

Aus der Abteilung Pädiatrie II: Neuropädiatrie
(Prof. Dr. med. J. Gärtner)
im Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Charakterisierung neuer Mutationen im *FOLR1*-Gen

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

vorgelegt von
Isabell Anna Just
aus
Gifhorn

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. med. R. Steinfeld

II. Berichtstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Bohnsack

III. Berichtstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Folat	1
1.1.1 Die Geschichte des Folats	1
1.1.2 Folat oder Folsäure?	1
1.1.3 Funktionen von Folat im menschlichen Körper	2
1.2. Folatrezeptoren und aktuelle Mutationen im <i>FOLR1</i> -Gen	3
1.2.1 Folatrezeptoren	3
1.2.2 Mutationen im <i>FOLR1</i> -Gen	4
1.3 Folatmangel	7
1.3.1 Der nutritive Folatmangel	7
1.3.2 Zerebrale Folatdefizienz (CFD)	7
1.4 Zielsetzung	10
Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits	11
2.2 Geräte und Software	14
2.3 Puffer und Lösungen	17
2.4 Verbrauchsmaterialien	18
2.5 Antikörper	19
2.6 Patienten-Mutationen im <i>FOLR1</i> -Gen	21
2.7 Plasmide	22
2.7.1 Verwendete Plasmide	22
2.7.2 Sequenzierung der Plasmide	24
2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion	26
2.7.4 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte	27

2.7.5 Transformation von Plasmid-DNS (Hanahan 1983)	27
2.7.6 Midi-Präparation der Plasmide	30
2.7.7 Gelextraktion	31
2.7.8 Ligation (Dugaiczky <i>et al.</i> 1975).....	32
2.7.9 Mini-Präparation der Plasmide.....	32
2.8 Zellkultur	33
2.8.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung.....	33
2.8.2 Transfektionsmethoden	35
2.8.3 Cryo-Aufbewahrung und Auftauen von Zellen.....	38
2.9 Restriktionsenzymverdau	38
2.10 Agarosegelelektrophorese	39
2.11 Methoden zur DNS-Aufreinigung.....	40
2.12 Bestimmungen von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösung.....	41
2.13 Untersuchung der Expression des FRa	41
2.13.1 Gewinnung von Proteinproben.....	42
2.13.2 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Bradford 1976)	42
2.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	43
2.13.4 Westernblot (Semi Dry Blot)	44
2.14 Untersuchung der Folsäurebindung des FRa	48
2.15 Untersuchung der Lokalisation des FRa.....	50
Ergebnisse.....	53
3.1 Heterologe Expression des FRa wt und der Mutanten in unterschiedlichen Zellmodellen.....	53
3.1.1 Expression des FRa wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen.....	53
3.1.2 Expression des FRa wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen ..	56

3.1.3 Expression des FR α wt und der mutanten Proteine in Z310-Zellen.....	57
3.2 Funktionelle Charakterisierung des FR α und der mutanten Proteine durch Untersuchungen der Rezeptor-Folsäurebindung in unterschiedlichen Zellmodellen.....	59
3.2.1 Rezeptor-Folsäurebindung des FR α wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen.....	59
3.2.2 Rezeptor-Folsäurebindung des FR α wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen	62
3.3 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in unterschiedlichen Zellmodellen.....	64
3.3.1 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen	64
3.3.2 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen	66
3.3.3 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in Z310-Zellen ..	68
3.3.4 Vergleich von membranpermeabilisierenden Reagenzien in der Immunfluoreszenzmikroskopie	71
Diskussion.....	72
4.1 Einfluss der Mutationen im <i>FOLR1</i> -Gen auf die Proteinexpression, Funktionalität und Lokalisation	72
4.2 Antikörper gegen den FR α	74
4.3 Medizinische Relevanz der Charakterisierung neuer Mutationen	76
4.4 Ausblick.....	77
Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	82

Liste verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
b	Base
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNS	komplementäre DNS
CFD	cerebral folate deficiency, zerebrale Folatdefizienz
CFTD	zerebrale Folattransport-Defizienz
CHO	chinesische Hamster Ovarialzellen
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dup	Duplikation
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> und andere
evtl.	eventuell
F	vorwärts
Fc-Fragment	kristallisierbares Fragment
FCS	fetales Kälberserum
<i>FOLR1</i> -Gen	Folatrezeptor 1 Gen
FR α , β , γ	Folatrezeptor α , β , γ
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
G418	Geneticindisulfat
ggf.	gegebenenfalls
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	Hydroxyethylpiperazin- Ethansulfonsäure-Puffer
H ₂ O	destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
LB Medium	lysogeny broth Medium
MCS	multiple Klonierungsstelle
MRT	Magnetresonanztomographie
5'-MTHF	5'-Methyltetrahydrofolat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Personal Computer
PCFT	protonengekoppelter Folattransporter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase

PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R	rückwärts
RFC	<i>reduced folate carrier</i>
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Saponin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	statistischer Standardfehler
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THF	5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

Einheiten

A	Ampère	Stromstärke
°C	Grad Celsius	Temperatur
kg	Kilogramm	Masse
l	Liter	Volumen
min	Minute	Zeit
s	Sekunde	Zeit
h	Stunde	Zeit
m	Meter	Länge
mol	Mol	Stoffmenge
		1 Mol = $6,022 \times 10^{23}$ Teile eines Stoffes
M	molar	Konzentration
		M = Mol/Liter
V	Volt	Spannung

Dezimal-Präfixe

k	Kilo	10^3
d	Dezi	10^{-1}
c	Zenti	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Pico	10^{-12}
f	Femto	10^{-15}

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gl	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Folat

1.1.1 Die Geschichte des Folats

Folat wurde 1930 erstmals als essentielles B-Vitamin entdeckt und elf Jahre später durch Snell *et al.* aus Blattspinat isoliert. So leitet sich der Name vom lateinischen „folium“ (= Blatt) ab (Carmel 2006). Bereits 1964 beschrieben Hansen H *et al.* neurologische Störungen in Kombination mit einer megaloblastären Anämie bei systemischem Folat-Mangel. Zusammenhänge zwischen der Folatversorgung und embryonalen Neuralrohrdefekten wurden 1980 erstmalig durch Smithells und Sheppard hergestellt. Im Laufe der Zeit konnten weitere Verbindungen zur Genese unterschiedlicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen sowie ein Stellenwert in der Onkologie gezeigt werden. Weltweit ist der nutritive Folatmangel eine der bedeutendsten Vitaminmangelkrankheiten, die insbesondere für Säuglinge, Mütter und ältere Menschen ein hohes Risiko darstellt.

1.1.2 Folat oder Folsäure?

Folsäure ist eine synthetische, stabile, oxidierte Form des Folats, die nicht natürlich im menschlichen Körper vorkommt. Sie findet eine therapeutische Anwendung und ist in Nahrungsergänzungsmitteln enthalten (Hyland *et al.* 2010). Folate (Abb. 1.1) kommen natürlicherweise in verschiedenen Verbindungen vor, die sich chemisch durch ihren Hydrierungsgrad, ihre Substituenten und die Anzahl ihrer Glutamatreste unterscheiden. Als biologisch aktive Formen gelten die Derivate der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF) (Pietrzik

et al. 2008). Im Folgenden wird in dieser Arbeit insgesamt von Folat im Sinne von Folatverbindungen gesprochen.

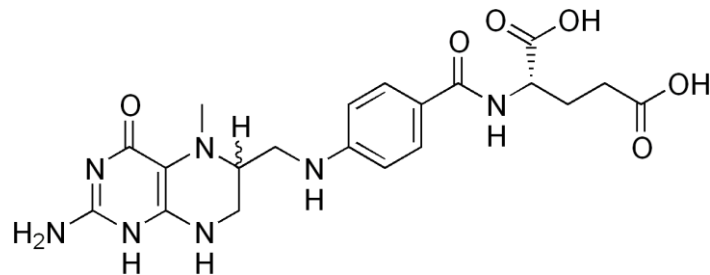


Abbildung 1.1: Strukturformel des Folats

1.1.3 Funktionen von Folat im menschlichen Körper

Da der menschliche Körper keine Möglichkeit besitzt Folat zu synthetisieren, besteht eine Abhängigkeit von der digestiven Aufnahme von Folatderivaten (Hyland *et al.* 2010). Folate in der Nahrung werden über den Darm aufgenommen, in der Leber zu 5'-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) metabolisiert und mit dem Blut im Körper verteilt (Steinfeld *et al.* 2009). Folat dient als Koenzym der Übertragung von Methyl-Gruppen in einer Reihe von Reaktionen in der DNS- und Proteinbiosynthese, dem Metabolismus von Aminosäuren und dem Phospholipidstoffwechsel (Löffler *et al.* 2007). Der Stellenwert als essentielles Vitamin im Hirnmetabolismus wird besonders deutlich beim Betrachten der Auswirkungen eines Folatmangels (Kapitel 1.3, S.7). Allerdings ist der Transport über die Blut-Liquor-Schranke aktuell noch nicht abschließend geklärt. Abbildung 1.2 zeigt einen derzeit diskutierten Folat-Transportweg durch Zellen des Plexus choroideus nach Hyland *et al.* (2010).

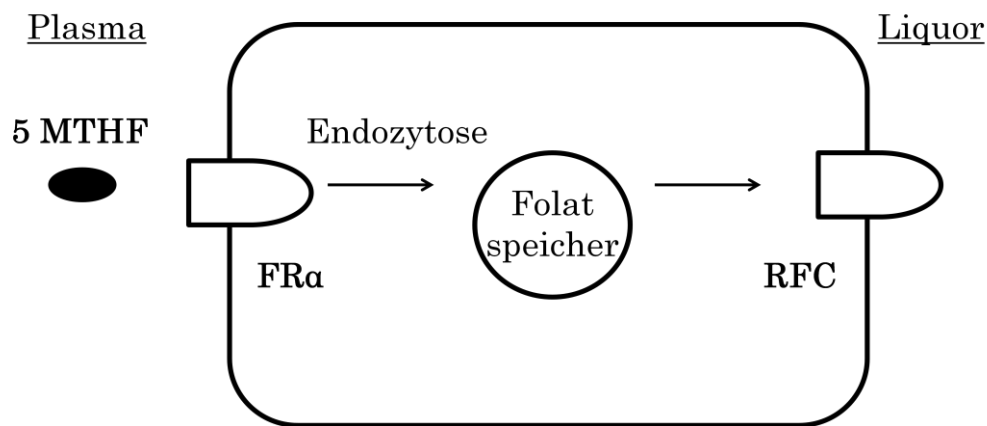


Abbildung 1.2: Der Transport von 5-MTHF über den Plexus choroideus nach Hyland *et al.* (2010). 5-MTHF bindet an den FR α . Der Komplex wird aktiv via Endozytose in die Zelle transportiert und in einer polyglutaminierten Form gespeichert. Bei Bedarf erfolgt die Abgabe als 5-MTHF über den *reduced folate carrier* (RFC) in den Liquor.

1.2. Folatrezeptoren und aktuelle Mutationen im *FOLR1*-Gen

1.2.1 Folatrezeptoren

Im menschlichen Körper erfolgt der Transport von Folat durch verschiedene Transportproteine. Der protonengekoppelte Folattransporter (PCFT) wird vor allem von Zellen des Dünndarms exprimiert, um Folate bei niedrigem pH zu absorbieren (Qiu *et al.* 2006, Steinfeld *et al.* 2009). Der *reduced folate carrier* (RFC) dagegen ist ein in vielen Geweben exprimierter, niedrigaffiner, bidirektionaler Transporter von Folaten (Hyland *et al.* 2010). Eine dritte Gruppe stellen die Folatrezeptoren (FR) dar, die in mehrere Isoformen unterteilt werden (α , β und γ). Dem FR α wird hierbei die größte physiologische Relevanz zugeschrieben. Er stellt einen Glycosylphosphatidylinositol-verankerten, hochaffinen Transporter für Folat und 5-MTHF in die Zelle via Endozytose dar (Doucette und Stevens 2004, Fan *et al.* 1995, Abb. 1.2). Nach Untersuchungen von Steinfeld *et al.* (2009) und Weitmann *et al.* (1992) findet sich eine Expression des FR α in epithelialen Zellen des Plexus choroideus, der Lunge, der Schilddrüse und der Nieren. Da der FR α am Plexus choroideus im Vergleich zu anderen Folatrezeptoren am häufigsten vertreten ist, stellt er den Haupttransporter von

Folat über die Blut-Liquor-Schranke dar. Der FR β scheint in mesenchymalen Zellen eine Rolle zu spielen (Wu und Pardridge 1999) und zudem zeigen Studien, unter anderem von Steinfeld *et al.* (2009), eine starke Expression im fetalen Hirn.

1.2.2 Mutationen im *FOLR1*-Gen

Das *FOLR1*-Gen, welches für das FR α -Protein kodiert, befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11q13.3-q14.1, Campbell *et al.* 1991). 1997 beschrieben Elwood *et al.* das *FOLR1*-Gen als bestehend aus 6,7 kB und 7 Exons mit unterschiedlichen Transkriptionsvarianten. Diese bestehen aufgrund des Vorhandenseins von mindestens zwei gewebespezifischen Promotoren, von mehreren Transkriptionsstartpunkten und dem alternativen Spleißen des Gens.

In der Arbeit von Steinfeld *et al.* (2009) wurden erstmalig autosomal rezessiv vererbte Mutationen im *FOLR1*-Gen als Ursache für einen Gehirn-spezifischen Folatmangel, der zerebralen Folattransport-Defizienz (Kapitel 1.3.2, S.7), identifiziert. Seitdem konnten durch verschiedene Arbeitsgruppen weitere Mutationen beschrieben werden. Tabelle I.1 gibt eine Übersicht über die derzeitig bekannten Mutationen.

Tabelle I.1: Identifizierte Mutationen im *FOLR1*-Gen

Mutation	Referenz
p.Q118X Nonsensemutation	Steinfeld <i>et al.</i> 2009
p.C175X Nonsensemutation	Steinfeld <i>et al.</i> 2009
p.R204X, Nonsensemutation	Dill <i>et al.</i> 2011
p.C105R, Missensemutation	Pérez-Dueñas <i>et al.</i> 2010
p.C169Y, Missensemutation	Grapp <i>et al.</i> 2012, Publikation im Rahmen dieser Arbeit
p.N222S, Missensemutation	Grapp <i>et al.</i> 2012, Publikation im Rahmen dieser Arbeit
p.C65W, Missensemutation	Grapp <i>et al.</i> 2012
p.K44_P49dup, Duplikationsmutation	Steinfeld <i>et al.</i> 2009
g.3576T>G, Splicemutation	Grapp <i>et al.</i> 2012

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung zweier neuer Missensemutationen p.C169Y und p.N222S im *FOLR1*-Gen. Diese wurden in der Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen bei homozygot (FR α p.C169Y) und compound heterozygot (FR α p.C169Y und p.N222S) erkrankten Patienten identifiziert (Grapp *et al.* 2012). Es handelt sich um Punktmutationen, die einen Austausch der Aminosäure Cystein gegen Tyrosin, bzw. Asparagin gegen Serin im FR α zur Folge haben. Ein dritte untersuchte *FOLR1*-Missensemutation, p.C105R, eines homozygot erkrankten Kindes verwandter heterozygoter Eltern wurde im Laufe dieser Arbeit durch Pérez-Dueñas *et al.* (2010) identifiziert. Es handelt sich um eine Punktmutation mit dem Austausch der Aminosäure Cystein gegen Arginin. Zudem erfolgte die Charakterisierung der homozygoten Duplikationsmutation p.K44_P49dup eines Kindes, die 2009 von Steinfeld *et al.* beschrieben wurde. Diese bewirkte eine Duplikation der Aminosäureabfolge KEKPGP ohne Verschiebung des Leserasters im *FOLR1*-Gen.

Die Genstruktur des *FOLR1*-Gens mit den eingefügten charakterisierten Mutationen, sowie Ausschnitte aus den Sequenzen der mutierten cDNS des *FOLR1*-Gens sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

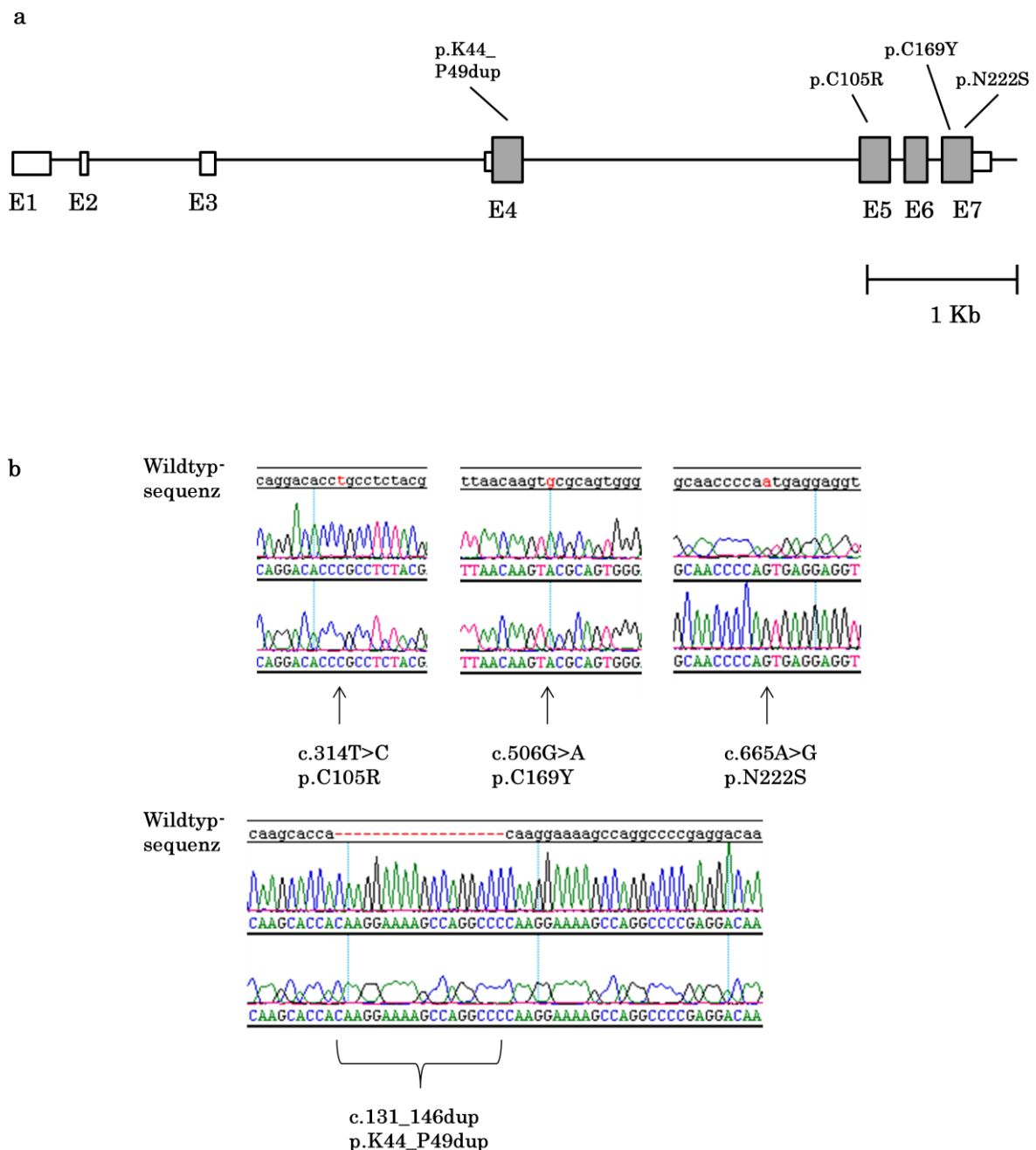


Abbildung 1.3: **a** Schematische Darstellung des *FOLR1*-Gens, kodierend für den FR α (vgl. Pérez-Dueñas *et al.* 2010). Die Rechtecke (E1-E7) stellen Exons dar. Alle kodierenden Abschnitte sind grau abgebildet. **b** Ausschnitte der cDNS-Sequenzen sequenzierter Expressionsplasmide der Mutationen FR α p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_49dup.

1.3 Folatmangel

1.3.1 Der nutritive Folatmangel

In einer 2008 durchgeführten Konsultation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Thema Folatmangel konnte festgestellt werden, dass weltweit niedrige Blutfolatspiegel in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen unabhängig vom Entwicklungsstatus des Landes vorkommen. In erster Linie waren eine mangelhafte Ernährung oder eine eingeschränkte Resorption ursächlich. Aktuell wird Erwachsenen die tägliche Aufnahme von 400 µg Folat über die Nahrung empfohlen, welches vor allem in Hülsenfrüchten, grünem Blattgemüse und Früchten enthalten ist (WHO 2008). Bei einem Folatmangel kommt es klinisch zu einer megaloblastären Anämie, kognitiven Funktionseinschränkungen und Depressionen. Insbesondere während der Schwangerschaft führt ein Folatmangel zu fetalen Missbildungen und schweren Komplikationen (WHO 2008). Aufgrund des unzureichenden Vitaminstatus in der Bevölkerung, wurden in vielen Ländern Lebensmittel mit Folat angereichert. In Deutschland besteht im Gegensatz zu den USA oder Kanada derzeit keine Beimengungspflicht (Shakur *et al.* 2010).

Dem nutritiven systemischen Folatmangel ist ein isolierter zerebraler Folatmangel im Liquor entgegenzusetzen, bei dem die Blutfolatspiegel im Normbereich sind.

1.3.2 Zerebrale Folatdefizienz (CFD)

Die zerebrale Folatdefizienz beschreibt einen Symptomkomplex, der durch erniedrigte Liquorfolatspiegel definiert ist. Man unterscheidet eine primäre zerebrale Folattransport-Defizienz von einer sekundären zerebralen Folatdefizienz.

Primäre zerebrale Folatdefizienz

Nach einer Definition von Ramaekers und Blau (2004) handelt es sich bei dem primären zerebralen Folatmangel um einen kürzlich immer häufiger erkannten neurologischen Symptomkomplex mit niedrigem zerebrospinalen Folatspiegel und normalwertigen Blutfolatkonzentrationen. Als Ursache für den isolierten zerebralen Folatmangel wurden Autoantikörper gegen den FR α durch Ramaekers *et al.* (2005) und Mutationen im *FOLR1*-Gen (Steinfeld *et al.* 2009, Pérez-Dueñas *et al.* 2010 und Dill *et al.* 2011, Grapp *et al.* 2012) beschrieben. Ist der Pathomechanismus der CFD auf einen defekten Transport des Folats über die Blut-Liquor-Schranke zurückzuführen, spricht man auch von einer zerebralen Folattransport-Defizienz (CFTD).

Die Diagnostik der primären CFTD beinhaltet eine Bestimmung des Folatstatus im Blut sowie im Liquor anhand einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach Verbeek *et al.* (2008), sowie eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Kopfes und schließlich eine Mutationsanalyse des *FOLR1*-Gens (Steinfeld *et al.* 2009) oder die Bestimmung der Folatrezeptor-Autoantikörper im Plasma.

Der Verlauf der CFTD wird als chronisch-progredient beschrieben, mit einem verzögerten Einsetzen der Symptome in der frühen Kindheit (zweiter Lebensmonat bis zweites Lebensjahr) nach zuvor unauffälliger Kindesentwicklung. Erste klinische Symptome zeigen sich in Form von Agitiertheit und Schlafstörungen. Im raschen Verlauf der Erkrankung wurden innerhalb der ersten Lebensjahre heterogene Symptome identifiziert, wie eine psychomotorische Retardierung, spastische Paraplegien, eine zerebelläre Ataxie, Epilepsien, Dyskinesien, sowie eine Mikrozephalie, Seh- und Hörstörungen (Steinfeld *et al.* 2009, Pérez-Dueñas *et al.* 2010, Ramaekers und Blau 2004 und Dill *et al.* 2011, Grapp *et al.* 2012).

