

Aus der Klinik Neuropädiatrie

(Prof. Dr. med. J. Gärtner)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss genetischer Mutationen im *CIC*- Gen auf den Folattransport

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Leonie Linnea Elisabeth Herholz

aus

Kiel

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Brück
Betreuer: Prof. Dr. Dr. Robert Steinfeld
Korreferent: Prof. Dr. Uwe Kornak
Promotorvertretung: Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 26.09.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss genetischer Mutationen im *CIC*-Gen auf den Folattransport" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Folat	1
1.2 Folattransport und Folattransportproteine	2
1.3 Systemische Folatdefizienz	4
1.4 Zerebrale Folatdefizienz	5
1.5 Capicua (CIC)	7
1.5.1 Die Funktion von CIC für den zerebralen Folattransport	8
1.5.2 Mutationen im <i>CIC</i> -Gen.....	9
1.6 Zielsetzung.....	10
2 Materialien und Methoden	11
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	11
2.2 Geräte und Software.....	14
2.3 Puffer und Lösungen.....	16
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.5 Antikörper.....	19
2.6 Primer	19
2.7 Untersuchte Mutationen im <i>CIC</i> -Gen.....	20
2.8 Klonierung.....	21
2.8.1 Verwendete Plasmide	21
2.8.2 Restriktionsenzymverdau.....	23
2.8.3 Ligation.....	24
2.8.4 Sequenzierung.....	24
2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion	26
2.8.6 Aufreinigung der PCR-Produkte	27
2.8.7 Methoden der Mutagenese	28
2.8.8 Transformation von Plasmid-DNS	30
2.8.9 Re-Transformation	31
2.8.10 Mini-Präparation der Plasmide	32
2.8.11 Midi-Präparation der Plasmide	33

2.8.12	Gelextraktion.....	34
2.9	Zellkultur.....	34
2.9.1	Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung.....	34
2.9.2	Methoden des Gentransfers.....	35
2.9.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	39
2.10	Agarosegelelektrophorese.....	39
2.11	Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösung.....	40
2.12	Untersuchung der Expression von CIC, FR α , RFC1 und PCFT.....	41
2.12.1	Gewinnung von Proteinproben.....	41
2.12.2	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	41
2.12.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE).....	42
2.12.4	Western Blot.....	44
2.13	Untersuchung der Folsäurebindung.....	46
2.13.1	Radioaktives Bindungsassay.....	46
2.13.2	Bestimmung der Proteinmenge durch Kontroll-BCA-Assay.....	47
2.14	Untersuchung der Lokalisation von CIC.....	47
2.15	Expressionsanalyse auf RNS-Ebene.....	49
2.15.1	RNS-Extraktion.....	49
2.15.2	Photometrische Konzentrationsmessung und Kontrollgel.....	50
2.15.3	cDNS-Synthese.....	51
2.15.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	52
2.16	Datenanalyse.....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Generierung von stabilen GFP-CIC-Mutanten in HeLa-Zellen.....	54
3.1.1	Untersuchung der Expression von CIC in HeLa-Zellen durch Western Blot Analyse.....	54
3.1.2	Untersuchung der Expression von FOLR1 unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse.....	56
3.1.3	Untersuchung der Expression von RFC1 unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse.....	58
3.1.4	Untersuchung der Expression von PCFT unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse.....	60

3.2	Charakterisierung der GFP-CIC-Mutanten in HeLa-Zellen	62
3.2.1	Lokalisation des CIC-WT und der CIC-Mutationen in HeLa-Zellen	62
3.2.2	Analyse der Proteine im Folattransport mittels quantitativer Echtzeit-PCR.....	64
3.2.3	Einfluss von CIC auf die Rezeptor-Folsäurebindung	67
3.2.4	Charakterisierung von stabilen pLVX-CIC-Mutanten in HeLa- Zellen	68
3.3	Charakterisierung von GFP, GFP-CIC WT und der CIC-Mutante p.T990I in Caco-2-Zellen.....	68
3.3.1	Generierung von stabilen GFP-CIC-Mutanten in Caco-2-Zellen..	68
3.3.2	Western Blot Analyse für CIC in stabilen Caco-2-Zellen.....	69
3.3.3	Western Blot Analyse für FOLR1 in stabil transfizierten Caco-2- Zellen	71
4	Diskussion.....	74
4.1	Einfluss der Mutationen im <i>CIC</i> -Gen auf Proteinexpression, Funktionalität und Lokalisation.....	74
4.2	Klinische Relevanz.....	80
4.3	Ausblick.....	82
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturformel von N^5 -Methyl-Tetrahydrofolat (5-MTHF).....	2
Abbildung 1.2: Schematische Abbildung des Folattransports über die Blut-Liquor-Schranke. .	4
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Gene der CIC-Isoformen CIC-L und CIC-S.....	8
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Gene <i>FOLR1</i> , <i>RFC1</i> und <i>PCFT</i>	9
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Gens CIC-S und des verkürzten CIC-Gens der Stopmutation p.R353X.....	10
Abbildung 2.1: Plasmid pcDNA5/FRT/TO GFP.	21
Abbildung 2.2: Plasmid pLVX-IRES-Puro.	22
Abbildung 3.1: Western Blot Analyse stabil transfizierter HeLa-Zellen zum Nachweis der Expression des CIC-Wildtyps und der CIC-Mutanten p.G580C, p.T990I und p.R353X.....	55
Abbildung 3.2: Quantifizierung der Proteinintensitäten von CIC für CIC-WT und die CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen.	56
Abbildung 3.3: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X.....	57
Abbildung 3.4: Quantifizierung der Proteinintensitäten des FR α im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen.....	58
Abbildung 3.5: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X.....	59
Abbildung 3.6: Quantifizierung der Proteinintensitäten des RFC1 im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen.....	60
Abbildung 3.7: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X.....	61
Abbildung 3.8: Quantifizierung der Proteinintensitäten des PCFT im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen.....	62
Abbildung 3.9: Lokalisationsanalyse des CIC-WT und dessen Mutanten p.G580C, p.T990I und p.R353X mithilfe von Immunfluoreszenzanalyse.....	64
Abbildung 3.10: Analyse der Auswirkung der CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X auf die Transkription der Gene, die für CIC und die Folattransportproteine FR α , RFC1 und PCFT kodieren, mittels qRT-PCR.	66
Abbildung 3.11: Analyse des radioaktiven Bindungsassays mit stabil transfizierten HeLa-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von CIC und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X auf die [3 H]-Folsäurebindung.....	68

Abbildung 3.12: Western Blot Analyse stabil transfizierter Caco-2-Zellen zum Nachweis der Expression der CIC-Mutanten p.T990I und p.R353X. 70

Abbildung 3.13: Quantifizierung der Proteinintensitäten von CIC für die CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X in Caco-2-Zellen. 71

Abbildung 3.14: Western Blot Analysen stabil transfizierter Caco-2-Zellen zum Nachweis der Expression der CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X. 72

Abbildung 3.15: Quantifizierung der Proteinintensitäten des FR α im Leervektor und den CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X in Caco-2-Zellen. 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Herstellerangaben.....	11
Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Software mit Herstellerangaben.....	14
Tabelle 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen mit Komponenten zur Herstellung.	16
Tabelle 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.	17
Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper mit Zielprotein/Epitop, Bezeichnungen und Herstellerangaben.	19
Tabelle 2.6: Angaben zu den verwendeten Primern mit zu amplifizierendem/r Gen(sequence), Bezeichnung und Basensequenz des Primers und Annealing-Temperatur.....	19
Tabelle 2.7: Eigenschaften der untersuchten Missense-Mutationen aus gnomAD, Stand: 11.03.2022.....	21
Tabelle 2.8: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierungs-PCR im Thermocycler.	25
Tabelle 2.9: Reaktionsbedingungen der PCR im Thermocycler.	27
Tabelle 2.10: Reaktionsbedingungen für die Mutagenese nach der QuikChange II XL Methode.	28
Tabelle 2.11: Reaktionsbedingungen für die Mutagenese mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase.....	29
Tabelle 2.12: Reaktionsbedingungen für die Q5® Site-Directed Mutagenese.	30
Tabelle 2.13: Zur Transformation verwendete Bakterienstämme.....	31
Tabelle 2.14: Pipettierschema der Standardkurve des BCA-Tests.	42
Tabelle 2.15: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Trenngels.	43
Tabelle 2.16: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Sammelgels.	43

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BLS	Blut-Liquor-Schranke
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
Caco-Zellen	<i>cancer coli cells</i> , heterogene, humane Epithelzellen des kolorektalen Adenokarzinoms
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFD	<i>cerebral folate deficiency</i>
CFTD	zerebrale Folattransportdefizienz
CIC	Capicua
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylprocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	erweitertes GFP
ETS	<i>E-twenty-six</i>
F	<i>forward</i>
Fc-Region	<i>fragment crystallizable region</i> , kristallisierbare Fragmentregion
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
<i>FOLR1</i> -Gen	Folatzeptor 1 Gen
FR α	Folatzeptor α
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphoinositol
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	humane Zellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
H ₂ O	destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
ILV	intraluminale Vesikel
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i>

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MTHF	Methyltetrahydrofolat
MVB	<i>multivesicular body</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCFT	protonengekoppelter Folattransporter
P _{CMV IE}	<i>human cytomegalovirus immediate early promoter</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	<i>reverse</i>
rDNA	ribosomale DNA
RFC	<i>Reduced Folate-Carrier</i>
RPLP0	<i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	Svedberg
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	statistischer Standardfehler
TAE	Trisacetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZK	Zellkern
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Folat

Folat bezeichnet das natürlich vorkommende hydrophile Vitamin B9 und setzt sich zusammen aus einem Pteridin-Derivat und *para*-Aminobenzoesäure sowie einem oder mehreren Glutaminsäureresten. Bei Folsäure handelt es sich um das synthetisch hergestellte, oxidierte, stabilere Derivat des Folats mit i. d. R. einem Glutaminsäurerest (Monoglutamat). Diese wird doppelt so gut über den Dünndarm aufgenommen wie Folat (Milman 2012), sodass sie in Nahrungsergänzungsmitteln verwendet wird. Im menschlichen Körper wird die aufgenommene Folsäure in zwei Reaktionsschritten durch das Enzym Dihydrofolatreduktase zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat reduziert. Folat wurde erstmals 1930 von Lucy Wills als hämatopoetischer Faktor identifiziert, der bei einem Mangel zu einer makrozytären Anämie führt (Rosenberg 2012). Namensgebend war das Vorkommen in grünem Blattgemüse, 1941 veröffentlicht von Mitchell, Snell und Williams (Welch 1983; Mitchell et al. 1941). Reich an Folsäure sind außerdem Hülsenfrüchte, Speisekleie, Spinat, Feldsalat, Leber und verschiedene Kohlrarten. Die biologisch aktiven Formen sind das 5,6,7,8-Tetrahydrofolat und dessen Derivate, wie das in Abbildung 1.1 (S. 2) dargestellte 5-Methyl-THF (5-MTHF), das diagnostisch in Blut und Liquor gemessen werden kann. THF wird benötigt, um in der *de novo* Synthese von Nukleotiden C1-Einheiten zu übertragen (Blount et al. 1997). Ein wichtiger Stoffwechselfvorgang, der durch 5-MTHF unterstützt wird, ist die Konversion von Homocystein in Methionin und die Bildung des Methylgruppen-Donors S-Adenosylmethionin (Ramaekers und Blau 2004). N5-N10-Methylentetrahydrofolat fungiert als Cofaktor für die Thymidylatsynthase (Das und Herbert 1989). Es ist entscheidend für viele biologische Prozesse wie die Synthese von Desoxyribonukleinsäuren (DNS) und Ribonukleinsäuren (RNS), Reparatur, Regulation der Genexpression und die Synthese von Neurotransmittern und Proteinen (Fournier et al. 2002). Es erhält Zellteilung und -wachstum aufrecht und ist somit insbesondere in schnell proliferierenden Geweben von Bedeutung. Die Bedeutung von Folat zur Verminderung von Tumorentstehung wird in vielen Studien diskutiert (Pieroth et al. 2018). Folat spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktion von Homocystein zu Methionin, sodass es u.a. in der Prävention kardiovaskulärer Risikofaktoren bedeutend ist (Balint et al. 2020). Khosravi und Sotoudeh et al. (2020) beschrieben eine Assoziation zwischen niedrigem Serumfolatspiegel und erhöhtem Risiko für Depressionen und weiteren psychischen Erkrankungen. Eine präkonzeptionelle Substitution von Folsäure trägt pränatal zur Vorbeugung von Störungen in der Organogenese bei, die zu Neuralrohrdefekten, beeinträchtigtem Gaumenschluss und anderen Fehlbildungen führen können. Die das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffenden Funktionen

des Folats werden verdeutlicht im Kapitel zur zerebralen Folatdefizienz (Kap. 1.4, S. 5). Folat übernimmt im menschlichen Körper überlebenswichtige Aufgaben, sodass laut Bundesamt für Gesundheit eine ausreichende Versorgung der gesamten Bevölkerung empfohlen wird.

