt und der Ansatz gemischt.

Nun wurde eine Kapazität von $500\ \mu\text{F}$ bei einer Spannung von 240 V über die Elektroporationsküvette durch die Zell/DNA-Suspension entladen. Durch Einwirkung eines solchen kurzen elektrischen Impulses oberhalb einer kritischen

Feldstärke werden biologische Membranen vorübergehend permeabilisiert, ohne dass die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit konnte das Rekombinationskonstrukt in die ES-Zellen eindringen. Die Zellen wurden nach dem Strompuls für 10 min bei RT stehengelassen, dann in ES-Medium aufgenommen und auf zwei vorbereitete 15-cm-Feederplatten verteilt. Als Negativ-Kontrolle wurden die ES-Zellen einer weiteren 10-cm-Platte ohne Zugabe von DNA elektroporiert.

2.3.9 Selektion von ES-Zell-Klonen nach Elektroporation

Transfizierte Zellen wurden 24 h nach der Elektroporation auf G418 (Geneticin®)-Resistenz selektiert, die bei erfolgreicher Rekombination durch die im Rekombinationskonstrukt enthaltene Neo-Kassette vermittelt wurde.

Dem ES-Medium wurde zu diesem Zweck 335 µg/ml G418 zugesetzt. Die Selektion wurde bis zur Isolierung von Einzelklonen nach 10 Tagen aufrechterhalten.

2.3.10 Isolierung von ES-Zell-Einzelklonen

Das Medium der Selektionsschalen wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS bedeckt. Unter dem Mikroskop wurden die Klone mit einer 20-µl-Pipette durch leichtes Umkratzen gelöst und aufgesaugt. Die Zellen eines Klons wurden in 0,25 %igem Trypsin-EDTA überführt, 15 min bei 37°C inkubiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Loch einer mit einem Feederrasen bedeckten 12-Loch-Gewebekulturplatte gegeben.

Die ES-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, durch Trypsinieren geerntet und der größte Teil eines jeden Loches kryokonserviert. Der geringe übriggebliebene Teil der Zellen wurde auf der Platte belassen, mit neuem Medium versetzt und nach erneuter Konfluenz der Zellen die genomische DNA isoliert. Mit Hilfe von Southernblot-Analysen und PCR wurde auf homologe Rekombinationsereignisse hin untersucht.

2.3.11 Ausschneiden der geflochten Neo-Kassette

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Neo-Kassette, die von zwei loxP-Sequenzen eingeschlossen war (gefloxt), als Selektionsmarker verwendet. Dies ermöglicht es, den Selektionsmarker schon vor der Mikroinjektion aus den homologen rekombinanten ES-Zellen wieder zu entfernen. Mit Hilfe der Elektroporation wurden 30 µg eines Cre-Rekombinase-Gen enthaltenden Plasmides in die ES-Zellen gebracht. Eine anschließende Selektion ist nicht mehr möglich. Mit Southernblot-Analysen oder PCR konnten die Zellen erneut überprüft werden.

2.3.12 Vorbereitung von ES-Zellen für die Mikroinjektion

Als Vorbereitung für die Mikroinjektion der ausgewählten ES-Zell-Klone wurden diese auf einer dünn bewachsenen 6-cm-Platte einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren wurden sie in 5 ml ES-Medium resuspendiert und 15 min auf der Platte bei 37°C ruhig stehen gelassen. In dieser Zeit setzten sich die schwereren Fibroblasten auf den Boden ab. Die leichteren ES-Zellen wurden anschließend mit dem Überstand in ein 15-ml-Plastikröhrchen überführt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung der Gene-Targeting-Vektoren (GTV)

Das murine Gen *Pmm2* besitzt eine Größe von 20 kb und umfasst acht Exons. Es kodiert für ein Protein mit einer Größe von 258 Aminosäuren. Zur einfacheren Handhabung wurden Zwischenprodukte des GTV in einen pBlueScript-Vektor (pB-SK) subkloniert.

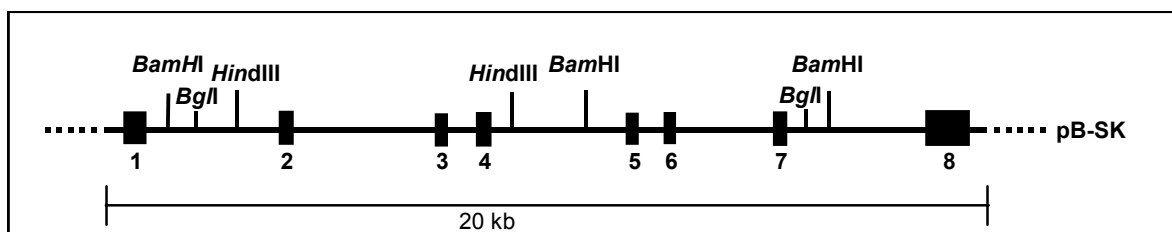


Abb. 5: Das *Pmm2*-Gen als subkloniertes Fragment im Vektor pBlueScript SK. Die eingezeichneten Restriktions-Schnittstellen wurden für die Konstruktion der Gene-Targeting-Vektoren benutzt.

Ziel war es, zwei Gene-Targeting-Vektoren zu generieren. Ein GTV, GTV-F115L, soll auf Exon 5 die Mutation F115L enthalten, der andere, GTV-R137H, ebenfalls auf Exon 5 die R137H-Mutation. Zur Einbringung der Mutationen wurde das 4-kb-*Bam*HI-Fragment, welches die Exons 5, 6, und 7 beinhaltet, für die *in-vitro*-Mutagenesen in pBlueScript SK subkloniert. Selektionsmarker für beide Konstrukte war eine Neomycin-Kassette, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert wurde und in das Intron 2 des *Hind*III-Fragmentes inseriert wurde.

3.1.1 Integration der Neo-Kassette

Als Selektionsmarker für beide GTV diene ein von zwei loxP-Sequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen. Diese „geflochte“ Neo-Kassette wurde in einen

nicht kodierenden Bereich des Gens inseriert und konnte nach Selektion mit Hilfe des sequenzspezifischen Cre/loxP-Rekombinationssystems aus dem Bakteriophagen P1 (Austin et al., 1981) anschließend wieder entfernt werden. Die Cre-Rekombinase gehört einer Familie sequenzspezifischer Rekombinasen an (Argos et al., 1986). Während des Prozesses der Rekombination erkennt das Cre-Protein die Sequenzen der loxP-Oligonukleotide und bindet an ihnen. Liegen zwei dieser loxP-sites mit Cre in direktem Kontakt, bildet sich ein Komplex aus vier Cre-Molekülen und zwei loxP-sites. Zwischen diesen beiden Bereichen findet dann die homologe Rekombination statt.

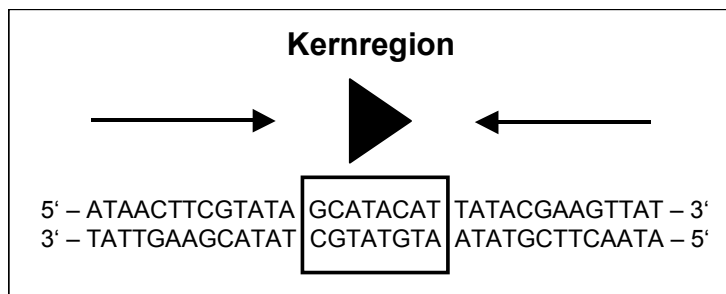


Abb. 6: **Aufbau einer loxP-Signalsequenz.** Sie besteht aus 34 Basenpaaren. Eine aus acht Basenpaaren bestehende Kernregion ist von zwei gegenläufigen identischen Sequenzen umgeben. Die nicht symmetrische Kernregion bestimmt die Orientierung der loxP-site (symbolisiert durch das Dreieck).

Liegen die loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung, wird der dazwischenliegende DNA-Bereich herausgeschnitten; sind sie entgegengesetzt orientiert, resultiert eine Inversion des entsprechenden Bereichs (Austin et al., 1981). Befinden sich die Signalsequenzen auf unterschiedlichen DNA-Molekülen, führt dies zum intermolekularen, reziproken Austausch der die loxP-Sequenzen flankierenden Bereiche.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System zur Entfernung der Neo-Kassette benutzt. Das Neomycin-Resistenzgen mit eigenem Promotor wurde von zwei loxP-Signalsequenzen mit gleicher Orientierung flankiert. Somit bestand die Möglichkeit in selektierten ES-Klonen die Neo-Kassette durch Elektroporation mit der Cre-Rekombinase wieder zu entfernen, wobei lediglich eine loxP-Signalsequenz zurückbleibt.

Die „gefloxt“ Neo-Kassette stand als 1,3 kb großes *Xba*I/*Sal*I-Fragment im pBlueScript-Vektor zur Verfügung. Um es als *Sal*I-Fragment in ein Intron des *Pmm2*-Gens zu inserieren, wurde durch gezielte *in-vitro*-Mutagenese (Primer: floxneo-*Sal*I-rein 1, -2) vor der *Xba*I-site eine zweite *Sal*I-site generiert (Abb.7).

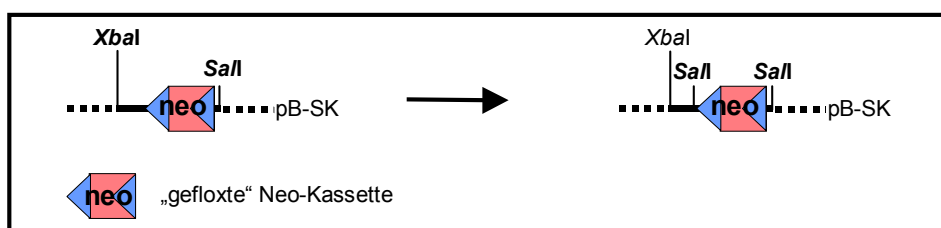


Abb. 7: Im zur Verfügung stehenden Fragment mit „gefloxter“ Neo-Kassette wurde am 5'-Ende der Neo-Kassette eine zweite *Sal*I-site generiert.

Zur Integration der Neo-Kassette als *Sal*I-Fragment wurde in das Intron 2, zwischen Exon 2 und Exon 3, eine *Sal*I-site durch *in-vitro*-Mutagenese eingebracht. Dazu wurde das 5,5 kb große *Hind*III-Fragment subkloniert, welches die Exons 2, 3 und 4 einschließt. Durch *in-vitro*-Mutagenese (Primer: pB*Hind*III-raus 1, -2) wurde ein pBlueScript-Vektor generiert, der in seiner Multiple Cloning Site (MCS) keine *Hind*III-Schnittstelle mehr besitzt. In diesen mutagenisierten Vektor (mut-pB-SK-*Hind*III-raus) wurde das 10-kb-*Bam*HI-Fragment mit den Exons 2 bis 4 subkloniert. Nach einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hind*III wurde dieses 5,5-kb-*Hind*III-Fragment in einen pBlueScript-Vektor subkloniert, der in seiner MCS keine *Sal*I-site mehr besitzt. Wie oben beschrieben wurde durch *in-vitro*-Mutagenese (Primer PMM2-*Sal*I-rein 1, -2) eine *Sal*I-Schnittstelle in das Intron 2 eingefügt. Nun konnte die „gefloxt“ Neo-Kassette nach entsprechendem Verdau als *Sal*I-Fragment in das Intron inseriert werden (siehe Abb.8). Dieses wurde mittels Kontrollverdau und PCR (Primer: Neo 1, TL44) überprüft.