Bei der Bestimmung von Liquorfolatspiegeln fallen besonders Patienten mit Mutationen im *FOLR1*-Gen durch sehr niedrige bzw. nicht detektierbare Werte auf (Dill *et al.* 2011, Steinfeld *et al.* 2009). Im Vergleich zeigen CFTD-Patienten mit Autoantikörpern gegen den FRα klinisch und laborchemisch mildere Ausprägungen (Pérez-Dueñas *et al.* 2010).

In einer Magnetresonanztomographie des Kopfes wurden progrediente frontotemporale bzw. frontoparietale Atrophien und progressive Leucodystrophien in Form von Myelinisierungsstörungen bzw. einer Demyelinisierung beschrieben (Ramaekers und Blau 2004 und Dill *et al.* 2011). Auch zerebelläre Atrophien wurde durch Pérez-Dueñas *et al.* (2010) dokumentiert. Mithilfe einer MRT-Spektroskopie gelang es Dill *et al.* (2011) und Pérez-Dueñas *et al.* (2010), einen verminderten Cholinpeak zu identifizieren, was ebenfalls für eine verminderte Myelinscheidensynthese spricht. Steinfeld *et al.* (2009) beschrieben die gestörte Myelinisierung in Form eines glialen Defizits an Cholin und Myo-Inositol als pathognomonisch für die CFTD.

Ein Therapiebeginn sollte möglichst sofort nach Diagnosestellung erfolgen. Ein späterer Beginn der Medikation konnte mit einer schlechteren Remission des behandelbaren Krankheitsbildes in Verbindung gebracht werden (Dill *et al.* 2011 und Steinfeld *et al.* 2009). Die Therapie erfolgt mit einer oralen, intravenösen oder intrathekalen hochdosierten Gabe von 5'-Formyltetrahydrofolat in Abhängigkeit der Schwere der klinischen Symptome bzw. dem Ansprechen auf die Behandlung (Steinfeld *et al.* 2009, Dill *et al.* 2011 und Hansen F und Blau 2005). Sowohl klinisch, als auch laborchemisch, radiologisch und elektroenzephalographisch konnte eine Remission der Erkrankung festgestellt werden (Hyland *et al.* 2010, Steinfeld *et al.* 2009).

Sekundäre zerebrale Folatdefizienz

Die sekundäre CFD beschreibt nach Ramaekers und Blau (2004) einen sowohl zerebral als auch im Plasma bestehenden Folatmangel. Ätiologisch kommen ein

chronischer Gebrauch von Folatantagonisten, eine Mangelernährung oder Malabsorption, angeborene Enzephalopathien (Pérez-Dueñas *et al.*, 2011) sowie verschiedene neurologische Syndrome in Betracht. Beispielsweise das Rett-Syndrom (Ramaekers *et al.* 2003), das Kearns-Sayre-Syndrom (Serrano *et al.* 2010) oder Autismus (Ramaekers *et al.* 2005). Die Zusammenhänge konnten allerdings noch nicht geklärt werden (Hyland *et al.* 2010). Die klinischen Symptome und Ergebnisse der Magnetresonanztomographie unterscheiden sich nicht von der primären Form der zerebralen Folattransport-Defizienz, allerdings sind sie durch eine mildere Ausprägung gekennzeichnet (Pérez-Dueñas *et al.* 2010). Ein Behandlungsversuch mit Folat wird empfohlen, jedoch zeigen insbesondere sekundäre Folatdefizienzen aufgrund von schweren Grunderkrankungen ein schlechtes Therapieansprechen (Pérez-Dueñas *et al.* 2011).

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die molekularen Auswirkungen von Mutationen im *FOLR1*-Gen charakterisiert werden. Untersuchungen der Proteinexpression, der Folsäure-Rezeptorbindung und der subzellulären Lokalisation mutierter Folatrezeptoren anhand von drei Punktmutationen im FR α (p.C105R, p.C169Y und p.N222S) sowie einer Duplikationsmutation (FR α p.K44_P49dup) sollen das Verständnis der primären zerebralen Folattransport-Defizienz verbessern.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle II.1: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	Herkunft
ABI PRISM Big Dye® Terminator Kit	Firma PerkinElmer, Applied Biosystems, Darmstadt
Accutase	Firma PAA, Pasching, Österreich
Agarose	Firma Bioline, Luckenwalde
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Firma Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Uptima, Firma Interchim, Frankreich
Ampicillin	Firma Serva, Heidelberg
BC Assay Reagent Kit	Firma Sigma-Aldrich, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	100x New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Bromphenolblau	Firma Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Firma Roth, Karlsruhe
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Firma Sigma-Aldrich, München
Chlorwasserstoff (HCl)	Firma Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Firma Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Firma Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	High Glucose 4,5 g/L, PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Effectene® Transfection Reagent Kit	Firma Qiagen, Hilden
Enzym Bgl II	New England BioLabs®, Frankfurt am Main

Enzym Hind III	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
Enzym Nhe I	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
Enzym Pvu I	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
Enzym T4 Ligase	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
Enzym Xho I	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
Epithelial Growth Factor (EGF)	100 µg/ml in PBS, Gibco®, Invitrogene, Firma Life Technologies, USA
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Firma Roth, Karlsruhe
Ethanol	Firma Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Firma AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS), Gold FCS superior	Firma PAA, Pasching, Österreich
Ficoll-400	Firma Biochrom, Berlin
Folsäure	Firma Amersham Biosciences, Freiburg
Folsäure, [3', 5', 7, 9- ³ H]	Firma Sigma-Aldrich, München
GelRed™	Firma Hartmann Analytic, Braunschweig
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Firma Biotium, Hayward, Kalifornien, USA
Geneticindisulfat (G418)	Firma Fermenta, St. Leon-Rot
D-Glucose	50 mg/ml Cellpure®, Firma Roth, Karlsruhe
L- Glutamin	Wasserfrei, Firma Roth, Karlsruhe
Glycerin	200 mM, Firma PAA, Pasching, Österreich
Glyzin	Wasserfrei, Firma AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Firma Roth, Karlsruhe
Hi-Di™ Formamide	Firma Roth, Karlsruhe
High Pure PCR Product Purification Kit	AB Applied Biosystems™, Firma Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Hydroxyethylpiperazin-	Firma Roche Applied Science, Mannheim
Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES)	Firma Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	Firma PAA, Pasching, Österreich
Isopropanol	Firma Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Firma Sigma-Aldrich, München

Kaliumdihydrogenphosphat	Firma Merck, Darmstadt
Laminin	Firma Sigma-Aldrich, München
Lumi Light Western Blotting Substrate	Firma Roche Applied Science, Mannheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1 M, Firma Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	Firma Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Blotting grade, Firma Roth, Karlsruhe
Nagellack	Firma Rival de Loop, Berlin; Firma Essence cosmetics, Sulzbach
Natriumacetat (NaAc)	3 M, pH 4,5 Firma Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Firma Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Firma Merck, Darmstadt
NucleoBond® Xtra Midi plasmid purification	Firma Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II Kit	Firma Macherey Nagel, Düren
Orange G	Firma Roth, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Firma Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA), 4 % in PBS	Firma USB®, Cleveland, Ohio, USA
Penicillin-Streptomycin Lösung	10 mg/ml, Firma PAA, Pasching, Österreich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Dulbecco's	Firma PAA, Pasching, Österreich
Ponceaus S Solution	Firma Sigma-Aldrich, München
Primer: T7 (F)	Firma Sigma-Aldrich, München
Primer: BGH (R)	Firma Sigma-Aldrich, München
Prolong® Gold	Antifade Reagent with DAPI, Invitrogene, Firma Life Technologies, USA
NE Puffer 2	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
NE Puffer 3	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
NE Puffer T4	New England BioLabs®, Frankfurt am Main
RNAse A	Firma Fermentas, St. Leon-Rot
Roswell Park Memorial Institutue (RPMI)1640	Mit L-Glutamin, Firma PAA, Österreich; Mit L-Glutamin, PhenolRed, ohne Folat, Gibco®, Firma

	Life Technologies, USA
Roti® Phenol (Phenol Chloroform)	Firma Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Firma Roth, Karlsruhe
Rotistock 20 % SDS	Firma Roth, Karlsruhe
Saponin	Firma Roth, Karlsruhe
Select-Agar	Firma Gibco® BRL, Karlsruhe
Super Signal® Femto	Firma Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Super Signal® Pico	Firma Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Szintillationsflüssigkeit	Utima Gold™ AB, Firma PerkinElmer, Waltham, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Firma Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Firma Roth, Karlsruhe
Tris(hydromethyl)aminomethan (Tris-Base)	Firma Roth, Karlsruhe
Triton X	Firma Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Firma PAA, Pasching, Österreich
Trypton ohne Pepton	Firma Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Firma Sigma-Aldrich, München
Ziegenserum	Zymed®, Invitrogene, Firma Life Technologies, USA

2.2 Geräte und Software

Tabelle II.2: Geräte und Software

Geräte und Software	Hersteller
ABI PRISM, Genetic Analyzer	Firma Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav	Firma Tecnomara, Schweiz
Brutschrank	HERAcell® 150, Firma Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Bunsenbrenner	CV 470 Plus, Firma CampingAZ, Hungen-

	Inheiden
Eismaschine	Firma Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophoresekammer für DNS	Owl Separation Systems, Firma Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Elektrophoresekammer für Westernblots	SDS Kammer, Mini Protean® Tetra Cell, Firma Bio-Rad, München
Feinwaage	2001 MP 2, Firma Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager M.1, Firma Zeiss, Göttingen
Gefrierschrank	Firma Liebherr, Bulle, Schweiz; Firma Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Heizblock	TB2 Thermoblock, Firma Biometra, Göttingen
Inkubator	Firma Memmert, Schwabach
Klonierungszyylinder	eigene Herstellung
Konfokalmikroskop	Olympus IX81, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Kühlschränke	Firma Liebherr, Bulle, Schweiz
Laminiergerät	Firma Severin, Münster
Luminescent Image Analyser LAS 4000	Firma FUJI Film, Düsseldorf
Magnetrührer	Firma IKA, Staufen; Magnetic Stirrer, Firma Hanna® Instruments, USA
Mikroskop	Eclipse TS 100, Firma Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	Firma Panasonic, Hamburg
Nanodrop® ND 1000	Firma NanoDrop, Wilmington, USA
Spectrophotometer	
PC-Programme	Microsoft Word 2000, Microsoft Exel 2000, Microsoft Powerpoint 2000, SeqMan Pro, LAS 4000 Analyzer, Axio Vision 4.8 Software Paket, LSM Image Browser, Bio Doc Analyser 2,0, UltraView®, Perkin-Elmer
PCR-Geräte	T3 Thermocycler, Firma Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 820, Firma Schott Geräte, Mainz
Photometer	Synergy Mx, Firma Bio Tek, Bad Friedrichshall

Pipetboy	Firma IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Reference-Pipetten, Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schüttelinkubator	Ecotron, Firma Infors HT, Schweiz; G24 Firma New Brunswick Scientific/Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schwenktisch	Rocking Platform, Firma Biometra, Göttingen; 3013 Firma GFL, Burgwedel
Stromgeber	Standard Power Pack P25, Firma Biometra, Göttingen; E443, Firma Consort, Belgien
Szintillationszähler	Beckman LS 5000 TD, Firma Tritech, Edgewater, MD, USA
Transferkammer	Fastblot, Firma Biometra, Göttingen
UV-Gerät	Bio Doc Analyzer, Firma Biometra, Göttingen
Vortex-Mixer	Firma Heidolph, Schwabach; Firma Velp Scientifica, Usmate, Italien; Firma Bender und Hobein, Bruchsal
Waage	Firma Sartorius, Göttingen
Wasserbad	1083, Firma GFL, Burgwedel; Firma Memmert, Schwabach
Zellkulturbank	HERAsafe HSPC, Firma Heraeus Kendro Laboratory Products, Hanau
Zentrifugen	Universal 320, Firma Hettich, Tuttlingen; 5424, Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; GPR Centrifuge, Firma Beckman Coulter, Krefeld; ROTANTA/R, Firma Hettich, Tuttlingen; MIKRO 200R, Firma Hettich, Tuttlingen; FugeOne® MicroZentrifuge, Firma StarLab, Ahrensburg; Sorvall RC5 Superspeed, Firma Thermo Fischer Scientific, Braunschweig

2.3 Puffer und Lösungen**Tabelle II.3: Puffer und Lösungen**

Puffer/ Lösung	Herstellung
Acid Puffer (Bindungsassay)	10 mmol/l NaAc, 150 mmol/l NaCl mit Essigsäure auf pH 3,5.
Agarosegel 1 %	1 % Agarose, 0,0006 % GelRed™ in TAE Puffer.
Agarosegel 2 %	2 % Agarose, 0,0009 % GelRed™ in TAE Puffer.
Antikörperlösung	1 % Milchpulver in PBS-T.
Blockier Puffer	5 % Milchpulver in PBS-T.
HBS Puffer (Bindungsassay)	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 2 mM MgCl ₂ mit NaOH auf pH 7,4.
Loading Puffer (Stopp Mix, 6 x), (Gelelektrophorese)	0,4 g EDTA, 15 g Ficoll-400, 10 ml Glycerin, 1 Spatelspitze Orange G.
Laufpuffer, 1 x (SDS PAGE)	3 g Tris-Base, 14,4 g Glycin, 5 ml 20 % SDS, auf 1000 ml H ₂ O.
LB Medium (<i>lysogeny broth</i>)	5 g Trypton ohne Pepton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 500 ml H ₂ O.
Lösung 1 (Mini Präparation)	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0).
Lösung 2 (Mini Präparation)	0,2 N NaOH, 1 % SDS.
Lösung 3 (Mini Präparation)	3 M NaAc pH 4,8.
Mild Stripping Buffer	1,5 g Glycin/HCl, 0,1 g SDS, 1 ml Tween auf 100 ml H ₂ O; pH 2,2.
PBS (10x)	400 g NaCl, 10 g KCl, 72 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 10 g KH ₂ PO ₄ auf 5 l H ₂ O pH 7,4.
PBS-T	0,05 % Tween in PBS (1x).
Probenpuffer, nicht-reduzierend (4x Laemmli) (SDS PAGE)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 40 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau.
Probenpuffer, reduzierend	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 40 %

(4x Laemmli) (SDS PAGE)	Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol.
Transferpuffer (Westernblot)	3 g Tris-Base, 12 g Glycin, 200 ml Methanol, 800 ml H ₂ O.
Trisacetat EDTA (TAE) Puffer	40 mM Tris/HCl, 20 mM NaAc, 1 mM EDTA; pH 7,0.
Sammelgel, 5 % (SDS-PAGE) (Angaben für ein Gel)	0,68 ml H ₂ O, 0,17 ml 30 % Rotiphorese-Gel, 0,13 ml 1 M TrisCl/SDS (4 x pH 6,8), 0,01 ml 10 % SDS, 0,01 ml 10 % APS, 0,001 ml TEMED .
Trenngel, 12 % (SDS-PAGE) (Angaben für ein Gel)	1,6 ml H ₂ O, 2,00 ml 30 % Rotiphorese-Gel, 1,3 ml 1,5 M TrisCl/SDS (4x pH 8,8), 0,05 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % APS, 0,002ml TEMED.
TrisCl/SDS 4 x pH 6,8	0,5 M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O; pH 6,8.
TrisCl/SDS 4 x pH 8,8	1,5 M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O; pH 8,8.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle II.4: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Blottingmembran	Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Firma Whatman®, Dassel
Cryo-Container	Nalgene® Cryo Container, Firma Nalge Nunc International, USA
Cryotubes	Firma Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Rund, Ø 12 mm, Firma Menzel-Gläser®, Braunschweig
Falcon Tubes	15 ml, Firma Necton Dickinson Labware, Heidelberg; 50 ml, Firma Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterpapier	GB 33 B003, Firma G. Heinemann Labortechnik, Schwäbsch Gmünd

Fluoreszenz Writer	Glow Writer, Firma Diversified Biotech, Dedham, USA
Kanüle	Sterican®, Firma B. Braun, Melsungen
Klarsichtfolien	Firma Falken, Peitz
Kolben	Firma Duran/ Schott, Mainz
Messzylinder	Firma Duran/Schott, Mainz
Mikrotiterplatte 96 Well	Firma Greiner bio-one, Frickenhausen
Objektträger	76 x 26 mm, Glas, Firma AHL
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pasteurpipetten	Firma WU, Mainz
Pipettenspitzen	Firma Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	2 ml, 1,5ml, 0,2 ml, Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Skalpell	Firma Tecnocut, Italien
Zellkulturflaschen	Firma Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen/-platten	Firma Necton Dickinson Labware, Heidelberg; Firma Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Firma Sarstedt, Nümbrecht

2.5 Antikörper

Tabelle II.5: Antikörper

Antikörper gegen	Name des Antikörpers	Beschreibung , Hersteller, Referenz
β-Aktin	Maus anti-β-Aktin-Antikörper	monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus gegen das eukaryotische Strukturprotein β-Aktin, Firma Sigma-Aldrich, München (North <i>et al.</i> 1994)
Calreticulin	Kaninchen anti-Calreticulin-Antikörper	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen das im Lumen des eukaryotischen ERs lokalisierte Protein Calreticulin, NB 600-101 C4, Novus

		Biologicals, Cambridge, UK (Placantonakis <i>et al.</i> 2002)
FR α	NCL-L-FR α	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus gegen den FR α , Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK (Smith <i>et al.</i> 2007)
	MOV18	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus gegen den FR α , Alexis [®] Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach, (Basal <i>et al.</i> 2009)
	Maus anti-FR α F5753	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus gegen den FR α , US Biological, Swampscott, Massachusetts, USA, (Basal <i>et al.</i> 2009)
	Kaninchen anti-FR α Antikörper N1C3	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen den FR α , Gene Tex, Irvine, USA
Anti-Kaninchen- Antikörper	Ziege anti-Kaninchen- Antikörper, fluoreszierend	Alexa Fluor [®] 488, monoklonaler IgG-Antikörper aus der Ziege, Molecular Probes, Invitrogene, Firma Life Technologies, USA (Kim <i>et al.</i> 2011)
Anti-Maus- Antikörper	Esel anti-Maus HRP Antikörper	HRP-gekoppelter monoklonaler IgG-Antikörper aus dem Esel, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
	Ziege anti-Maus- Antikörper (CY TM 3), fluoreszierend	CY TM 3-konjugierter monoklonaler IgG Antikörper aus der Ziege, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
PDI	Kaninchen Anti-PDI- Antikörper	Monoklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen gegen die Protein-Disulfid-Isomerase, Firma Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA (Goldberger <i>et al.</i> 1963)

Maus anti-PDI Antikörper	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus gegen die Protein-Disulfid- Isomerase, Firma Abcam, Cambridge, UK (Bernardi <i>et al.</i> 2008)
-----------------------------	---

2.6 Patienten-Mutationen im *FOLR1*-Gen

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation charakterisierten FR α -Mutanten wurden anhand von Sequenzanalysen des *FOLR1*-Gens aus Patienten-DNS detektiert. Im lysosomalen Labor der Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen wurden zwei Missense-Mutanten im FR α , p.C169Y und p.N222S (Publikation im Rahmen dieser Arbeit: Grapp *et al.*, 2012), sowie eine Duplikationsmutante, p.K44_P49dup, identifiziert (Steinfeld *et al.* 2009). Zudem beschrieben im Laufe dieser Arbeit Pérez-Dueñas *et al.* (2010) eine weitere Missense-Mutante im FR α , p.C105R, dessen Charakterisierung ebenfalls in die Arbeit aufgenommen wurde.

2.7 Plasmide

2.7.1 Verwendete Plasmide

pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A

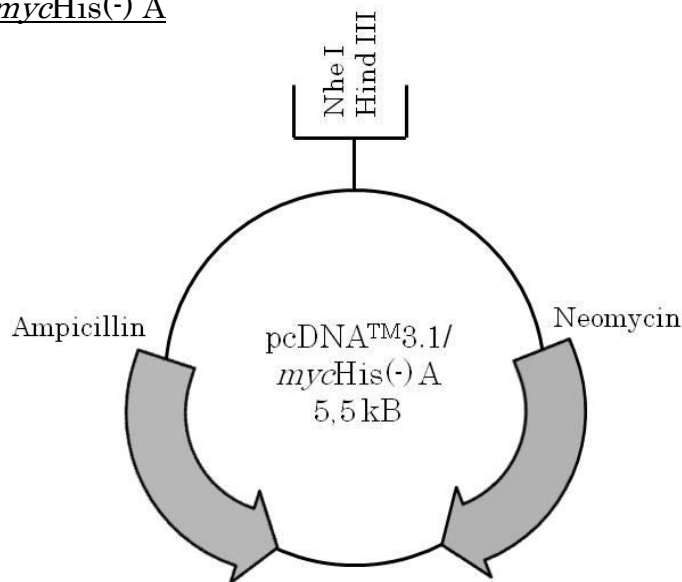


Abbildung 2.1: Karte des Vektors pcDNATM3.1/*mycHis* (-) A. Aufgeführt sind das Ampicillin-Resistenzgen, sowie das Neomycin (G418)-Resistenzgen und die MCS.

Der Vektor pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A (Abb. 2.1), bestehend aus 5,5 kB, wurde an seiner multiplen Klonierungsseite (MCS) mithilfe der Restriktionsenzyme Nhe I und Hind III mit der cDNS des *FOLR1* und dessen Mutationen p.C105R (c.314T>C), p.C169Y (c.506G>A), p.N222S (c.665A>G) und p.K44_P49dup (c.131_146dup) versehen. Die kodierenden Vektoren lagen in der Arbeitsgruppe der Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen bereits vor.

Die Vektoren dienen der Übertragung der cDNS in CHO-K1- und HepG2-Zellen durch stabile oder transiente Transfektion. Die beiden Resistenzgene ermöglichen eine Selektion zum einen nach der Transformation in kompetente Bakterienstämme (Ampicillin Resistenz) (Kapitel 2.7.5, S.27) und zum anderen nach der stabilen Transfektion in eukaryotische Zellen (G418 Resistenz) (Kapitel 2.8.2, S.35).

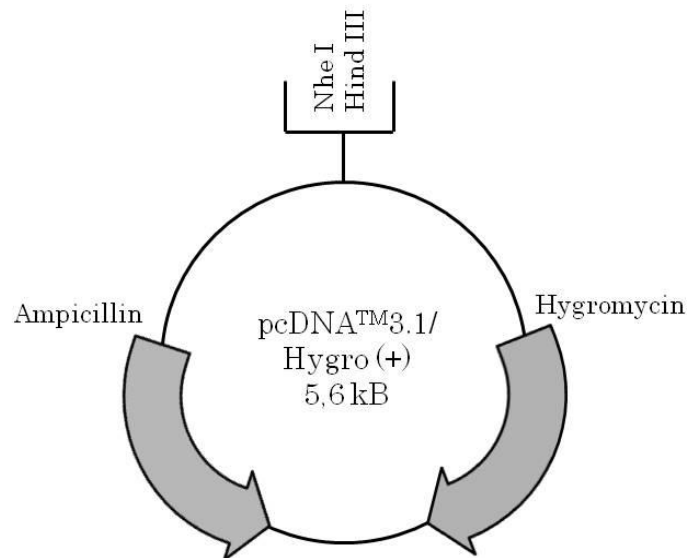
pcDNATM3.1/Hygro (+)

Abbildung 2.2: Karte des Vektors pcDNATM3.1/ Hygro (+). Aufgeführt sind das Ampicillin-Resistenzgen, sowie das Hygromycin-B-Resistenzgen und die MCS.