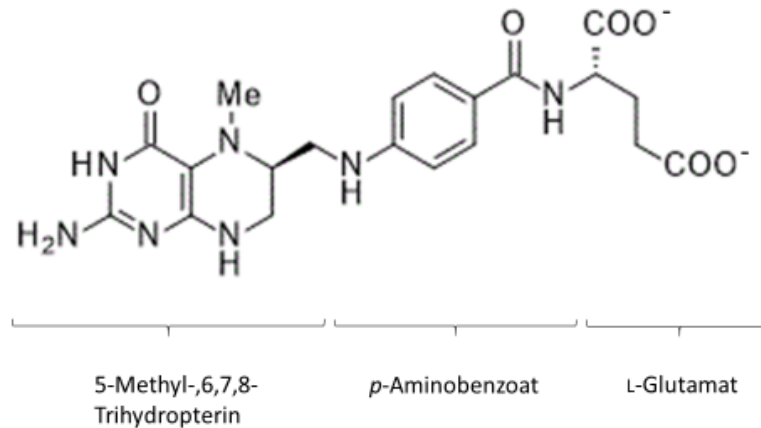


Abbildung 1.1: Strukturformel von *N*⁵-Methyl-Tetrahydrofolat (5-MTHF) mit Kennzeichnung der Bestandteile 5-Methyl-6,7,8-tetrahydrobiopterin, *p*-Aminobenzoat und L-Glutamat.

1.2 Folattransport und Folattransportproteine

In der Nahrung liegt Folat überwiegend als Polyglutamat vor. Die Aufnahme erfolgt größtenteils über das Duodenum und das proximale Jejunum (Qiu et al. 2006). Zur Absorption über das Endothel muss dieses enzymatisch in Monoglutamate gespalten werden, dies erfolgt über die γ -Glutamyl-Carboxypeptidase. Die Resorption ist pH-abhängig und hat ein Maximum bei einem pH von 6,0. In den Enterozyten wird das Monoglutamat zum biologisch aktiven 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF) umgewandelt und als 5-Methyl-THF (MTHF), 10-Formyl-THF oder überwiegend als freies THF zur Leber transportiert, dem hauptsächlichen Speicherort für Folat. Dort kommt es zur Methylierung und in geringerem Maße zur Formylierung des THF, sodass das im Blut zirkulierende Folat überwiegend als 5-MTHF vorkommt und ca. zur Hälfte unspezifisch an Albumin, Transferrin oder α -Makroglobulin, zu einem geringen Teil an spezifische Folatbindeproteine gebunden ist. Über den Blutkreislauf wird das Folat im Organismus verteilt. Der Transport über Zellmembranen erfolgt im Wesentlichen über drei Systeme, den protonengekoppelten Folattransporter (PCFT), den *Reduced Folate-Carrier* (RFC) und die Folatrezeptoren (FR) FR α , FR β und FR γ (Steinfeld et al. 2009). Der RFC wird ubiquitär exprimiert, besonders hoch ist die Expression in den Enterozyten des Darms. In geringerem Maße wird dieser auch im Gehirn exprimiert, hier u.a. in den Zellen des Plexus choroideus (Wang et al. 2001). Es handelt sich um einen Antiporter, der 5-MTHF gegen organische oder anorganische Anionen austauscht. Die Affinität zu Folat ist relativ gering, das pH-Optimum liegt bei 7,4 (Zhao et al. 2011). Die Aufnahme von Folat in die Dünndarm-Enterozyten erfolgt über den

PCFT, einen Protonen-Kotransporter mit einem pH-Optimum bei 5,5 (Grapp et al. 2013). Er wird ebenfalls in vielen anderen Geweben exprimiert, u.a. im Gehirn. Der FR α wird nach Zhao et al. (2011) und Steinfeld et al. (2009) von epithelialen Geweben vor allem im Plexus choroideus, der Lunge, der Schilddrüse und renalen Tubuluszellen exprimiert, der FR β vor allem in mesenchymalen und blutbildenden Zellen. Die FRs sind über eine Glykosylphosphoinositol(GPI)-Domäne in der Zellmembran verankert und binden Folat mit besonders hoher Affinität. Es wird angenommen, dass der Transport von Folat über Membranen durch die FRs über Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt. Folat bindet über den FR α basolateral an die Zellmembran der Epithel-Zellen des Plexus choroideus, die Membran invaginiert und Folat, gebunden an FR α , wird intrazellulär in spezialisierte endosomale Kompartimente eingeschlossen und dann in *multivesicular bodies* (MVBs) überführt. Durch Fusion der MVBs mit der apikalen Zellmembran werden FR α -enthaltende intraluminale Vesikel (ILV) in den Liquor freigesetzt. Von hier an werden diese Vesikel als Exosomen bezeichnet, die wahrscheinlich über Ependymzellen aufgenommen werden und so zu Astrozyten und Neuronen gelangen (Grapp et al. 2013). Der angenommene Transport von Folat über die Blut-Liquor-Schranke in den Zellen des Plexus choroideus ist schematisch in Abbildung 1.2 (S.4) dargestellt. Unbeeinträchtigte Transportmechanismen von Folat über die Darmwand, die Plazenta und die Blut-Liquor-Schranke sind entscheidend, um das Gehirn und die anderen Organe ausreichend mit Folat zu versorgen (Ramaekers und Blau 2004).

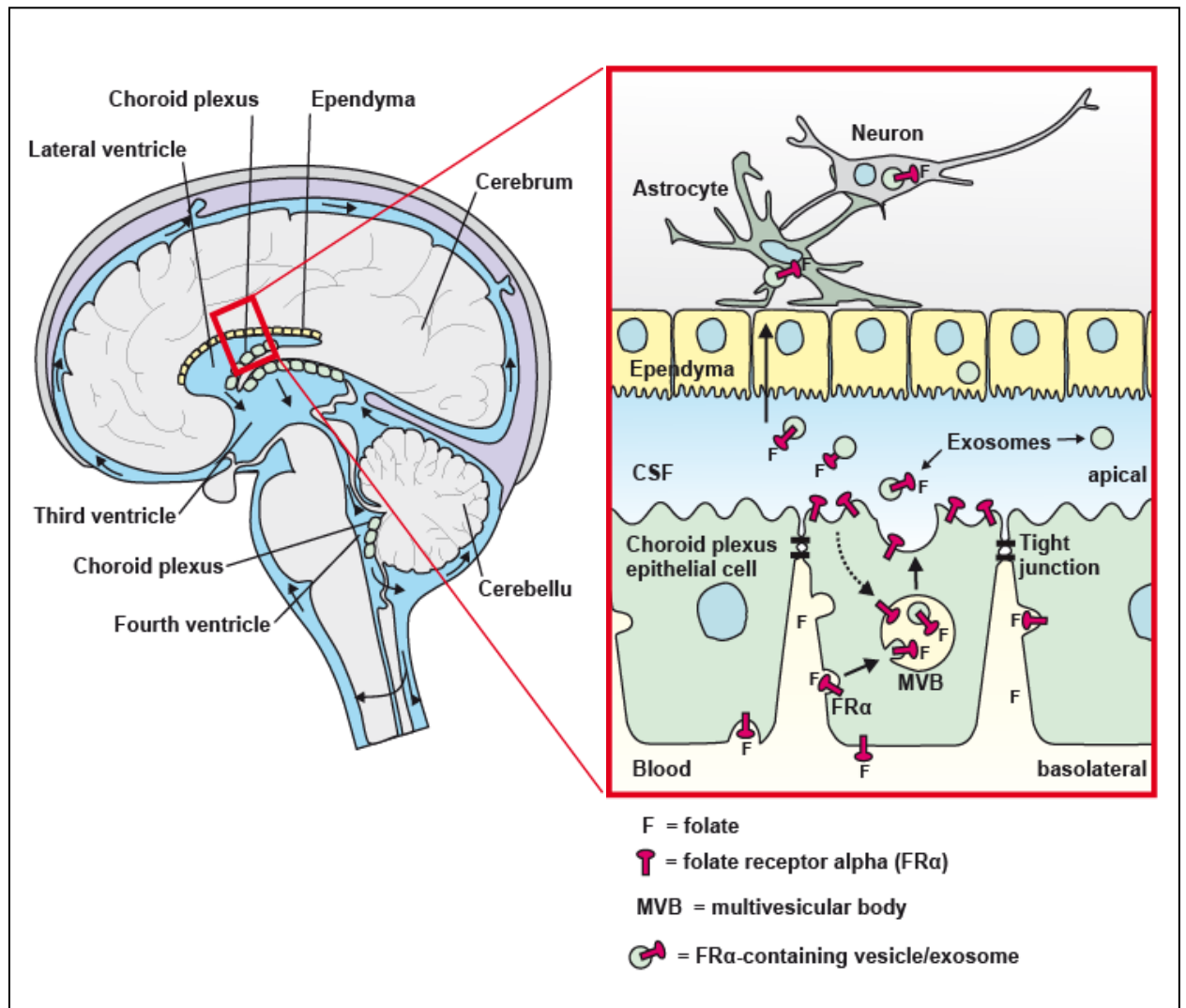


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung des Folattransports über die Blut-Liquor-Schranke nach Grapp et al. (2013). 5-MTHF bindet basolateral der Zelle des Plexus choroideus an den FR α . Durch Rezeptorvermittelte Endozytose wird der 5-MTHF-FR α -Komplex internalisiert und zu MVBs überführt. Durch Fusion der MVB-Membran mit der apikalen Membran der Plexus-choroideus-Zelle werden FR α -enthaltende intraluminal Vesikel in den Liquor freigesetzt, wo diese als Exosomen bezeichnet werden.

1.3 Systemische Folatdefizienz

Folat ist ein essenzielles Vitamin und kann nicht vom menschlichen Körper synthetisiert, sondern muss über die Nahrung aufgenommen werden. Der Körper hat einen Folatspeicher von etwa 1000-10000 μg , Erwachsene benötigen eine tägliche Zufuhr von ca. 400 μg , um den Verbrauch auszugleichen. Bei einer Halbwertszeit von ca. 100 Tagen (Butterworth und Bendich 1996) kommt es bei unzureichender Zufuhr nach ca. 8 bis 16 Wochen zu einem Mangelzustand. Gründe für Folatmangel sind eine unzureichende Aufnahme, erhöhter Bedarf, Malabsorption, Enzymdefekte oder genetische Veränderungen, die den Folatmetabolismus oder -transport im Körper beeinflussen. Der häufigste Grund ist eine ungenügende Aufnahme, diese tritt insbesondere bei Mangelernährung oder erhöhtem Alkoholkonsum auf (Khan und Jialal 2022). Die

Absorption kann beeinträchtigt werden durch Darmerkrankungen wie Zöliakie, Kurzdarmsyndrom oder einen erhöhten intestinalen pH-Wert. Medikamente wie Methotrexat, Phenytoin, Sulfasalazin und Trimetoprim können die biologische Wirkung von Folat antagonisieren bzw. die Absorption oder die Konversion in die aktive Form beeinträchtigen. U.a. bei Frauen in der Schwangerschaft und Stillzeit oder Patienten mit hämolytischer Anämie besteht ein erhöhter Bedarf. Klinisch kann sich ein Folatmangel mit verminderter Leistungsfähigkeit, Blässe, Glossitis oder neurologischen Auffälligkeiten wie kognitiven Einschränkungen, Depression oder Demenz präsentieren. Laborchemisch können in der Basisdiagnostik neben einem niedrigen Folatspiegel Zeichen einer makrozytären Anämie festgestellt werden. Weltweit betrachtet ist der Folatmangel eine der häufigsten Vitamin-Defizienzen, ein Zusammenhang zwischen Folatkonzentration, geographischer Verteilung, Entwicklungsstand oder Bevölkerungsgruppen konnte noch nicht festgestellt werden (McLean et al. 2008). Laut Robert-Koch-Institut sind 86 % der Erwachsenen in Deutschland ausreichend mit Folat versorgt, eine generelle Empfehlung zur zusätzlichen Substitution von 400 µg Folsäure pro Tag besteht in Deutschland aktuell nur für Frauen vier Wochen präkonzeptionell bis zum Ende des ersten Trimenons, um insbesondere Neuralrohrdefekte zu verhindern (Mensink et al. 2016). Zu beachten ist, dass Kinder und Jugendliche mit am gefährdetsten von ernährungsbedingter Folatdefizienz sind (Steinfeld et al. 2009).