Das 6,8 kb große HindIII-Fragment, welches die Neo-Kassette enthielt, wurde wieder zurück in das BamHI-Fragment kloniert. Die korrekte Orientierung wurde mittels PCR bestätigt (Primer: TL42, TL61).

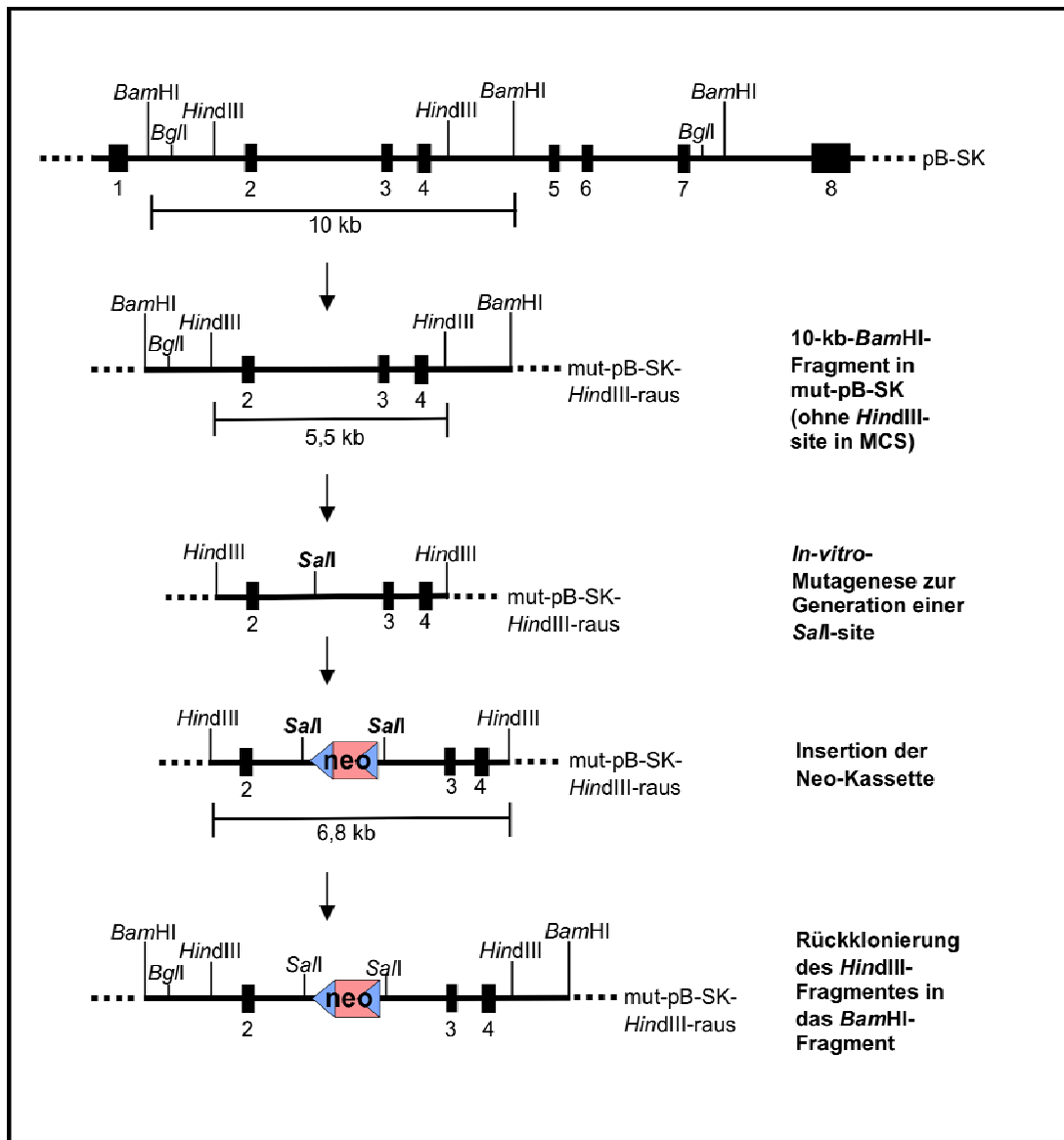


Abb. 8.: Schema zur Integration der Neo-Kassette. Das 10-kb-BamHI Fragment wurde in einen zuvor mutagenisierten pB-SK ohne HindIII-site eingebracht. Nach einer weiteren Subklonierung des enthaltenen HindIII-Fragmentes und Einfügen einer SalI-site ins Intron 2 konnte die „gefloxt“ Neo-Kassette inseriert werden.

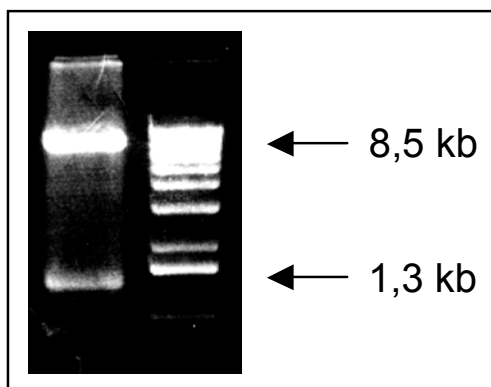


Abb: 9: Analytisches Agarosegel nach *Sall*-Kontrollverdau. Das *HindIII*-Fragment bildet zusammen mit dem pB-SK die Bande bei 8,5 kb; die inserierte Neo-Kassette bildet die 1,3-kb-Bande.

3.1.2 Einbringen der Mutation F115L bzw. R137H

Mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bam*HI wurde ein 4 kb großes Fragment subkloniert, welches die Exons 5, 6 und 7 einschließt. Sowohl die Mutation F115L als auch die R137H-Mutation wurden in Exon 5 eingebracht. Mit gezielter *in-vitro*-Mutagenese (Primer: PMM2-F119L A, -B; PMM2-R141H A, -B) wurden zwei Konstrukte hergestellt (a: 4 kb *Bam*HI-F115L; b: 4 kb *Bam*HI-R137H). Das codierende Triplett der Aminosäure an Position 115 für Phenylalanin wurde im Konstrukt a durch den Austausch einer Base in eine codierende Sequenz für Leucin mutagenisiert. Um im Konstrukt b die R137H-Mutation einzufügen, wurden zwei Basen ausgetauscht, so dass das veränderte Triplett an der Position 137 nun für Histidin statt Arginin codiert (Abb.: 10).

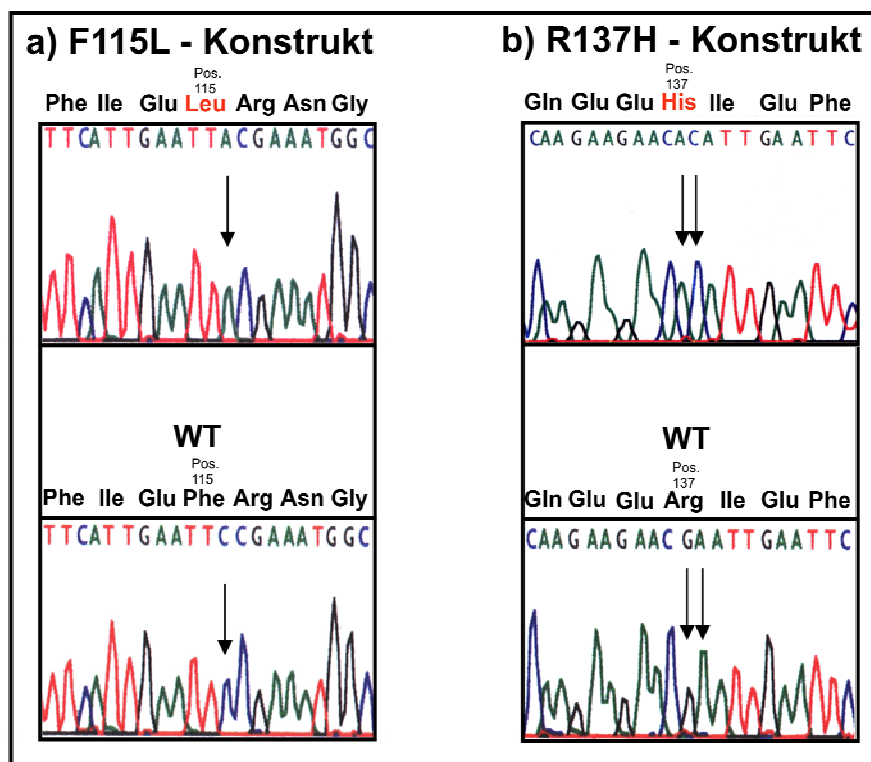


Abb. 10: Basensequenz der beiden GTV im Bereich der jeweiligen Mutation. Im Konstrukt a wurde für die F115L-Mutation mit in-vitro-Mutagenese Cytidin durch Adenin (5'→3') ersetzt. Statt Phenylalanin ist nun Leucin die resultierende Aminosäure. Im Konstrukt b wurden Guanin und Adenin gegen Adenin und Cytidin (5'→3') ausgetauscht, so dass die Basen für Histidin und nicht für Arginin codieren. Die mit WT bezeichneten Sequenzen zeigen die ursprünglichen Wildtyp-Sequenzen im entsprechenden Bereich.

3.1.3 Zusammenfügen der Fragmente für GTV-F115L und GTV-R137H

Die vorbereiteten Fragmente für die beiden GTV mussten anschließend in ursprünglicher Orientierung wieder zusammengefügt werden. Es handelte sich um ein 11,3-kb-*Bam*HI-Fragment, welches die „gefloخته“ Neo-Kassette enthält, je ein 4-kb-*Bam*HI-Fragment mit der Mutation F115L bzw. R137H (Konstrukt a und b) und den entsprechenden Vektor, ebenfalls mit *Bam*HI-Enden. Eine Drei-Fragment-Ligation schlug fehl, darum wurden in den zwei subklonierten 4-kb-*Bam*HI-Fragmenten, welche die beiden Mutationen enthielten, die 3'-gelegene *Bam*HI-site

mittels *in-vitro*-Mutagenese beseitigt (Primer: 4kb *Bam*HI raus 1, -2). Nach *Bam*HI-Verdau ergab sich nachfolgend ein linearisiertes 7-kb-Konstrukt, bestehend aus dem jeweiligen 4-kb-*Bam*HI-Fragment und dem 3-kb-pBlueScript-Vektor (Abb. 11b).

Nach der Entfernung der 3'-*Bam*HI-Schnittstelle konnten das 11,3-kb-*Bam*HI-Fragment und das 7-kb-*Bam*HI-Fragment ligiert werden (Abb. 11a). Die erfolgte Ligation und die richtige Orientierung dieser beiden Fragmente zueinander wurden mittels entsprechenden Kontrollverdaus und PCR überprüft (Primer: TL27, PMM2-F119L-B, Abb. 11c).