Der Vektor pcDNATM3.1/Hygro (+) (Abb. 2.2), bestehend aus 5,6 kB, diente der Transfektion von Z310-Zellen mit der wt sowie mutierten *FOLR1*-cDNS. Die Z310-Zellen wurden durch die Transfektion eines viralen Plasmids und die anschließende Selektion mit G418 immortalisiert (Zheng und Zhao 2002) und waren nun aufgrund der G418-Resistenz nicht mit dem Vektor pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A transfizierbar.

Die Klonierung des Vektorplasmids erfolgte durch eine Ligation (Kapitel 2.7.8, S.32) nach Gelextraktion (Kapitel 2.7.7, S.31) der cDNS aus bereits vorhandenen Plasmiden. Der Vektor pcDNATM3.1/Hygro (+) mit der eingefügten cDNS des *FOLR1* wt (lag bereits in der Arbeitsgruppe vor), sowie der Vektor pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A mit der cDNS aller *FOLR1*-Mutationen wurden hierfür mit den Restriktionsenzymen Nhe I und Hind III geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Es folgte die Ligation des Vektors pcDNATM3.1/Hygro (+) mit der cDNA der mutierten Proteine (Kapitel 2.7.8, S.32).

Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone diente das Hygromycin-B-Resistenzgen. Die Ampicillinresistenz ermöglichte die Selektion nach der Transformation in kompetente Bakterien (Kapitel 2.7.5, S.27).

Alle Vektorplasmide wurden nach der Klonierung mit Hilfe einer Sequenzierung auf ihre Intaktheit überprüft.

2.7.2 Sequenzierung der Plasmide

Anhand einer Sequenzierungs-PCR konnte die genaue Nukleotidabfolge und somit die Aminosäureabfolge eines Proteins untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde so zum einen nach Mutationen im *FOLR1*-Gen der Patienten-DNS gesucht, zum anderen konnte der Erfolg der Plasmidklonierung überprüft werden. Die Sequenzierung der DNS erfolgte nach einer Erweiterung des Prinzips der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977).

Mithilfe ausgewählter Primer und mit dem ABI PRISM BigDye® Terminator Kit konnte eine DNS-Polymerase im Kit enthaltene fluoreszierende 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate im Rahmen einer Sequenzierungs-PCR in die entstehenden DNS-Doppelstränge einfügen. Dies führte zu einem Kettenabbruch, der nach genügend vielen PCR-Zyklen (Kapitel 2.7.3, S.26) für jedes Nukleotid stattfand. Anschließend konnten die unterschiedlich fluoreszierenden Dideoxynukleotide anhand der Kettenlängen in die Reihenfolge der Nukleotidabfolge der untersuchten DNS-Sequenz geordnet werden.

Für die Sequenzierungs-PCR wurden 500 ng der aufgereinigten DNS nach dem Pipettierschema (Tabelle II.6) mit 5 x Puffer, einem die DNS-Sequenz vorwärts (F – T7 Primer) oder rückwärts (R – BGH Primer) andockenden Primer (Tabelle II.7), sowie dem BigDye® (enthält fluoreszierende 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate, sowie Puffer) auf 10 µl H₂O angesetzt.

Tabelle II.6: Pipettierschema der Sequenzierungs-PCR

	DNS	5 x Puffer	Primer	BigDye®	H ₂ O
Plasmid 1- F	500 ng	2 µl	T7 0,5 µl	0,8 µl	auf 10 µl
Plasmid 1- R	500 ng	2 µl	BGH 0,5 µl	0,8 µl	

Tabelle II.7: Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer

Primer	Sequenz
T7	5'-GATTTAGGTGACACTATAG- 3'
BGH	5' -TAGAAGGCACAGTCGAGG- 3'

Die Sequenzierungs-PCR fand in dem T3-Thermocycler unter den in Tabelle II.8 aufgeführten Reaktionsbedingungen statt:

Tabelle II.8: Reaktionsbedingungen im PCR-Block

Schritte	Temperatur in °C	Dauer	Wiederholungen
1	96	1 min	
2	96	10 sec	24
3	55	10 sec	24
4	60	4 min	24
Pause	10		

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR erfolgte nach dem Aufreinigen der Produkte (Kapitel 2.7.4, S.27) das Erkennen und Aufzeichnen der Nukleotidabfolge durch ein Detektorsystem (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer).

2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.* 1986, Saiki *et al.* 1988) ermöglichte eine in-vitro-Amplifikation von DNS. Hierbei wurde durch ein hitzestabiles Enzym, die Taq-DNS-Polymerase, unter Zugabe ausgewählter Primer, ein definierter Zielbereich der DNS zyklisch und somit exponentiell vervielfältigt. Der Ablauf der PCR gestaltete sich in einem Thermocycler in drei Phasen (Abb. 2.3):

1. Denaturierung: Durch das Erhitzen der DNS-Doppelstränge auf 96 °C lösten sich diese in ihre Einzelstrangpaare.
2. Annealing: An die freien Einzelstränge konnten sich nun, nach dem Abkühlen der DNS auf die optimale Annealing Temperatur, die Oligonukleotid-Primer an ihre Zielsequenz anlagern.
3. Extension: Die Taq-DNS-Polymerase synthetisierte, mit Hilfe der zugegebenen Desoxynukleosidtriphosphate, vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend, die neuen DNS-Doppelstränge.

Da alle neu entstandenen DNS-Stränge im nächsten Zyklus als Matrize dienten, erfolgte eine exponentielle Amplifikation der DNS. Auf diese Weise ließen sich in 30 Zyklen 10^5 Zielsequenzkopien synthetisieren.

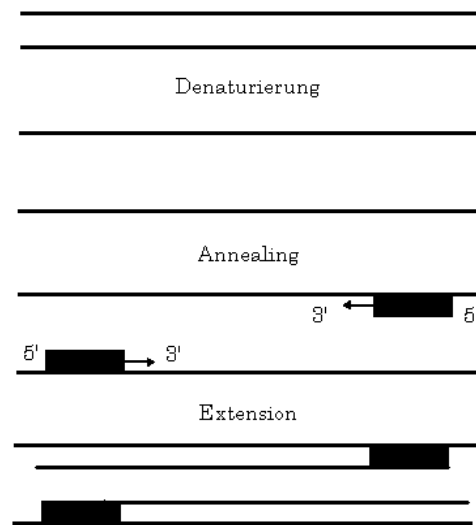


Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion

2.7.4 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Zur Reinigung der DNS von den übrigen Sequenzierungsprodukten, wurden 10 µl Cycle Sequencing Produkt mit 120 µl H₂O, 10 µl NaAc (pH 4,6) und 220 µl 100%-Ethanol versetzt, gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 18 000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die DNS mit 300 µl 70%-Ethanol gewaschen (auf dem Vortex-Mixer mischen, 5 min bei 18 000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen) und das DNS-Pellet bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Abschließend wurde die DNS in 10 µl Formamid-Lösung resuspendiert.

Die aufgereinigten Sequenzierungsprodukte konnten nun mittels eines automatischen ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers sequenziert werden.

2.7.5 Transformation von Plasmid-DNS (Hanahan 1983)

Herstellung von Agarplatten (LB-Platten) mit Ampicillin

Zur Herstellung von Agarplatten wurde zu dem LB-Medium (Tabelle II.3, S.17) Select-Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) gegeben.

Nach dem Ansetzen erfolgte das Autoklavieren des Mediums und das Zufügen von 100 µg/ml Ampicillin.

Herstellung kompetenter E. Coli (Top Ten) (Dagert und Ehrlich 1979)

Tabelle II.9: Verwendeter Bakterienstamm

Bakterienstamm	Eigenschaften	Hersteller	Referenz
Escherichia-coli-DH5α TM	Mutation in der DNS-spezifischen Endonuklease I erzeugt eine höhere Transformationseffizienz	Invitrogene, Firma Life Technologies, USA	Taylor <i>et al.</i> (1993)

100 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur der DH5α-E. coli-Zellen mit 1:1000 Streptomycin angeimpft und bei 37 °C zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 inkubiert. Nach dem Verteilen der Zellsuspension auf zwei 50-ml-Falcon Tubes wurde diese für 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (20 min bei 4 °C und 3000 rpm). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 4 ml eiskalter 80 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min bei 4°C und 3000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet nun in 2,5 ml CaCl₂/Glycerin (4:1)-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Ablauf der Transformation

Die Transformation von Plasmiden diente dem Vervielfältigen von Plasmid-DNS in kompetenten Bakterienstämmen.

Es wurden 50 ng Plasmid-DNS in 20 µl vorsichtig auf Eis aufgetauten Top-Ten-Zellen für 30-40 min auf Eis inkubiert. Die verwendeten Escherichia-Coli-DH5αTM wiesen als kompetente Zellen die Fähigkeit auf, freie DNS aus dem Medium aufzunehmen. Da E. coli-Zellen keine natürliche Kompetenz besitzen, wurde in den mit CaCl₂ vorbehandelten Zellen durch einen Hitzeschock eine künstliche

Kompetenz erzielt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst 30 sec auf einem Heizblock bei 42 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis gelagert. Nach dem Zufügen von 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum (Tabelle II.3, S.17) in dem sterilen Feld einer Bunsenbrennerflamme erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C unter permanentem Schütteln bei 500 rpm. Die LB-Agarplatten wurden währenddessen bei 37 °C in einem Inkubator vorgewärmt. Um ein Ansammeln von Kondenswasser auf dem Agar zu vermeiden, erfolgte die Lagerung im Inkubator mit dem Agarboden nach oben.

Bei der Herstellung der Agarplatten wurden diese mit einem Antibiotikum versehen, das in Abhängigkeit der Resistenzen der zu transformierenden Vektor-DNS gewählt wurde. Im Falle der Vektoren pcDNATM3.1/ *mycHis*(-) A und pcDNATM3.1/ Hygro (+) (Abb. 2.1, S.22 und Abb. 2.2, S. 23) wurden die Agarplatten mit Ampicillin hergestellt. Pro Transformation wurden zwei LB-Platten mit 70 bzw. 140 µl des Zellansatzes im Bunsenbrennersterilfeld ausplattiert. Nach kurzem Trocknen für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Selektivagars wuchsen auf den Platten Kolonien einzelner transformierter Bakterien. Mit einer Pipettenspitze wurde eine einzelnstehende Kolonie vorsichtig von dem Agar abgehoben und als Vorkultur in einem sterilen Tube mit 1 ml LB-Medium und 1 µl Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm mindestens 6 h unter Schütteln inkubiert. 100 µl der Vorkultur wurden anschließend in 200 ml LB-Medium und 200 µl Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Aus dieser Hauptkultur wurde durch eine Midi-Präparation (Kapitel 2.7.6, S.30) die Plasmid-DNS aus den Bakterien herauspräpariert.

Unterschiede bei einer Transformation von Plasmid-DNS nach Ligation und Gelextraktion

Bei der Transformation von Plasmid-DNS aus einer Ligation von geextrahierten DNS-Abschnitten wurde mit 10 µl des Ligationsprodukts wie oben beschrieben verfahren. Vor dem Ausplattieren auf die LB-Agarplatten wurden die

kompetenten Bakterien 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert und, durch schnelles Abgießen eines Großteils des Überstandes, das Pellet in den ungefähr verbliebenen 100 µl Überstand resuspendiert. Für das Ausplattieren wurde nun das gesamte Volumen verwendet. Für eine Vorkultur wurden pro Plasmid drei Kolonien in einzelne sterile Tubes mit 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin überführt. Nach der Inkubation der Vorkultur wurde aus 2 ml der Kultur im Rahmen einer Mini-Präparation (Kapitel 2.7.9, S.32) DNS aus den Bakterien präpariert. Durch einen Restriktionsenzymverdau (Kapitel 2.9, S.38) und anschließende Gelelektrophorese (Kapitel 2.10, S.39) wurde die Intaktheit der Plasmide überprüft und eine Hauptkultur aus 1 ml der getesteten Vorkultur konnte angesetzt werden.

2.7.6 Midi-Präparation der Plasmide

Die Präparation der transformierten Plasmide aus den kompetenten Bakterienstämmen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem NucleoBond® Xtra plasmid purification Kit (Tabelle II.1, S.13).

Die 200 ml der Bakterienkultur wurden bei 4 °C 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in 8 ml Buffer RES + RNase A durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert wurde, erfolgte ein Lysieren der Zellen durch die Zugabe von 8 ml Buffer LYS und fünfmaliges Invertieren. Nun folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Währenddessen wurde eine NucleoBond® Xtra Column Säule mit einem Filter versehen, der mit 12 ml Buffer EQU befeuchtet wurde. Das Zellysate wurde mit 8 ml neutralisierendem Buffer NEU 10-15 Mal durch Invertieren gemischt. Hierbei wurden Proteine und chromosomale DNS ausgefällt. Nun wurde das Zellysate in den Filter der Säule gefüllt. Beim Durchlaufen des Filters blieb das Präzipitat aus Proteinen und chromosomaler DNS im Filter zurück. Beim anschließenden Durchlaufen der Säule erfolgte die Bindung der Plasmid-DNS an eine Membran. Nach dem Waschen des Filters mit 5 ml Buffer EQU bei dem Lysatreste aus dem Filter entfernt wurden, wurde der Filter entsorgt und die DNS auf der Säulenmembran

mit 8 ml Buffer WASH gewaschen. Nun konnte die Plasmid-DNS mit 5 ml Buffer ELU von der Membran eluiert und in einem 50-ml-Falcon Tube gesammelt werden. Die DNS wurde anschließend auf fünf 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und mit je 700 µl 100%-Isopropanol durch Mischen auf einem Vortex-Mixer und der Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 x g für 30 min ausgefällt. Ein Waschen der DNS erfolgte nach dem Abpipettieren des Überstandes mit 400 µl 70%-Ethanol und Zentrifugation (5 min, 14 000 x g, bei Raumtemperatur). Nach dem Abpipettieren des 70%-Ethanol wurde das DNS-Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 60 µl sterilem H₂O durch Schütteln bei Raumtemperatur für 15 min resuspendiert.

Im Anschluss erfolgte eine Bestimmung der DNS-Konzentration und des Reinheitsgrads (Kapitel 2.12, S.41).

2.7.7 Gelextraktion

Eine Gelextraktion ermöglichte das Herauslösen und Aufreinigen von DNS aus einem Agarosegel (Vgl. Kapitel 2.7.1, S.22). Es wurden die Banden des Vektors pcDNATM3.1/Hygro (+) sowie die cDNS der *FOLR1*-Mutationen nach einer elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel unter UV-Sicht mit einem sauberen Skalpell in einem Stück herausgeschnitten und im Anschluss mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit (Tabelle II.1, S.13) aus dem Gel extrahiert. 100 mg Agarosegel wurden 5 bis 10 min bei 50 °C mit 200 µl Buffer NT inkubiert. Für ein vollständiges Auflösen des Gels in dem Puffer war mehrmaliges vorsichtiges Mischen auf einem Vortex-Mixer notwendig. Im Anschluss wurde das gelöste Gel in eine NucleoSpin[®] Extract II Column Säule, welche zuvor in einem Sammeltube platziert wurde, pipettiert und 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Bei diesem Schritt fand eine Bindung der DNS auf einer Membran der Säule statt. Der Säulendurchfluss in dem Sammeltube wurde verworfen. Das Waschen der DNS erfolgte mit 700 µl Buffer NT3 (1 min bei 11 000 x g zentrifugieren). Nach dem Entfernen des Buffer NT3 aus dem Sammeltube wurde die Membran durch Zentrifugation getrocknet (2 min,

11 000 x g). Nun folgte das Lösen der DNS von der Membran durch die Zugabe von 20 µl Buffer NE. Nach einer Inkubation (1 min bei Raumtemperatur) erfolgte das Eluieren der DNS durch Zentrifugation für 1 min bei 11 000 x g.

Als Erfolgskontrolle der Gelextraktion, sowie zum Abschätzen der benötigten DNS-Menge für die anschließende Ligation, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese der Proben durchgeführt (Kapitel 2.10, S.39).

2.7.8 Ligation (Dugaiczky *et al.* 1975)

Im Rahmen der Herstellung neuer Plasmide diente eine Ligation dem Integrieren der cDNS des *FOLR1* wt oder seiner Mutationen in das Vektorplasmid pcDNATM3.1/Hygro (+). Das Enzym T4-Ligase verknüpfte hierbei die freien 3'-OH- und 5'-PO₄-Enden der DNS-Abschnitte.

In Abhängigkeit der DNS-Konzentration der einzelnen Gelextraktionsproben wurden 2 µl des Vektors und 6-10 µl (3- bis 5-fache Menge) DNS mit 2 µl T4-Puffer und 1 µl T4-Ligase auf 20 µl H₂O aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Transformation (Kapitel 2.7.5, S.27) zum Vervielfältigen der ligierten Plasmid-DNS.

2.7.9 Mini-Präparation der Plasmide

Die Mini-Präparation, basierend auf einer alkalischen Lyse nach Birnboim (1983), wurde im Rahmen einer Transformation (Kapitel 2.7.5, S.27) von ligierten DNS-Abschnitten aus einer Gelextraktion durchgeführt. Anhand der Mini-Präparation konnten kleine Mengen DNS gewonnen werden, die anschließend, vor dem Animpfen einer Hauptkultur, durch einen Restriktionsenzymverdau und eine Gelelektrophorese auf ihre Intaktheit geprüft wurden.

1,5 ml der Vorkultur wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Bakterien in 200 µl der Lösung 1 mit 1:100 RNase A (10 µg/µl) (Tabelle II.3,

S.17) resuspendiert. Durch das Schwenken der Suspension mit 200 µl der Lösung 2 (Tabelle II.3, S.17) fanden ein alkalisches Lysieren der Bakterien, sowie ein Denaturieren der chromosomalen DNS und der Proteine statt. Nach dem Zufügen von 300 µl der Lösung 3 (Tabelle II.3, S.17) erfolgte eine Renaturierung der DNS durch die pH-Neutralisation. Nach dem Inkubieren auf Eis für 2-3 min wurden die Proben 10 min bei 11 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Plasmid-DNS im Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 490 µl 100%-Isopropanol durch kurzes Mischen auf einem Vortex-Mixer, 2 min Inkubation bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation (10 min, 11 000 x g bei Raumtemperatur) ausgefällt. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein Waschen der DNS mit 500 µl 70%-Ethanol durch Mischen auf dem Vortex-Mixer und anschließender Zentrifugation (2 min, 11 000 x g, bei Raumtemperatur). Das Trocknen des Pellets erfolgte für 5 min bei 37 °C auf einem Heizblock. Je nach Pelletgröße wurde die DNS abschließend in 50-80 µl H₂O, alternativ in 10 mM Tris (pH 7,4), aufgenommen.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

Tabelle II.10: Verwendete Zelllinien

	Eigenschaften	Referenz
CHO-K1	Fibroblastentumorzelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters	Tjio und Puck (1958)
Hep G2	Humane Leberkarzinomzelllinie	van Ijzendoorn <i>et al.</i> (1997)
Z310	Epithelzellen des Plexus choroideus der Ratte	Zheng und Zhao (2002)

Alle verwendeten Zelllinien waren bereits im Labor vorhanden und wurden in einem Brutschrank bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in 75-cm²-Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium kultiviert.

Kultivierung von CHO-K1-Zellen

Für die Kultivierung der CHO-K1-Zellen wurde zunächst das verwendete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum superior, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, sowie 1 % L-Glutamin versetzt.

Ein Mediumwechsel erfolgte, je nach Wachstum, alle zwei bis drei Tage nach einmaligem Waschen der adhärent wachsenden Zellen mit 5 ml PBS. Im Abstand von fünf Tagen wurden die CHO-K1-Zellen 1:10 passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und für 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 1 ml Trypsin-EDTA bis zum Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden, evtl. durch vorsichtiges Abklopfen, inkubiert. Zum Inhibieren der Trypsinwirkung wurde die Zellsuspension mit 5 ml Medium versetzt und bei 800 rpm 5 min zentrifugiert. Ein Zehntel des Zellpellets wurde in 12 ml frischem Medium in T75-Zellkulturflasche kultiviert.

Kultivierung von HepG2-Zellen

Für die Kultivierung von HepG2-Zellen wurde das RPMI Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung versetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage, nach dem Waschen mit 5 ml PBS. Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach Wachstum alle sieben Tage 1:4 entsprechend dem Passagieren der CHO-K1-Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA und einer Inkubationszeit von 7 min.

Kultivierung von Z310-Zellen

Zum Kultivieren der Z310-Zellen wurde das Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) mit 10 % FCS Gold, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 1 % L-Glutamin, 10 ng/ml EGF, sowie 200 µg/ml G418 versetzt.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage nach dem einmaligen Waschen mit 5 ml PBS. Die Zellen wurden im Abstand von fünf Tagen 1:10, entsprechend der CHO-K1-Zellen, passagiert.

2.8.2 Transfektionsmethoden

Stabile und transiente Transfektion

Ziel der stabilen Transfektion war die dauerhafte Integration eines fremden DNS-Fragments in das Genom einer eukaryotischen Zelle. Dieses erforderte die vorherige Linearisierung der Vektorplasmid-DNS durch einen Restriktionsenzymverdau (Kapitel 2.9, S.38), um eine korrekte Aufnahme und Integration sicherzustellen. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte stets durch das Vorhandensein eines Antibiotikumresistenzgenes auf dem Vektor (Abb. 2.1, S.22 und Abb. 2.2, S.23), sowie durch Ringisolation von Zellkolonien deren Zellen von einer einzigen, transfizierten Zelle abstammten. Bei der transienten Transfektion hingegen wurden Plasmide vorübergehend in eine Zelle eingeschleust, nicht in deren Genom integriert, dennoch über einen Promoter reguliert abgelesen und nach einer gewissen Zeit wieder von der Zelle entfernt.

Effectene® Transfection Reagent Kit

Die Transfektion stabiler und transienter Klone in CHO-K1- und Z310-Zellen erfolgte via Lipofektion mit dem Effectene® Transfection Reagent Kit (Tabelle II.1, S.11). Voraussetzung war ein 40- bis 80-prozentiges Wachstum der Zellen. Nach Herstellerprotokoll wurden pro Well einer 6-Well-Platte 0,4 µg Plasmid-DNS durch 3,2 µl Enhancer in einem Puffersystem (Buffer EC) kondensiert (1 s Mischen auf einem Vortex-Mixer, 2-5 min bei Raumtemperatur Inkubieren und wenige Sekunden Tropfen Herunter-Zentrifugieren). Anschließend bildeten sich durch die Zugabe von 10 µl Effectene Transfection Reagent DNS-Lipid-Komplexe (10 s Vortexen, 5-10 min bei Raumtemperatur Inkubieren). Der Transfektionsansatz wurde in 600 µl frischem Medium auf die mit PBS gewaschenen Zellen in 1600 µl Medium gegeben und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert, und somit eine Aufnahme der DNS-Lipid-Komplexe durch Endozytose erzielt (Tang und Szoka 1997). Nach 24 bis 48 Stunden erfolgten je nach Wachstum ein Passagieren der Zellen auf 10-cm-Zellkulturschalen und ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion transfizierter Zellen. Im Falle des pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A Vektors mit 800 µg/ml Geneticindisulfat (G418). Bei Transfektionen mit dem Vektor pcDNATM3.1/Hygro (+) erfolgte die Selektion mit 400 µg/ml Hygromycin B.

Zum weiteren Nachweis des Transfektionserfolges wurden stets auf einem Well der 6-Well-Zellkulturplatte Zellen mit dem Transfektionsansatz ohne beigefügte Plasmid-DNS identisch inkubiert. Nach dem Hinzufügen des Antibiotikums konnte, je nach Wachstum, nach drei bis sieben Tagen ein Zelluntergang beobachtet werden.