1.4 Zerebrale Folatdefizienz

Neben der systemischen Folatdefizienz kann ein isolierter zerebraler Folatmangel bestehen, bei dem die Konzentration von 5-MTHF im Liquor erniedrigt ist, aber der Folatspiegel im Serum im Normbereich liegt. Generell kann ein zerebraler Folatmangel im Rahmen einer oben beschriebenen systemischen Folatdefizienz auftreten. Bei der im Folgenden beschriebenen isolierten zerebralen Folatdefizienz (isolierte CFD) handelt es sich um ein neurologisches Syndrom, das mit einem zerebralen Mangel insbesondere an 5-MTHF assoziiert ist, dem aktiven Folatmetaboliten, und mit normwertigem peripherem Folatspiegel einhergeht. Bei normwertigem Folat im Serum kann der Mangel entweder Folge eines gestörten Transports über die Blut-Liquor-Schranke oder eines erhöhten zerebralen Umsatzes von Folat sein (Ramaekers und Blau 2004). Die Ursachen der CFD sind noch nicht abschließend geklärt. Beschrieben wurden Autoantikörper, die sich gegen den FR α richten (Ramaekers et al. 2005) sowie Mutationen in Genen, die den Folattransport und -metabolismus betreffen, die u.a. für die Dihydrofolatreduktase, den PCFT oder den FR α kodieren (Steinfeld et al. 2009; Pérez-Dueñas et al. 2010; Grapp et al. 2012). Die den FR α betreffende Erkrankung wird auch als zerebrale Folattransportdefizienz (CFTD)

bezeichnet, um zu verdeutlichen, dass ihr ein gestörter Folattransport ins Gehirn zugrunde liegt. Finnell und Cabrera et al. stellten erstmals einen Zusammenhang zwischen CFD und Mutationen im Transkriptionsfaktor Capicua (CIC) dar (Frigerio et al. 2019). Dieser Einfluss soll im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersucht werden.

Eine sekundäre zerebrale Folatdefizienz wurde assoziiert mit zugrunde liegenden Störungen wie Enzymdefekten der 5,10-Methylen-Tetrahydrofolatreduktase, der 3-Phosphoglyzeratdehydrogenase, der Dihydrofolatreduktase oder der Dihydropteridinreduktase, mit der hereditären Folatmalabsorption, der Einnahme von Antikonvulsiva oder Folatantagonisten sowie neurologischen Erkrankungen wie dem Rett-Syndrom, Aicardi-Goutières-Syndrom, Kearns-Sayre-Syndrom oder mitochondrialen Störungen (Mangold et al. 2011; Hyland et al. 2010).

Fallstudien zeigten, dass bei der klinisch beschriebenen, initial als idiopathisch bezeichneten CFD, nach zunächst normaler Entwicklung erste Symptome wie Agitiertheit und Schlafstörungen ab dem Alter von vier bis sechs Monaten auftreten können. Bei Progredienz der Erkrankung traten psychomotorische Retardierung, Dyskinesien wie choreoathetischen Handbewegungen, zerebelläre Ataxie, spastische Diplegie und Mikrozephalie auf. Ab dem Alter von drei Jahren wurden Sehstörungen, ab dem sechsten Lebensjahr Hörstörungen festgestellt. Bei einem Teil der Patienten kam es zu Autismus oder Epilepsien mit myoklonisch-astatischen, generalisiert tonisch-klonischen Anfällen oder Absenzen (Hyland et al. 2010; Mangold et al. 2011; Ramaekers und Blau 2004). Insgesamt zeigte sich eine sehr heterogene Ausprägung der klinischen Manifestation, die der heterogenen Ursache dieses Symptomenkomplexes geschuldet ist.

Diagnostisch ist die Bestimmung der 5-MTHF-Konzentration im Liquor durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die des peripheren Folatstatus erforderlich, des Weiteren magnetresonanztomographische Bildgebung (MRT), Spektroskopie und ggf. genetische Diagnostik sowie Antikörper-Bestimmung (Pérez-Dueñas et al. 2010; Grapp et al. 2012). Weitere neurologische Diagnostik mittels Elektroenzephalografie (EEG) und Neurophysiologie kann bei weiteren Symptomen wie zerebralen Anfällen oder motorischen, sensiblen, visuellen oder akustischen Ausfallerscheinungen ergänzt werden. Bei Sehstörungen konnte eine Optikusatrophie sowie verlängerte Latenzen und Reduktion bis Auslöschung der Amplituden in den visuell evozierten Potentialen festgestellt werden, bei peripherer Neuropathie verlängerte Latenzen in den somatosensibel evozierten Potentialen. (Steinfeld et al. 2009; Al-Baradie und Chudary 2014; Ramaekers und Blau 2004; Grapp et al. 2012).

Patienten mit einem genetisch nachgewiesenen $FR\alpha$ -Defekt weisen im Gegensatz zu Patienten mit einer CFD anderer Ursache einen wesentlich einheitlicheren Verlauf mit definierten Symptomen auf. Mutationen im *Folatrezeptor 1* Gen (*FOLR1*) sind mit einer progredienten neurologischen Störung mit Beginn im frühen Kindesalter, meist im zweiten Lebensjahr, charakterisiert

und mit psychomotorischen Rückschritten, Ataxie und zerebralen Anfällen assoziiert. Bei der durch einen Defekt des $FR\alpha$ verursachten CFD zeigte sich ein vergleichsweise ausgeprägter zerebraler Folatmangel (Steinfeld et al. 2009; Grapp et al. 2012). Eine eindeutige Korrelation zwischen Restfunktion des $FR\alpha$ und Schwere der Symptome konnte bislang nicht festgestellt werden. In der MRT zeigten sich Auffälligkeiten insbesondere der weißen Substanz im Sinne einer gestörten Myelinisierung oder fronto-temporale bzw. zerebelläre Atrophie. In der Spektroskopie konnte eine Depletion von Cholin und Inositol in der weißen Substanz festgestellt werden. Im EEG zeigten sich u.a. generalisierte Verlangsamung oder multifokale epileptische Potentiale als Korrelat der zerebralen Anfälle (Grapp et al. 2012).

Die Therapie der CFD erfolgt i .d. R. mit Calciumfolinat, das oral, intravenös und intrathekal verabreicht werden kann. Es zeigte sich in vielen Fällen ein gutes Therapieansprechen mit klinischer Besserung, Normalisierung der 5-MTHF-Konzentration im Liquor und der neurophysiologischen Befunde, rückläufiger Cholin- und Inositoldepletion sowie Zeichen der Remyelinisierung in der MRT. Bei frühem Therapiebeginn direkt bei auftretenden Symptomen konnte eine weitere klinische Ausprägung verhindert werden (Steinfeld et al. 2009; Hyland et al. 2010; Grapp et al. 2012). Kinder, die jenseits des sechsten Lebensjahrs therapiert wurden, zeigten ein geringeres Therapieansprechen mit unvollständigem Rückgang der Symptomatik (Ramaekers und Blau 2004; Grapp et al. 2012).

1.5 Capicua (CIC)

Das Protein CIC ist ein High-Mobility Group-Box Transkriptionsfaktor, der in Signalkaskaden den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK) nachgeschaltet ist. Diese Signalwege sind evolutionär hochkonserviert und regulieren viele Entwicklungsprozesse (Jiménez et al. 2000). Der Name Capicua leitet sich ab von der katalanischen Bedeutung „Kopf und Schwanz“, da CIC erstmals 2000 in *Drosophila melanogaster* als transkriptioneller Repressor identifiziert wurde, der in der Embryogenese die Bildung der Kopf- und Schwanzregion reguliert (Jiménez et al. 2000). In den meisten Studien wurde CIC bislang als transkriptioneller Repressor beschrieben. In den RTK-Signalkaskaden fungiert CIC als negativer Regulator, eine RTK-Aktivierung fördert den Abbau und/oder die Translokation von CIC durch Phosphorylierung. Dadurch wird die Expression von RTK-nachgeschalteten CIC-Zielgenen induziert (Lee 2020). CIC wurde konserviert in Nessel-tieren, Wirbeltieren, Mäusen und im Menschen (Jimenez et al. 2012). Es werden zwei Isoformen exprimiert, die kurze Version (CIC-S) und die lange Version (CIC-L), dargestellt in Abbildung 1.3 (S. 8). Diese unterscheiden sich in ihrer Größe und der N-terminalen Region. CIC-L beinhaltet ein verlängertes N-

terminales Segment, dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist (Jimenez et al. 2012). Die meisten Untersuchungen und auch die vorliegende Arbeit beziehen sich auf CIC-S, im Folgenden als CIC bezeichnet. CIC besitzt zwei hochkonservierte Domänen, die HMG-Box und ein C-terminales Motiv (C1). Die HMG-Box erkennt die oktamere Sequenz T(G/C)AATG(G/A)A im Promotor von Zielgenen und vermittelt unter Mitwirkung des C1-Motivs die Bindung an die DNS (Forés et al. 2017). Zu beachten ist, dass die in humanem CIC identifizierte Kernlokalisationssequenz (NLS) nicht konserviert ist (Jimenez et al. 2012). Die bislang am besten charakterisierten Zielgene von CIC sind die onkogenen *E-twenty-six*(ETS)-Transkriptionsfaktoren ETV1, 4 und 5, die den RTK und MAPK-Signalkaskaden nachgeschaltet sind. Einige Studien bestätigten, dass CIC in diversen Tumorarten als Tumorsuppressor funktioniert (Simón-Carrasco et al. 2018; Wong und Yip 2020). Des Weiteren spielt CIC eine Rolle in vielen biologischen Prozessen wie der Lungenentwicklung, Leberhomöostase, Autoimmunität und verhaltensneurologischen Effekten (Simón-Carrasco et al. 2018). Lu et al. beschrieben, dass CIC einen Co-Repressor-Komplex mit dem Protein Ataxin 1 (ATXN1) und dem paralogen Protein Ataxin 1-like (ATXN1L) bildet. CIC bindet diesen Komplex an die DNS der Zielgene und beeinflusst so deren Expression. Ein Funktionsverlust resultiert in vielfältigen neurologischen Auffälligkeiten wie intellektuellen Defiziten, Hyperaktivität oder Störungen des Sozialverhaltens, was die Annahme stützt, dass ein funktionsfähiger ATXN1-CIC-Komplex entscheidend ist für eine normale Hirnentwicklung (Lu et al. 2017).