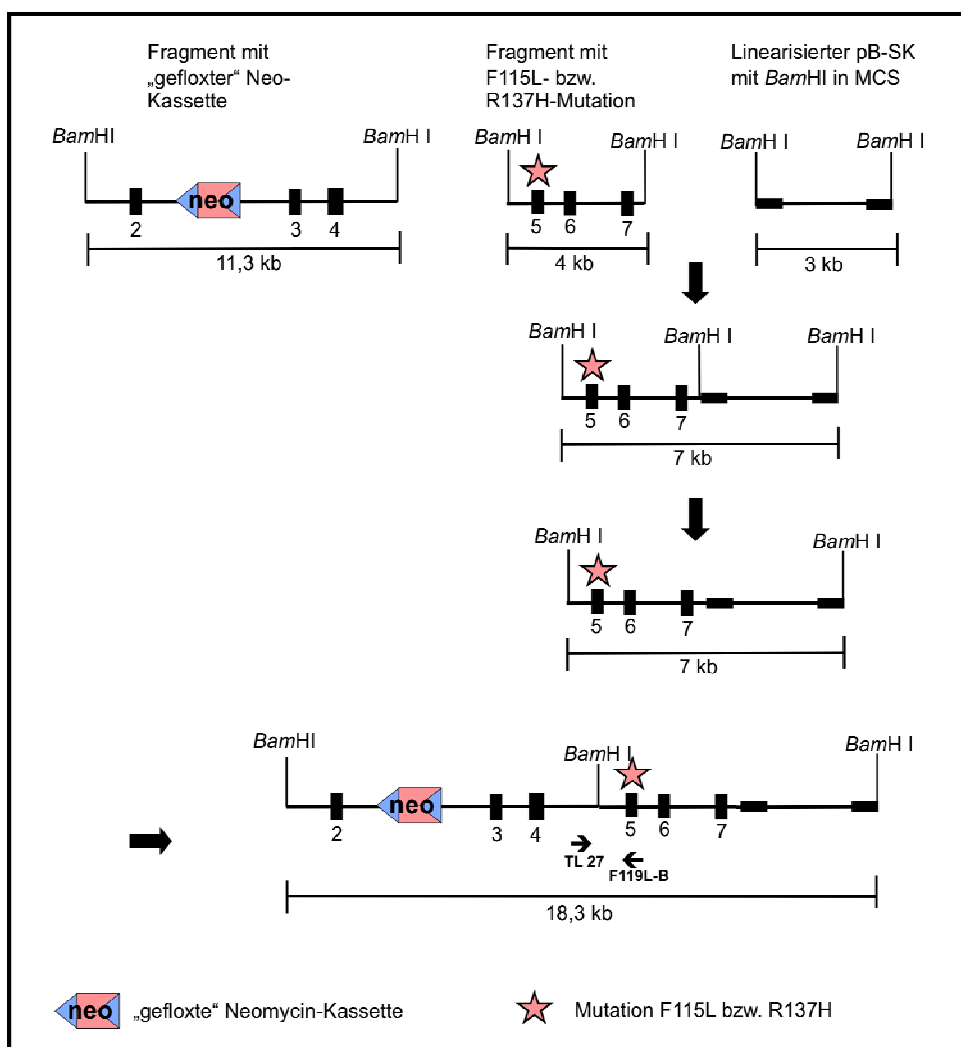


Abb. 11a: Schema zur 3-Fragment-Ligation. Zwei *Bam*HI-Fragmente mit je 4 und 3 kb wurden ligiert, um anschließend die mittig gelegene *Bam*HI-site zu entfernen. Nach Kontrolle der richtigen Orientierung wurde das dritte *Bam*HI-Fragment mit Neo-Kassette ligiert.

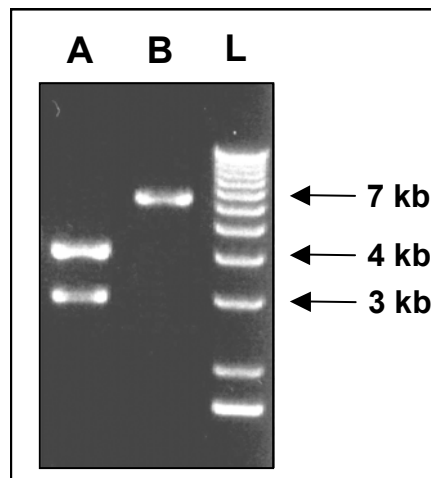


Abb. 11b: Analytisches Agarosegel nach Kontrollverdau mit *Bam*HI. Spur A zeigt den Vektor bei 3 kb und das 4-kb-*Bam*HI-Fragment vor der Mutagenese zur Zerstörung der 3' *Bam*HI-site. In Spur B erkennt man die erfolgreiche Mutagenese. Das *Bam*HI-Fragment und der Vektor liegen linearisiert bei 7 kb vor. Diese Mutagenese wurde für Konstrukt a und b durchgeführt.

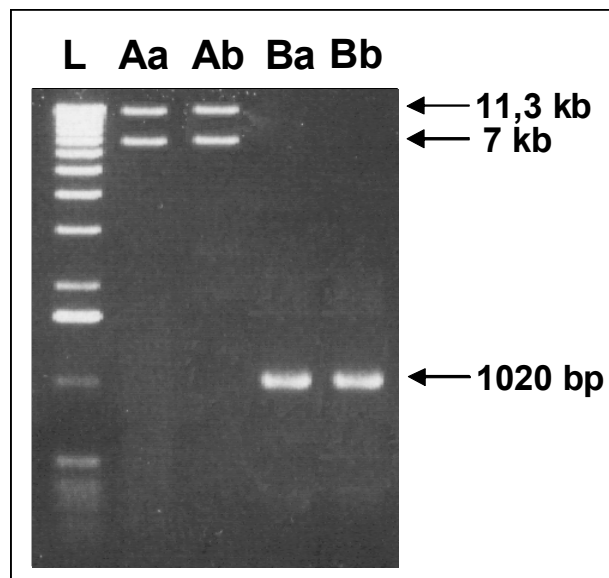


Abb. 11c: Analytisches Agarosegel zur 3-Fragment-Ligation. Aa,Ab: Kontrollverdau der Fragmente nach Entfernung der 3'-*Bam*HI-site für Konstrukt a und b mit *Bam*HI. Ba, Bb: Bande nach PCR mit Primern TL27 und F119L-B. Durch korrekte Orientierung der Fragmente entsteht für beide Konstrukte jeweils eine Bande bei 1020 bp.

3.1.4 Vorbereitung der zwei GTV zur Elektroporation

Für eine höchstmögliche Effizienz der Elektroporation mit anschließender homologer Rekombination sollte das verwendete Targeting-Konstrukt mehr als 10 kb homologe DNA-Sequenz besitzen, wovon mindestens 1,5 kb sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende liegen sollten. Zudem sollte das Konstrukt in linearisierter Form elektroporiert werden. Aus diesen Gründen wurde ein Restriktionsverdau mit *Bgl*I durchgeführt, das am 5'-Ende vor dem Exon 2 und hinter Exon 6 am 3'-Ende schneidet, um ein 14,3 kb großes Fragment zu generieren (Abb. 12).

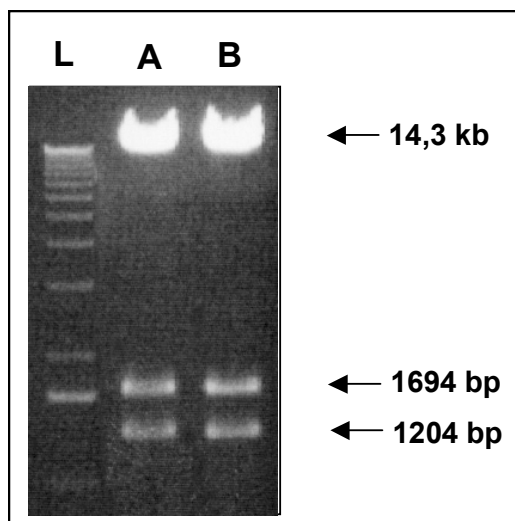


Abb. 12: Gelelektrophorese nach *Bgl*I-Verdau des F115L-Konstruktes (A) und des R137H-Konstruktes (B). Das 14,3-kb-*Bgl*I-Fragment wurde jeweils geextrahiert und zur Elektroporation verwendet. Die beiden kleineren Banden bei 1694 bp und 1204 bp entstanden durch eine weitere *Bgl*I-site in der MCS des Vektors.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Extraktion entstand ein *Bgl*I-Fragment mit „gefloxter“ Neo-Kassette und F115L-Mutation, sowie eines mit der R137H-Mutation. Das jeweilige linearisierte *Bgl*I-Fragment kann nach erfolgter Gel-Extraktion zur Elektroporation genutzt werden.

3.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

3.2.1 Elektroporation der ES-Zellen

Embryonale Stammzellen wurden auf Feederzellen kultiviert und bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte durch Elektroporation mit den linearisierten *BglI*-Fragmenten transfiziert. Die anschließende Selektion der rekombinanten Klone wurde mit G418[®] durchgeführt. In jeweils sieben Elektroporationsrunden wurden von beiden Zellreihen (GTV-F115L und GTV-R137H) 840 bzw. 900 überlebende Klone isoliert und getrennt kultiviert. Ein Teil der Zellen jedes Klones wurde eingefroren und aus dem Rest wurde genomische DNA zur Analyse präpariert.

3.2.2 Southern-Blot-Analyse der selektierten Klone

Ein Teil der präparierten DNA aus jedem der insgesamt 1740 Klone wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Southern-Blots auf homologe Rekombinations-Ereignisse untersucht. Es wurde eine externe Sonde (Primer: TL24, TL25) verwendet, die 5' des zweiten Exons und innerhalb des *Bam*HI-Fragmentes bindet. Das Wildtyp-Fragment hat eine Länge von 10 kb, während das Fragment des rekombinanten Allels durch die Insertion der Neo-Kassette eine Länge von 11,3 kb aufwies (Abb. 13a und 13b).

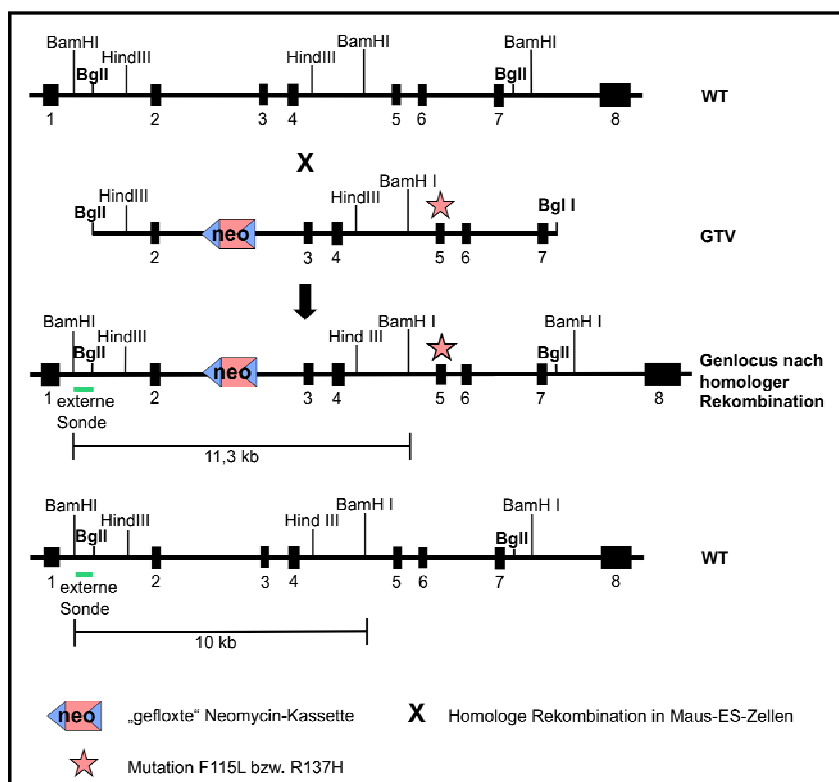


Abb. 13a: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.