Calcium-Phosphat-Präzipitation

Als eine effiziente Methode zur stabilen Transfektion von HepG2-Zellen erwies sich die Calcium-Phosphat-Präzipitation (Ausubel et al. 1987). Durch das Ausfällen von DNS mit Calciumchlorid entstanden Komplexe, die via Endozytose von den Zellen aufgenommen wurden.

Für den Versuchstag wurden Zellen konfluenten Wachstums auf 10-cm-Zellkulturschalen ausplattiert. An der Zellkulturbank wurden zunächst 5 µg linearisierte DNS auf 300 µl H₂O aufgefüllt und mit 300 µg CaCl₂ gemischt. Die Lösung wurde nun unter permanentem Schütteln tropfenweise zu 600 µl HBS pipettiert. Die Präzipitatbildung erfolgte während einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dem Abziehen des Kulturmediums der Zellen wurden diese einmal mit 5 ml PBS gewaschen und die DNS-Komplexlösung in konzentrischen Kreisen auf die Zellen gegeben. Diese wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS konnten die Zellen für weitere 24 h in ihrem Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren. Für eine Selektion transfizierter Zellen erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Antibiotikum (800 µg/ml G418).

Ringisolierung von Einzelzellklonen

Beim Isolieren von Einzelzellklonen wurde eine gut abgrenzbare, adhärenzwachsende Zellklonkolonie von der Zellkulturplatte auf ein Well einer 24- oder 12-Well-Platte überführt.

Nach der Selektion durch ein Antibiotikum wuchsen aus einzelnen transfizierten Zellen Einzelzellklonkolonien. Je nach Teilungsrate der Zelllinie, waren nach zehn Tagen bis drei Wochen makroskopisch kleine Kolonien erkennbar. Für das sichere Isolieren von Einzelzellklonen sollten diese groß genug gewachsen und zudem gut abgrenzbar voneinander sein. Dies wurde unter einem Mikroskop überprüft und ausgewählte Kolonien mit einem Stift auf der Unterseite der Zellkulturplatte markiert. Nach dem Entfernen des Kulturmediums und dem Waschen der Zellen mit 5 ml PBS setzte man einen sterilen Klonierungszyylinder mit Silikonpaste um eine markierte Zellkolonie. Um die Zellen von der Platte zu lösen, wurde jede Kolonie mit 15 μ l Accutase für 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 50 μ l des entsprechenden Zellkulturmediums (Kapitel 2.8.1, S.33) mit Antibiotikum in dem Klonierungszyylinder suspendiert und die einzelnen Kolonien in je ein Well einer 24- oder 12-Well-Platte übertragen.

Herstellung von Mischklonen

Zum Herstellen von Mischklonen wurden nach der Transfektion der Zellen alle gewachsenen Einzelzellkolonien suspendiert und in einer Zellkulturflasche kultiviert.

Nach dem Abziehen des Mediums und dem Waschen der Zellen mit 5 ml PBS wurden alle Einzelzellkolonien mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ je nach Zelllinie (Kapitel 2.8.1, S.33) inkubiert und ihrem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren bei 800 rpm wurde das Medium entfernt und das Mischklonzellpellet in 12 ml Kulturmedium mit entsprechendem Antibiotikum resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte in T75-Zellkulturflaschen.

2.8.3 Cryo-Aufbewahrung und Auftauen von Zellen

Für 50 ml Einfriermedium wurden zu 40 ml des Kulturmediums der jeweiligen Zelllinie 5 ml FCS superior und 5 ml DMSO zum Verhindern einer Kristallbildung zugefügt. Für das Einfrieren wurden die Zellen, wie in der Kultivierung beschrieben, von den T75-Zellkulturflaschen durch Trypsin-EDTA gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wurde zunächst in einem Cryotube bei $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Cryo-Container eingefroren. Nach etwa 48 h erfolgte ein Umfrieren in flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Das Auftauen der Cryotubes erfolgte in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad. 1 ml der Zellen in dem Einfriermedium wurden in 10 ml frischem Kulturmedium abzentrifugiert (5 min bei 800 rpm), der Überstand verworfen und anschließend je nach Wachstum in T-25- bis T-75-Zellkulturflaschen kultiviert.

2.9 Restriktionsenzymverdau

Der Restriktionsenzymverdau diente dem gezielten Schneiden von Vektorplasmiden durch Enzyme an spezifischen Schnittstellen. Hierbei erkannten Restriktionsenzyme spezifische Basensequenzen in den DNS-Doppelsträngen und hydrolysierten die Phosphatdiesterbindungen beider Stränge (Goodsell 2002). Dies war erforderlich, um eine korrekte Aufnahme und Integration der DNS bei einer stabilen Transfektion zu gewährleisten (Kapitel 2.8.2, S.35) oder auch zum Einfügen oder Herausschneiden von DNS-Abschnitten aus einem Vektor (Kapitel 2.7.1, S.22).

Die Wahl des Restriktionsenzym erfolgte anhand des jeweiligen Plasmidaufbaus. Zur Linearisierung vor der Transfektion des pcDNATM3.1/mycHis(-) A Vektors wurden nach Empfehlung des Herstellers für einen 20- μl -Ansatz 3 μg Plasmid-DNS mit 2 μl NE Puffer 3, 0,5 μl BSA, sowie 1 μl Restriktionsenzym Pvu I in H_2O für mindestens 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Alternativ konnte auch 1 µl des Restriktionsenzym Bgl II ohne Verwendung von BSA zum Einsatz kommen. Nach der Linearisierung erfolgten die Aufreinigung der DNS (Kapitel 2.11, S.40) und das Überprüfen des Linearisierungserfolgs anhand einer Agarosegelelektrophorese (2.10, S.39). Im Zuge der Linearisierung des Vektors pcDNATM3.1/Hygro (+) vor der stabilen Transfektion wurden für einen 20-µl-Ansatz 3 µg Plasmid-DNS, 2 µl NE Puffer 3, sowie 1 µl des Restriktionsenzym Bgl II in H₂O für 3 bis 4 h bei 37 °C inkubiert.

Da Z310-Zellen nach ihrer Immortalisierung eine Resistenz gegen Geneticindisulfat vorwiesen, erfolgte nach dem Herausschneiden der *FOLR1* wt bzw. mutierten cDNS aus dem Vektor pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A ein Einfügen der cDNS in den Vektor pcDNATM3.1/Hygro (+). Zum enzymatischen Herausschneiden der für das Protein kodierenden cDNS wurden 1 µg Plasmid-DNS mit 1 µl NE Puffer 2, 0,5 µl BSA, sowie je 0,5 µl der Restriktionsenzyme Nhe I und Hind III auf 10 µl H₂O aufgefüllt (Abb. 2.1, S.22 und Abb. 2.2, S.23). Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 3-4 h auf einem Heizblock. Nach dem Schneiden erfolgten eine Gelelektrophorese (Kapitel 2.10, S.39) und eine Gelextraktion (Kapitel 2.7.7, S.31) der gewünschten DNS-Abschnitte mit anschließender Ligation (Kapitel 2.7.8, S.32) der neuen Plasmide.

2.10 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden DNS-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt (Adkins und Burmeister 1996). Die negativ geladene DNS wanderte in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Fragmentgröße (je kleiner, desto größer die Wanderungsgeschwindigkeit) in dem Agarosegel zum positiven Pol. Ein Marker ermöglichte das Ablesen der ungefähren Basenpaaranzahl der DNS-Banden. Ein analytisches Gel diente dem Überprüfen des Erfolges eines Restriktionsenzymverdau oder einer PCR. Präparative Gele wurden genutzt, um Fragmente aufzutrennen und anschließend aus dem Gel zu isolieren.

Für ein analytisches Gel wurde eine kleine Elektrophoresekammer mit einem 1 % Agarosegel (Tabelle II.3, S.17) verwendet. Für jede Probe wurden 300 ng DNS mit 3 µl Loading Puffer (Tabelle II.3, S.17) in eine Geltasche geladen. Zusätzlich wurden zum Abschätzen der Basenpaaranzahl 2 µl GeneRuler™-Marker aufgetragen. Anschließend wurden die DNS-Fragmente in TAE Elektrophoresepuffer (Tabelle II.3, S.17) für etwa eine Stunde bei 85 V aufgetrennt. Durch das im Gel enthaltene GelRed™ konnte die DNS bei ultraviolettem Licht im Bio Doc Analyzer mit einer Videokamera und der entsprechenden PC Software, Bio Doc Analyse 2.0, sichtbar gemacht werden.

2.11 Methoden zur DNS-Aufreinigung

NucleoSpin® Extract II

Zum Aufreinigen von DNS nach einer Linearisierung wurde das NucleoSpin® Extract II Kit (Tabelle II.1, S.13) nach Herstellerprotokoll verwendet. Hierzu wurde das DNS-Versuchsvolumen mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt, mit 200 µl NT-Puffer gemischt und in die NucleoSpin® Extract II Säule pipettiert. Nach dem Zentrifugieren (1 min bei 11000 x g) wurde der Überstand verworfen. Das Waschen der Säule erfolgte mit 700 µl NT₃ Puffer (1 min bei 11 000 x g, 2 min bei 11 000 x g). Nach dem Verwerfen der Waschlösung wurde die aufgereinigte DNS in einem 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß durch Zentrifugation (1 min bei 11 000 x g) in 15 µl NE-Puffer eluiert.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Zum Aufreinigen von DNS Proben nach einer Linearisierung konnte alternativ auch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt werden (Sambrook *et al.* 1989). Hierbei entsprach die Menge des eingesetzten Phenol-Chloroforms dem DNS-Probenvolumen. 40 µl linearisierte DNS wurden mit 40 µl Phenol-Chloroform nach dem Mischen im Vortex-Mixer (1 min), für 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Die obere entstandene Phase wurde in ein

Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch das Zufügen von 4 µl 3-M-NaAc (pH 4,6) und 80 µl 100%-Ethanol, ließ sich die DNS durch leichtes Klopfen ausfällen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und dem Zentrifugieren (5 min bei 11 000 x g) wurde der Ethanol vorsichtig von dem DNS-Pellet abpipettiert und verworfen. Es folgte ein Waschen der DNS mit 200 µl 70%-Ethanol, 5 min Zentrifugation (11 000 x g) und ein Abpipettieren des Ethanols. Nach einem kurzen Trocknen, offen bei Raumtemperatur, wurde das DNS-Pellet unter der Zellkulturbank in 12 µl PBS resuspendiert.

2.12 Bestimmungen von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösung

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure erfolgte photometrisch im Nanodrop® ND 1000 Spectrophotometer.

Die Konzentrationsbestimmung der DNS wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (Bouguer 1729, Lambert 1760 und Beer 1852) anhand der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) durchgeführt. Die Reinheit der DNS-Probe wurde anhand von Wellenlängen-Quotienten überprüft. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt (OD_{280}), sollte das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm größer als 1,8 sein ($OD_{260} : OD_{280} > 1,8$). Zudem galt es zu prüfen, ob das Verhältnis von 260 nm und 230 nm (OD_{230}) größer als 1,6 war, um eine Verunreinigung durch Lösungsmittel (Absorptionsmaximum bei 230 nm) auszuschließen ($OD_{260} : OD_{230} > 1,6$).

2.13 Untersuchung der Expression des FRa

Der Nachweis der Expression des FRa erfolgte durch eine Immundetektion in Westernblot-Analysen. Die Proteinproben kultivierter Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf

dieser Membran ließ sich mithilfe von primären und sekundären Antikörpern der FR α nachweisen.

2.13.1 Gewinnung von Proteinproben

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Proteinproben für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Zellen konfluenten Wachstums auf 6-cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Nach dem Entfernen des Kulturmediums erfolgte das zweimalige Spülen mit 3 ml PBS auf Eis. Die Zellen wurden tropfenweise mit 100 μ l CellLytic™ M Cell Lysis Reagent (Tabelle II.1, S.11) benetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Hierbei wurden die Proteine laut Herstellerangaben durch das Lysieren der Zellen und der Solubilisation der Proteine extrahiert. Nach dem Lösen noch adhärenter Zellen mit einem sterilen Zellschaber wurden die Zelllysate in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß aufgenommen. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 18 000 x g in einer gekühlten Tischzentrifuge (4°C) wurden die im Überstand gelösten Proteine in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.13.2 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Bradford 1976)

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentrationen gewonnener Proteinproben wurde das BC Assay Reagent Kit (Tabelle II.1, S.11) nach Herstellerprotokoll verwendet. Auf einer 96-Well-Platte wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle II.11 eine Eichkurve von 0, 5, 10, 15, 20 und 30 μ g Eichprotein in H₂O, sowie 5 μ l jeder Proteinprobe in 20 μ l H₂O jeweils zweimal aufgetragen. In jedes Well fügte man 200 μ l einer 50:1-Lösung von BSA Reagent A und B hinzu. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proteinkonzentrationen photometrisch im Synergy Mx Photometer bestimmt. Durch Doppelbestimmungen konnten Messfehler minimiert werden.

Tabelle II.11: Pipettierschema der Eichgeraden nach dem BS Assay Kit

$\mu\text{g Protein}$	$\mu\text{l BSA-Eichprotein}$	$\mu\text{l H}_2\text{O}$
0	0	25
5	2,5	22,5
10	5	20
15	7,5	17,5
20	10	15
30	15	10,5

2.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) diente dem Auftrennen von Proteinen in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Je kleiner das denaturierte Protein, desto schneller wanderte es durch die Poren des Trenngels in Richtung der Anode.

Zwischen zwei sauberen, fettfreien Glasplatten wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel bestehend aus einem 5%-Sammelgel (Tabelle II.3, S.17) und einem 12%-Trenngel (Tabelle II.3, S.17) gegossen. Mithilfe eines Kammes wurden im Sammelgel Taschen für das Auftragen der Proteinproben gebildet. Jede aufzutrennende Probe enthielt den gleichen Proteingehalt (40 μg) und wurde mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt und mit 7,5 μl vierfach-Laemmli-Puffer (Tabelle II.3, S.17) für 10 min auf 95 °C erhitzt. Je nach dem welches Protein in der späteren Immundetektion nachgewiesen werden sollte, wurde ein reduzierender oder nicht reduzierender Laemmli-Puffer verwendet. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit SDS-PAGE-Laufpuffer (Tabelle II.3, S.17) gefüllt. Das im Puffer enthaltene SDS überdeckte zum einen die Eigenladung der Proteine und ermöglichte somit ein Auftrennen nach dem Molekulargewicht, zum anderen bildete es denaturierende SDS-Protein-Komplexe. Es wurden je 20 μl Proteinprobe und 5 μl des PageRulerTM-Markers,

als Protein-Molekulargewichtstandard, aufgetragen. Aufgrund der großen Porengröße wurde das Sammelgel bei 30 mA schnell durchlaufen. An der Grenze zum Trenngel sammelten sich aufgrund des pH-Unterschiedes die Proben. Bei 50 mA erfolgte dann die Auftrennung der Proteinbanden im Trenngel in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes.

2.13.4 Westernblot (Semi Dry Blot)

Der Westernblot diente dem Nachweis von Proteinen anhand einer Immundetektion. Hierfür wurden die aufgetrennten Proteinbanden im Trenngel zunächst in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin *et al.* 1979). Das Muster der Proteinbanden blieb bei diesem Verfahren erhalten und die Proteine waren nun für die Immundetektion zugänglich.

Elektrophoretische Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Das Trenngel, sechs Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Gelgröße wurden zunächst für 5 min in Transferpuffer (Tabelle II.3, S.17) gelegt. Der Puffer löste zum einen beim späteren Transfer der Proteine die SDS-Protein-Komplexe und ermöglichte dadurch eine unvollständige Renaturierung in die Sekundär- oder Tertiärstruktur, zum anderen diente er als Ionen-Reservoir für die Elektrophorese. Nach dem Schema in Abbildung 2.4 wurden in der Semi-Dry-Blotting-Kammer die Filterpapiere, das Gel, sowie die Membran als „Blotting Sandwich“ angeordnet.

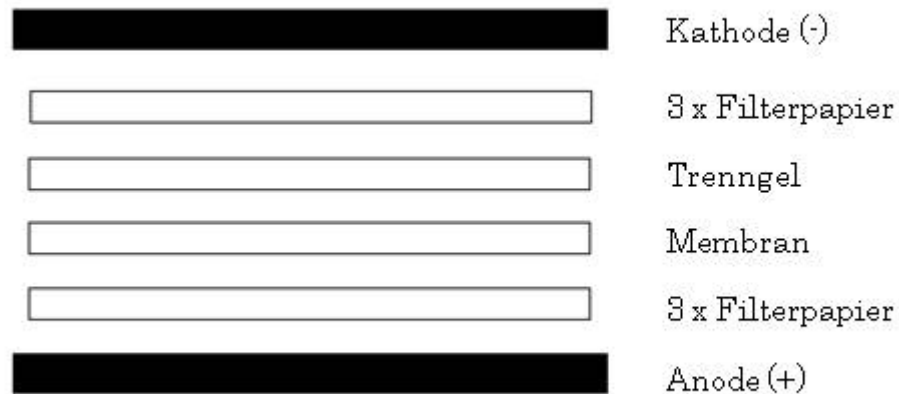


Abbildung 2.4: „Blotting Sandwich“: Anordnung von Filterpapieren, Trenngel und Nitrozellulosemembran in der Semi-Dry-Blotting-Kammer (Biometra 2009).

Um Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden, erfolgte ein vorsichtiges Walzen über das „Blotting Sandwich“ mit einem Glasstab. Nach dem Anlegen von $1,2 \text{ mA/cm}^2$ Gel wurden die Proteine in 75 min von dem Trenngel in Richtung Anode auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Überprüfen des Transfererfolgs

Zum sofortigen Überprüfen des Transfererfolgs wurden die Proteinbanden reversibel mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Hierzu ließ man die Nitrozellulosemembran kurz in der Lösung schwimmen und spülte anschließend die Membran mit Wasser ab, bis lediglich die gefärbten Banden sichtbar waren. Anhand dieser reversiblen Färbung ließ sich zum einen der Transfererfolg feststellen und zum anderen konnten überschüssige Membranränder mit einem Skalpell entfernt werden.

Immundetektion

Vor dem Detektieren des gesuchten Proteins wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in Blockier-Puffer (Tabelle II.3, S.17) auf einem Schwenktisch blockiert.

Um den FRa nachzuweisen, wurden monoklonale murine Antikörper gegen das zu detektierende Protein in einer Antikörperlösung (Tabelle II.3, S.17) verwendet (Blake *et al.* 1984). Die Membran wurde mit 2 ml der Primärantikörperlösung luftdicht in Klarsichtfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert. Nach dem Abgießen der überschüssigen primären Antikörperlösung erfolgte ein gründliches Waschen, um überschüssige ungebundene Antikörper zu entfernen (nach einmaligem Spülen wurde die Membran dreimal mit frischem PBS-T für 10 min schwenkend gewaschen). Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation mit 10 ml einer sekundären Antikörperlösung. Der sekundäre anti-Maus-Antikörper gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers wurde 1:10000 verdünnt und war an eine Meerrettich Peroxidase (HRP), die dazu diente das Lumi-Light- Blottingsubstrat enzymatisch umzusetzen, gekoppelt. Das Produkt dieser Reaktion konnte als Lichtemission um den Antigen-Antikörperkomplex detektiert werden (Abb. 2.5).

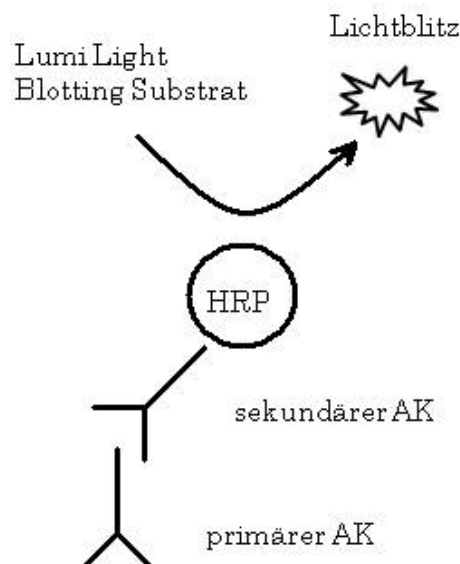


Abbildung 2.5: Umsetzung des Blottingsubstrats durch die am Sekundärantikörper gebundene HRP.

Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte noch einmal ein Spülen und dreimaliges Waschen der Membran mit PBS-T.

Als Substrat für die HRP wurden die beiden Lösungen des Lumi Light Western Blotting Substrate Kits (Tabelle II.1, S.13) nach Herstellerangaben 1:1 je 1 ml pro Membran durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf die Membran gegeben. Alternativ konnten für den Nachweis besonders geringer Proteinmengen Super Signal® Femto oder Super Signal® Pico als Substrat nach Herstellerangaben verwendet werden. Nach 2- bis 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran zwischen Klarsichtfolien gelegt und der PageRuler™-Marker auf der Folie mit einem Fluoreszenzstift nachgezeichnet, um später eine orientierende Skala der Standardproteingrößen zu erhalten. Mit Hilfe des Fuji Film Luminescent Image Analyzers LAS 4000 und der dazugehörigen Software konnten die Lichtblitze der HRP-Reaktion um die Antigen-Antikörperkomplexe detektiert werden und somit der FRa nachgewiesen werden (Abb. 2.5). Das entstandene Bild zeigte nicht nur das Vorhandensein des Proteins an, sondern erlaubte auch eine quantitative Einschätzung der Menge des Proteins, da alle Proteinproben in gleicher Konzentration aufgetragen wurden.

Strippen der Nitrozellulosemembran

Das Strippen der Membran diente dem Ablösen gebundener Antikörper und ermöglichte eine weitere Immundetektion auf derselben Membran. Nach jeder Proteindetektion erfolgte der Nachweis des Zytoskelett-Kontrollproteins β -Aktin, um Fehler beim Transfer oder große Abweichungen von den aufgetragenen Proteinkonzentrationen ausschließen zu können.

Vor dem Strippen wurde die Membran zweimal je 10 min in PBS-T auf dem Schwenktisch gewaschen, anschließend zweimal je 5 min mit einem Mild Stripping Buffer (Tabelle II.3, S.17) schwenkend gestrippt und zweimal 10 min mit PBS-T unter Schwenken gewaschen.

β-Aktin Kontrollimmundetektion

Die antikörperfreie Membran konnte anschließend nach dem obig beschriebenen Schema 1 h blockiert und mit 5 ml einer 1:10000 verdünnten murinen anti-β-Aktin-Antikörperlösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Da β-Aktin ein ubiquitär exprimiertes Zytoskelettprotein darstellt, konnte die Immundetektion des Proteins als Nachweis eines stattgefundenen Transfers auf die Nitrozellulosemembran gewertet werden. Zudem konnte die aufgetragene Proteinmenge anhand der Bandendicke und Intensität im Vergleich zu benachbarten Banden eingeschätzt werden. Nach dem Spülen und dem dreimaligen 10-minütigen Waschen in PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem anti-Maus-Sekundärantikörper, der mit Hilfe einer gekoppelten HRP das Lumi-Light-Substrat zu detektierbaren Lichtblitzen umsetzte (Abb. 2.5).

2.14 Untersuchung der Folsäurebindung des FRα

Die Auswirkungen der Mutationen im *FOLR1*-Gen auf die Folsäurebindung des Rezeptors wurden im Rahmen dieser Arbeit durch einen radioaktiven Bindungsassay untersucht. Die Versuchszellen wurden mit [3', 5', 7, 9-³H]-Folsäure (³H-Folsäure) inkubiert. Eine Bindung der radioaktiven Folsäure an die zellmembranständigen Rezeptoren fand in Abhängigkeit der Anzahl und deren Bindungsfähigkeit statt. Nach dem Entfernen der überschüssigen [³H]-Folsäure wurde von jeder Zellprobe die gebundene Folsäure gelöst und in einer Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Nun konnte die Menge der radioaktiven Folsäure anhand der erfassten Szintillationsereignisse in einem Szintillationszähler berechnet werden.