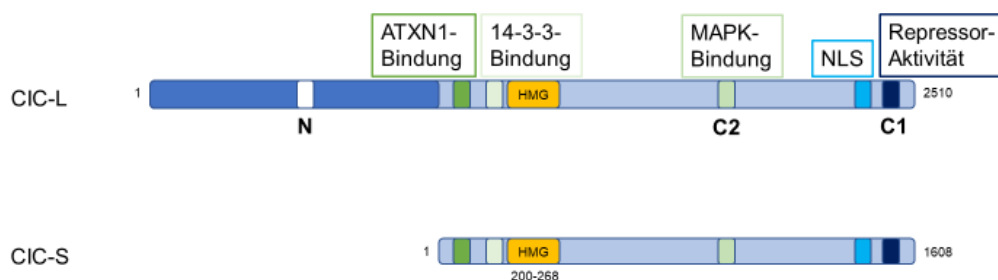


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Gene der beiden CIC-Isoformen CIC-L und CIC-S mit den relevanten Bindungsstellen für ATXN1, das 14-3-3-Protein und die MAPK (C2), der HMG-Box an Position 200-268, der Kernlokalisationssequenz (NLS) sowie der Repressor-Aktivitäts-Sequenz (C1) und Angabe der Gesamtbasenpaare. CIC-L enthält zusätzlich das N-terminale Motiv (N).

1.5.1 Die Funktion von CIC für den zerebralen Folattransport

R. Finnell und R. Cabrera (Houston, Texas) untersuchten Patienten mit CFD und Hinweisen auf einen gestörten zerebralen Folattransport ohne ursächliche Mutationen in den für den Folattransport relevanten Genen *FOLR1*, *RFC1* und *PCFT* (Frigerio et al. 2019). Klinisch präsentierten sich diese Patienten mit heterogenen Symptomen wie Autismus, intellektuellen Einschränkungen oder Epilepsie (Lu et al. 2017). Durch Genom-Sequenzierung wurden in fünf

Patienten *de novo* Stopmutationen im *CIC*-Gen detektiert. Es konnte festgestellt werden, dass die regulatorischen Regionen von allen drei Folattransporter-Genen *FOLR1*, *RFC1* und *PCFT* das *CIC*-Bindungsmotiv enthalten. *FOLR1* besitzt zwei Bindungsstellen in der Promotor-Region (Abbildung 1.4, S. 9). Die Bindung von *CIC* an diese Gene wurde durch Chromatin-Immunoprecipitations-Assays bestätigt. Es erfolgten Studien mit *CIC*-knockout-Mäusen, die zu den CFD-Patienten vergleichbare Phänotypen zeigten. Diese unterstützten die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen *CIC*-Mutationen und CFD (Frigerio et al. 2019).

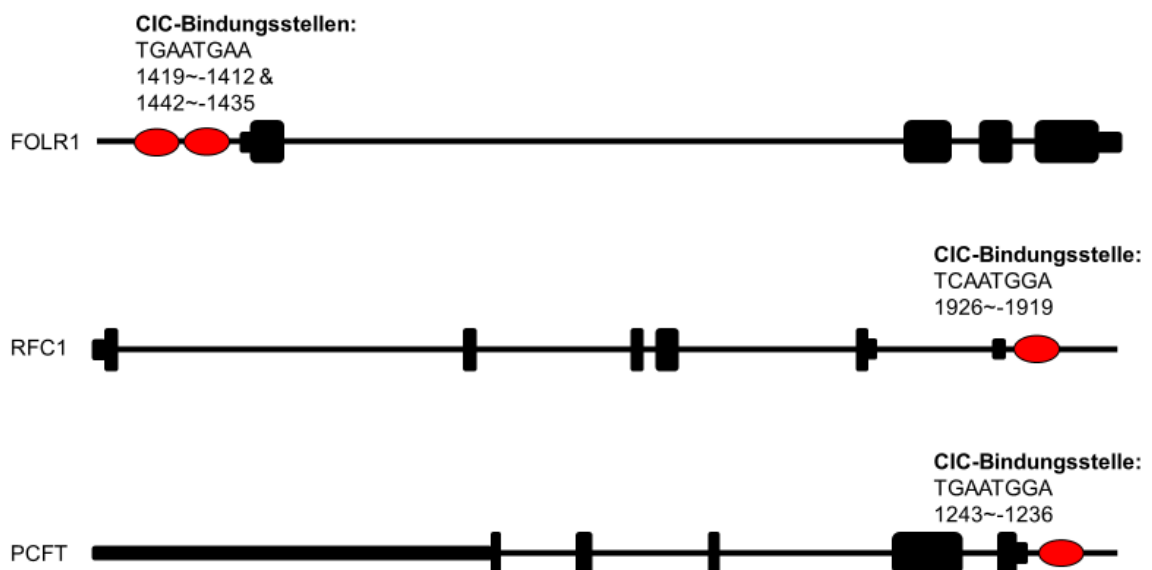


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Gene *FOLR1*, *RFC1* und *PCFT* mit den *CIC*-Bindungsstellen (rot), Angabe der Oktamer-Sequenz und Position der Basenpaare.

1.5.2 Mutationen im *CIC*-Gen

Beim Menschen ist *CIC* auf dem langen Arm des Chromosom 19 (19q13.2) lokalisiert und beinhaltet 20 Exons (Wong und Yip 2020). Lu et al. (2017) untersuchten die Funktion von *CIC* anhand von vier Stopmutationen, alle Patienten trugen heterozygote Mutationen. Sie postulierten, dass diese Mutationen durch *nonsense-mediated decay* zum Funktionsverlust des Proteins führen. Untersucht wurden Fibroblasten des Patienten mit der Mutation p.R353X. Der Einfluss dieser Stopmutation und außerdem der beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I auf den zerebralen Folattransport soll im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersucht werden. Die beiden Punktmutationen führen jeweils zum Austausch einer Aminosäure, bei p.G580C zum Austausch von Glycin zu Cystein und bei p.T990I von Threonin zu Isoleucin. Durch die Mutation p.R353X entsteht ein Stopcodon. Die Lokalisation der Mutationen und das durch das Stopcodon verkürzte Gen sind in Abbildung 1.5 (S. 10) dargestellt. Abgesehen von der *CIC*-Mutation wurden keine weiteren Mutationen in den bisher bekannten krankheitsverursachenden Genen detektiert, die für den Phänotyp der Patienten ursächlich sein könnten.

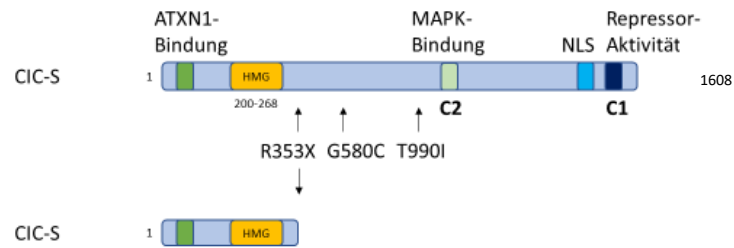


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Gens *CIC-S* mit Positionsangabe der Mutationen p.R353X, p.G580C und p.T990I (Pfeile) und Darstellung des verkürzten *CIC*-Gens der Stopmutation p.R353X (unten).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand der Stopmutation p.R353X und der beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I im *CIC*-Gen der Einfluss des Proteins *CIC* auf den zerebralen Folattransport untersucht werden. Anhand von Western Blot Analysen wird die vollständige Proteinexpression untersucht, mittels Immunfluoreszenzen (IF) kann dargestellt werden, an welchem Ort der Zelle das *CIC*-Protein lokalisiert ist. In der qRT-PCR kann die Expression der RNS überprüft werden und mit radioaktiven Bindungsassays wird die Folsäurebindungskapazität der Zellen untersucht. Anhand dieser Methoden soll somit der Einfluss des Proteins *CIC* auf Expression, Lokalisation und Rezeptorbindung untersucht werden. Lu und Tan et al. beschrieben bereits einen möglichen Einfluss anhand von Stopmutationen, dies soll hier weitergehend analysiert und des Weiteren geprüft werden, ob der Einfluss ebenfalls anhand von Missense-Mutationen nachgewiesen werden kann.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Herstellerangaben.

Substanz/Kit	Hersteller
Acrylamid-Mix, Rotiphorese® Gel 30, 30 % Acrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Bioline, Luckenwalde
10 % Ammoniumpersulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Uptima, Interchim, Frankreich
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BCA-Assay Reagent Kit	Interchim
Benzonase	Abcam
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, England
Bovines Serumalbumin (BSA)	Interchim
Calciumchlorid (CaCl_2), 2 M	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CutSmart Puffer	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	Serva, Heidelberg
dNTPs, 3,75 mM	PEQLAB Biotechnologie GmbH
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM), 1 g/L D-Glukose	Biochrom GmbH
Effectene® Transfection Reagent (Kit)	Qiagen, Hilden
Ethanol (EtOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum, FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Folsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH
^3H -Folsäure	Hartmann Analytic, Braunschweig
Formamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
GelRed™	BioTrend

Substanz/Kit	Hersteller
GeneRuler™, DNA Ladder Mix	Fermentas Life Science
D-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, Österreich
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Größenmarker	Thermo Scientific
H ₂ O, Ribonuklease(RNase)-frei	Qiagen GmbH, Hilden
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES), pH 7,05	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
KAPAHiFi™ DNA Polymerase	Kapa Biosystems
LB-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ligase-Puffer (für T4-Ligase)	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Lösung A (BCA Assay Reagent A)	Interchim, Frankreich
Lösung B (BCA Assay Reagent B)	Interchim, Frankreich
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Myco-3	AppliChem GmbH
Magnesium (Mg ²⁺)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 25 mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Methanol (MeOH)	VWR International
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Moviol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat (NaAc) (3 M, pH 4,6)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) (4 M)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH
NEBuffer 1.1	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.

Substanz/Kit	Hersteller
NEBuffer 2.1	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
NEBuffer 3.1	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
NucleoBond® Xtra Midi Plasmid DNA purification (Kit)	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Kit)	Machery-Nagel, Düren
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Paraformaldehyd (PFA)	USB®, Cleveland, Ohio, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Dulbecco's	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
pMD2.G	Addgene
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Polybrene	Santa Cruz Biotechnology
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ponceau S Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH
psPAX	Addgene
10 x Puffer (PCR)	Qiagen, Hilden
Puromycin	InvivoGen
Q-Solution	Qiagen, Hilden
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
qRT-PCR-Mastermix	Thermo Fisher Scientific
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Restriktionsenzym BamHI	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzym CpoI	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsenzym DpnI	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzym EcoRI HF	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzym NotI	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzym Sall	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzym SmaI	Thermo Fisher Scientific
2 x RNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
RNA purification from cultured cells and tissue (Kit)	Machery-Nagel, Düren

Substanz/Kit	Hersteller
RNase A	Fermentas Life Science
RNase Away	Molecular CioProducts, Inc., San Diego, CA
Spin column purification (Aufreinigung nach Linearisierung)	Machery-Nagel, Düren
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific
SYBR® Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific
Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™)	PerkinElmer, Waltham USA
T4-Ligase	New England BioLabs®, Frankfurt a.M.
<i>Thermus aquaticus</i> (Taq)-Polymerase	Qiagen, Hilden
N, N, N' N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (1 M, pH 6,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Karlsruhe
Tris (1,5 M, pH 8,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton® 0,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA in PBS (0,5 %)	Biochrom GmbH
Tween® 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH

2.2 Geräte und Software

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Software mit Herstellerangaben.