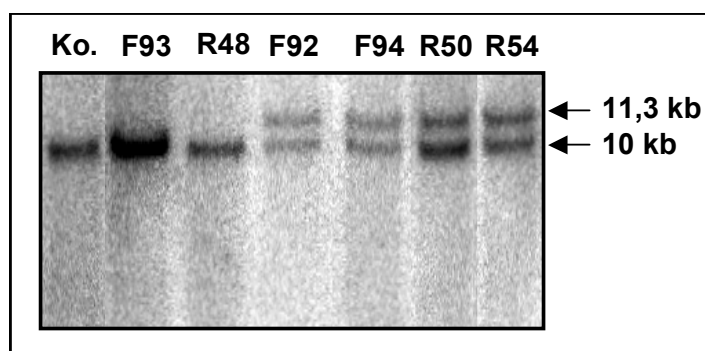


Abb 13b: Bandenmuster nach Southern-Blot mit genomischer DNA aus verschiedenen ES-Zell-Klonen und einer Kontroll-DNA. Sowohl die Kontrolle (Ko.) als auch die exemplarisch ausgewählten Klone F93 und R48 zeigen eine Bande bei 10 kb. Die Klone F92, F94, R50 und R54 weisen eine zusätzliche Bande bei 11,3 kb auf.

Die Klone F92, F94, R50 und R54 aus der siebten Elektroporationsrunde (die Bezeichnung der Klone mit ‚F‘ und ‚R‘ richten sich nach dem elektroporierten Konstrukt; GTV-,F'115L, GTV-,R'137H) wiesen gegenüber der nicht transfizierten

Kontrolle im Southern-Blot eine zusätzliche Bande bei 11,3 kb auf. Diese Veränderung des Bandenmusters konnte bei 0,24 % der selektionierten F115L-Klone und 0,22 % der selektionierten R137H-Klone nachgewiesen werden. ES-Zell-Klone mit rekombinantem Allel wurden zusätzlich auf die eingebrachten Mutationen F115L und R137H hin untersucht. Mittels einer nested-PCR mit zwei externen Primern (PMM2-Test A, 4kb rev 1; PMM2-Test D, 4kb rev 2) wurde ein 3500-bp-Fragment amplifiziert (Abb. 14a), welches die Exons 5, 6 und 7 enthielt.

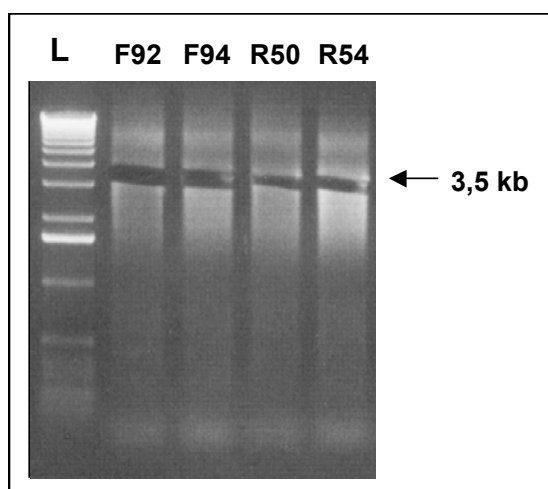


Abb. 14a: Gelelektrophorese-Foto nach Gelextraktion der Banden bei 3,5 kb zur Sequenzierung. Die jeweilige Bande ergab sich nach einer nested-PCR mit Primern PMM2-Test A, 4kb rev 1, PMM2-Test D, 4kb rev 2. Ausgangsmaterial war genomische DNA der Klone F92, F94, R50 und R54.

Sowohl die Klone, die mit dem F115L-Konstrukt transfiziert worden sind, als auch die R137H-transfizierten Klone wiesen Heterozygotie für die entsprechende Mutation auf (Abb. 14b).

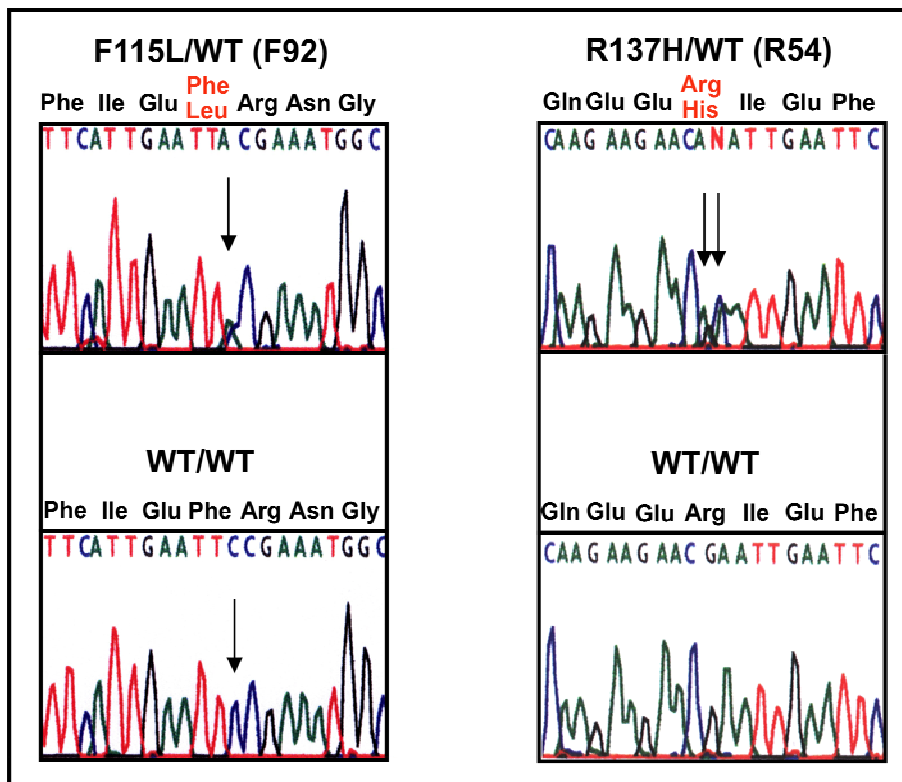


Abb.14b: Vergleich genomischer DNA-Sequenzen von F92, R54 und Wildtyp im Bereich der eingeführten Mutationen.

Zwei dieser positiv getesteten Klone, F92 mit dem Genotyp F115L+Neo/WT und R54 mit Genotyp R137H+Neo/WT, wurden für die Cre-Rekombinase-Reaktion zum Ausschneiden der Neo-Kassette vorbereitet. Dazu wurden beide Klone aus den eingefrorenen Beständen aufgetaut und kultiviert, bis sie eine geeignete Dichte auf den Feeder-Platten besaßen. Diese ES-Zellen wurden dann mit 30 µg eines Cre-Rekombinase-Gen enthaltenden Plasmides elektroporiert. Die transgenen ES-Zellen konnten nach dieser Elektroporation nicht selektiert werden, da der Selektionsmarker bei erfolgreicher Cre-Rekombinase-Reaktion entfernt wurde. Aus beiden Zelllinien wurden je 120 Klone isoliert und kultiviert. Ein Teil jedes Klones wurde eingefroren, der andere Teil für die Präparation der DNA benutzt. Die Überprüfung der Klone erfolgte erneut durch *Bam*HI-Verdau der DNA und anschließenden Southern-Blot mit der bereits beschriebenen externen Sonde (Abb. 15).

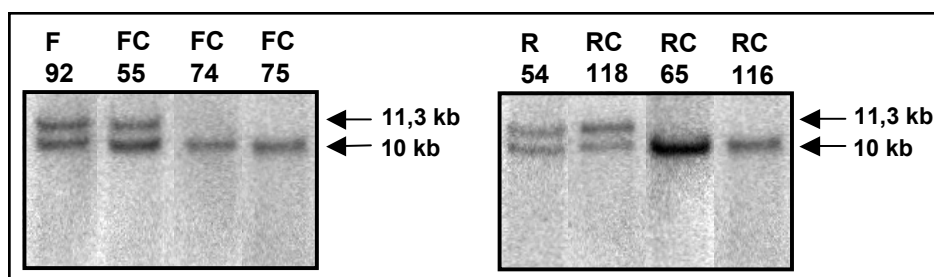


Abb. 15: Bandenmuster nach Southern-Blot mit genomischer DNA der Ausgangsklone F92 bzw. R54 und deren jeweilige ES-Zell-Klone nach der Cre-Rekombinase-Reaktion.

Bei den Klonen FC74 und FC75 sind die Banden des rekombinanten Allels bei 11,3 kb, wie sie im Ausgangsklon F92 noch zu sehen war, nicht mehr vorhanden. Gleiches war auch bei den Klonen RC65 und RC116 zu beobachten, die beide dem Ausgangsklon R54 entstammten. Eine erfolgreiche Cre-Rekombinase-Reaktion mit entsprechendem Ausschneiden der Neo-Kassette konnte bei jeweils vier von 60 Klonen beobachtet werden. Die im Intron verbliebenen 34 Basenpaare der loxP-site im rekombinanten Allel sind in der gelelektrophoretischen Auftrennung nicht zu erkennen. Die eingebrachten Mutationen F115L bzw. R137H wurden in oben beschriebener Weise erneut bestätigt.

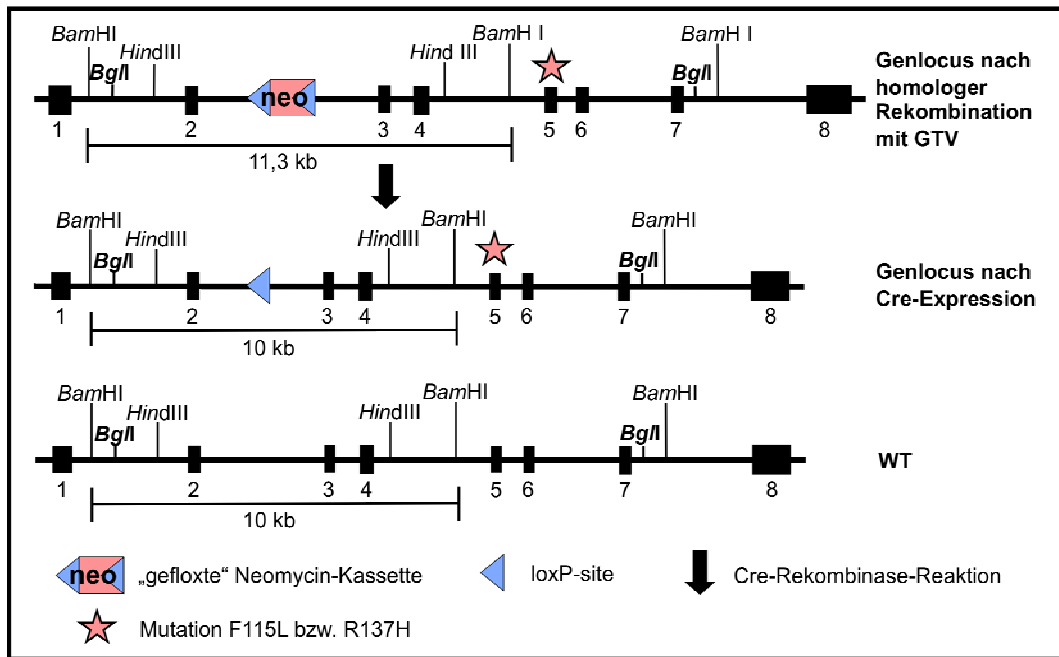


Abb. 16: Schematische Darstellung des *Pmm2*-Genlocus zur Cre-Rekombinase-Reaktion

3.3 Mikroinjektion der ES-Zellen

Insgesamt stehen jeweils 4 rekombinante Klone je Mutation (R137H und F115L) zur Erzeugung der Keimbahnchimären zur Verfügung.