Jede zu untersuchende Zellprobe lag am Versuchstag auf vier Wells einer 6-Well-Platte in 100-prozentiger Konfluenz vor. Zunächst wurde das Kulturmedium der Zellen abgezogen und es erfolgte eine Inkubation mit 1 ml PBS pro Well für 5 min auf Eis. Um gebundene Folsäure von den membranständigen Rezeptoren zu entfernen, wurden die Zellen anschließend für 5 min mit 1 ml Acid Puffer

(Tabelle II.3, S.17) pro Well auf Eis inkubiert. Nach dem Abziehen des Acid Puffers erfolgte das zweimalige Waschen der Zellen mit einem HBS Puffer (Tabelle II.3, S.17), um den sauren Puffer vollständig von den Zellen zu entfernen. Alle Zellproben wurden auf je vier Wells ausplattiert, um zwei Doppelbestimmungen vorzunehmen: Zwei Wells wurden mit 5 nM eiskalter [^3H]-Folsäure inkubiert, die anderen beiden zusätzlich mit 500 nM nicht radioaktiv markierter Folsäure („kalter Folsäure“). Da bei letzterer Doppelbestimmung kalte Folsäure im Überschuss auf die Zellen gegeben wurde, konnte im Nachhinein die spezifische Bindung aus der Differenz der gebundenen [^3H]-Folsäure in Anwesenheit und Abwesenheit von kalter Folsäure errechnet werden.

Die Inkubation mit der radioaktiv markierten und der kalten Folsäure erfolgte für 20 min auf Eis. Durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml HBS pro Well wurde anschließend überschüssige, ungebundene Folsäure entfernt. Die an den membranständigen Folatrezeptoren gebundene Folsäure wurde nun durch die Zugabe von 1 ml Acid Puffer pro Well in 10 min auf Eis gelöst und jeweils in einzelne Szintillationsbehälter mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert (Abb. 2.6).

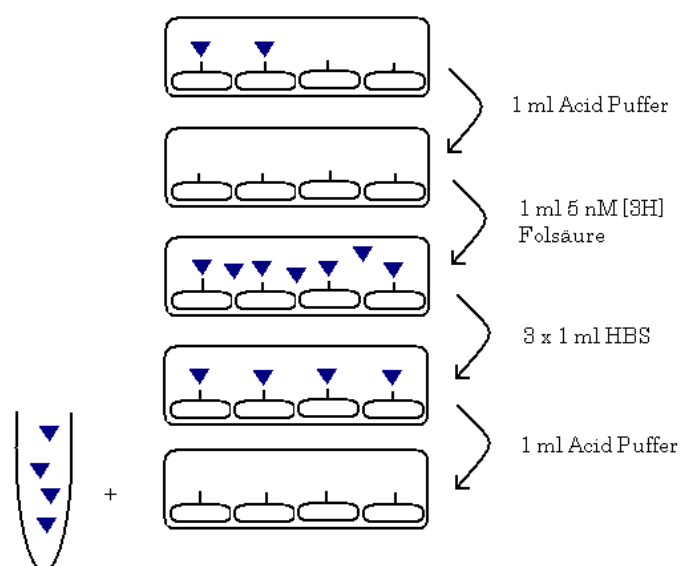


Abbildung 2.6: Schematischer Ablauf des radioaktiven Bindungsassays zur Bestimmung der Folsäurebindungskapazität des FRa.

In einem Szintillationszähler regte die vom Tritium ausgehende β -Strahlung Lösungsmittelmoleküle der Szintillationsflüssigkeit an. Durch einen Szintillator wurde diese Anregungsenergie in Lichtblitze übersetzt, welche in Form von elektrischen Impulsen aufgezeichnet wurden. Im Vergleich der einzelnen Proben konnte nun die relative Bindung von Folsäure am Rezeptor berechnet werden.

Für jede Zellprobe wurden zusätzlich zwei Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte in gleicher Konfluenz und zum gleichen Zeitpunkt ausplattiert, um den Proteingehalt jedes Wells am Versuchstag mittels eines BC-Assays (Kapitel 2.13.2, S.42) photometrisch zu bestimmen. Somit konnte die Menge der gebundenen Folsäure pro mg Protein errechnet werden. Für die Proteinextraktion vor dem BC-Assay wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1 ml PBS pro Well gewaschen und anschließend mit 200 μ l 0,2-N-Natriumhydroxid pro Well für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Zellysate wurde in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 18000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun das gelöste Gesamtprotein der Zellen.

2.15 Untersuchung der Lokalisation des FR α

Im Rahmen einer Lokalisationsanalyse wurde der FR α anhand von fluoreszierenden Antikörpern mikroskopisch detektiert.

Im Rahmen des indirekten Immunfluoreszenzversuchs wurden möglichst spärlich ausplattierte Zellen, ca. 30 % konfluent, verwendet. Das Ausplattieren erfolgte auf jeweils einem Well einer 24-Well-Zellkulturplatte. In jedes Well wurde vor dem Einpipettieren der Zellsuspension ein steriles Deckgläschen (12 mm Durchmesser) gelegt. Eine bessere Adhäsion der Z310-Zellen konnte durch eine Beschichtung der Deckgläschen mit Laminin erzielt werden. Hierzu wurden die sterilen Deckgläschen in der 24-Well-Zellkulturplatte mit 1 ml Medium (DMEM High Glucose, ohne weitere Zusätze) und 3 μ g/ml Laminin über

Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag konnte ein Ausplattieren der Z310-Zellen erfolgen.

Nach dem Abziehen des Zellkulturmediums und dreimaligem, vorsichtigem Waschen der Zellen mit 0,5 ml PBS bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 400 µl 4% (w/v)-Paraformaldehyd (PFA) in PBS pro Well für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit 400 µl PBS pro Well gewaschen und durch die Zugabe von 400 µl 50-mM-NH₄Cl in PBS pro Well erfolgte ein abstoppen der PFA-Reaktionen, um eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper an die Aldehyde des PFA zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Es folgte das dreimaligen Spülen mit 400 µl PBS pro Well und eine Permeabilisierung der Zellmembran durch die Inkubation mit 400 µl 0,5%-SAP in PBS pro Well für 20 min. Nach dreimaligem Waschen mit 400 µl 0,1%-SAP pro Well wurden zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen die Zellen mit 400 µl eines 10 % Ziegenserum in 0,2%-SAP pro Well für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten noch zwei Waschvorgänge mit 400 µl 0,1%-SAP pro Well. Zum Herstellen der primären Antikörperlösung wurde ein Antikörper gegen den FRα zusammen mit einem Antikörper gegen ein Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) in entsprechender Verdünnung (Tabelle II.13, S.17) in 0,1%-SAP angesetzt. Es war zu beachten, dass die beiden primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten. Jedes Well wurde mit 60 µl primärer Antikörperlösung versehen und für eine Stunde bei 37 °C in einer Frischhaltebox mit feuchtem Zellstoff (feuchte Kammer) inkubiert. Nach dem Abziehen der primären Antikörperlösung und dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch das dreimalige Spülen der Zellen in 400 µl 0,1%-SAP pro Well erfolgte die Inkubation der sekundären Antikörper. Die Antikörper wurden in Abhängigkeit des Ursprungs der primären Antikörper gewählt. Es fand eine Bindung der unterschiedlich fluoreszierenden sekundären Antikörper an die Fc-Fragmente der gebundenen primären Antikörper statt (Abb. 2.7).

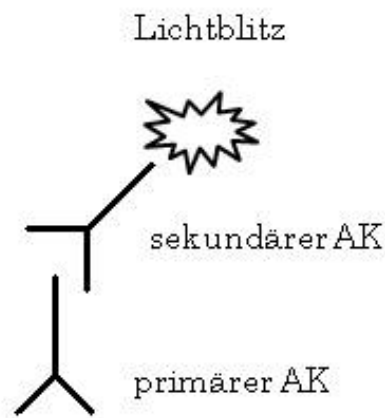


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzreaktion.

Die Inkubation mit 60 µl der sekundären Antikörperlösung pro Well erfolgte für 45 min bei 37 °C in der feuchten Kammer. Nach dem Absaugen des sekundären Antikörpers und dreimaligem Waschen der Zellen mit 400 µl 0,1%-SAP pro Well verblieb das SAP des letzten Waschvorgangs auf den Zellen. Das Eindeckeln der Deckgläschen auf Objektträgern erfolgt mit 4 µl Prolong® Gold (Tabelle II.1, S.13) mit Hilfe einer spitzen Pinzette und einer gebogenen Kanüle. Das Prolong® Gold konservierte zum einen das Fluoreszenzsignal der markierten Zielproteine und enthielt zum anderen den blauen Zellkern-Kontrastfarbstoff DAPI. Nach dem Trocknen im Dunkeln bei Raumtemperatur für mindestens drei Stunden und dem Fixieren der Deckgläschen durch Umpinseln mit Nagellack wurden die Objektträger bis zum Mikroskopieren im Kühlschrank gelagert.

Alternativ wurde statt des verwendeten Saponins die Immunfluoreszenz unter der Verwendung von Triton X durchgeführt, um ggf. Unterschiede in der Permeabilisierung der Zellmembran festzustellen. Die Verdünnungen des Triton X in PBS entsprachen den Verdünnungen des SAPs.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression des FR α wt und der Mutanten in unterschiedlichen Zellmodellen

Ein möglicher Einfluss der Mutationen im FOLR1-Gen, p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup, auf die Proteinexpression wurde anhand von Westernblot-Analysen (Kapitel 2.13, S.41) ermittelt. Es wurden Expressionsplasmide, die für den FR α und die Mutanten kodieren, in CHO-K1-Zellen, HepG2-Zellen und Z310-Zellen transient oder stabil transfiziert. Im Rahmen der Detektion der Proteine wurden unterschiedliche Antikörper gegen den FR α miteinander verglichen (Abb. 3.1 bis 3.5).

3.1.1 Expression des FR α wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen

Als etabliertes Zellmodell wurden CHO-K1-Zellen sowohl stabil (in Form von Mischklonen) als auch transient mit den Expressionsplasmiden transfiziert, die für den FR α wt und die mutanten Proteine kodieren. Die Transfektion erfolgte durch eine Lipofektion (Effectene[®] Transfection Reagent Kit) mit anschließender Selektion stabiler Klone mit G418 (Kapitel 2.8.2, S.35). Es konnte sowohl die Expression des FR α Wildtypproteins, als auch die der mutanten Proteine p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup mit dem Antikörper NCL-L-FR α nachgewiesen werden. In Vektor-transfizierten Zellen konnte keine spezifische Bande detektiert werden (Abb. 3.1).

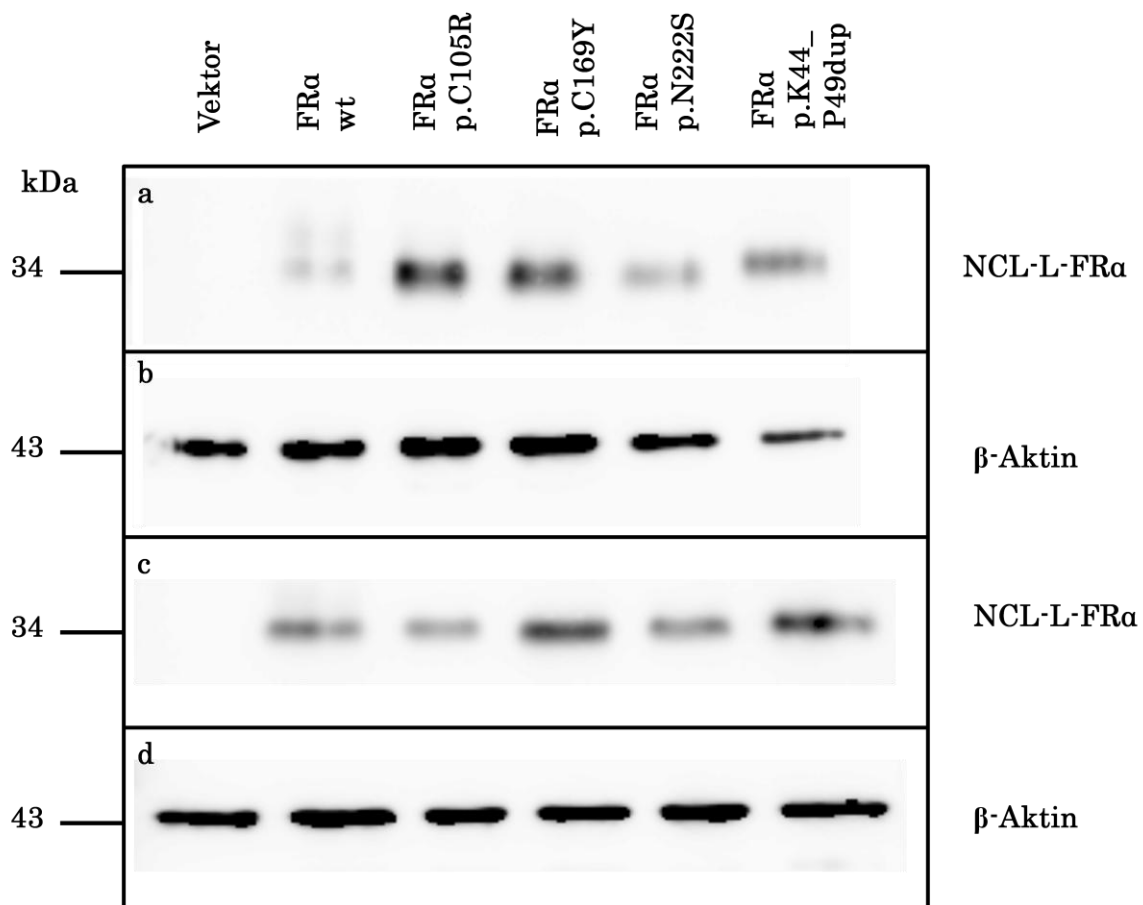


Abbildung 3.1: Westernblot-Analyse stabil (a, b) und transient (c, d) transfizierter CHO-K1-Zellen zum Nachweis der Expression des FR α Wildtyps, sowie der mutanten Folatrezeptoren (p.C105R, p.C169Y, p.N222S, p.K44_P49dup). Die Immundetektion erfolgte durch den monoklonalen Mausantikörper NCL-L-FR α (1:1000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver) (a, c). Die Negativkontrolle stellte der transfizierte Vektor pcDNATM3.1/mycHis(-) A dar. Zudem erfolgte der Nachweis des Kontroll-Zytoskelettproteins β -Aktin durch einen monoklonalen Mausantikörper (1:10000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver) (b, d).

Zum Vergleich wurde ein Westernblot mit stabil sowie transient transfizierten CHO-K1-Mischklonzellen mit dem Antikörper MOV18 durchgeführt. Dieser erkannte ausschließlich das Epitop des FR α wt. Keine der Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S oder p.K44_P49dup (vgl. Steinfeld *et al.* 2009) ließen sich mit dem Antikörper MOV18 detektieren (Abb. 3.2).

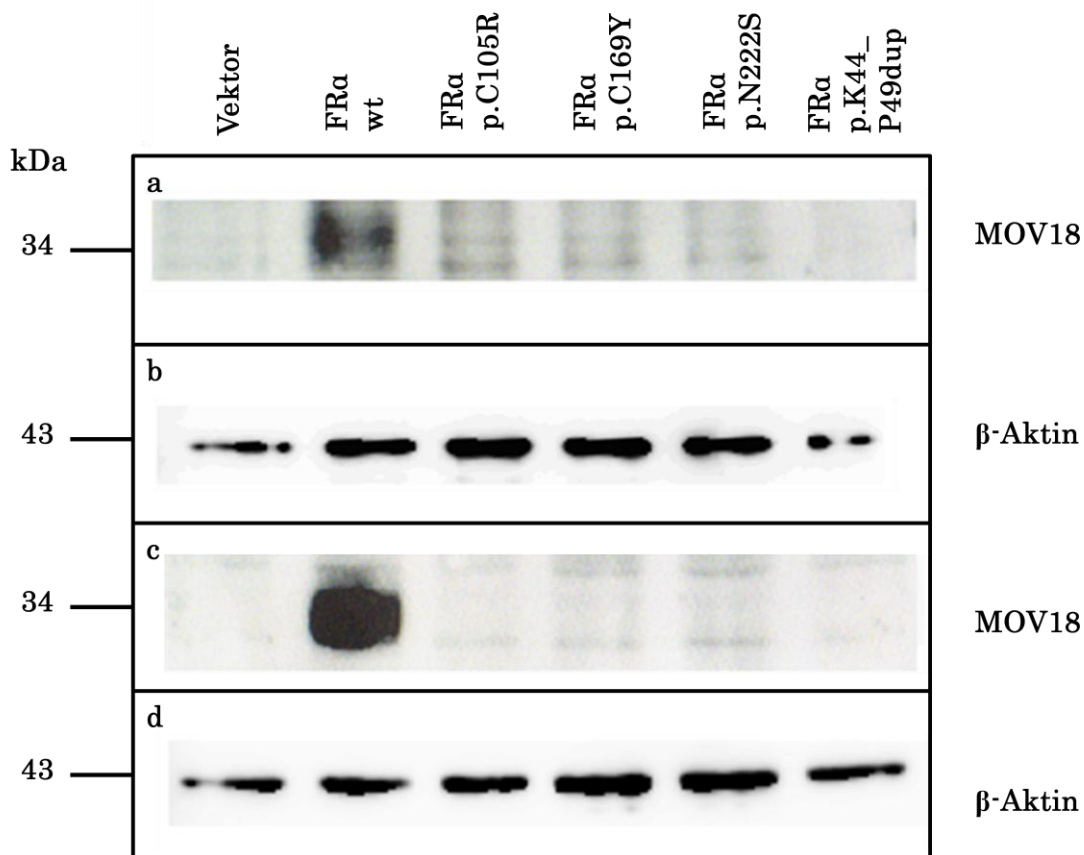


Abbildung 3.2: Westernblot-Analyse stabil (a, b) und transient (c, d) transfizierter CHO-K1-Zellen zum Nachweis der Expression des FR α Wildtyps, sowie der mutanten Folatrezeptoren (p.C105R, p.C169Y, p.N222S, p.K44_P49dup). Die Immundetektion erfolgte durch den monoklonalen Mausantikörper MOV18 (1:500 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver) (a, c). Die Detektion der Banden des Antikörpers MOV18 wurden mit einem besonders empfindlichen Westernblotting-Substrat (Super Signal® Femto) durchgeführt, um gegebenenfalls geringe Proteinmengen darzustellen. Als Negativkontrolle dienten Vektor-transfizierte Zellen. Es erfolgte der Nachweis des Kontroll-Zytoskelettproteins β -Aktin durch einen monoklonalen Mausantikörper (1:10000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver) (b, d). Mit Hilfe des Antikörpers MOV18 gelang die Immundetektion des FR α Wildtyps, wohingegen keine der Mutanten des FR α detektiert werden konnte.

3.1.2 Expression des FR α wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen

Die Expression des FR α in seiner wt sowie mutanten Form konnte zudem in einem polaren Zellmodell, der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2, dargestellt werden (Abb. 3.3). Die Transfektion gelang mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation (Ausubel *et al.* 1987). Transfektionsversuche via Lipofektion (Effectene® Transfection Reagent Kit) waren, wie zuvor durch Lee *et al.* (1996) beschrieben, erfolglos. Im Zuge der stabilen Transfektion wurden die für den FR α wt und dessen Mutanten kodierende cDNS mithilfe des Vektors pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A (Kapitel 2.7.1, S.22) in das Genom der HepG2-Zellen aufgenommen. Nach der Selektion durch G418 und einer Ringisolation (Kapitel 2.8.2, S.35) konnte in Einzelzellklonen des FR α wt sowie der mutanten FR α -Proteine p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup die Expression des Proteins durch den Antikörper NCL-L-FR α nachgewiesen werden.

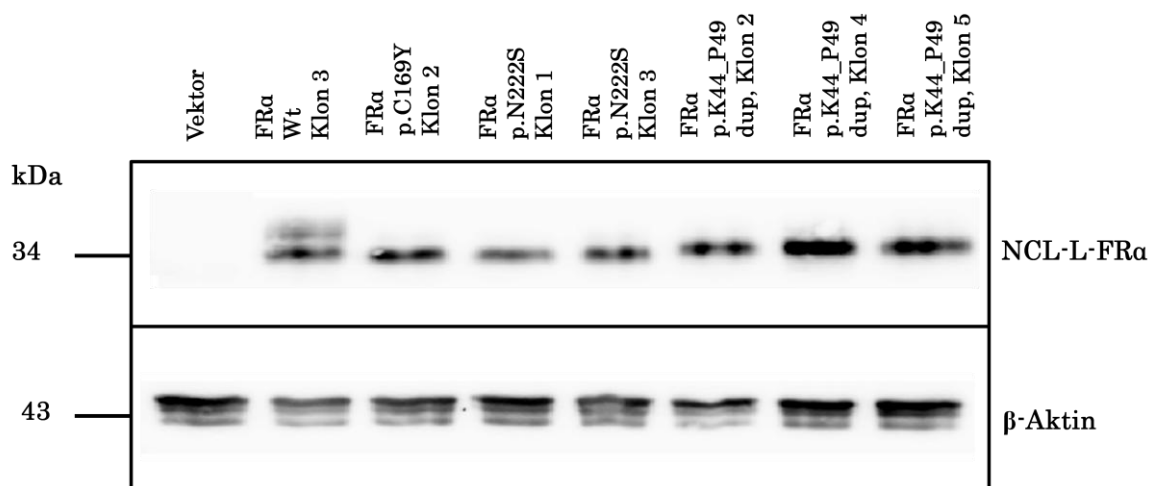


Abbildung 3.3: Westernblot-Analyse stabil transfizierter HepG2 Einzelzellklone (Wildtyp, p.C169Y, p.N222S, p.K44_P49dup) zum Nachweis der Expression des Proteins in seiner wildtyp-, sowie mutanten Form. Die Immundetektion erfolgte mit dem Antikörper NCL-L-FR α (1:1000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver). Der Nachweis des Kontrollzytoskelettproteins β -Aktin erfolgte über einen monoklonalen Mausantikörper (1:10000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver). Als Negativkontrolle diente der transfizierte Mischklon des Vektors pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A.

3.1.3 Expression des FR α wt und der mutanten Proteine in Z310-Zellen

Des Weiteren konnte die Expression des FR α sowie der mutanten Proteine in Z310-Zellen, Epithelzellen des Plexus choroideus aus der Ratte, nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Die Transfektion des Expressionsplasmids pcDNATM3.1/Hygro (+) mit dem FR α wt sowie den FR α -Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup erfolgte mittels Effectene[®] Transfection Reagent (Lipofektion). Die Selektion der Mischklonzellen erfolgte durch Hygromycin G (Kapitel 2.8.2, S.35). In der Immundetektion konnte die Expression aller untersuchten Mutanten des FR α durch den Antikörper NCL-L-FR α in stabil transfizierten Mischklonen nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten Vektor-transfizierte Zellen.