Gerät/Software	Hersteller
ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav	Tecnomara, Schweiz
BCA-Assay-Auslesegerät	BioTek® Instruments, Winooski, U.S.A.
Bunsenbrenner	CampingAZ, Hungen-Inheiden
Cryo-Container Nalgene®	Nalge Nunc International, USA
Rotator	Cole-Parmer
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen Isernhagen
Elektrophoresekammer (PCR)	Owl Separation Systems, USA; Biometra®, Göttingen
Elektrophoresekammer (WB)	Bio-Rad, München

Gerät/Software	Hersteller
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.1	Zeiss, Göttingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz; Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Heizblock	Biometra, Göttingen
Inkubatoren	Thermo Scientific; Memmert, Schwabach
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laminiergerät	Severin, Münster
Luminescent Image Analyzers LAS 4000	FUJI Film, Düsseldorf
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Multipette® Plus	Eppendorf AG
NanoDrop® ND 1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH + CO. KG
PC-Programme	Axio Vision 4.8, Bio Doc Analyzer 2.0, BioRad IQ5, Gen 5 1.11, GraphPad Prism 8.4.2, ImageJ 1.49, LAS 4000 Analyzer, Microsoft Office 365 ProPlus Word, Microsoft Office 365 ProPlus Excel, Microsoft Office 365 ProPlus PowerPoint, SeqMan Pro
PCR-Geräte	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Schott Geräte, Mainz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipette 10 µl	Gilson, Pipetman, Frankreich
Pipette 20 µl	Gilson, Pipetman, Frankreich
Pipette 100 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipette 200 µl	Gilson, Pipetman, Frankreich
Pipette 1000 µl	Gilson, Pipetman, Frankreich
Real-Time PCR Detection System (MyiQ™ Single Color)	Bio-Rad Laboratories
Schüttelinkubator	Infors HAT, Schweiz; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schwenktisch (Rocking Platform)	Biometra, Göttingen

Gerät/Software	Hersteller
Sterilbank (LaminAir HB2448)	Heraeus
Stromgeber	Biometra, Göttingen; Consort, Belgien; Sarstedt-Gruppe, Bonn
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg; HLC Bio Tech, Bovenden
Transferkammer (Fastblot)	Biometra, Göttingen
UV-Lampe für Agarose-Gele (Bio Doc Analyzer)	Biometra, Göttingen
UV-Lampe	Nikon Corporation
Vortex-Mixer	Velp Scientifica, Italien; Bender und Hobein, Schweiz
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel; Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen mit Komponenten zur Herstellung.

Puffer/Lösung	Herstellung
Acid Puffer (Bindungsassay)	10 mmol/L NaAc, 150 mmol/L NaCl (pH 3,5)
Agarosegel 0,8 %	0,8 % Agarose, 0,0005 % GelRed™ in Trisacetat EDTA (TAE)-Puffer
Agarosegel 1 %	1 % Agarose, 0,0006 % GelRed™ in TAE-Puffer
Agarosegel 1,5 %	1,5 % Agarose, 0,0008 % GelRed™ in TAE-Puffer
Blockier Puffer	5 % Milchpulver in TBS-T
2 x DNA-Präzipitationspuffer	50 nM HEPES (pH 7,05), 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 12 mM Glukose
Einfriermedium	DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO
HEPES-gepufferte Salzlösung (HBS) Puffer (Bindungsassay)	20 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl ₂ , 5 mmol/L Glucose (pH 7,4)
Ladepuffer	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
4 x Laemmli Puffer (SDS-PAGE)	Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau
<i>Lysogeny broth</i> (LB-Medium)	5 g Trypton ohne Pepton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 500 ml H ₂ O
Lysepuffer	25 mM Tris-HCL (pH 7,5) mit 1 % SDS
PBS (Bindungsassay)	400 g NaCl, 10 g KCl, 72 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 10 g KH ₂ PO ₄ auf 5 l H ₂ O (pH7,4)

Puffer/Lösung	Herstellung
Puffer P1	50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA
Puffer P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
Puffer P3	3 M Na-Acetat (pH 5,5)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Laufpuffer	3 g Tris-Base, 14,4 g Glycin, 10 ml 10 % SDS, 1 l H ₂ O
Sekundärantikörper-Lösung	1 µl Antikörper, 30 µg Milchpulver in 3 ml TBS-T
Stripping-Puffer	1,5 g Glycin/HCl, 0,1 g SDS, 1 ml Tween auf 100 ml H ₂ O (pH 2,2)
50 × TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer)	242 g Tris Base, 47,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, 1 l H ₂ O (pH 8,0)
TBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 30 g Tris, 1 l H ₂ O, pH 7,5
TBS-T	1 l TBS, 1 ml Tween
Transferpuffer	24,8 mM Tris (3 g), 12 g 160 mM Glycin, 200 ml 20 % MeOH, 1 l H ₂ O

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.

Material	Hersteller
96-Well-Platte (BSA)	Greiner bio-one
96-Well-Platte (qRT-PCR)	Applied Biosystems
Cryotubes	Thermo Fischer Scientific, Dänemark
Deckgläschen 11 mm	Menzel-Gläser®
Falcons 15 ml (Cellstar® Tubes)	Sarstedt
Falcons 50 mL	Greiner bio-one
Filterpapier	Sartorius
Fluoreszenz Writer (Glow Writer™)	Diversified Biotech, USA
Glasflaschen (0,25 L, 0,5 L, 1 L)	DWK Life Sciences; neoLab Migge GmbH
Glaspipetten (1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt
Glasplatten (WB)	Bio-Rad
Glaszylinder	JENA ^{ER} GLAS 500, Schott, Mainz
Mini-/Midi-Röhrchen (14 mL)	Greiner bio-one
Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0,45 µm)	GE Healthcare Life Sciences
Objektträger	ORSA tec

Material	Hersteller
Pasteurpipetten	Labsolute
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen 100 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter 10 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter 100 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter 1000 µL	Sarstedt
Probenkamm 0,75 mm	Bio-Rad
Reaktionsgefäße 0,2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 2 mL	Eppendorf AG
Skalpell	Feather Safety Razor
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Greiner, Bio-One
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner, Bio-One
Zellkulturflaschen 175 cm ²	Greiner, Bio-One
Zellkulturplatten, 6-Well	Falcon
Zellkulturplatten, 12-Well	Greiner, Bio-One
Zellkulturplatten, 24-Well	Greiner, Bio-One
Zellkulturplatten, 10 cm ²	Sarstedt

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper mit Zielprotein/Epitop, Bezeichnungen und Herstellerangaben.

Zielprotein/ Epitop	Bezeichnung	Hersteller, Referenz
CIC	CIC polyclonal Antikörper	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A., LOT-Nr. RB2153996
GFP	Anti-GFP Antikörper, polyklonal, Kaninchen	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen, Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, Pennsylvania (Phillips 2001), Nr. 632381
	Living Colors® A.v. monoklonaler Antibody (JL-8)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen GFP, Takara Bio Clontech, Kalifornien, USA, LOT-Nr. A5033481
FR α	NCL-L-FRalpha	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, England (Smith et al. 2007)
RFC1	Anti-RFC Antikörper (ab62302)	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen, Abcam, Berlin
	Anti-SLC19A1 Antikörper	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen, Sigma-Aldrich, Darmstadt
PCFT	PCFT (Goldmann) Kaninchen Antikörper	Polyklonaler IgG-Antikörper aus dem Kaninchen, Abcam
β -Aktin	Maus anti- β -Aktin-Antikörper	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus, Sigma-Aldrich, München
Tubulin	Monoclonal Anti- α -Tubulin Antikörper, hergestellt in Maus	Sigma Aldrich, LOT-Nr. 078M4796V
Vinculin	Monoclonal Anti-Vinculin Antikörper hergestellt in Maus	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus, Sigma-Aldrich, München
FC-Region von Maus-AK	Anti-Mouse HRP Antikörper	Jackson ImmunoResearch
FC-Region von Kaninchen-AK	Ziege anti-Kaninchen-AK, peroxidase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch, LOT-Nr. 88813
FC-Region von Kaninchen-AK	Cy3 anti rabbit	IgG-Antikörper, Jackson ImmunoResearch, LOT Nr. 123834

2.6 Primer

Tabelle 2.6: Angaben zu den verwendeten Primern mit zu amplifizierendem/r Gen(sequenz), Bezeichnung und Basensequenz des Primers und Annealing-Temperatur.

Gen(sequenz)	Bezeichnung	Basensequenz	Annealing-Temperatur
FOLR1	hFOLR1_qRT-PCR #1-F	GAGGACAAGTTGCAT-GAGCA	60 °C
	hFOLR1_qRT-PCR #1-R	AGGTGCCATCTCTCCACAGT	60 °C
RFC1	hSLC19A1_qRT-PCR #1-F	GTCAACACGTTCTTTGCCAC	60 °C
	hSLC19A1_qRT-PCR #1-R	ATGGCCCCCAAGAAGTA-GAT	60 °C
PCFT	hSLC46A1_qRT-PCR #1-F	GGTCTTTGCCITTTGCCACTA	60 °C
	hSLC46A1_qRT-PCR #1-R	GCAGAAAAGAGAGCAC-CCTG	60 °C

Gen(sequenz)	Bezeichnung	Basensequenz	Annealing-Temperatur
RPLP0	hRPLP0_qRT-PCR-F	GGC GAC CTG GAA GTC CAA CT	60 °C
	hRPLP0_qRT-PCR-R	CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC	60 °C
GAPDH	hGAPDH_qRT-PCR-F	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	60 °C
	hGAPDH_qRT-PCR-R	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG	60 °C
CIC-Mutation G580C	CIC-S pG580C-fw	CAC CCC CTG GGG CTG GGT GTC CAG CGA CAC CTT CC	75 °C
	CIC-S pG580C-rev	GGA AGG TGT CGC TGG ACA CCC AGC CCC AGG GGG TG	75 °C
CIC-Mutation T990I	CIC-S pT990I-fw	GCC ACA CTC CCT GGA CCC ATC TCT CAG CCT CAG AAG GTC C	74 °C
	CIC-S pT990I-rev	G GAC CTT CTG AGG CTG AGA GAT GGG TCC AGG GAG TGT GGC	74 °C
CIC-Mutation R353X	CIC-S pR353X-fw	CTG GCT CAG CCC GGC CCT GAG CTT TCT CCC ACA GCG	75 °C
	CIC-S pR353X-rev	CGC TGT GGG AGA AAG CTC AGG GCC GGG CTG AGC CAG	75 °C

2.7 Untersuchte Mutationen im *CIC*-Gen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Mutationen des Gens untersucht, welches für das Protein CIC kodiert und mit dem Wildtyp (WT) des CIC-kodierenden Gens verglichen. Zur Kontrolle wurde eine mit dem leeren Vektor transfizierte Zelllinie eingesetzt. Zwei der Mutationen wurden von Dr. R. H. Finnell (Center for Precision Environmental Health, Houston, USA) übernommen, die Missense-Mutation CIC_S pG580C sowie die Stop-Mutation CIC-S pR353X, letztere veröffentlicht von Lu et al. (2017). Eine weitere Missense-Mutation, CIC-S pT990I, wurde im Labor der Pädiatrie der Universitätsmedizin Göttingen durch Sequenzierung von Patienten-DNS ermittelt und nach den für die anderen beiden Mutationen beschriebenen Methoden kloniert und transfiziert. Die beiden Missense-Mutationen sind gelistet in der Datenbank Genome Aggregation Database (gnomAD), bekannt sind die in Tabelle 2.7 genannten Merkmale (Stand: 11.03.2022). Aktuell sind in gnomAD insgesamt 22 genetische Varianten mit wahrscheinlicher Pathogenität für CIC aufgelistet (Stand: 04.01.2022).

Tabelle 2.7: Eigenschaften der untersuchten Missense-Mutationen aus gnomAD, Stand: 11.03.2022.

	p.G580C (p.Gly580Cys)	p.T990I (p.Thr990Ile)
Position	19-42794658-G-T	19-42796320-C-T
Ges. gezählte Allele	11	2
Allelnummer	280934	251024
Allelfrequenz	0,00003916	0,000007967
Anzahl der Homozygoten	0	0
Prognose über funktionelle Effekte auf humane nicht-synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (nsSNPs)	Voraussichtlich schädigend	Gutartig

2.8 Klonierung

2.8.1 Verwendete Plasmide

2.8.1.1 pcDNA5/FRT/TO GFP

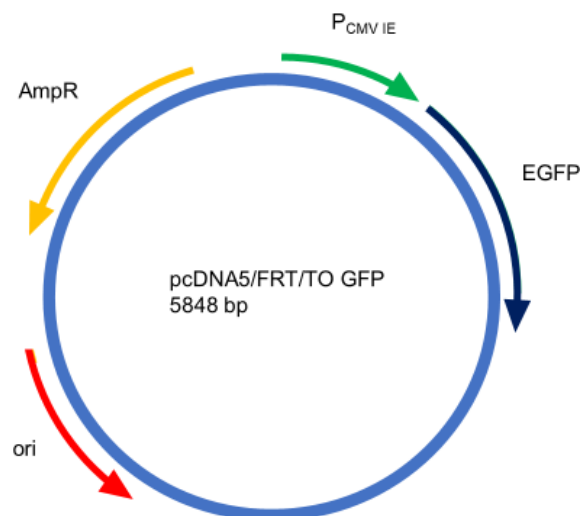


Abbildung 2.1: Plasmid pcDNA5/FRT/TO GFP, farblich markiert sind die für diese Klonierung relevanten Bereiche. ori: Replikationsursprung (rot); AmpR: Ampicillin-Resistenzgen (gelb); EGFP: erweitertes GFP (dunkelblau); P_{CMV IE}: Human cytomegalovirus immediate early promoter (grün).