4 Diskussion

4.1 CDG-Ia

Bei CDG-Ia-Patienten ist die Synthese der Glykoproteine an einem sehr frühen Zeitpunkt gestört. Der Defekt wird durch die stark verminderte Aktivität des zytosolischen Enzyms Phosphomannomutase 2 ausgelöst. Es setzt Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat um (van Schaftingen und Jaeken, 1995). Als Konsequenz sinkt nachfolgend die Konzentration von GDP-Mannose und Dol-P-Mannose. Da GDP-Man und Dol-P-Man für die Synthese der lipidverknüpften Oligosaccharide (LLO) benötigt werden, entstehen in den nachfolgenden Schritten meist unvollständige LLOs wie $\text{Man}_5\text{Glc-NAC}_2$ (Panneerselvam und Freeze, 1996). Die verkürzten LLOs werden nur mit sehr geringer Effizienz vom OST auf ein Protein übertragen (Körner et al., 1998); so dass es zum partiellen Verlust ganzer Oligosaccharid-Seitenketten auf dem reifen Glykoprotein kommt.

Da Glykoproteine im Organismus vielfältige und wichtige Funktionen ausüben, ist auch das phänotypische Spektrum der CDG-Ia-Patienten weitreichend und heterogen. Man kann die Patienten nach ihrem klinischen Bild grob in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe fällt vorrangig durch neurologische Defizite auf, während die zweite Gruppe über die neurologischen Probleme hinaus auch schwerwiegende intestinale Komplikationen entwickelt. Des Weiteren variieren die Ausprägungen der Symptome unter den CDG-Ia-Patienten stark. Das Spektrum reicht von Kindern, die mit axialer Hypotonie der Muskulatur und psychomotorischen Retardierungen verhältnismäßig leicht betroffen sind, bis hin zu Kindern mit zusätzlichem Strabismus, Areflexie, Epilepsie und cerebellärer Hypoplasie. Auch bei den extraneurologischen Symptomen reicht es von leichten Wachstums-Retardierungen bis zu ständigem Erbrechen, Diarrhoe, Steatorrhoe und Anorexie (de Lonlay et al., 2001, Jaeken und Carchon 2004). In beiden Gruppen können häufig dysmorphe Zeichen wie invertierte Brustwarzen oder ungewöhnliche Fettansammlungen im Oberarm- und Gesäßbereich beobachtet werden.

4.2 Therapieansätze

Bisher existiert keine wirksame Therapie für CDG-Ia-Patienten. Die Behandlung erfolgt lediglich symptomatisch. Jedoch sind mit dem Wissen über die biochemischen Grundlagen der Erkrankung einige Therapieansätze veröffentlicht worden.

So wurden Haut-Fibroblasten von CDG-Ia-Patienten in der Zellkultur auf die Zucker-Struktur ihrer lipid-verknüpften Oligosaccharide (LLO) untersucht. Im Gegensatz zu gesunden Kontroll-Fibroblasten konnten in den Zellen der Patienten zum großen Teil nur unvollständig glykosylierte Vorstufen der LLOs nachgewiesen werden. Dieser Defekt konnte durch Zuführung eines mannosereichen Nährmediums ausgeglichen werden. Analysen der Oligosaccharide von CDG-Ia-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten zeigten nach der Behandlung mit Mannose keine Unterschiede mehr (Körner et al., 1998; Panneerselvam and Freeze, 1996). Zudem steigt die GDP-Mannose-Konzentration in den Patienten-Fibroblasten von durchschnittlich 2,4 pmol/10⁶Zellen auf 15,5 pmol/10⁶Zellen, was ca. 75 % der GDP-Mannose in gesunden Fibroblasten-Zellen entspricht (Rush et al., 2000). Scheinbar kann durch die exogene Zufuhr des Substrates Mannose die verminderte Aktivität der Phosphomannomutase annähernd kompensiert werden. Versuche, diesen Therapieansatz auch auf CDG-Ia-Patienten zu übertragen, zeigten bislang keine Erfolge. Durch die Gabe von Mannose (sowohl oral als auch intravenös) konnte die Mannose-Konzentration im Serum der Patienten auf ein mehrfaches des Normalen angehoben werden. Es zeigte sich jedoch weder eine Verbesserung des gesundheitlichen Zustandes der behandelten Kinder noch eine Verbesserung der unvollständig synthetisierten Glykoproteine (Mayatepek et al., 1997; Mayatepek und Kohlmüller, 1998). Die Ursache für die unterschiedlichen Effekte in der Fibroblastenkultur und beim CDG-Ia-Patienten ist bislang nicht geklärt.

Ein anderes Therapiekonzept ist es, den Defekt der PMM2 zu umgehen und den Zellen Mannose-1-Phosphat zuzuführen. Mannose-1-Phosphat selbst ist jedoch wegen der hohen Polarität nicht membrangängig und kann nicht in die Zellen transportiert werden. Darum arbeiten mehrere Arbeitsgruppen daran, membrangängige Derivate zu synthetisieren. Nach Applikation und Aufnahme dieser Prodrugs in die Zelle, steht nach intrazellulärer und enzymatischer

Wiederaufarbeitung Mannose-1-Phosphat der N-Glykosylierung zur Verfügung. Bisher veröffentlichten Prodrugs mangelt es derzeit noch an Stabilität der Verbindung und damit einer ausreichenden Halbwertszeit. Zudem sind relativ hohe Konzentrationen im Serum nötig, um suffizient über die Zellmembran aufgenommen zu werden. In diesem Zusammenhang muss auch die Toxizität der bisher verfügbaren Derivate genannt werden, die in den notwendigen Konzentrationen auftritt. Einige Prodrugs konnten in der Zellkultur von CDG-Ia-Fibroblasten die gestörte LLO-Synthese normalisieren (Muus et al., 2004; Eklund et al., 2005, Hardré et al., 2007).

Um diese und andere Therapie-Optionen an höher entwickelten Organismen zu testen und um mehr über die Pathophysiologie zu lernen, wurde versucht, ein Mausmodell für CDG-Ia zu entwickeln (Thiel et al., 2006).

4.3 Pmm2-Knock-Out

Thiel et al. schalteten das Pmm2-Gen in Mäusen gezielt aus. Heterozygote Tiere für diesen Pmm2-Knock-Out zeigten sich in Entwicklung, Fertilität und Anatomie unverändert zu den Wildtyp-Tieren. Hingegen konnten keine homozygoten Mäuse mit einem Pmm2-Knock-Out unter den 220 Nachkommen von verpaarten heterozygoten Tieren gefunden werden. Erst genotypische Untersuchungen in der frühen embryonalen Entwicklung dieser Nachkommen konnten bis zum Tag 2,5 nach Befruchtung homozygote Embryonen mit einem Pmm2-Null-Allel nachweisen (Thiel et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass ein vollständiger Knock-Out des Pmm2-Gens nicht mit dem Leben vereinbar ist und zu einer sehr frühen embryonalen Entwicklungsstörung führt. Korrespondierend beginnt um den Tag 2,5 des Embryos die Proteinbiosynthese und der Abbau der maternalen RNA ist zu 90 % erfolgt (Schultz, 2002).

Eine weitere Erklärung für ein embryonales Absterben zu diesem Zeitpunkt könnten Hindernisse in der Nidation der befruchteten Eizelle im Uterus sein. Kitamura et al. meinen, dass Glykoproteine an der Zelloberfläche in den interzellulären Erkennungsmechanismen zwischen Embryo und dem Epithel des Endometriums eine wichtige Rolle spielen (Kitamura et al., 2003). Durch die gestörte Glykoproteinbiosynthese in den Pmm2-defizienten Zellen ist es

wahrscheinlich, dass auch diese Oberflächenproteine ungenügend ausgebildet sind und die Nidation behindern wird.

Weiterführende Verpaarungen von männlichen und weiblichen heterozygoten Mäusen mit Wildtyp-Mäusen zeigten eine stark verminderte Weitergabe des weiblichen Null-Allels. So wurde das männliche Null-Allel zu 48 % an die Nachkommen weitergegeben, hingegen das weibliche nur zu 20 %. Statt einer erwarteten Heterozygoten-Quote von 1:1 zeigte sich ein Verhältnis von 4:1 für die Wildtyp-Nachkommen (Thiel et al., 2006). Es scheint demnach die Befruchtung selbst oder die Oogenese durch das *Pmm2*-Null-Allel gestört zu sein.

Um die frühe Letalität des „*Pmm2* Knock-Out“ zu umgehen, begannen wir mit der Entwicklung eines hypomorphen Mausmodells mit einer Restaktivität der Phosphomannomutase, wie sie auch Patienten mit dem CDG-Ia-Syndrom zeigen. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Erstellung zweier Gene-Targeting-Vektoren für die zwei häufigsten Mutationen im *PMM2*-Gen von compound-heterozygoten Patienten, R141H und F119L. Diese Mutationen entsprechen der R137H- und F115L-Mutation im *Pmm2*-Gen der Maus.

4.4 Mutation R141H und F119L

Die beiden häufigsten Mutationen im *PMM2*-Gen sind R141H und F119L. Einen spezifischen Phänotyp für diese compound-Heterozygotie findet man nicht (Erlandson et al., 2001). Jedoch scheint der Genotyp R141H/F119L eher den klinisch schwerer betroffenen Anteil der CDG-Ia-Patienten zu repräsentieren. In einer Studie von Kjaergaard et al. aus 2001 wurden 25 Patienten mit diesem häufigen Genotyp untersucht. Sie zeigten einheitlich und früh Probleme in der Ernährung, schwere Wachstumsverzögerungen, stark ausgeprägte axiale muskuläre Hypotonie, invertierte Brustwarzen und subkutane Fettansammlungen. Hinzu kamen hepatische Dysfunktionen, Perikardergüsse und Entwicklungsverzögerungen.

In einer weiteren Studie von Kjaergaard et al. aus dem Jahr 2002 lässt sich erkennen, dass im Entwicklungsverlauf der am R141H/F119L-Genotyp erkrankten Kinder diese zwar ein normales fetales Wachstum zeigen, sich jedoch im sofortigen Anschluss an die Geburt ein Defizit einstellt. Körpergewicht,

Körperlänge, Body-Mass-Index (BMI) und Kopfumfang wuchsen in den ersten sechs Monaten nicht so schnell wie die Maße einer Vergleichsgruppe. So zeigte das Geburtsgewicht gemessen als Standard deviation score (SDS) bei Geburt – 0.3; dieser sank in den nächsten sechs Monaten bis auf –3 SDS ab und blieb auch erniedrigt bzw. stieg nur leicht an. Der SDS-Kopfumfang fiel von gemessenen 0 im Alter von drei Monaten auf –1.9 mit fünf Jahren. Diese Daten zeigen aber auch, dass sich die Krankheit mit zunehmendem Alter zu stabilisieren scheint. Untersuchungen über das Lebensalter von CDG-Ia-Patienten unterstützen diese Tendenz (Matthijs et al., 2000).

Mit Mausmodellen, jeweils heterozygot für die hypomorphen Mutationen R137H und F115L, wäre die Möglichkeit gegeben, die CDG-Ia-Erkrankung des Menschen nachzuahmen. Beide Mausmodelle müssten mit der heterozygoten Mutation unbeeinträchtigt lebensfähig sein, da selbst der vollständige Knock-Out keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen zeigt, wenn nur ein Allel betroffen ist (Thiel et al., 2006).

Anschließende Verpaarungen zweier Tiere mit jeweils einer unterschiedlichen Mutation ergäben ein Mausmodell compound heterozygot für R137H und F115L und würden so, wie oben bereits beschrieben, den am häufigsten vorkommenden Genotyp der CDG-Ia-Patienten repräsentieren.