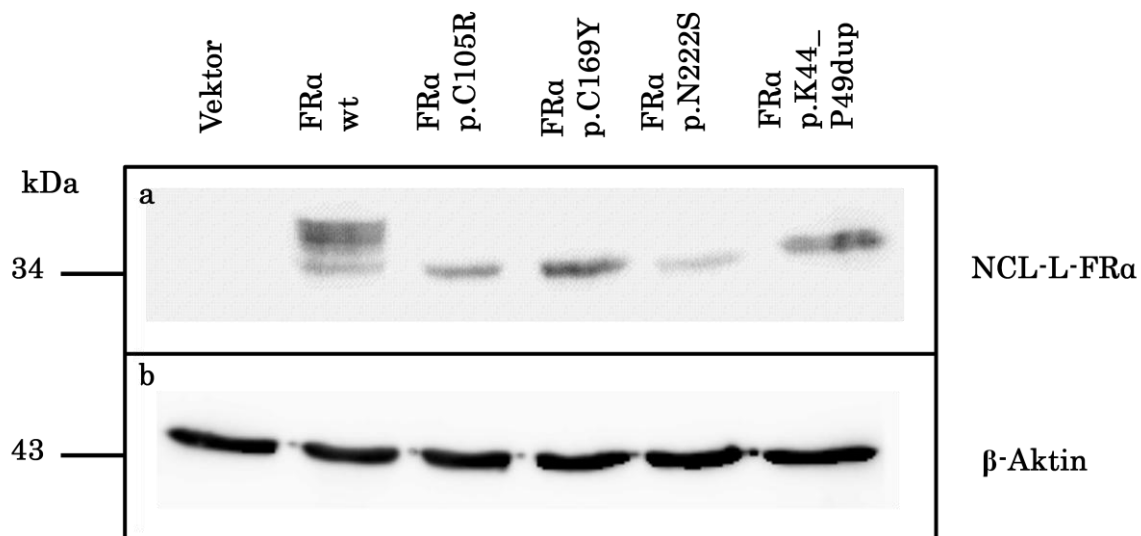


Abbildung 3.4: Westernblot-Analyse des FR α Wildtyps, sowie der Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup in stabil transfizierten Z310-Mischklonzellen. Die Negativkontrolle stellten Vektor-transfizierte Zellen dar. Die Immundetektion erfolgte mit dem Antikörper NCL-L-FR α (1:1000 verdünnt in PBS-T und 1 % Milchpulver). Als Kontrollprotein wurde β -Aktin mithilfe eines monoklonalen Mausantikörpers nachgewiesen (1:10000 verdünnt in PBS-T und 1 % Milchpulver).

Zum Vergleich wurde der monoklonale FR α Antikörper F5753 auf seine Immundetektion des FR α sowie der mutanten Proteine in Westernblot-Analysen stabil transfizierter Z310-Mischklonzellen hin untersucht. Im Gegensatz zum Antikörper MOV18 (Abb. 3.2, S.55) konnte der Antikörper F5753 weder die mutanten Folatrezeptoren (p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup), noch den FR α wt detektieren (Abb. 3.5). Als Negativkontrolle dienten Vektor-transfizierte Zellen.

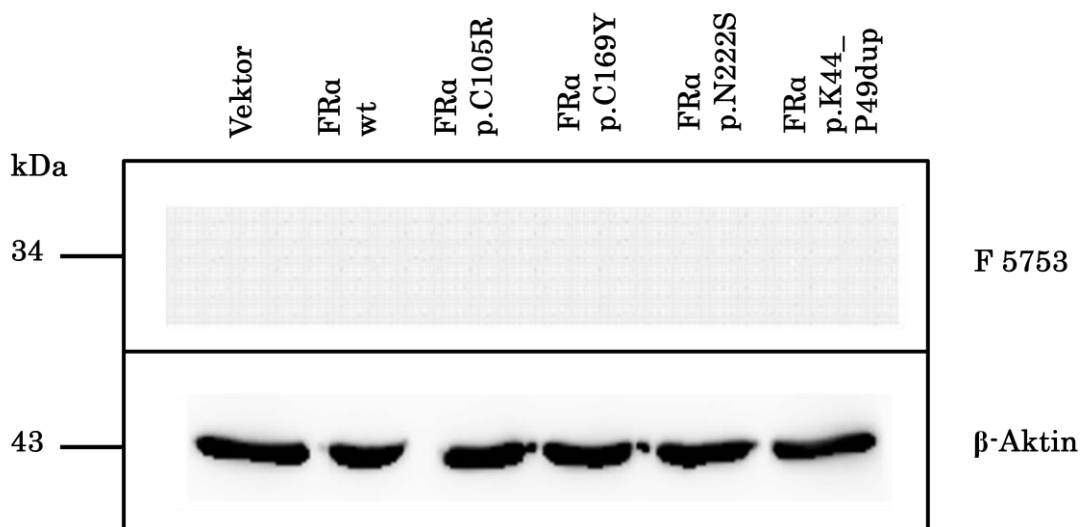


Abbildung 3.5: Westernblot-Analyse stabil transfizierter Z310-Mischklonzellen zum Nachweis der Proteinexpression des FR α Wildtyps und der Mutanten FR α p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup. Die Immundetektion erfolgte durch den Antikörper F5753 (1:500 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver). Der Nachweis des Kontrollzytoskelettproteins β -Aktin erfolgte über einen monoklonalen Mausantikörper (1:10000 verdünnt in PBS-T mit 1 % Milchpulver). Als Negativkontrolle dienten Vektor-transfizierte Mischklonzellen. Mit dem Antikörper F5753 gelang kein Nachweis der Proteinexpression.

3.2 Funktionelle Charakterisierung des FR α und der mutanten Proteine durch Untersuchungen der Rezeptor-Folsäurebindung in unterschiedlichen Zellmodellen

In einer weiteren Versuchsreihe galt es zu untersuchen, ob die Mutationen p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup im *FOLR1*-Gen die Rezeptor-Folsäurebindung beeinflussen. Hierzu wurden radioaktive Bindungsassays mit [3', 5', 7, 9-³H]-Folsäure durchgeführt (Kapitel 2.14, S.48). Die Bindungskapazität des FR α wt sowie der mutanten Proteine wurde in stabil oder transient transfiziert CHO-K1-Zellen sowie transfizierten HepG2-Zellen untersucht. Um unspezifische Bindungen der Folsäure auszuschließen, wurden Hemmungen mit nicht radioaktiv markierter Folsäure durchgeführt. In den Abbildungen 3.6 (S. 61) bis 3.7 (S.63) wurden diese bereits von der Gesamtbindung der Tritium-markierten Folsäure subtrahiert und somit die spezifische Bindung dargestellt. Alle Ergebnisse entstanden aus Mittelwerten von mindestens drei Experimenten. Bei den aufgeführten Streumaßen handelt es sich um statistische Standardfehler (SEM).

3.2.1 Rezeptor-Folsäurebindung des FR α wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen

Zur Bestimmung des Einflusses der Mutationen p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup im *FOLR1*-Gen auf die Rezeptor-Folsäurebindung im CHO-K1-Zellmodell, wurden radioaktive Bindungsassays in stabil und transient transfizierten Zellen durchgeführt. Nach der Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden die für den FR α und die mutanten Proteine kodierten erfolgte eine Selektion durch das Antibiotikum G418 und das Herstellen von Mischklonzellen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als pmol gebundene [³H]-Folsäure pro Milligramm Gesamtprotein der untersuchten Zellen (Abb. 3.6). Als Negativkontrolle, bzw. als Hinweis auf die natürliche Folsäurebindung der Versuchszellen, dienen Vektor-transfizierte CHO-K1-Zellen.

Die stabile Transfektion der CHO-K1-Zellen (Abb. 3.6 a) mit der cDNS des FR α führte zu einer 21-fach erhöhten Folsäurebindung im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen. Es ließ sich nachweisen, dass alle untersuchten Mutationen des *FOLR1*-Gens die Rezeptor-Folsäurebindung des Proteins in unterschiedlichem Ausmaße beeinflussten. Die mutanten FR α -Proteine p.C105R und p.C169Y zeigten eine [³H]-Folsäure-Bindung von 0,105 pmol/mg Protein, 8 % der Bindung des FR α -Wildtypproteins entsprechend. Die FR α -Mutante p.N222S wies im Vergleich zum Wildtypprotein eine relative Bindung der [³H]-Folsäure von 16 % (0,205 pmol/mg Protein) auf und die FR α -Mutante p.K44_P49dup zeigte eine Bindung der radioaktiv markierten Folsäure von 0,3 pmol/mg Protein, entsprechend 23 % der Bindung des FR α wt.

Die Ergebnisse aus den stabil transfizierten Zellen ließen sich durch transiente Transfektionen der entsprechenden Expressionsplasmide in CHO-K1-Zellen bestätigen (Abb. 3.6 b). Hier führte die Transfektion des Wildtyp-Proteins zu einer 28-fachen Erhöhung der Folsäurebindung verglichen mit den Kontrollzellen. Die Transfektion der FR α -Mutanten p.C169Y und p.N222S führten zu einer Erhöhung von 0,285 pmol/mg, bzw. 0,543 pmol/mg Protein, 8 % bzw. 15 % des Wildtyp-Proteins entsprechend. Eine Folsäurebindung von 0,759 pmol/mg Protein, 21 % entsprechend, konnte durch die transiente Transfektion der CHO-K1-Zellen mit der cDNS der FR α -Mutante p.K44_P49dup gezeigt werden.

Die Rezeptor-Folsäurebindung war insgesamt, aufgrund der höheren Expressionsrate, in dem transient transfizierten CHO-K1-Zellmodell größer als in stabil transfizierten Zellen.

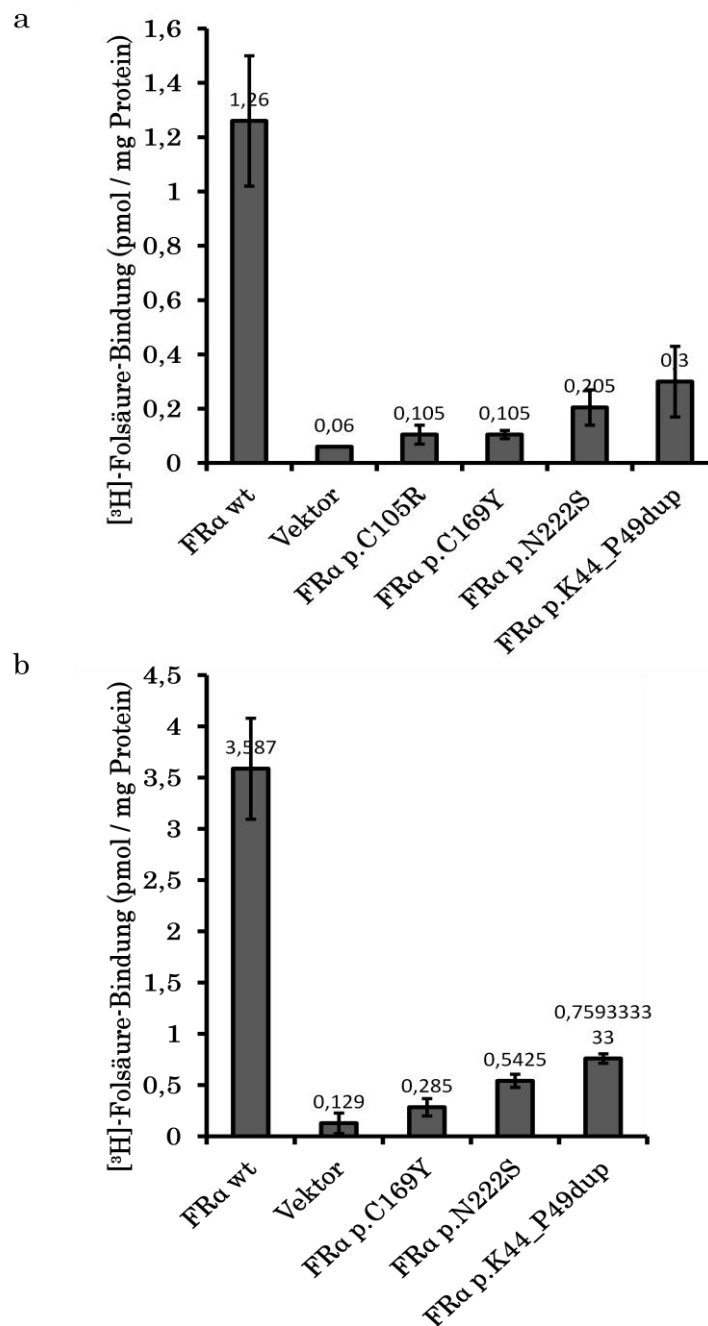


Abbildung 3.6: Radioaktiver Bindungsassay stabil (a) und transient (b) transfizierter CHO-K1-Mischklonzellen zur Darstellung des Einflusses der FRa-Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup auf die [³H]-Folsäure-Bindung in pmol/mg Protein. Als Hinweis für die natürliche Folsäurebindung des Zellmodells dienten Vektor-transfizierte Mischklonzellen. Als radioaktiver Marker diente [3', 5', 7, 9-³H]-Folsäure. Die dargestellten Daten zeigen die spezifische Folsäurebindung nach Subtraktion der in Hemmversuchen mit nicht radioaktiv markierter Folsäure ermittelten unspezifischen Bindung. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

3.2.2 Rezeptor-Folsäurebindung des FR α wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen

Der radioaktive Bindungsassay zur Identifikation eines Einflusses der Mutationen des *FOLR1*-Gens auf die Rezeptor-Folsäurebindung wurde zudem exemplarisch anhand der FR α -Mutanten p.C169Y und p.N222S im polaren Zellmodell der HepG2-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden Expressionsplasmide (pcDNATM3.1/*mycHis*(-) A) mit dem FR α wt sowie den mutanten FR α -Proteinen p.C169Y und p.N222S stabil in HepG2-Zellen transfiziert und anschließend durch G418 sowie einer Ringisolierung (Kapitel 2.8.2, S.35) in Form von Einzelzellklonen selektiert. In einer Westernblot-Analyse wurde der Transfektionserfolg überprüft und Klone für die Versuche ausgewählt (Abb. 3.3, S.56). Bei dem FR α wt handelt es sich um stabil transfizierte Mischklonzellen. Als Nachweis der zelleigenen Folsäurebindung diente ein stabil transfizierter Mischklon Vektor-transfizierter HepG2-Zellen. Die Ergebnisse des Bindungsassays (Abb. 3.7) stellen die spezifische Rezeptor-[³H]-Folsäurebindung des FR α und dessen Mutanten dar, nach Subtraktion der mithilfe von Hemmversuchen ermittelten unspezifischen Bindungen.

Die FR α -Mutanten zeigten eine herabgesetzte Rezeptor-Folsäurebindung im Vergleich zum FR α Wildtypprotein. Der p.C169Y Klon 2 zeigte entsprechend der Bindungsassays in CHO-K1-Zellen nur eine geringe Rezeptor-[³H]-Folsäurebindung von 0,055 pmol/mg Protein bzw. 2% im Vergleich zum Wildtyprezeptor. Der p.N222S wurde in Form von zwei unterschiedlichen selektierten Einzelzellklonen (Klon 1 und Klon 3) untersucht. Die Klone wiesen eine [³H]-Folsäurebindung von 0,2-0,34 pmol/mg Protein auf, entsprechend 6-10 % des FR α wt.

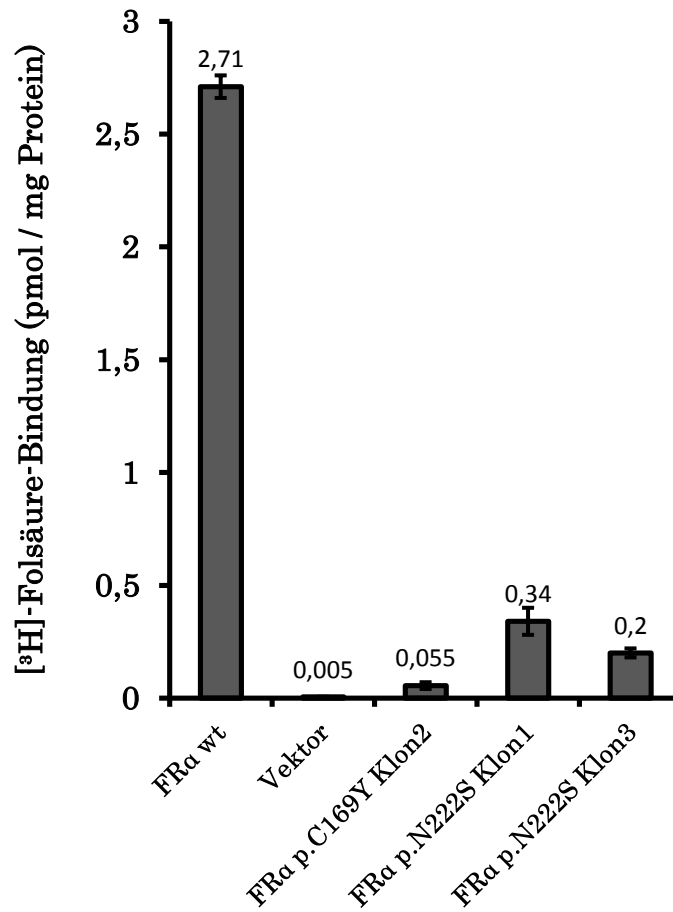


Abbildung 3.7: Radioaktiver Bindungsassay zur Untersuchung des Einflusses der FRα-Mutanten p.C169Y und p.N222S auf die Folsäurebindung in HepG2-Zellen. Die Rezeptor-^{[3}H]-Folsäurebindung wurde in pmol/mg Gesamtprotein dargestellt. Als radioaktiver Marker diente [³, 5[′], 7, 9-³H]-Tritium-Folsäure. Die dargestellten Daten zeigen die spezifische Folsäurebindung nach Subtraktion der in Hemmversuchen mit überschüssiger nicht radioaktiv markierter Folsäure ermittelten unspezifischen Bindung. Als Hinweis auf eine zelleigene Folsäurebindung wurden Vektor-transfizierte Mischklonzellen untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

3.3 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in unterschiedlichen Zellmodellen

Im Rahmen einer Lokalisationsanalyse des FR α in seiner wt sowie mutanten Form erfolgte eine Immunfluoreszenzmikroskopie der immunmarkierten Rezeptoren, um einen Einfluss der Mutationen im FOLR1-Gen auf die Lokalisation des Proteins zu überprüfen. In unterschiedlichen Zellmodellen wurde der stabil oder transient transfizierte FR α erfolgreich mit dem anti-FR α -Antikörper MOV18 dargestellt (Abb. 3.8 bis 3.10). Zudem wurden im Rahmen der Versuche weitere anti-FR α -Antikörper: NCL-L-FR α , F5753 und N1C3 (Tab. II.5, S.20) auf die Fähigkeit der Immunfluoreszenzmarkierung des Rezeptors hin untersucht. Im Rahmen jeder Untersuchung wurden pro Deckglas mindestens 50 Zellen betrachtet und repräsentative Beispiele fotografiert.

3.3.1 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in CHO-K1-Zellen

Der Lokalisationsnachweis der Proteine gelang in CHO-K1-Zellen die stabil mit Plasmiden transfiziert wurden, welche für den FR α wt und die mutanten FR α -Proteine p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup kodierten. Die Selektion der Mischklone erfolgte durch G148. Die Immundetektion gelang mit dem monoklonalen Mausantikörper MOV18 und dem sekundären, fluoreszierenden Anti-Mausantikörper CYTM3 mithilfe eines konfokalen Mikroskops.

Der FR α wt konnte als Membranprotein an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 3.8, a), wohingegen sich alle Mutanten des Rezeptors intrazellulär abbildeten, partiell kolokalisiert mit einem Marker des endoplasmatischen Retikulums, dessen Darstellung über einen monoklonalen Antikörper gegen die Protein-Disulfid-Isomerase PDI (Tab. II.5, S.20) und den sekundären, fluoreszierenden Anti-Kaninchenantikörper Alexa Fluor[®] 488 gelang (Abb. 3.8, c-f). In Vektor-transfizierten Zellen ließ sich kein FR α -spezifisches Signal ermitteln.

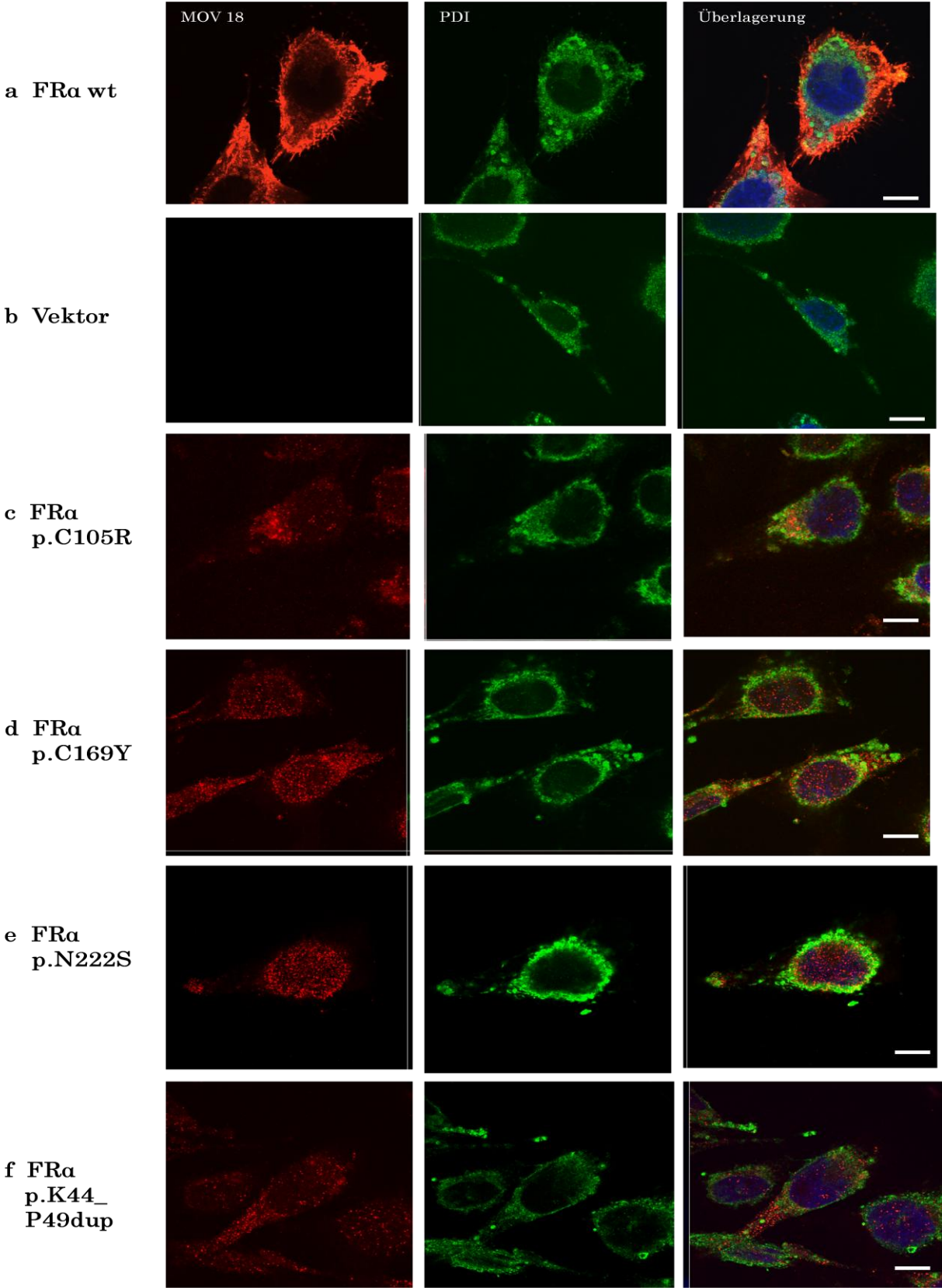


Abbildung 3.8: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse des FR α -Wildtypproteins sowie der Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup in stabil transfizierten CHO-K1-Mischklonzellen. Der FR α zeigte sich auf der Zelloberfläche lokalisiert (**a**). Alle mutanten FR α -Proteine ließen sich intrazellulär, größten Teils kolokalisiert mit dem ER-Marker PDI detektieren (**c-f**). In Vektor-transfizierten Zellen ließ sich kein FR α -spezifisches Signal feststellen (**b**). Die Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte mit dem primären Antikörper MOV18 gegen den FR α (1:200 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP). Zur Darstellung des ERs wurde als primärer Antikörper PDI (1:250 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP) verwendet. Die blaue Färbung der Zellkerne erfolgte durch das im Prolong[®] Gold enthaltenen DAPI. Der eingefügt Maßstab entspricht 10 μ m.