Der Vektor pcDNA5/FRT/TO GFP (Abbildung 2.1, S. 21) diente der Übertragung der CIC-Mutationen p.R353X, p.G580C und p.T990I als CIC-mutant-GFP-pcDNA in das Plasmid CIC-S-WT-pLVX bzw. CIC-S-WT-GFP-pLVX. Die Größe des Vektors, der sich zusammensetzt aus einem Gerüst von 5137 bp und einem GFP-Insert von 872 bp, beträgt nach Einfügen des Inserts insgesamt 5848 bp. Er verfügt unter anderem über multiple Schnittstellen für Restriktionsenzyme und ein zur Selektion benötigtes Ampicillin-Resistenzgen. Durch einen dreifachen Verdau mit den Restriktionsenzymen SallI, NotI und CpoI (Kap. 2.8.2, S. 23), Auftrennung der

Fragmente in einem Agarosegel (Kap. 2.10, S. 39) und Extraktion des entsprechenden Genabschnitts (Kap. 2.8.12, S. 34), konnte die Mutation isoliert und für die Ligation mit dem pLVX bzw. dem GFP-pLVX-Vektor verwendet werden.

2.8.1.2 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 26,9 kDa. Unter ultraviolettem (UV) Licht angeregt, bildet das Protein durch Autokatalyse grüne Fluoreszenz, die unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GFP-DNS mit der DNS des zu untersuchenden Proteins verbunden, gemeinsam transfiziert und als Fusionsprotein exprimiert. So diente GFP als Marker für eine erfolgreiche Transfektion und ließ Rückschlüsse auf die Lokalisation des Proteins in der exprimierenden Zelle zu.

2.8.1.3 pLVX-IRES-Puro

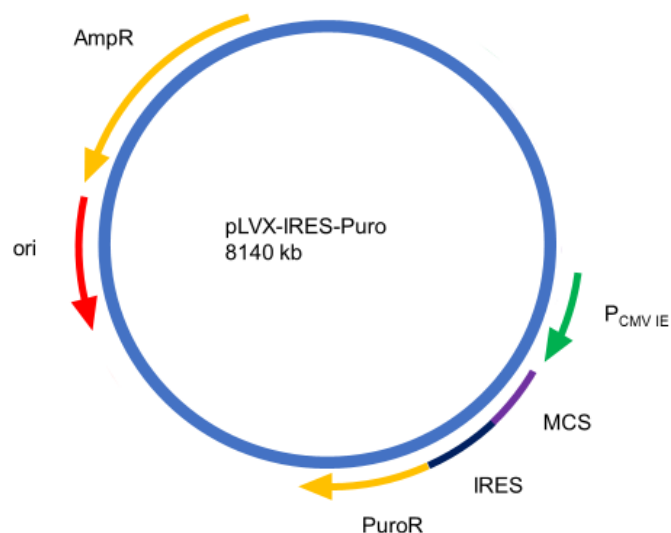


Abbildung 2.2: Plasmid pLVX-IRES-Puro, farblich markiert sind die für diese Klonierung relevanten Bereiche. ori: Replikationsursprung (rot); AmpR und PuroR: Ampicillin und Puromycin-Resistenzgen (gelb); MCS: Multiple Cloning Site (lila); IRES: Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site (dunkelblau); P_{CMV IE}: Human cytomegalovirus immediate early promoter (grün).

Die cDNS des Proteins CIC-WT lag in Verbindung mit dem Plasmid pLVX-IRES-Puro (Abbildung 2.2, S. 22) vor. Dieses Plasmid hat eine Länge von 8140 bp und enthält eine multiple Klonierungssequenz zur Integration eines Inserts und außerdem ein Ampicillin sowie ein Puromycin-Resistenzgen. Durch einen zweifachen Restriktionsenzymverdau mit NotI und CpoI und Gelextraktion des Vektors konnten durch Ligation die CIC-Mutationen jeweils als Insert eingefügt werden. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente Zellen (Kap. 2.8.8, S. 30), sodass CIC-WT und die Mutationen des Proteins mittels Transfektion (Kap. 2.9.2.1, S. 36)

bzw. lentiviraler Transduktion (Kap. 2.9.2.2, S. 37) in humanen Zellen eines Zervixkarzinoms (HeLa), humanen embryonalen Nierenzellen(HEK)-293T und humanen Epithelzellen des kolorektalen Adenokarzinoms(Caco)-2-Zellen integriert werden konnten.

2.8.2 Restriktionsenzymverdau

Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde für Klonierungen verwendet und außerdem zur Erfolgskontrolle generierter Plasmide nach Transformation genutzt (Kap. 2.8.8, S. 30). Restriktionsenzyme erkennen die für sie spezifischen Basensequenzen und schneiden doppelsträngige DNS an dieser Stelle. So können unter anderem Plasmide linearisiert oder gezielt Bereiche aus einer DNS herausgeschnitten werden. Bei der Klonierung wurden Vektoren und Inserts mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, sodass kompatible Enden an den Schnittstellen entstanden und Vektor und Insert miteinander ligiert werden konnten.

Um die für die CIC-Mutationen kodierenden Sequenzen aus dem Plasmid pcDNA5/FRT/TO GFP herauszuschneiden, erfolgte im ersten Schritt der Verdau mit SalI. Eingesetzt wurden 2 µg DNS, 3 µl Enzym und 5 µl des dazugehörigen Puffers (Tabelle 2.1, S. 11). Mit H₂O wurde der Reaktionsansatz auf 50 µl aufgefüllt, durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und über 4-5 h bei 37 °C inkubiert. Da das Plasmid für das Restriktionsenzym SalI drei Schnittstellen aufweist, zeigte sich in der anschließenden Gelelektrophorese (Kap. 2.10, S. 39) eine Auftrennung in drei DNS-Fragmente von 8,3 kb, 0,86 kb und 2,2 kb Länge. Es erfolgte die Gelextraktion (Kap. 2.8.12, S. 34) der längsten Bande und die Bestimmung von Reinheit von Konzentration der in 40 µl H₂O eluierten DNS mittels NanoDrop™ (Kap. 2.11, S. 40). Im zweiten Schritt wurde das extrahierte DNS-Fragment des Plasmids mit dem Restriktionsenzym NotI verdaut. 40 µl DNS wurden mit 3 µl Enzym, 5 µl Puffer und 2 µl H₂O für 4-5 h bei 37 °C inkubiert und mit dem 5,66 kb großen entstandenen DNS-Fragment verfahren wie oben beschrieben. Der dritte Verdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym CpoI nach dem für NotI beschriebenen Verfahren. Das 4,14 kb lange, extrahierte DNS-Fragment mit der für das mutierte CIC-Protein kodierenden Sequenz wurde in 20 µl H₂O eluiert und konnte für die nachfolgende Ligation mit dem Vektor verwendet werden.

Um die für die Vektoren pLVX bzw. GFP-pLVX kodierenden DNS-Sequenzen aus dem Plasmid pLVX-IRES-Puro herauszuschneiden, erfolgte ein zweifacher Verdau. Eingesetzt wurden 2 µg DNS, 3 µl des Restriktionsenzym NotI, 5 µl des zum Enzym passenden Puffers (Tabelle 2.1, S.11) und H₂O zum Auffüllen des Reaktionsansatzes auf 50 µL. Da das Plasmid lediglich eine Schnittstelle für NotI enthält, kam es dadurch zu dessen Linearisierung. Der DNS wurden 500 µl NTI (Tabelle 2.1, S.11) hinzugefügt und es erfolgte eine Aufreinigung mittels spin

column purification (Tabelle 2.1, S. 11) entsprechend dem Vorgehen nach Gelextraktion. Das Produkt wurde in 40 μl H_2O eluiert. 40 μl der DNS wurden anschließend mit CpoI geschnitten, wie oben bereits für dieses Restriktionsenzym beschrieben. Nach Gelelektrophorese wurde das die für den Vektor pLVX bzw. GFP-pLVX kodierende DNS-Sequenz enthaltende Fragment extrahiert, in 20 μl H_2O eluiert und konnte anschließend für die Ligation mit den CIC-Mutationen verwendet werden.

2.8.3 Ligation

Durch Ligation wurden die CIC-Mutationen mit den später für die Transfektion verwendeten Vektoren verbunden, sodass jede Mutation einmal in Verbindung mit dem Vektor pLVX und einmal gekoppelt an den Fusionsvektor GFP-pLVX vorlag. Ermöglicht wurde die Ligation durch das Enzym T4-Ligase, das das 3'-OH-Ende des einen DNS-Doppelstrangs mit dem 5'-Phosphat-Ende des anderen zu einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung ligiert.

Eingesetzt wurden 25 ng DNS des Vektors und DNS der CIC-Mutation als Insert im Verhältnis 1:3 bis 1:6 (Vektor zu Insert). Hinzugefügt wurden 1 μl T4-Ligase und 1 μl Ligase-Puffer (Tabelle 2.1, S. 11), mit H_2O wurde der Ansatz auf 10 μl aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt in kompetente Bakterien transformiert (Kap. 2.8.8.3, S. 31). Zeigte sich nach Aufreinigung der Plasmide und Probeverdau ein erfolgreich ligiertes Konstrukt aus CIC-Mutation und Vektor, konnte dieses für die Transfektion in Zellen verwendet werden. Zur Kontrolle erfolgte analog zur oben beschriebenen Ligation die Inkubation eines Ligationsansatzes ohne Insert, als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt. Nach Transformation in Bakterien kam es in diesem Fall nicht zur Ausbildung von Bakterienkolonien, da ein Wachstum auf dem Selektivagar ohne Antibiotika-Resistenzgen nicht möglich ist.

2.8.4 Sequenzierung

2.8.4.1 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge innerhalb eines bestimmten DNS-Abschnitts und wurde einerseits zur Detektion von Mutationen und andererseits zur Kontrolle der Klonierungen verwendet. Sie erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977), auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet, bei der die Abfolge der Nukleotide mit Hilfe fluoreszierender Didesoxynukleosidtriphosphate ermittelt wird.

Der Sequenzierungsansatz wurde in einem 200- μl -Reaktionsgefäß vorbereitet. Eingesetzt wurden als Template 300-400 ng DNS, 2 μl eines aus dem BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Tabelle 2.1, S. 11) stammenden 5-fach Puffers, 0,8 μl eines ebenfalls in dem Kit

enthaltenen BigDye-Premix‘ und 0,5 μ l eines zum untersuchenden DNS-Abschnitt passend ausgewählten Primers. Bei doppelsträngigem DNS-Template erfolgten jeweils einzeln die Sequenzierung des einen Stranges mit dem *Forward*-Primer und die Sequenzierung des komplementären Stranges mit dem *Reverse*-Primer. Mit H₂O wurde der Ansatz auf insgesamt 10 μ l aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte im Thermocycler (Tabelle 2.2, S. 14) die Sequenzierungs-PCR nach dem in Tabelle 2.8 angegebenen Schema.