Mit der Verpaarung zweier heterozygoter F115L-Tiere ließe sich ein milder Phänotyp erreichen. Der entsprechende Genotyp müsste dann nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu 25 % unter den Nachkommen zu finden sein. Genotypisierungen von CDG-Ia-Patienten bestätigen dieses Gleichgewicht (Matthijs et al., 1998). Demnach scheint die Weitergabe des hypomorphen Allels mit dieser Mutation nicht stark eingeschränkt zu sein; anders als der vollständige Knock-Out von Pmm2 (Thiel et al., 2006).

Verpaarungen von heterozygoten Mäusen für die R137H-Mutation würden mutmaßlich keine lebenden Nachkommen ergeben, die eine Homozygotie für diese Mutation aufweisen. Dafür spricht sowohl, dass entgegen der Hardy-Weinberg-Formel kein Patient mit entsprechendem Genotyp diagnostiziert worden ist, als auch die fehlende Restaktivität des rekombinanten PMM2-Proteins mit der R141H-Mutation (Kjaergaard et al., 1998, Pirard et al., 1999). Genotypische Untersuchungen der Embryonen könnten zeigen, ob und in welchem Stadium die

Mutation letal wäre und ob es Unterschiede zu den oben genannten Untersuchungen bei Pmm2-Knock-Out-Mäusen gibt.

4.5 Effizienz der Transfektionen

Das Ereignis der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen ist ein seltenes Ereignis unter den DNA-Integrationsmechanismen. Tausend mal häufiger ist der zufällige und nicht-homolog rekombinante Einbau einer Fremd-DNA (Sargent und Wilson, 1998). Zudem erfolgt die Aufnahme eines Targeting-Konstruktes im Rahmen einer Elektroporation nur in einer von 2400 Zellen (Vasquez et al., 2001). Unter Verwendung von Selektionsmarkern, wie in dem vorliegenden Fall mit einer Neomycin-Kassette, und anschließender Southern-Blot-Analyse können dennoch Klone mit erfolgter homologer Rekombination selektiert werden.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 1740 Klone nach Elektroporation mit den beiden Gene-Targeting-Vektoren (GTV-F115L und GTV-R137H) und der G418-Selektion untersucht. Die homologe Rekombination konnte bei ca. 0,2 % der Klone nachgewiesen werden, unabhängig vom verwendeten GTV. Der Anteil an erfolgreicher homologer Rekombination liegt somit unterhalb der in der Literatur beschriebenen Effizienzrate von 1 bis 15 % (Mamo et al., 2010; te Riele et al., 1992), was möglicherweise auf eine der Anlagerung des GTVs hinderliche Konformation des Pmm2-Locus zurückgeführt werden kann.

Die anschließende Elektroporation eines Cre-Plasmids in ES-Zellen, die positiv auf die homologe Rekombination hin überprüft worden sind, zur Deletion der Neomycin-Kassette aus dem Pmm2-Locus, konnte bei jeweils 4 von 60 Klonen mit GTV-F115L und GTV-R137H erfolgreich nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Ereignisrate von ca. 7 %, was einer in der Literatur beschriebenen Effizienz der erfolgreichen Cre-Rekombinase-Reaktion entspricht (Meininger 2004).

4.6 Isoenzym PMM1

Neben dem zuvor beschriebenen Enzym PMM2 wurde 1997 auch das Isoenzym PMM1 entdeckt (Matthijs et al., 1997a,b). Das Gen *PMM1* liegt auf Chromosom

22q13 und codiert für ein 262 Aminosäuren langes Protein. Das orthologe Isoenzym PMM2 hingegen wird auf Chromosom 16p13 codiert und hat auf Aminosäure-Ebene eine 66 %ige Homologie zu PMM1. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beiden Phosphomannomutase-Gene PMM1 und PMM2 vor ca. 75 bis 110 Millionen Jahren aus einer Duplikation entstanden sind (Schollen et al., 1998). Bei dem Vergleich der jeweiligen orthologen Gene *PMM1* und *PMM2* des Menschen mit den Genen *Pmm1* und *Pmm2* der Maus findet sich mit 90 % eine große Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, die zudem in Exon-Intron-Übergängen im hohen Maße konserviert ist (Heykants et al., 2001).

Die Präsenz der zwei konservierten Isoenzyme spricht für eine signifikante Funktion beider, wobei die Rolle von PMM1 bislang nicht geklärt ist. Krankheitsauslösende Mutationen sind nicht bekannt und auch ein Knock-Out-Mausmodell für *Pmm1* zeigte keinen pathologischen Phänotyp (Cromphout et al., 2006). In vitro besitzt PMM1 Phosphomannomutase-Aktivität, diese kann jedoch die krankheitsauslösende reduzierte Aktivität der PMM2 bei CDG-Ia-Patienten in vivo nicht kompensieren. Untersuchungen der Expressionsmuster von *Pmm1* in der Maus zeigten ein vermehrtes Vorkommen im Gehirn und neuroendokrinem Gewebe. Da auch *Pmm2* in denselben Zellen exprimiert wird, kann die fehlende Kompensation nicht durch das Expressionsmuster erklärt werden (Cromphout et al., 2006).

Welche physiologische Rolle PMM1 in vivo spielt, soll in zukünftigen Studien durch Verpaarungen der *Pmm1*-Knock-Out-Maus und den oben genannten Mauslinien mit hypomorphen *Pmm2*-Allel geklärt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

CDG-Ia ist eine genetisch bedingte Stoffwechselstörung, die eine fehlerhafte Synthese von Glykoproteinen zur Folge hat. Ursache sind Mutationen in der genetischen Information für das Enzym Phosphomannomutase II (PMM2), welches innerhalb der Glykoproteinsynthesekette Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat umsetzt. Infolge der verminderten Enzymaktivität von PMM2 bei CDG-Ia-Patienten und des damit verbundenen Mangels an Mannose-1-Phosphat entstehen unvollständige und funktionsgestörte Glykoproteine.

Bei dieser Multisystemerkrankung leiden die Patienten unter körperlichen und geistigen Behinderungen, deren Ausmaß stark von der zugrundeliegenden Mutation und damit von der PMM2-Aktivität abhängt. Um weiterführende Untersuchungen im Bereich der Biochemie und Pathophysiologie sowie mögliche Therapieoptionen an höher entwickelten Lebewesen zu erforschen, soll ein Mausmodell für CDG-Ia generiert werden.

Inhalt dieser Arbeit ist die Generierung von zwei Gene-Targeting-Vektoren (GTV) und den entsprechenden transgenen embryonalen Maus-Stammzellen, welche jeweils die beiden häufigsten Mutationen R141H und F119L (R137H und F115L im Maus-Genom) tragen.

Zunächst wurde ein Teil des murinen *Pmm2*-Gens in einen pBlueScript-Vektor subkloniert. Mit gezielter *in-vitro*-Mutagenese erfolgte das Einbringen der jeweiligen Mutation. Als Selektionsmarker für beide GTV diente ein von zwei loxP-Sequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen. Die beiden derart konstruierten GTV (GTV-F115L, GTV-R137H) wurden als linearisiertes Konstrukt durch Elektroporation in embryonale Mausstammzellen transferiert. Durch G418[®]-Selektion, Southern-Blot-Analysen und DNA-Sequenzkontrollen wurden erfolgreich transfizierte transgene Klone nach der homologen Rekombination identifiziert. Zum Entfernen der noch inserierten Neo-Kassette wurde je ein Stammzell-Klon mit dem Genotyp F115L/WT und R137H/WT mit einem Cre-Rekombinase-Gen enthaltenden Plasmid per Elektroporation transfiziert.

Nach Kontrolle der erfolgreichen Entfernung der Neo-Kassette mittels Southern-Blot und DNA-Sequenzanalyse wurde ein Klon mit der heterozygoten Mutation R137H zur Mikroinjektion in Maus-Blastozysten verwendet. Die Blastozysten

wurden pseudoschwangeren Foster-Weibchen eingesetzt, um Chimären zu erzeugen. Heterozygote Tiere, die aus Verpaarungen von chimären Männchen mit Weibchen des C57/Bl06-Stammes entstammten, wurden zur Generierung homozygoter Stämme verwendet.

Wie zu erwarten, waren homozygote Mäuse mit dem Genotyp R137H/R137H nicht lebensfähig und verstarben schon intrauterin vor dem 6. Tag nach Befruchtung. Homozygote Tiere mit der sehr milden, synthetischen Mutation F118L (F122L beim Menschen; Silvaggi et al., 2006) zeigten trotz einer reduzierten PMM-Aktivität in kultivierten Embryonalfibroblasten der Maus von 38 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede im Phänotyp. Verpaarungen von heterozygoten WT/R137H-Mäusen mit einer hypomorphen F118L-Mauslinie zeigten ebenfalls eine embryonale Letalität, die zwischen Tag 9,5 und 10,5 nach Befruchtung lag. Besonders hervorzuheben ist die Erkenntnis, dass die beschriebene embryonale Letalität der compound-heterozygoten R137H/F118L-Mäuse durch eine pränatale und orale Mannose-Therapie überwunden werden kann und eine normale Entwicklung möglich ist (Schneider et al., 2011).

Meine praktischen Arbeiten zur Herstellung der beiden Gene-Targeting-Vektoren und der rekombinanten Stammzellen mit der Mutation F115L und R137H erfolgten in den Jahren 2001 bis 2004 in Göttingen. Die spätere Charakterisierung der verschiedenen Mauslinien einschließlich der Generierung der F118L-Mutation erfolgte nach dem Umzug der Arbeitsgruppe von Prof. Körner an das Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin ab dem Jahr 2004 dann an der Universität Heidelberg.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDG	Congenital Disorder(s) of Glycosylation
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie ($2,22 \times 10^6$ counts per minute)
CMP	Cytidinmonophosphat
cpm	counts per minute
Cre	center of recombination (of phage P1)
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag(e)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
Dol	Dolichol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii (lat. und andere)
F	Farad
FKS	fötales Kälberserum
Fuc	Fucose
G	Guanin
G418 [®]	Geneticin [®] 418
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
GTV	Gene-Targeting-Vektor
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktopyranosid
l	Liter
LB	Luria Broth
LIF	leukemia inhibitor factor
LLO	lipid linked oligosaccharides
loxP	locus of crossing over (of phage P1)
M	molar
Man	Mannose
MCS	multiple cloning site
MEF	Maus-Embryonen-Fibroblasten
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NANA	Sialinsäure
NEB	New England Biolab
Neo	Neomycin
OD	Optische Dichte

OMIM	online Mendelian inheritance in man
OST	Oligosaccharid-Transferase
P	Phosphat
³² P	Phosphor 32
p.a.	pro analysi (lat. zur Analyse)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pB-SK	pBlueScript-Vektor
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMM	Phosphomannomutase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T _{ann}	Annealing-Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U	Uridin
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UV	ultraviolett
V	Volt

Vol.	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Verwendete Vorsilben für Potenzen der Zahl Zehn:

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

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder im Ein-Buchstabencode angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

6.2 Primer-Sequenzen

Bezeichnung	Basensequenz
floxneo- <i>Sall</i> -rein 1	ATC CAA ATT AGT CGA CCT GCA GCC CCA
floxneo- <i>Sall</i> -rein 2	TGG GGC TGC AGG TCG ACT AAT TTG GAT
Neo 1	GAC CGC TTC CTC GTG CTT TAC
pB- <i>Hind</i> III-raus 1	GAA TTC GAT ATC AAG GTT ATC GAT ACC G
pB- <i>Hind</i> III-raus 2	CGG TAT CGA TAA CCT TGA TAT CGA ATT C
PMM2-F119L-A	CTT TCA TTG AAT TAC GAA ATG GCA TGT TG
PMM2-F119L-B	CAA CAT GCC ATT TCG TAA TTC AAT GAA AG
PMM2-R141H-A	CCA AGA AGA ACA CAT TGA ATT CTA CGA A