3.3.2 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in HepG2-Zellen

Die Lokalisation des FR α wt und der Einfluss der FR α -Mutanten p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup hierauf wurde in dem polaren Zellmodell der HepG2-Zellen überprüft. Die cDNS des *FOLR1* Wildtyp-Gens bzw. seiner Mutationen wurde mittels pcDNATM3.1/ *mycHis*(-) A Vektor stabil in die Zellen transfiziert. Einzelzellklonkolonien wurden durch G418 und im Rahmen einer Ringisolierung selektiert (Kapitel 2.8.2, S.35) und mithilfe eines Westernblots (Abb. 3.3, S.56) auf die Proteinexpression und somit auf eine erfolgreiche Transfektion hin untersucht. Als Negativkontrolle dienten Vektor-transfizierte HepG2-Mischklonzellen.

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte der FR α wt auf der Zelloberfläche der HepG2-Zellen lokalisiert werden (Abb. 3.9, a). Die mutanten FR α -Rezeptoren p.C169Y und p.N222S konnten intrazellulär zum großen Teil kolokalisiert mit dem ER-Marker PDI (Abb. 3.9, c und d) dargestellt werden. Die FR α -Mutante p.K44_P49dup zeigte im polaren Zellmodell neben der intrazellulären Lokalisation eine Oberflächenständigkeit an der apikalen Zellmembran. Im Falle der HepG2-Zellen ist dies die gallengangbildende Membran (Abb. 3.9, e) (Ishigami *et al.* 2005). Die Immunmarkierung der Proteine gelang durch den primären Antikörper MOV18, sowie den sekundären, fluoreszierenden Antikörpern CYTM3 und Alexa Fluor[®] 488. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass die Antikörper NCL-L-FR α und N1C3 den

FR α und die mutanten Proteine in der Immunfluoreszenz nicht darstellen konnten (ohne Abbildung).

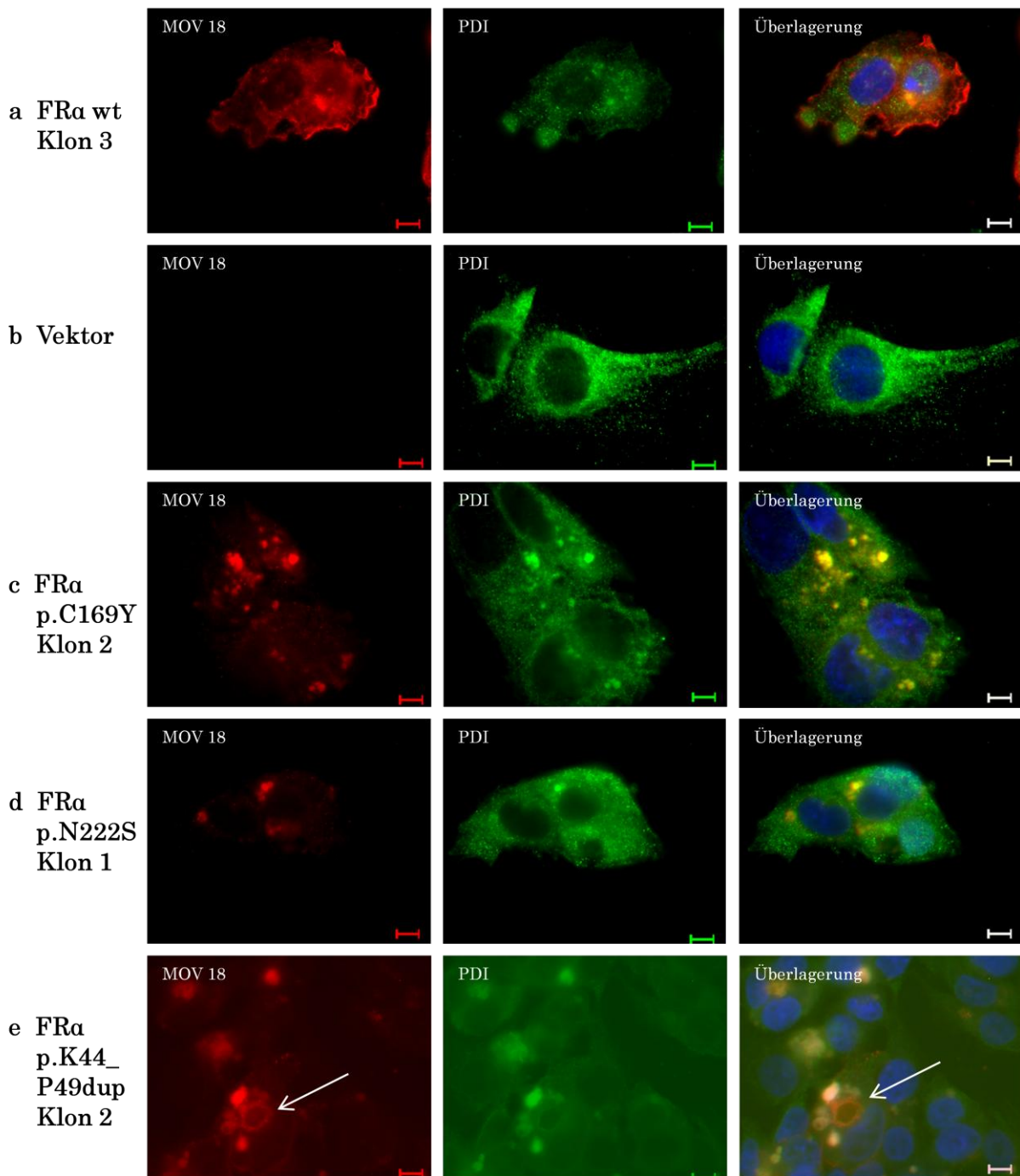
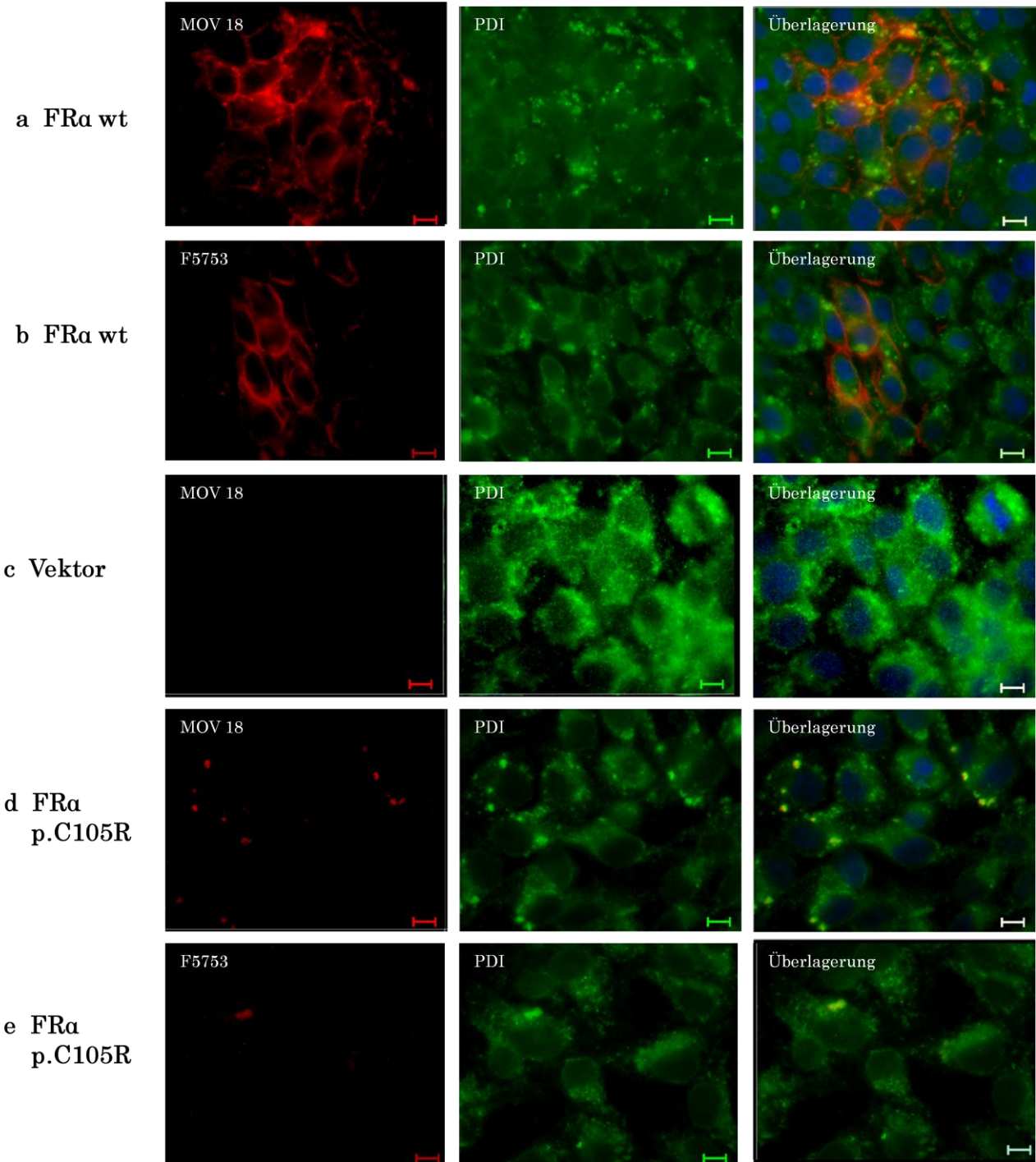


Abbildung 3.9: Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisationsanalyse des FR α wt und der mutanten Proteine in stabil transfizierten HepG2-Einzelzellklonen. Das Wildtypprotein zeigte eine zellmembranständige Lokalisation (**a**). Die FR α -Mutanten p.C169Y und FR α p.N222S führten zu einer Fehllokalisierung von FR α in intrazellulären Kompartimenten, die partiell mit dem ER-Marker PDI kolokalisierten (**c** und **d**). Der p.K44_P49dup Klon 2 ließ sich sowohl intrazellulär als auch an der apikalen, gallengangsbildenden Membran (durch einen Pfeil markiert) der Zelle darstellen (**e**). In Vektor-transfizierten Zellen zeigte sich kein FR α -spezifisches Signal (**b**). Zur Detektion des FR α wurde der Antikörper MOV18 (1:200 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP) verwendet. Die Darstellung des ERs erfolgte durch den Antikörper PDI (1:250 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP), die Färbung der Zellkerne anhand des im Prolong[®] Gold enthaltenen Farbstoffes DAPI. Die eingefügten Maßstäbe entsprechen 10 μ m.

3.3.3 Lokalisation des FR α wt und der mutanten Proteine in Z310-Zellen

Der Lokalisationsnachweis gelang zudem in Z310-Zellen, die stabil mit Plasmiden transfiziert wurden, welche für das FR α Wildtypprotein, sowie die mutanten FR α -Proteine p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup kodierten. Die Selektion der stabilen Mischklone erfolgte durch Hygromycin G.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie ließen sich alle Rezeptoren durch die primären Antikörper MOV18 und F5753 und die sekundären Antikörper CYTM3 und Alexa Fluor[®] 488 darstellen (Abb. 3.10). Mit den Antikörpern NCL-L-FR α und N1C3 gelang es weder den FR α wt noch die Mutanten in der Immunfluoreszenz nachzuweisen (ohne Abbildung). Der FR α wt war oberflächenständig an der Zellmembran zu detektieren. Die mutanten FR α -Proteine p.C105R, p.C169Y und p.N222S waren intrazellulär größtenteils mit dem ER-Marker PDI kolokalisiert. Die FR α -Mutante p.K44_P49dup ließ sich sowohl intrazellulär als auch membranständig nachweisen. Vektor-transfizierte Mischklonzellen zeigten im Sinne einer Negativkontrolle kein FR α -spezifisches Signal.



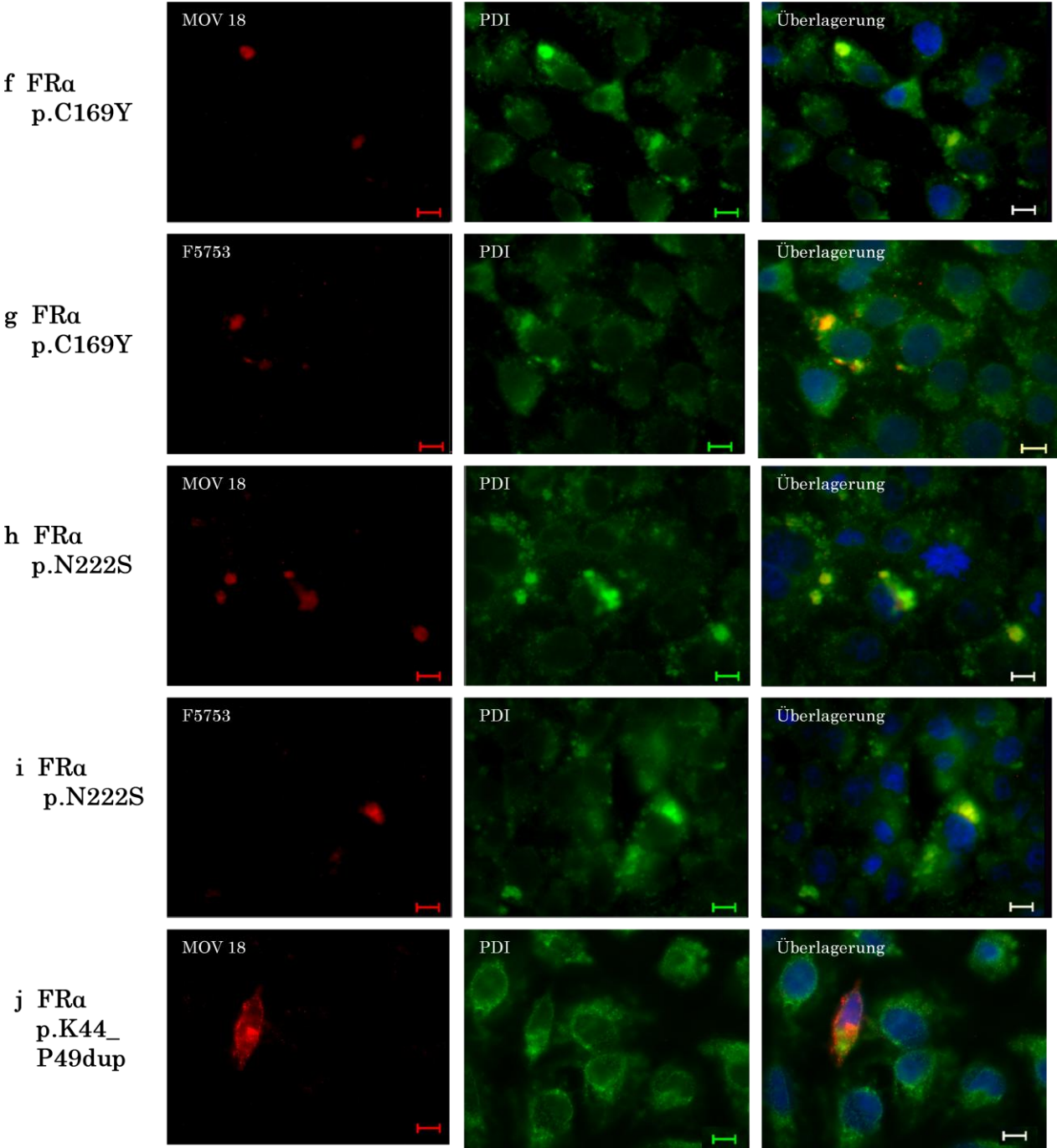


Abbildung 3.10: Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisationsanalyse des FR α wt und der Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup in stabil transfizierten Z310-Mischklonzellen. Es gelang die Darstellung des FR α und der Mutanten durch den Antikörper MOV18 (1:200 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP) (**a, c, d, f, h, j**) sowie durch den Antikörper F5753 (1:200 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP) (**b, e, g, i**). Der FR α wt wurde zellmembranständig detektiert (**a, b**). Die mutanten FR α -Proteine p.C105R, p.C169Y und p.N222S waren intrazellulär zum großen Teil mit dem ER-Marker kolokalisiert (**d, e, f, g, h, i**). Die FR α -Mutante p.K44_P49dup zeigte sich sowohl intrazellulär, als auch oberflächenständig an der Zellmembran lokalisiert (**j**). Die Negativkontrolle, in Form eines Vektor-transfizierten Mischklons, zeigte kein FR α -spezifisches Signal (**c**). Die Darstellung des ERs erfolgte durch den Antikörper PDI (1:250 verdünnt in PBS mit 0,1%-SAP). Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch den im Prolong[®] Gold enthaltenen Farbstoff DAPI. Die eingefügten Maßstäbe entsprechen 10 μ m.

3.3.4 Vergleich von membranpermeabilisierenden Reagenzien in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Im Laufe der Versuche wurde untersucht, ob die Zellpermeabilisierung durch das Verwenden von Triton X statt Saponin (in identischer Verdünnung) verstärkt werden könne und somit eine höhere Antikörperbindung und ein stärkeres Signal in der Immunfluoreszenz zu erzielen sei. Die Ergebnisse (ohne Abbildung) zeigten keinen sichtbaren Unterschied.

Kapitel 4

Diskussion

Die FR α -Mutanten p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup wurden durch die Pädiatrie II der Universität Göttingen (Grapp *et al.* 2012), die FR α -Mutante p.C105R durch Pérez-Dueñas *et al.* 2010 identifiziert und als Ursache einer zerebralen Folattransport-Defizienz festgestellt.

Im Rahmen der Charakterisierung neuer Mutationen im *FOLR1*-Gen wurde der Einfluss der FR α -Mutanten p.C105R, p.C169Y, p.N222S und p.K44_P49dup hinsichtlich der Expression, der Rezeptor-Folatbindung und der Lokalisation des Proteins untersucht. Es erfolgte die Evaluation verschiedener Antikörper gegen den FR α und die Interpretation der Ergebnisse, unter Berücksichtigung aktueller Studien, hinsichtlich ihrer medizinischen Relevanz.

4.1 Einfluss der Mutationen im *FOLR1*-Gen auf die Proteinexpression, Funktionalität und Lokalisation

Anhand von Westernblot-Analysen konnten alle untersuchten Proteine detektiert werden und somit ein Einfluss der Mutanten auf die Expression des FR α ausgeschlossen werden. Wie zuvor durch Doucette und Stevens *et al.* (2004) beschrieben, zeigte die FR α -Expression in den einzelnen stabil transfizierten Zellklonen erhebliche Variationen, die im Westernblot durch eine unterschiedliche Intensität der Banden festzustellen war. Diese Variation konnte bei identisch durchgeführten Versuchen auf variable Transfektions- und Expressionsraten zurückgeführt werden. Letztere wurden insbesondere in Abhängigkeit der Integrationsstelle der Plasmid-DNS bei der stabilen Transfektion beeinflusst.

Desweiteren fiel in den Westernblot-Analysen auf, dass sich der FR α wt im Vergleich zu den mutanten Proteinen zum Teil doppelbandig darstellte (Abb. 3.4, S.57). Dies wurde 2004 zuvor von Doucette und Stevens auf eine glykosylierte Form des FR α mit einem hohen Mannoseanteil oder komplexen Oligosacchariden zurückgeführt.

Zudem gelang es im Zuge der Expressionsanalyse die FR α -Mutante p.K44_P49dup mit dem Antikörper NCL-L-FR α zu detektieren. Wie 2009 von Steinfeld *et al.* beschrieben, eignete sich der Antikörper MOV18 nicht zum Detektieren der Mutante. Dies erlaubte Rückschlüsse darauf, dass die beiden Antikörper unterschiedliche Epitope des FR α erkennen (Kapitel 4.2, S.75).

Die Veränderungen des FR α durch die Mutationen p.C105R und p.C169Y zeigten einen Einfluss auf die Rezeptor-Folsäurebindung sowie auf die Lokalisation des membranständigen Proteins. Für beide Mutanten konnte keine bzw. eine sehr geringe Restbindung festgestellt werden. Dies wurde durch die Ergebnisse der Lokalisationsanalyse unterstützt, indem die mutanten Folatrezeptoren p.C105R und p.C169Y intrazellulär größtenteils kolokalisiert mit einem ER-Marker detektiert wurden. Die intrazelluläre Lokalisation konnte als Folge einer strukturellen Veränderung des Proteins gewertet werden, erklärbar durch den Austausch der Aminosäure Cystein. Eine Beeinflussung der Tertiärstruktur durch den Verlust einer Disulfid-Brücke oder einer Störung der posttranslationalen Modifikation waren denkbar. Pérez-Dueñas *et al.* beschrieben 2010 die Wahrscheinlichkeit einer veränderten Proteinfaltung als besonders hoch für die FR α -Mutante p.C105R, durch den Austausch von Cystein gegen Arginin, einer neutralen gegen eine positiv geladene Aminosäure.

Die FR α -Mutante p.N222S zeigte in der Immunfluoreszenzmikroskopie ebenfalls eine überwiegend intrazelluläre Kolokalisation mit dem Marker des ERs. Es konnte mikroskopisch kein Nachweis einer Zellmembranständigkeit gesichert werden. In den radioaktiven Bindungsassays dagegen zeigte das Protein eine relative Folsäurebindung von 15-16 % im Vergleich zum Wildtypprotein. Dies

ließ schlussfolgern, dass ein geringer Teil der F α -Mutante p.N222S dennoch auf der Zelloberfläche exprimiert wurde.

Als einzige untersuchte Mutation im *FOLR1*-Gen beeinflusste die F α -Duplikationsmutante p.K44_P49dup die Lokalisation und Rezeptor-Folsäurebindung des Proteins auf eine vergleichsweise moderate Weise. In der Immunfluoreszenzmikroskopie ließ sich der Rezeptor in den polaren Zellmodellen (Z310 und HepG2) sowohl kolokalisiert mit dem ER-Marker, als auch zellmembranständig darstellen (Abb. 3.9, S.67 und 3.10, S.70). In dem radioaktiven Bindungsassay wurde dies bestätigt und weiter quantifiziert, indem dem Protein im Vergleich zum F α -Wildtypprotein eine 21- bis 24-prozentige Rezeptor-Folsäurebindung nachgewiesen werden konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Folsäurebindung und Lokalisation in der Zellmembran entsprach den zuvor durch Steinfeld *et al.* (2009) ermittelten Ergebnissen. Es ist zu beachten, dass bei einer Membranständigkeit und einer vorhandene Rezeptor-Folsäure Bindung nicht zwangsläufig auf eine intakte Funktionalität, im Sinne eines Folsäuretransportmechanismus, geschlossen werden konnte, da beispielsweise Störungen der Rezeptorinternalisierung vorliegen könnten.