Wie die in Kap. 2.8.5 (S. 26) detailliert beschriebene PCR besteht auch die Sequenzierungs-PCR im Wesentlichen aus drei Schritten: der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. In der Elongation werden aus den im Premix enthaltenen Desoxyribonukleosidtriphosphaten neue, zum Template komplementäre DNS-Stränge synthetisiert. Von jeder der vier Basen der DNS sind jeweils auch die entsprechenden Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) enthalten, die an einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind. Jede der vier ddNTP-Arten ist an einen anderen Farbstoff gekoppelt, sodass sie einem einzigen Reaktionsansatz zugefügt werden und bei der Auswertung dennoch voneinander unterschieden werden können. Die ddNTPs enthalten an ihrem 3'-Ende keine Hydroxygruppe, sodass eine Verlängerung der DNS durch die Polymerase nach Einbau nicht mehr möglich ist, es kommt an dieser Stelle zum Kettenabbruch. So entstehen DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit einem Fluoreszenz-markierten ddNTP enden. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts können mit Hilfe eines Detektors die Farbsignale erkannt und anschließend anhand der Kettenlängen die Reihenfolge der Basen ermittelt und als Sequenz angegeben werden.

Tabelle 2.8: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierungs-PCR im Thermocycler.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Wiederholungen
Inkubation	96	01:00	—
Denaturierung	96	00:10	24
Annealing	55	00:10	24
Elongation	60	04:00	24
Lagerung	10	Bis Aufreinigung	—

2.8.4.2 Aufreinigung

Zur Abtrennung von Dye-Terminatoren erfolgte im Anschluss an die Sequenzierung die Aufreinigung des Produkts. Die 10 μ l Sequenzierungs-Produkt wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 120 μ l H₂O, 10 μ l 3 M NaOAc (pH 4,6) sowie 220 μ l 100 % EtOH hinzugefügt. Der Ansatz wurde über 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und

anschließend für 15 min bei 14000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer gelben auf eine blaue aufgesetzte Pipettenspitze abpipettiert und das Pellet mit 300 µl 70%igem EtOH unter Vortexen gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm, das Abpipettieren des Überstands und das Trocknen des Pellets bei 37 °C im Heizblock. Das Pellet wurde in 10 µl Formamid aufgenommen und bis zur Detektion der Sequenz des PCR-Produkts bei 4 °C gelagert. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte nach dem oben beschriebenen Prinzip durch den ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Tabelle 2.2, S. 14).

2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation definierter DNS-Abschnitte *in vitro*. Eine hitzestabile Polymerase synthetisiert spezifisch neue DNS-Fragmente mithilfe ausgewählter Primer, die jeweils zu einem der beiden komplementären DNS-Einzelstränge passen. Die entstandenen DNS-Abschnitte dienen jeweils als Matrize für den nächsten Zyklus, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung erfolgt.

Der PCR-Ansatz wurde in einem 200-µl-PCR-Tube vorbereitet. Eingesetzt wurden ca. 250 ng Template-DNS, 2,6 µl (3,75 mM) dNTPs, je 2 µl (10 pMol) des *Forward* und des *Reverse*-Primers, 5 µl 10 × Puffer (Tabelle 2.3, S. 16), 0,4 µl Taq-Polymerase und H₂O, um den Ansatz auf 50 µl aufzufüllen. Um die Reaktionsbedingungen zu verbessern, wurden bei Bedarf Magnesium (Mg²⁺) und/oder Q-Solution hinzugefügt. Mg²⁺ dient der Polymerase als Cofaktor, bildet lösliche Komplexe mit den dNTPs und wirkt stabilisierend auf die Anlagerung der Primer an die Template-DNS. Q-Solution verbessert v.a. die Amplifikation von DNS mit hohem Guanin und Cytosin-Anteil, indem es das Schmelzverhalten der DNS beeinflusst. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, die innerhalb eines Thermocyclers stattfinden:

1. Denaturierung: Bei 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, so dass die DNS-Doppelstränge in Einzelstränge aufgespalten werden.
2. Annealing: Bei 55, 62 bzw. 66 °C erfolgt das Anlagern der Primer an spezifische Abschnitte der DNS, sie umrahmen den zu vervielfältigenden DNS-Abschnitt an den jeweils komplementären Strängen.
3. Elongation: Die Primer dienen als Ausgangspunkt der bei 72 °C stattfindenden Amplifikation. Die Taq-Polymerase lagert sich am 3'-Ende des Primers an und synthetisiert aus den hinzugefügten Desoxyribonukleosidtriphosphaten den neuen DNS-Strang.

Mit 35 Zyklen konnte so innerhalb kürzester Zeit eine Anzahl an Kopien des spezifischen DNS-Abschnitts generiert werden, die annähernd der Anzahl des DNS-Templates multipliziert mit 2^{35} entspricht.

Tabelle 2.9: Reaktionsbedingungen der PCR im Thermocycler.

Reaktionsschritt	Temperatur in [°C]	Zeit in [s]	Wiederholungen
Denaturierung	95	180	35
	95	30	
Annealing	62 (CIC, PCFT)	30	35
	66 (RFC1)		
	55 (Plasmid-DNS)		
Elongation	72	30	35
	72	600	
Lagerung	4	∞	—

2.8.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung erfolgte mithilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (Tabelle 2.1, S. 11). In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 50 μ l H₂O vorgelegt, nach kurzem Zentrifugieren das PCR-Produkt hinzupipettiert sowie 500 μ l Binding Buffer (Tabelle 2.3, S. 16). Nach kurzem Vortexen erfolgte das Überführen auf einen Filter und die Zentrifugation über 1 min bei 14000 rpm. Die DNS befand sich nun im Filter, das Eluat wurde verworfen. Anschließend erfolgte nach Angaben des Kits das Waschen der DNS in zwei Schritten, zunächst mit 500 μ l und dann mit 200 μ l Wash Buffer (Tabelle 2.3, S. 16) und jeweils anschließender Zentrifugation über 1 min bei 14000 rpm. Der Filter, inklusive der daran gebundenen DNS, wurde in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß gestellt und 50 μ l Purification Kit (Tabelle 2.1, S. 11) direkt auf den Filter pipettiert. Zeigte die nach der PCR durchgeführte Gel-Kontrolle (Kap. 2.8.10.1, S. 33) nur wenig Produkt, wurden lediglich 30 μ l verwendet, um eine zu starke Verdünnung zu vermeiden. Es erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen, wodurch die DNS aus dem Filter eluiert wurde.

Wie zuvor beschrieben, erfolgte eine erneute Kontrolle der aufgereinigten DNS durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Eingesetzt wurden ca. 100 ng des Produkts mit der entsprechenden Menge eines 6 \times Ladepuffers (Tabelle 2.3, S. 16), die auf ein 1,5%iges Gel aufgetragen wurden. Über mindestens 20 min wurde eine Spannung von 85 V angelegt.

2.8.7 Methoden der Mutagenese

Mutagenese bezeichnet das Einbringen von Mutationen in DNS, in diesem Fall gezielt erwünschter Mutationen. Sie erfolgt auf Grundlage einer PCR, in der durch eine thermostabile Polymerase mithilfe spezifischer Mutagenese-Primer Mutationen in die Ziel-DNS eingefügt werden. Dass das Produkt im Gegensatz zur Ausgangs-DNS mutiert ist, gelingt durch den Einsatz von Oligonukleotid-Primern, die die gewünschte Mutation enthalten (Shenoy und Visweswariah 2003). Generiert wurden auf diese Weise DNS-Abschnitte, die für das Protein CIC kodieren und jeweils eine der Mutationen p.G580C, p.T990I bzw. p.R353X enthielten. Diese dienten anhand mehrerer Methoden dem Vergleich mit der WT-DNS. Verwendet wurden verschiedene, im Folgenden beschriebene Verfahren, die sich insbesondere in der verwendeten Polymerase unterscheiden.

2.8.7.1 QuikChange II XL Site-Directed Mutagenese

Eingesetzt wurden 50 ng der Ausgangs-DNS, die für den Wildtyp des Proteins CIC kodiert, 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer aus dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Tabelle 2.1, S. 11), 1 μ l dNTP Mix, 3 μ l Quick Solution, 1 μ l Pfu Ultra HF DNA Polymerase und je 1 μ l des passenden *Forward* und des *Reverse*-Primers. Mit H₂O wurde der Reaktionsansatz auf 50 μ l aufgefüllt. Die verwendeten Primer zur Generierung der CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X sind unter Kap. 2.6 (S. 19) aufgeführt. Die Reaktion erfolgte unter den in Tabelle 2.10 aufgeführten Bedingungen. Der Ansatz wurde wie oben beschrieben mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut.

Tabelle 2.10: Reaktionsbedingungen für die Mutagenese nach der QuikChange II XL Methode.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Wiederholungen
Inkubation	95	01:00	—
Denaturierung	95	00:50	25
Annealing	55	00:50	25
Elongation	68	13:00	25
Inkubation	68	10:00	—
Lagerung	10	∞	—

2.8.7.2 Mutagenese mit der Kapa HiFi Polymerase

Auch bei dieser Methode wurden 50 ng der Ausgangs-DNS eingesetzt, 10 μl 5 \times Reaktionspuffer, je 1 μl des *Forward* und des *Reverse*-Primers, 1,5 μl dNTP Mix und 1 μl der KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Tabelle 2.1, S. 11). Aufgefüllt wurde ebenfalls auf 50 μl mit H₂O. Die Mutagenese erfolgte unter den in Tabelle 2.11 aufgeführten Bedingungen. Anschließend erfolgte wie oben beschrieben der Verdau der Ausgangs-DNS mit DpnI.

Tabelle 2.11: Reaktionsbedingungen für die Mutagenese mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Wiederholungen
Inkubation	95	05:00	—
Denaturierung	98	00:20	25
Annealing	55	00:20	25
Elongation	72	13:00	25
Inkubation	72	10:00	—
Lagerung	10	∞	—

2.8.7.3 Q5® Site-Directed Mutagenese

Diese Methode erfolgte unter Gebrauch des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kits (Tabelle 2.1, S. 11). Für den Reaktionsansatz wurden 12,5 μl Q5 Hot Start High-Fidelity 2 \times Master Mix inklusive der High-Fidelity DNS-Polymerase, je 1,25 μl des passenden *Forward* und *Reverse*-Primers und 25 ng der Ausgangs-DNS in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Mit H₂O wurde der Ansatz auf 25 μl aufgefüllt. Die Mutagenese erfolgte unter den in Tabelle 2.12 angegebenen Bedingungen im Thermocycler.

Anschließend wurden 1 μl des PCR-Produkts 5 μl 2 \times KLD Reaktionspuffer, 3 μl Nuklease-freies H₂O und 1 μl 10 \times KLD Enzyme Mix hinzugefügt. Dieser enthielt DpnI sowie eine Kinase und eine Ligase.

Der Erfolg der Mutagenese-PCR wurde mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden nach jeder Methode 10 μl des PCR-Produkts auf ein 0,8%iges Agarosegel (Tabelle 2.1, S. 11) aufgetragen. Anschließend wurde die mutierte DNS in zur jeweils verwendeten Methode passende Bakterien transformiert.

Tabelle 2.12: Reaktionsbedingungen für die Q5® Site-Directed Mutagenese.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Wiederholungen
Inkubation	98	00:30	—
Denaturierung	98	00:10	25
Annealing	55	00:30	25
Elongation	72	07:00	25
Inkubation/Abschlusselongation	72	02:00	—
Lagerung	10	∞	—

2.8.8 Transformation von Plasmid-DNS

2.8.8.1 Herstellung von Agar-Platten

In eine 1-l-Glasflasche wurden 500 ml doppelt-demineralisiertes H₂O und 20 g Pulver zur Herstellung von LB-Agar (Tabelle 2.1, S. 11) gegeben und mit einem Magnetrührer vermischt, bis das Pulver komplett gelöst war. Anschließend wurde der Ansatz autoklaviert und noch einmal kurz vermischt. Nach dem Abkühlen bis auf 55 °C wurden 500 µl Ampicillin hinzugegeben, sodass darauf nur Bakterienkolonien wachsen konnten, die mit erfolgreicher Transformation auch das Ampicillin-Resistenzgen erhalten hatten.