PMM2-R141H-B	TTC GTA GAA TTC AAT GTG TTC TTC TTG G
PMM2- <i>Sall</i> -rein 1	CTA AAC TTA AGT CGA CGT TGC AGA CTG
PMM2- <i>Sall</i> -rein 2	CAG TCT GCA ACG TCG ACT TAA GTT TAG
PMM2-Test-A	GTA GTA CTG TGT GGC TCA AAG C
PMM2-Test D	CCA TGA TGT CAC TTA CTC ATG C
TL24	GGG ACT TTG TTC CGC TAA CAG
TL25	GTT GCC CAT CAC TTG GGG TG
TL27	GTG CCT CAA GGT GTA ACC CC
TL42	CAG GAT GTG TCA CGT TGG CTG ACC AC
TL44	CGG GTG CTG CTG GAG TGA CAG GC
TL61	CTG TCC TGG GTT ATG ACT TG
4-Kb- <i>Bam</i> HI-raus 1	CAC CTT TTT GTA GGA TGC ACT AG
4-Kb- <i>Bam</i> HI-raus 2	CTA GTG CAT CCT ACA AAA AGG TG
4-Kb-rev 1	CAC ACA ACC GGG ACC CAA GG
4-Kb rev 2	GCT AAG TAG CTG GTT CTA AAG C

7 Literaturverzeichnis

- Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, Hennet T, Imbach T, Stutz A, Bjursell C** (1999): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J* 11:669-71:
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR** (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5350–5354.
- Anand M, Rush JS, Ray S, Doucey MA, Weik J, Ware FE, Hofsteenge J, Waechter CJ, Lehrman MA** (2001): Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol Biol Cell* 2: 487-501.
- Andréasson S, Blennow G, Ehinger B, Strömmland K** (1991): Full-field electroretinograms in patients with the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Am J Ophthalmol* 112: 83-86.
- Aratani Y, Okazaki R, Koyama H** (1992): End extension repair of introduced targeting vectors mediated by homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 20: 4795-4801.
- Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS 3rd** (1986): The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* 5: 433-440.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N** (1981): A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-736.

- Bjursell C, Erlandson A, Nordling M, Nilsson S, Wahlstrom J, Stibler H, Kristiansson B, Martinsson T** (2000): PMM2 mutation spectrum, including 10 novel mutations, in a large CDG type 1A family material with a focus on Scandinavian families. *Hum Mutat* 16: 395-400.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E** (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309: 255-256.
- Burda P, Borsig L, de Rijk-van Andel J, Wevers R, Jaeken J, Carchon H, Berger EG, Aebi M** (1998): A novel carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome characterized by a deficiency in glucosylation of the dolichol-linked oligosaccharide. *J Clin Invest* 102: 647-652.
- Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E** (2010): *SRD5A3* is required for the conversion of polyprenol to dolichol, essential for *N*-linked protein glycosylation. *Cell* 142: 203–217.
- Capecchi MR** (1989): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5: 70-76.
- Chantret I, Dupre T, Delenda C, Bucher S, Dancourt J, Barnier A, Charollais A, Heron D, Bader-Meunier B, Danos O** (2002): Congenital disorders of glycosylation type Ig is defined by a deficiency in dolichyl-P-mannose:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl mannosyltransferase. *J Biol Chem* 277: 25815-25822.
- Chantret I, Dancourt J, Dupre T, Delenda C, Bucher S, Vuillaumier-Barrot S, Ogier De Baulny H, Peletan C, Danos O, Seta N** (2003): A deficiency in dolichyl-P-glucose:Glc1Man9GlcNAc2-PP-dolichyl-alpha3-glucosyltransferase defines a new subtype of congenital disorders of glycosylation. *J Biol Chem* 278: 9962-9971.

Clayton PT, Winchester BG, Keir G (1992): Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis* 15: 857-861.

Cromphout K, Vleugels W, Heykants L, Schollen E, Keldermans L, Sciote R, D'Hooge R, De Deyn PP, von Figura K, Hartmann D (2006): The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Mol Cell Biol* 15: 5621-35.

Damen G, de Klerk H, Huijmans J, den Hollander J, Sinaasappel M. (2004): Gastrointestinal and other clinical manifestations in 17 children with congenital disorders of glycosylation type Ia, Ib, and Ic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38: 282-287.

de Lonlay P, Seta N, Barrot S, Chabrol B, Drouin V, Gabriel BM, Journel H, Kretz M, Laurent J, Le Merrer M (2001): A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet* 38: 14-19.

Deng C, Capecchi MR (1992): Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12: 3365-3371.

de Praeter CM, Gerwig GJ, Bause E, Nuytinck LK, Vliegenthart JF, Breuer W, Kamerling JP, Espeel MF, Martin JJ, De Paepe AM (2000): A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet* 66: 1744-1756.

Eklund EA, Merbouch N, Ichikawa M, Nishikawa A, Clima JM, Dorman JA, Norberg T, Freeze H (2005): Hydrophobic Man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 15: 1084-1093.

Erlandson A, Bjursell C, Stibler H, Kristiansson B, Wahlstrom J, Martinsson T (2001): Scandinavian CDG-Ia patients: genotype/phenotype correlation and geographic origin of founder mutations. *Hum Genet* 108: 359-367.

Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, Jaeken J, Mills P, Winchester B, Krieger M, Annaert W, Matthijs G (2006): Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. *Proc Nat Acad Sci* 103: 3764-3769.

Foulquier F, Ungar D, Reynders E, Zeevaert R, Mills P, Garcia-Silva M T, Briones P, Winchester B, Morelle W, Krieger M (2007): A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Hum Molec Genet* 16: 717-730.

Frank C G, Grubenmann C E, Eyaid W, Berger E G, Aebi M, Hennet T (2004): Identification and functional analysis of a defect in the human ALG9 gene: definition of congenital disorder of glycosylation type II. *Am J Hum Genet* 75: 146-150.

Freeze H H (1998): Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg? *J Pediatrics* 133: 593-600.

Freeze H H (2001): Congenital disorders of glycosylation and the pediatric liver. *Semin Liver Dis* 21:501-15

Freeze H H (2006): Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* 7: 537-51.

Fukuda M (1996): Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* 56: 2237-2244.

Gabius HJ (1987): Vertebrate lectins and their possible role in fertilization, development and tumor biology. *In Vivo* 1: 75-83.

Grubenmann CE, Frank CG, Kjaergaard S, Berger EG, Aebi M, Hennet T (2002): ALG12 mannosyltransferase defect in congenital disorder of glycosylation type Ig. *Hum Mol Genet* 19: 2331-9.

Hauptle M A, Pujol F M, Neupert C, Winchester B, Kastaniotis A J, Aebi M, Hennet T (2008): Human RFT1 deficiency leads to a disorder of N-linked glycosylation. *Am J Hum Genet* 82: 600-606.

Hansske B, Thiel C, Lübke T, Hasilik M, Honing S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K (2002): Deficiency of UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I causes the congenital disorder of glycosylation type IId. *J Clin Invest* 109: 725-733.

Hardré R, Khaled A, Willemetz A, Dupré T, Moore S, Gravier-Pelletier C, Le Merrer Y (2007): Mono, di and tri-mannopyranosyl phosphates as mannose-1-phosphate prodrugs for potential CDG-Ia therapy. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 152-5.

Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A (1992): The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 12: 2464-2474.

Helenius J, Ng DTW, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002): Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415: 447-451.

Heykants L, Schollen E, Grunewald S, Matthijs G (2001): Identification and localization of two mouse phosphomannomutase genes, Pmm1 and Pmm2. *Gene* 270: 53-59.

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

Hoess RH, Ziese M, Sternberg N (1982): P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3398-3402.

Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E: Manipulating the Mouse Embryo. *A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Laboratory Press, New York 1994.*

Imbach T, Burda P, Kuhnert P, Wevers RA, Aebi M, Berger EG, Hennet T (1999): A mutation in the human ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* ALG6 gene causes carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-Ic. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6982-6987.

Imbach T, Schenk B, Schollen E, Burda P, Stutz A, Grunewald S, Bailie NM, King MD, Jaeken J, Matthijs G (2000): Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie. *J Clin Invest* 105: 233-239.

Jaeken J, Carchon H (1993): The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. *J Inherit Metab Dis* 16: 813-820.

Jaeken J, Carchon H (2004): Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Curr Opin Pediatr* 16: 434-9.

Jaeken J, Stibler H: A newly recognized inherited neurological disease with carbohydrate-deficient secretory glycoproteins. *In: Genetics of Neuropsychiatric Diseases. Wenner-Gren International Symposium Series, L. Wetterberg, Vol. 51, Macmillan Press, London, 1989, 69-80.*

Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E, Eeckels R (1980): Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrom? *Pediatr Res* 14: 179.

Jaeken J, van Eijk H.G, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E (1984): Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrom. *Clin Chim Acta* 144: 245-247.

Jaeken J, Eggermont E, Stibler H (1987): An apparent homozygous X-linked disorder with carbohydrate-deficient serum glycoproteins. *Lancet* 1987,2: 1398.

Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G (1994): Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Arch Dis Child* 71: 123-127.

Joyner AL: Gene Targeting. A Practical Approach. *IRL Press at Oxford University Press, New York* 1993.

Kean EL (1991): Sialic acid activation. *Glykobiology* 1: 441-447.

Kim S, Westphal V, Srikrishna G, Mehta DP, Peterson S, Filiano J, Karnes PS, Patterson MC, Freeze HH (2000): Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie). *J Clin Invest* 105: 191-198.

Kitamura K, Suganuma N, Takata K, Matsuyama K, Goto J, Furuhashi M, Kanayama N (2003): Changes in oligosaccharide expression on plasma membrane of the mouse oocyte during fertilisation and early cleavage. *Zygote* 11: 183-9.

Kjaergaard S, Skovby F, Schwartz M (1998): Absence of homozygosity for predominant mutations in PMM2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Eur J Hum Genet* 6: 331-336.

Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F (2001): Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotyp. *Arch Dis Child* 85: 236-239.

Kjaergaard S, Müller J, Skovby F (2002): Prepubertal growth in congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Arch Dis Child* 87: 324-327.

Körner C, Lehle L, von Figura K (1998): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose. *Glycoconj J* 15: 499-505.

Körner C, Knauer R, Stephani U, Marquardt T, Lehle L, von Figura K (1999): Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J* 18: 6816-6822.

Kornfeld R, Kornfeld S (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.

Kranz C, Denecke J, Lehrman MA, Ray S, Kienz P, Kreissel G, Sagi D, Peter-Katalinic J, Freeze HH, Schmid T (2001): A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If). *J Clin Invest* 108: 1613-1619.

Kranz C, Denecke J, Lehle L, Sohlbach K, Jeske S, Meinhardt F, Rossi R, Gudowius S, Marquardt T. (2004): Congenital disorder of glycosylation type Ik (CDG-Ik): a defect of mannosyltransferase I. *Am J Hum Genet* 74: 545-551.