Im Rahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie fiel bei den intrazellulär lokalisierten Folatrezeptoren auf, dass, neben der zu einem großen Teil vorhandenen Kolokalisation mit dem ER-Marker, ein Teil der Rezeptoren auch in anderen subzellulären Kompartimenten verblieben. Anhand der Darstellung könnte es sich im Vergleich zu mikroskopischen Ergebnissen von van Ijzendoorn (2006) um Endosomen handeln, die als Transportvehikel innerhalb der Zelle zum Abbau in den Lysosomen dienen. Alternativ war eine Degradierung mutanter F α -Proteine in den Proteasomen denkbar.

4.2 Antikörper gegen den F α

Im Rahmen der Charakterisierung neuer Mutationen im *FOLR1*-Gen wurden vier Antikörper gegen das Protein in Westernblot-Analysen und der

Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Detektionsfähigkeit des FR α überprüft. Hierbei handelte es sich um die monoklonalen Antikörper NCL-L-FR α , MOV18 und F5753 sowie einen polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, N1C3. Tabelle IV.1 zeigt zusammenfassend die Detektierbarkeit des Wildtyp- oder mutanten Folatrezeptors durch die einzelnen Antikörper.

Tabelle IV.1: Vergleich von Antikörpern gegen den FR α in Westernblot-Analysen und der Immunfluoreszenzmikroskopie

	Westernblot-Analyse	Immunfluoreszenzmikroskopie
NCL-L-FRα	Proteindetektion möglich	keine Detektion möglich
MOV18	Detektion des FR α wt, keine Detektion der untersuchten Mutanten	Proteindetektion möglich
F5753	keine Detektion möglich	Proteindetektion möglich
N1C3	nicht überprüft	keine Detektion möglich

Im Unterschied zu den Westernblot-Analysen, bei denen durch eine Zellyse und das Denaturieren der Proteine durch SDS und Mercaptoethanol die Proteinfaltung stark beeinflusst wurde, blieb bei der Immunfluoreszenzmikroskopie die Zelle und die Proteinfaltung durch das Fixieren und Permeabilisieren der Zellmembran erhalten.

Der Antikörper NCL-L-FR α eignete sich im Westernblot zum Detektieren des FR α in seiner wt sowie mutanten Form. Für die Proteindetektion im Rahmen der

Mikroskopie dagegen nicht. Denkbar war somit, dass der Antikörper NCL-L-FR α an ein lineares Epitop bindet, das in der natürlichen intrazellulären Faltung des Proteins nicht besteht und die Antikörperbindung somit abhängig von der Primär- oder Sekundärstruktur des Proteins ist. Entgegengesetzt verhielt sich der Antikörper F5753, mit dem eine Proteindetektion nur in der Immunfluoreszenzmikroskopie gelang. Eine starke Abhängigkeit des Epitops von der tertiären Proteinstruktur, wie es natürlicherweise gefaltet in der Zelle vorkommt, in Form eines diskontinuierlichen Epitops, war somit annehmbar. Mit dem Antikörper MOV18 war ebenfalls eine Detektion des FR α und seiner untersuchten Mutanten in der Immunfluoreszenzmikroskopie möglich. Zudem konnte mithilfe des Antikörpers der FR α wt im Westernblot detektiert werden, allerdings keines der mutanten Proteine. Folglich beeinflussten die Mutationen beim Vorliegen einer Auflösung der Proteinfaltung das Epitop des Antikörpers MOV18, sodass keine Detektion mehr erfolgen konnte. Der Antikörper N1C3 wurde nur im Rahmen von Immunfluoreszenzdetektionen verwendet und eignete sich hierfür nicht. Die Fähigkeit der untersuchten Antikörper den FR α zu detektieren erwies sich als unabhängig vom Zellmodell.

4.3 Medizinische Relevanz der Charakterisierung neuer Mutationen

Molekulare Versuche an mutanten Folatrezeptoren erlauben einen Einblick in die Vielfalt der Konsequenzen der einzelnen Mutation im *FOLR1*-Gen, und das Verständnis einer behandelbaren Ursache der zerebralen Folattransport-Defizienz wird verbessert.

Aufgrund einer individuellen Ausstattung mit Proteinen und einem Einfluss der Ernährung und Umwelt auf das Folatangebot im Blut und im Liquor, darf allein anhand der durchgeführten molekularen Charakterisierung der Mutationen im *FOLR1*-Gen nicht auf einen Phänotypen der erkrankten Kinder, den Verlauf der Erkrankung oder die Therapie geschlossen werden. So beschrieben Grapp *et al.*

(2012) bei Kindern mit identischer *FOLR1*-Genmutation unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe.

Bisherige Studien (Mangold *et al.* 2011) konnten keine Korrelation zwischen der Liquorfolatkonzentration und der Schwere bzw. der Erkrankungsdauer zeigen. Daten von Ramaekers *et al.* (2004), Cario *et al.* (2009) und Steinfeld *et al.* (2009) lieferten allerdings Hinweise auf Zusammenhänge des Phänotyps und dem Therapieansprechen. In der Behandlung von CFD-Patienten bewirkte die orale Gabe von Folat nur bei manchen Kindern eine Remission der Symptome. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der phänotypischen Symptomschwere und dem Ansprechen auf eine orale Therapie identifiziert werden. So benötigten nach Mangold *et al.* (2011) schwerer Erkrankte Kinder höhere Folatdosen für eine Symptombesserung.

In Betracht der Ergebnisse der vorliegenden Charakterisierung der Mutanten ist es vorstellbar, dass Mutationen im *FOLR1*-Gen mit geringen molekularen Konsequenzen für den FR α , z.B. die FR α -Mutante p.K44_P49dup, durch das therapeutische Erhöhen des Folatangebots im Blut trotz der Mutation eine ausreichende Menge an Folsäure in den Liquor transportieren können. Dies wird durch das Ansprechen eines Patienten mit der Duplikationsmutation im *FOLR1*-Gen auf die orale Folatsubstitution durch Steinfeld *et al.* (2009) bekräftigt. Wohingegen Patienten mit einer den FR α stark beeinträchtigenden *FOLR1*-Mutation, z.B. die FR α -Mutante C105R, evtl. auf die intrathekale Gabe von Folsäure angewiesen wären, da eine Erhöhung der Blutfolsäurekonzentration aufgrund eines fehlenden Transports therapeutisch nicht ausreichen würde. Hierzu fehlten allerdings bislang klinische Daten.

4.4 Ausblick

Die Aufklärung über das Krankheitsbild und der einzuleitenden Diagnostik bei dem Verdacht auf einen CFD-Symptomkomplex ist von großer Bedeutung, um möglichst viele Patienten mit einer behandelbaren Ursache zu identifizieren und zu therapieren. Im Hinblick auf die Charakterisierung der Mutationen im

FOLR1-Gen wären weitere Studien zu der genotypisch-phänotypischen Korrelation für die einzelnen Mutationen anzustreben. Weitere FR α -Mutanten gilt es zu identifizieren und molekulare Konsequenzen für die Expression, Rezeptor-Folatbindung und Lokalisation des FR α zu charakterisieren. Die Genetik könnte als ein Faktor für eine Einstufung der CFTD in Schweregrade untersucht werden und gegebenenfalls als ausschlaggebend für die Entscheidung der Therapieoption, der oralen oder intrathekalen Folatsubstitution, erkannt werden.

Der Symptomkomplex der zerebralen Folattransport-Defizienz ist bislang vor allem in Bezug auf seine klinischen Symptome und möglichen Ursachen hin beschrieben wurden. In Zukunft gilt es noch weitere Faktoren, die den Liquorfolatspiegel beeinflussen, zu identifizieren, bevor ein vollständiges Begreifen der Erkrankung möglich ist.

Der Mechanismus des Folattransports über die Blut-Liquor-Schranke ist bislang nicht ausreichend geklärt und essentiell für das Verständnis des Krankheitsbildes. Hierbei ist weder das Zusammenspiel des FR α mit anderen intrazellulären Folattransportern, noch die Expression eines fetalen FR β , der mit dem späten Krankheitsbeginn und einer normalen pränatalen Entwicklung durch Steinfeld *et al.* (2009) in Verbindung gebracht wurde, bekannt.

In Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation mutierter Folatrezeptoren wären Kolokalisationsuntersuchungen mit endosomalen Markern zur Feststellung der neben den im ER kolokalisierten, intrazellulären Rezeptoren anzustreben.

Ein weiterer interessanter Aspekt im Zuge der Erforschung von Mutationen im *FOLR1*-Gen ist die onkologische Relevanz. In aktuellen Studien (Chen *et al.* 2011 und O'Shannessy *et al.* 2011) wurde beschrieben, dass der FR α von vielen epithelialen Tumoren, bspw. Ovarialkarzinomen, Endometriumkarzinomen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, exprimiert wurde. FR α -positive

Tumore zeigten schlechtere Überlebensraten, ein höheres Staging und Resistenzen in der Chemotherapie. Zudem wurde der FR α als ein diagnostischer Biomarker, Prognosefaktor und Kriterium für den Therapieerfolg diskutiert. Aktuell wird bereits der Antikörper Farletuzumab gegen den FR α in klinischen Phase 3 Studien eingesetzt (Beck *et al.* 2011).

In Hinblick auf Patienten mit einer *FOLR1*-mutationsbedingten CFTD stellt sich die Frage, ob durch die Mutation ein Schutz vor Tumoren mit FR α -abhängigem Wachstum gegeben ist. Da es sich bei der zerebralen Folattransport-Defizienz um ein neuerkanntes Krankheitsbild handelt, konnten bislang keine Daten zu Lebenserwartungen und Spätfolgen von Patienten erhoben werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentell durchgeführten Dissertation wurden neue Mutationen im *FOLR1*-Gen molekular charakterisiert. Die untersuchten Mutationen führten zu Veränderungen im Folatrezeptor α , einem von Zellen des Plexus choroideus exprimierten Protein, welches den Haupttransporter von 5-MTHF über die Blut-Liquor-Schranke darstellt. Mutationen im *FOLR1*-Gen sind kürzlich als Ursache einer zerebralen Folattransport-Defizienz identifiziert worden. Diese Erkrankung gehört zu einer Gruppe neurologischer Störungen, die sich durch isoliert niedrige Liquorfolatwerte auszeichnen und zusammenfassend als zerebrale Folatdefizienz bezeichnet werden. Die zerebrale Folattransportdefizienz manifestiert sich typischerweise im frühen Kleinkindesalter und äußert sich klinisch in Form einer chronisch-progredienten psychomotorischen Regression mit zerebralen Krampfanfällen und einer durch MRT nachweisbaren Myelinisierungsstörung. Eine Substitution mit 5'-Formyltetrahydrofolat konnte bei der Mehrzahl der identifizierten Patienten eine partielle Remission der Symptome bewirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Mutationen im *FOLR1*-Gen hinsichtlich ihrer molekularen Auswirkungen auf die Proteinexpression, die Funktionalität bzw. Rezeptor-Bindungsfähigkeit und die Lokalisation des Proteins untersucht. Bei den Mutationen handelt es sich um zwei neue, aus Patienten-DNS identifizierte Punktmutationen, p.C169Y und p.N222S, sowie die bereits beschriebenen FR α -Mutanten p.C105R und FR α p.K44_P49dup.

Die heterologe Expression der mutanten Folatrezeptoren zeigte in Westernblot-Analysen keine signifikanten Veränderungen der Protein-Expressionsrate,

verglichen mit dem Wildtyp-Protein. Allerdings bestand eine stark verminderte Rezeptor-Folsäurebindung in radioaktiven Bindungsassays. Ein funktioneller Unterschied zwischen den einzelnen Mutanten konnte im Verlauf der Experimente identifiziert werden. Die FR α -Proteinmutanten p.N222S und p.K44_P49dup zeigten verglichen mit den anderen Mutanten eine höhere Folsäure-Restbindung von ca. 20 % des Wildtypproteins. Im Rahmen von Immunfluoreszenzmikroskopien konnte gezeigt werden, dass die FR α -Mutante p.K44_P49dup partiell zellmembranständig, entsprechend dem FR α -Wildtyp, exprimiert wurde. Die übrigen untersuchten Proteinmutanten zeigten in intrazellulären Kompartimenten zumindest teilweise eine Kolokalisation mit dem Marker des endoplasmatischen Retikulums. Alle Untersuchungen wurden mit transfizierten CHO-K1-Zellen durchgeführt und konnten in zwei polaren Zelllinien, immortalisierten Epithelzellen des Plexus choroideus (Z310) und humanen Leberzellkarzinomzellen (HepG2) bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind Bestandteil einer kürzlich in BRAIN veröffentlichten Arbeit (Grapp *et al.* 2012) und tragen zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der zerebralen Folattransport-Defizienz, einer neuerkannten, behandelbaren neuropädiatrischen Erkrankung, bei. Die Pathogenität der untersuchten *FOLR1*-Mutationen wird auf molekularer Ebene belegt. Die Bedeutung dieser molekulargenetischen Untersuchungen besteht darin, dass eine frühzeitige Folat-Behandlung erkrankter Kinder zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome führt.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

Adkins S, Burmeister M (1996): Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: application for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* 240: 17-23

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore O, Seidman F, Smith J, Struhl K: Current protocols in molecular biology, Vol1, John Wiley & Sons Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapur 1987

Basal E, Eghbali-Fatourehchi G, Kalli K, Hartmann L, Goodman K, Goode L, Kamen B, Low P, Knutson K (2009): Functional folate receptor alpha is elevated in the blood of ovarian cancer patients. *PLoS One* 4: e6292

Beck A, Wurch T, Reichert J (2011): 6th Annual European Antibody Congress 2010: November 29- December 1, 2010, Geneva, Switzerland. *MAbs* 3: 111-132

Beer A (1852): Bestimmung der Absorption des roten Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann Phys Lpz* 86: 78-88

Bernardi K, Forster M, Lencer W, Tsai B (2008): Derlin-1 facilitates the retrotranslocation of cholera toxin. *Mol Biol Cell* 19: 877-884

Biometra: Fastblot Semi-Dry Blotter, Bedienungsanleitung, Biometra, Göttingen 2009, S. 12, Abb. 2

-
- Birnboim HC (1983):** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid-DNA. *Methods Enzymol* 100: 243-255
- Blake M, Johnston K, Russell-Jones G, Gotschlich E (1984):** A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136: 175-179
- Bouguer P:** *Essai d' Optique sur la Gradation de la Lumiere* (1729). Kessinger Publishing LLC Havre, France 2010
- Bradford M (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Campbell I, Jones T, Foulkes W, Trowsdale J (1991):** Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* 51: 5329-5338
- Cario H, Bode H, Debatin K, Opladen T, Schwarz K (2009):** Congenital null mutations of the FOLR1 gene: a progressive neurologic disease and its treatment. *Neurology* 73: 2127-2129
- Carmel R:** Folic acid; in: Shils M, Shike M, Olson R: *Modern nutrition in health and disease*. 10. Aufl., Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia 2006, S.470-481
- Chen Y, Chang M, Huang C, Chiang Y, Lin H, Chen C, Hsieh C, Cheng W (2011):** Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival cytotoxic chemo-response. *Mol Oncol* 6: 360-369
- Dagert M, Ehrlich S (1979):** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28

-
- Dill P, Schneider J, Weber P, Trachsel D, Tekin M, Jacobs C, Thöny B, Blau N (2011):** Pyridoxal phosphate-responsive seizures in a patient with cerebral folate deficiency (CFD) and congenital deafness with labyrinthine aplasia, microtia and microdontia (LAMM). *Mol Genet Metab* 104: 362-368
- Doucette M, Stevens V (2004):** Point mutations alter the cellular distribution of the human folate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells. *J Nutr* 134: 308-316
- Dugaiczuk A, Boyer H, Goodman H (1975):** Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96: 171-184
- Elwood P, Nachmanoff K, Saikawa Y, Page S, Pacheco P, Roberts S, Chung K (1997):** The divergent 5' termini of the alpha human folate receptor (hFR) mRNAs originate from two tissue-specific promoters and alternative splicing: characterization of the alpha hFR gene structure. *Biochemistry* 36: 1467-1478
- Fan J, Kureshy N, Vitols K, Huennekens F (1995):** Novel substrate analogs delineate an endocytotic mechanism for uptake of folate via the high-affinity, glycosylphosphatidylinositol-linked transport protein in L1210 mouse leukemia cells. *Oncol Res* 7: 511-516
- Goldberger R, Epstein C, Anfinsen C (1963):** Acceleration of reactivation of reduced bovinepancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem* 238: 628-635
- Goodsell D (2002):** The molecular perspective: restriction endonucleases. *Stem Cells* 20: 190-191
- Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lucke T, Hausler M, Gartner J, Steinfeld R (2012):** Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain*. 135: 2022-2031

-
- Hanahan D (1983):** Studies on Transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hansen F, Blau N (2005):** Cerebral folate deficiency: Life-changing supplementation with folinic acid. *Mol Genet Metab* 84: 371-373
- Hansen H, Nordqvist P, Sourander P (1964):** Megaloblastic anemia and neurologic disturbance combined with folic acid deficiency. Observations on an epileptic patient treated with anticonvulsants. *Acta Med Scand* 176: 243-251
- Hyland K, Shoffner J, Heales S (2010):** Cerebral folate deficiency. *J Inherit Metab Dis* 33: 563-570
- Ishigami A, Fujita T, Inoue H, Handa S, Kubo S, Kondo Y, Maruyama N (2005):** Senescence marker protein-30 (SMP30) induces formation of microvilli and bile canaliculi in Hep G2 cells. *Cell Tissue Res* 2: 243-249
- Kim S, Jun D, Kim H, Jeong K, Lee C (2011):** Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response. *J Biomol Screen* 16: 259-265
- Laemmli U (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lambert J:** *Photometria sive de mensura et Gradibus Luminis Colorum et Umbrae* (1760), W. Engelmann, Augsburg 1892
- Lee C, Liu M, Sie K, Lee M (1996):** Prostate-specific antigen promoter driven gene therapy targeting DNA polymerase-alpha and topoisomerase II alpha in prostate cancer. *Anticancer Res* 16: 1805-1811

Löffler G, Petrides P, Heinrich P : Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007

Mangold S, Blau N, Opladen T, Steinfeld R, Weßling B, Zerres K, Häusler M (2011): Cerebral folate deficiency: A neurometabolic syndrome? *Mol Genet Metab* 104: 369-372.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-27

North A, Gimona M, Lando Z, Small J (1994): Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Sci* 107: 445-455

O'Shannessy D, Somers E, Albone E, Cheng X, Park Y, Tomkowicz B, Hamuro Y, Kohl T, Forsyth T, Smale R, Fu Y, Nicolaidis N (2011): Characterization of human folate receptor alpha via novel antibody-based probes. *Oncotarget* 2: 1227-1243

Pérez-Dueñas B, Toma C, Ormazábal A, Muchart J, Sanmartí F, Bonbau G, Serrano M, García-Cazorla A, Cormand B, Artuch R (2010): Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. *J Inherit Metab Dis* 33: 795-802

Pérez-Dueñas B, Ormazábal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano M, Sierra C, De Grandis E, Marfa M, García-Cazorla A, Campistol J, Pascual J, Artuch R (2011): Cerebral folate deficiency syndromes in childhood: clinical, analytical and etiologic aspects. *Arch Neurol* 68: 615-621

Pietrzik K, Golly I, Loew D: Handbuch Vitamine, Für Prophylaxe, Therapie und Beratung. Elsevier Verlag, München 2008, S.82-127

-
- Placantonakis D, Cicirata F, Welsh J (2002):** A dominant negative mutation of neural connexin 36 that blocks intercellular permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 98: 15-28
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006):** Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 5: 917-928
- Ramaekers V, Blau N (2004):** Cerebral folat deficiency. *Dev Med Child Neurol* 46: 843-851
- Ramaekers V, Hansen S, Holm J, Opladen T, Senderek J, Häusler M, Heimann G, Fowler B, Maiwald R, Blau N (2003):** Reduced folate transport to CNS in female Rett patients. *Neurology* 61: 506-515
- Ramaekers V, Rothenberg S, Sequeira J, Opladen T, Blau N, Quadros E, Selhub J (2005):** Autoantibodies to folate receptors in cerebral folate deficiency syndrome. *N Engl J Med* 352: 1985-1991
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T:** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor- USA 1989
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Serrano M, García-Silva M, Martín-Hernández E, O'Callaghan M, Quijada P, Martínez-Aragón A, Ormazábal A, Blázquez A, Martín M, Briones P, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Artuch R, Pineda M (2010):** Kearns-Sayre syndrome: cerebral folate deficiency, MRI

findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochondrion* 10: 429-432

Shakur Y, Garriguet D, Corey P, O'Connor D (2010): Folic acid fortification above mandated levels results in a low prevalence of folate inadequacy among Canadians. *Am J Clin Nutr* 92: 818-825

Smith A, Pinkney M, Piggott N, Calvert H, Milton I, Lunec J (2007): A novel monoklonal antibody for detection of folate receptor alpha in paraffin-embedded tissues. *Hybridoma* 26: 281-288

Smithells R, Sheppard S (1980): Possible prevention of neural-tube defects by preconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980,1: 647

Steinfeld R, Grapp M, Kraetzner R, Dreha-Kulaczewski S, Helms G, Wevers R, Grosso S, Gärtner J (2009): Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. *Am J Hum Genet* 85: 354-363

Tang M, Szoka F (1997): The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 4: 823-832

Taylor R, Walker D, McInnes R (1993): E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparation used for sequencing. *Nucleic Acid Res* 21: 1677-1678

Tijo J, Puck T (1958): Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med* 108: 259-268

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24: 145-149

-
- Van Ijzendoorn S (2006):** Recycling endosomes. *J Cell Sci* 119: 1679-1681
- Van Ijzendoorn S, Zegers M, Kok J, Hoekstra D (1997):** Segregation of glucosylceramide and sphingomyelin occurs in the apical to basolateral transcytotic route in Hep G2 cells. *J Cell Biol* 137: 347-357
- Verbeek M, Bloom A, Wevers R, Lagerwerf A, van de Geer J, Willemsen M (2008):** Technical and biochemical factors affecting cerebrospinal fluid 5-MTHF, biopterin and neopterin concentrations. *Mol Genet Metab* 95: 127-132
- Weitman S, Lark R, Coney L, Fort D, Frasca V, Zurawski V, Kamen B (1992):** Distribution of folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res* 12: 3396-3401
- WHO (World Health Organization) (2008):** Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B₁₂ deficiencies. *Food Nutr Bul* 29: 238-244
- Wu D, Pardridge M (1999):** Blood-brain barrier transport of reduced folic acid. *Pharm Res* 16: 415-419
- Zheng W, Zhao Q (2002):** Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Res* 958: 371-380

Danksagung

Prof. Dr. Dr. med. Robert Steinfeld danke ich für die Vergabe dieses außerordentlich interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, im Labor der Pädiatrie II der Universitätsmedizin Göttingen meine Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für die Chance, als Vollzeitstudentin zu promovieren, und für eine allzeit problemlose Erreichbarkeit.

Ganz besonders möchte ich Dr. rer. nat. Marcel Grapp für eine geduldige, zielgerichtete Betreuung, eine stete uneingeschränkte Unterstützung, sowie die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen danken. Ein großes Dankeschön für allzeit offene Ohren, motivierende Worte und viel Zeit für belebende Diskussionen.

Corinna Dickel danke ich für die herzliche Unterstützung und Anleitung bei praktischen Laborarbeiten. Zudem danke ich Frau Maria Metten aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie für die freundliche Einführung in das Arbeiten im Radioaktiv-Labor.

Kathrin Schreiber, Tanja Wilke und Nicole Holstein danke ich für eine kollegiale Atmosphäre und die kleinen Hilfestellungen im Laboralltag. Ein Dankeschön an die vielen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeiter und Doktoranden der Pädiatrie II für ein tolles Arbeitsklima, Zuverlässigkeit und eine gute Zeit.