- Kranz C, Jungeblut C, Denecke J, Erlekotte A, Sohlbach C, Debus V, Kehl H G, Harms E, Reith A, Reichel S, Grobe H, Hammersen G, Schwarzer U, Marquardt T** (2007a): A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy. *Am J Hum Genet* 80: 433-440.
- Kranz C, Ng B G, Sun L, Sharma V, Eklund E A, Miura Y, Ungar D, Lupashin V, Winkel R D, Cipollo J F** (2007b): COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIh. *Hum Molec Genet* 16: 731-741.
- Krasnewich D, O'brien K, Sparks S** (2007): Clinical features in adults with congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C: 302-6.
- Kristiansson B, Andersson M, Tonny B, Hagberg B** (1989): Disialotransferrin developmental deficiency syndrome. *Arch Dis Child* 64: 71-76.
- Lefeber D J, Schonberger J, Morava E, Guillard M, Huyben K M, Verrijp J, Grafakou O, Grunewald S** (2009): Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet* 85: 76-86.
- Lehrach H, Frischauf AM**: EMBL Lab-Manual. *EMBL, Heidelberg* 1982.
- Lennarz W** (1993): Glycoprotein Synthesis and embryonic development. *Crit Rev Biochem* 14: 257-272.
- Lübbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen B, de Koning TJ, van Hasselt PM, Körner C** (2010): Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet* 19: 3623-3633.
- Lübke T, Marquardt T, von Figura K, Körner C** (1999): A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. *J Biol Chem* 274: 25986-25989.

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

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

MacGillivray RTA, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K (1983): The primary structure of human serum transferrin. *J Biol Chem* 258: 3543-3553.

Mamo S, Kobolak J, Borbíró I, Bíró T, Bock I, Dinnyes A (2010): Gene targeting and Calcium handling efficiencies in mouse embryonic stem cell lines. *World J Stem Cells* 2: 127–140.

Mansouri A: Gene Targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells. In: Cell Biology. A Laboratory Handbook; hrsg. v. Celis JE. Second Edition. Vol. 3. *Academic Press, San Diego* 1998, 478-497.

Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-7638.

Martinez-Duncker I, Dupre T, Piller V, Piller F, Candelier J-J, Trichet C Tchernia G, Oriol, R, Mollicone R (2005): Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood* 105: 2671-2676.

- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaftingen E** (1997a): Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet* 16: 88-92.
- Matthijs G, Schollen E, Pirard M, Budarf ML, Van Schaftingen E, Cassiman JJ** (1997b): PMM (PMM1), the human homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* 40: 41-47.
- Matthijs G, Schollen E, Van Schaftingen E, Cassiman JJ, Jaeken J** (1998): Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Am J Hum Genet* 62: 542-550.
- Matthijs G, Schollen E, Bjursell C, Erlandson A, Freeze H, Imtiaz F, Kjaergaard S, Martinsson T, Schwartz M, Seta N** (2000): Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat* 16: 386-394.
- Mayatepek E, Kohlmüller D** (1998): Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrom type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr* 157: 605-606.
- Mayatepek E, Schröder M, Kohlmüller D, Bieger WP, Nützenadel W** (1997): Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrom type I. *Acta Paediatr* 86: 1138-1140.
- McPherson MJ, Quirke P, Tayler GR**: PCR I: A Laboratory Approach. *IRL Press at Oxford University Press, London 1991*.

- Meinzinger S:** Biochemische und molekularbiologische Studien zur Funktionsanalyse der UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase. *Diss. rer. nat. Köln 2004.*
- Müller W, Kühn R, Rajewsky K** (1991): Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. *Eur J Immunol* 21: 921-925.
- Münster AK, Eckardt M, Potvin B, Mühlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R** (1998): Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9140-9145.
- Muus U, Kranz C, Marquardt T, Meier C** (2004): cycloSaligenyl-mannose-1-monophosphates as a New Strategy in CDG-Ia Therapy: Hydrolysis, Mechanistic Insights and Biological Activity. *Eur J Org Chem*: 1228-1235.
- Niehues R, Hasilik M, Alton G, Körner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, Zimmer KP, Wu R, Harms E, Reiter K** (1998): Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J Clin Invest* 101: 1414-1420.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW** (1983): Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4417-4421.
- Paesold-Burda P, Maag C, Troxler H, Foulquier F, Kleinert P, Schnabel S, Baumgartner M, Hennet T** (2009): Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet* 18: 4350-4356.

Panneerselvam K, Freeze HH (1996): Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest* 97: 1478-1487.

Peters V, Penzien JM, Reiter G, Körner C, Hackler R, Assmann B, Fang J, Schaefer JR, Hoffmann GF, Heidemann PH (2002): Congenital disorder of glycosylation IId (CDG-IId) -- a new entity: clinical presentation with Dandy-Walker malformation and myopathy. *Neuropediatrics* 33: 27-32.

Petersen MB, Brostrom K, Stibler H, Skovby F (1993): Early manifestations of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Pediatr* 122: 66-70.

Pirard M, Matthijs G, Heykants L, Schollen E, Grunewald S, Jaeken J, van Schaftingen E (1999): Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett* 452: 319-322.

Qiagen Handbuch: HotStar-Taq-PCR, Qiagen, Hilden 1999.

Qiagen Handbuch: The QIAexpressionist. Protokoll 2: Preparation of competent E. coli. Qiagen, Hilden 2001.

QIAprep Midiprep Handbuch, Qiagen, Hilden 1999.

QIAprep Miniprep Handbuch, Qiagen, Hilden 1999.

QIAquick Gel Extraction Kit, Handbuch, Qiagen, Hilden 1999.

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Stratagene, La Jolla, Californien 1996.

Ramdas J, Mythili E, Muniyappa K (1991): Nucleosomes on linear duplex DNA allow homologous pairing but prevent strand exchange promoted by RecA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1344-1348.

Reynders E, Foulquier F, Teles EL, Quelhas D, Morelle W, Rabouille C, Annaert W, Matthijs G (2009): Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum Mol Genet* 18: 3244-3256.

Rind N, Schmeiser V, Thiel C, Absmanner B, Lübbehusen J, Hocks J, Apeshiotis N, Wilichowski E, Lehle L, Körner C (2010): A severe human metabolic disease caused by deficiency of the endoplasmatic mannosyltransferase hALG11 leads to congenital disorder of glycosylation-1p. *Hum Mol Genet* 19, 1413-24.

Robertson EJ: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. *IRL Press, Oxford*, 1987.

Rush JS, Panneerselvam K, Waechter CJ, Freeze HH (2000): Mannose supplementation corrects GDP-mannose deficiency in cultured fibroblasts from some patients with Congenital Disorders of Glycosylation (CDG). *Glycobiology* 10: 829-835.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* 1989.

Sargent RG, Wilson JH (1998): Recombination and gene targeting in mammalian cells. *Curr Res Mol Ther* 1: 584–592.

Schenk B, Imbach T, Frank CG, Grubenmann CE, Raymond GV, Hurvitz H, Korn-Lubetzki I, Revel-Vik S, Raas-Rotschild A, Luder AS (2001):

MPDU1 mutations underlie a novel human congenital disorder of glycosylation, designated type If. *J Clin Invest* 108: 1687-1695.

Schneider A, Thiel C, Rindermann J, De Rossi C, Popovici D, Hoffmann GF, Gröne H-J, Körner C (2011): Successful prenatal mannose treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice. *Nat Med* 18: 71-73.

Schollen E, Pardon E, Heykants L, Renard J, Doggett NA, Callen DF, Cassiman JJ, Matthijs G (1998): Comparative analysis of the phosphomannomutase genes PMM1, PMM2 and PMM2psi: the sequence variation in the processed pseudogene is a reflection of the mutations found in the functional gene. *Hum Mol Genet* 7: 157-164.

Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G (2000): Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet* 8: 367-371.

Schollen E, Frank CG, Keldermans L, Reyntjens R, Grubenmann CE, Clayton PT, Winchester BG, Smeitink J, Wevers RA, Aebi M. (2004): Clinical and molecular features of three patients with congenital disorders of glycosylation type Ih (CDG-Ih) (ALG8 deficiency). *J Med Genet* 7: 550-6.

Schultz RM (2002): The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 8: 323-31.

Schwarz M, Thiel C, Lubbehusen J, Dorland B, de Koning T, von Figura K, Lehle L, Körner C (2004): Deficiency of GDP-Man:GlcNAc2-PP-dolichol mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ik. *Am J Hum Genet* 74: 472-481.

Silvaggi NR, Zhang C, Lu Z, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN (2006): The X-ray Crystal Structures of Human -Phosphomannomutase 1 Reveal the

Structural Basis of Congenital Disorder of Glycosylation Type 1a. *J Biol Chem* 281: 14918-14926.

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230-234.

Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.

Spik G, Bayard B, Fournet B, Strecker G, Bouquelet S, Montreuil J (1975): *FEBS Lett.* 50, 296-299.

Spiro RG (1973): Glykoproteins. *Adv Protein Chem* 27: 349-467.

Sternberg N, Hamilton D (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150: 467-486.

Tan J, Dunn J, Jaeken J, Schachter H (1996): Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am J Hum Genet* 59: 810-817.

Tatu U, Helenius A (1997): Interaktions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmatic reticulum. *J Cell Biol* 136: 555-565.

te Riele H, Maandag ER, Berns A (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5128-5132.

Thiel C, Schwarz M, Hasilik M, Grieben U, Hanefeld F, Lehle L, Von Figura K, Körner C (2002): Deficiency of dolichyl-P-Man:Man7GlcNAc2-PP-dolichyl

mannosyltransferase causes congenital disorder of glycosylation type Ig. *Biochem J* 367: 195-201.

Thiel C, Schwarz M, Peng J, Grzmil M, Hasilik M, Braulke T, Kohlschütter A, Von Figura K, Lehle L, Körner C (2003): A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-li) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. *J Biol Chem* 278: 22498-22505.

Thiel C, Lubke T, Matthijs G, von Figura K, Korner C (2006): Targeted disruption of the mouse phosphomannomutase 2 gene causes early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 26: 5615-20.

Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-512.

Valancius V, Smithies O (1991): Double-strand gap repair in a mammalian gene targeting reaction. *Mol Cell Biol* 11: 4389-4397.

Van Geet C, Jaeken J. (1993): A unique pattern of coagulation abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr Res* 33: 540-1.

van Schaftingen E, Jaeken J (1995): Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett* 377: 318-320.

Varki A (1993): Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiologie* 3: 97-130.

Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH (2001): Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci* 98: 8403–8410.

Wada Y, Nishikawa A, Okamoto N, Inui K, Tsukamoto H, Okada S, Taniguchi N (1992): Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 832-836.

Wada Y, Gu J, Okamoto N, Inui K (1994): Diagnosis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 23: 108-109.

Weinstein M, Schollen E, Matthijs G, Neupert C, Hennet T, Grubenmann C E, Frank C G, Aebi M, Clarke J T R, Griffiths A (2005): CDG-IL: an infant with a novel mutation in the ALG9 gene and additional phenotypic features. *Am J Med Genet* 136A: 194-197.

Willig T-N, Breton-Gorius J, Elbim C, Mignotte V, Kaplan C, Mollicone R, Pasquier C, Filipe A, Mielot F, Cartron J-P (2001): Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes--a new syndrome? *Blood* 97: 826-828.

Wong EA and Capecchi MR (1986): Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat Cell Mol Genet* 12: 63-72.

Wu X, Rush JS, Karaoglu D, Krasnewich D, Lubinsky MS, Waechter CJ, Gilmore R, Freeze HH (2003): Deficiency of UDP-GlcNAc:dolichol phosphate N-acetylglucosamine-1 phosphate transferase (DPAGT1) causes a novel congenital disorder of glycosylation type Ij. *Hum Mutat* 22: 144-150.

Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, Spaapen L, Kornfeld S, Freeze HH (2004): Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 10: 518-523.

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