2.8.8.2 Verwendete Bakterienstämme

Für die Transformation wurden die in Tabelle 2.13 angegebenen Bakterienstämme verwendet oder anhand der Calciumchlorid-Methode chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E.-coli*)-Zellen hergestellt. Dazu wurden 100 ml LB-Medium 1:1000 mit Streptomycin versetzt und mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur der *E.-coli*-Zellen angeimpft und bei 37 °C inkubiert bis eine optische Dichte (OD)₆₀₀ von 0,2-0,5 erreicht war. Anschließend wurde die Zellsuspension in sterilen 50-ml-Falcons 10-20 Min. auf Eis belassen und dann für 20 Min. bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, mit 4 ml kalter 80 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, dann wurden weitere 16 ml CaCl₂-Lösung hinzugegeben. Nach 30 Min. auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 Min. bei 4 °C und 3000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2,5 ml CaCl₂/Glycerol (4:1) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.13: Zur Transformation verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Eigenschaften	Hersteller
5-alpha F' Iq Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	DH5 α -Derivat, chemisch kompetent	New England Biolabs®
BioBlue Chemically Competent Cells	Chemisch kompetent	Bioline GmbH

2.8.8.3 Transformation

Bei der Transformation wird DNS in kompetente Bakterien eingebracht, die dazu in der Lage sind, freie DNS aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Die DNS wird so vervielfältigt und kann anschließend in ausreichender Menge wieder extrahiert werden.

Die zuvor eingefrorenen Bakterien wurden über ca. 10 min schonend auf Eis aufgetaut, um die Transformationseffizienz nicht zu mindern. Sobald das Auftauen abgeschlossen war, wurden 50 μ l der Bakteriensuspension in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls auf Eis gelagert. Dann wurden 5 μ l DNS hinzupipettiert, durch leichtes Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß mit den Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurzer Hitzeschock bei 42 °C für 30 s, wodurch die DNS durch die Membran in die Zellen aufgenommen werden konnte. Dann wurde die Suspension erneut für 5 min auf Eis inkubiert, 500 μ l LB-Medium (Tabelle 2.3, S. 16) (Raumtemperatur) hinzugefügt und zur Regeneration für 60 min bei 37 °C unter Schütteln (ca. 250 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert, ca. 450 μ l des Überstands abgenommen und die Zellen in den verbleibenden ca. 100 μ l resuspendiert. Die gesamten Zellen wurden auf einer Agar-Platte im sterilen Feld einer Bunsenbrennerflamme ausgesät, für ca. 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen und über Nacht bei 37 °C mit dem Agar nach oben inkubiert.

2.8.9 Re-Transformation

Für die Vervielfältigung bereits kontrollierter Plasmid-DNS wurde eine erneute Transformation, eine Re-Transformation, durchgeführt. Dazu wurden 50 ng der DNS zu 20 μ l Bakterien Top 10 hinzugefügt und anschließend nach dem oben bereits beschriebenen High Efficiency Transformation Protocol verfahren. Das Aussäen erfolgte jedoch ohne vorheriges Aufkonzentrieren durch Zentrifugieren, mit einem Drittel der Bakteriensuspension.

2.8.10 Mini-Präparation der Plasmide

Die vervielfältigte DNS kann anschließend mithilfe der Methode der alkalischen Lyse aus Bakterien isoliert werden. Die Mini-Präparation diente der Gewinnung geringer DNS-Mengen, um durch Restriktionsenzymverdau, Gelelektrophorese und Sequenzierung den Erfolg der jeweiligen Klonierung zu überprüfen.

Nach der Transformation sind die Bakterien auf Selektivagar ausgesät worden. Durch das enthaltene Antibiotikum, in diesem Fall Ampicillin, waren nur die Bakterien zur Bildung einer Kolonie fähig, die durch erfolgreiche Transformation mit dem Plasmid auch das entsprechende Antibiotika-Resistenzgen erhalten hatten. Nach 24-stündiger Inkubation waren jeweils ca. 3-10 Bakterienkolonien gewachsen. Für jede Kolonie wurden 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin im sterilen Feld eines Bunsenbrenners in ein 15-ml-Röhrchen vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurden die Kolonien vorsichtig vom Nährboden gelöst und einzeln verwendet, um das vorbereitete Medium für eine sogenannte Vorkultur anzuzüchten. Diese wurde für weitere 24 h bei 37 °C unter permanentem Schütteln inkubiert.

1,5 ml der Bakteriensuspension wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen in der Zentrifuge bei 8000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und eine Lyse der Zellen zur Isolierung der Plasmid-DNS durchgeführt. Dazu wurde das Pellet in 200 µl Puffer P1 (Tabelle 2.3, S. 16) mit 2 µl RNaseA (Tabelle 2.1, S. 11) zur Degradation vorhandener RNS resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 (Tabelle 2.3, S. 16) wurde die Suspension 20 × invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das im Puffer enthaltene NaOH kam es aufgrund der Alkalisierung zum Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen der DNS-Stränge, wobei nur Plasmid-DNS aufgrund ihrer Konformation wieder renaturiert. Nach Zugabe von Puffer P3 (Tabelle 2.3, S. 16) wurde das Reaktionsgefäß erneut 20 × invertiert, die Proteine präzipitierten und konnten mit den lysierten Zellbestandteilen und der degradierten DNS über 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert werden. Die Plasmid-DNS verbleibt im Überstand, kann in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe und Vortexen mit 500 µl Isopropanol ausgefällt werden. Durch Zentrifugation über 20 min bei 14000 rpm wurde die DNS pelletiert, der Überstand abgenommen und die DNS mit 400 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren über 10 min bei 14000 rpm wurde der Überstand vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen, das DNS-Pellet bei 37 °C für etwa 5 min getrocknet und in 25 µl H₂O resuspendiert.

2.8.10.1 Kontrolle der isolierten Plasmid-DNS

Zunächst erfolgte eine Konzentrationsbestimmung nach der in Kap. 2.11 (S. 40) beschriebenen Methode mit dem NanoDrop[™]. Mit ca. 300 ng DNS, 0,5 µl des Restriktionsenzym SmaI bzw. der Enzyme NotI und EcoRI HF oder BamHI, 1 µl des zum Enzym passenden Reaktionspuffers und H₂O zum Auffüllen des Ansatzes auf 10 µl erfolgte ein Probeverdau des Plasmids. Mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.10, S. 39) wurde kontrolliert, ob Größe und Anzahl der durch das Restriktionsenzym entstandenen DNS-Fragmente mit dem gewünschten Plasmid konform waren, als Hinweis auf eine erfolgreiche Klonierung durch Ligation. Zur endgültigen Bestätigung erfolgte nach positiver Gelelektrophorese eine Sequenzierung des Plasmids (Kap. 2.8.4, S. 24).

2.8.11 Midi-Präparation der Plasmide

Die Midi-Präparation diente der Isolation und Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNS aus Bakterien. Vorbereitend wurde in 100 ml LB-Medium und 100 µl Ampicillin mit 100 µl Zellsuspension einer Vorkultur (Kap. 2.8.10, S. 32) eine Hauptkultur angesetzt. Diese wurde zur Vermehrung der transformierten Bakterien über Nacht unter permanentem Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der Plasmid-DNS aus Bakterien anhand des Protokolls Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi) nach der High-Copy-Variante. Zusammengefasst wurden dazu 100 ml Zellsuspension auf zwei 50-ml-Falcons aufgeteilt und für 15 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Pellets in je 4 ml Puffer RES (Tabelle 2.1, S. 11) resuspendiert und wieder vereint. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 8 ml Puffer LYS (Tabelle 2.1, S. 11), fünfmaliges Invertieren und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Zur anschließenden Äquilibration wurde ein NucleoBond® Xtra Filter in eine dazugehörige Säule gestellt und vom Rand aus komplett mit 12 ml Puffer EQU (Tabelle 2.1, S. 11) benetzt. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 8 ml Puffer NEU (Tabelle 2.1, S. 11). Um eine vollständige Neutralisation und somit eine quantitative Fällung von Protein und DNS zu erreichen, wurde auf eine ausreichende, aber vorsichtige Durchmischung durch 10-15-maliges Invertieren geachtet. Im nächsten Schritt wurde das Lysat auf die Säule gegeben und beim Durchlaufen geklärt. Um die Säule nicht zu verstopfen, wurde das Lysat direkt davor noch dreimal invertiert und so homogenisiert. Nachdem das gesamte Präzipitat den Filter durchlaufen hatte, wurde dieser mit 5 ml Puffer EQU gewaschen. Für eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNS wurde der Puffer erneut vom Rand aus, in kreisenden Bewegungen auf die Säule pipettiert. Dann wurde nach Entfernen

des Filters die Säule einzeln mit 8 ml Puffer WASH (Tabelle 2.1, S. 11) gereinigt und im Anschluss konnte die Plasmid-DNS in 5 ml Puffer ELU (Tabelle 2.1, S. 11) eluiert werden. Das Eluat wurde auf fünf 2-ml-Zentrifugationsröhrchen verteilt, zum Präzipitieren der eluierten DNS jeweils 700 µl Isopropanol hinzugefügt und damit gevortext, dann für 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, die Pellets mit je 400 µl EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert, für 5 min bei 15000 x g bei Raumtemperatur. Da das Pellet nicht am Röhrchen haftete, wurde der EtOH vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur zum Trocknen platziert. Über 15 min wurden die Pellets bei 30 °C unter permanentem Schütteln in je 30 µl sterilem H₂O gelöst. Anschließend wurden mittels NanoDropTM Reinheit und Konzentration der isolierten und aufgereinigten Plasmid-DNS kontrolliert (Kap. 2.11, S. 40).

2.8.12 Gelextraktion

Sind DNS-Fragmente beim Durchlaufen eines Agarose-Gels voneinander getrennt worden, können Banden einzeln aus dem Gel isoliert werden. Dies erfolgte mithilfe des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Tabelle 2.1, S. 11). Durch das der Agarose hinzugefügte GelRed waren die Banden unter UV-Licht sichtbar, sodass das benötigte DNS-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten werden konnte. Das Gelstück wurde mit dem Skalpell zerteilt und mit je 200 µl NTI-Puffer (Tabelle 2.1, S. 11) pro 100 mg Agarose-Gel bei 50 °C für 5-10 min gelöst. Je 700 µl wurden auf eine Säule mit DNS-adsorbierender Kieselgelmembran pipettiert und für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert. In 700 µL-Dosen wurde so die gesamte gelöste DNS an dieselbe Säule gebunden. Dann wurde die Membran zweimal mit je 700 µl Puffer NT3 (Tabelle 2.1, S. 11) gewaschen und anschließend unter den vorherigen Bedingungen zentrifugiert. Durch erneutes Zentrifugieren über 1 min bei 11000 x g wurde die Membran getrocknet und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gestellt. 20-40 µl Puffer NE (Tabelle 2.1, S. 11) wurden direkt auf die Membran pipettiert und durch Zentrifugation über 1 min bei 11000 x g die DNS darin eluiert.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

2.9.1.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einer Nährlösung aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) High Glucose (4,5 g/L) und dem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Glutamin und ggf. 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Vor der Verwendung wurde die Nährlösung stets

im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in 75-cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Brutschrank in Kultur gehalten. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen erfolgte bei Konfluenz alle zwei bis drei Tage die Subkultivierung mit einem Aufsplitten von 1:4 bzw. 1:6 unter dem Abzug. Zunächst wurden die Zellen mit 12 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bevor sie anschließend mit 1,5 ml Trypsin und einer Einwirkzeit von ca. 4 min im 37 °C-Brutschrank vom Flaschenboden gelöst wurden. Um das Trypsin zu neutralisieren und so eine Beschädigung der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen mit DMEM abgespült und anschließend bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in DMEM resuspendiert und zu einem Viertel bzw. Sechstel in 12 ml Nährmedium mit 120 µl Myco-3 (Tabelle 2.1, S. 11) und 1,2 µl Puromycin zur Weiterkultivierung in eine neue Zellkulturflasche aufgenommen und geschwenkt, sodass sich die Zellen gleichmäßig am Flaschenboden verteilen.

2.9.1.2 Kultivierung von HEK-293T-Zellen

Im Unterschied zu HeLa-Zellen haben HEK-Zellen eine höhere Verdopplungsrate, weshalb sie alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:8 bzw. 1:10 passagiert wurden. Aufgrund der geringeren Adhärenz am Flaschenboden, erfolgte zum Lösen der Zellen die Behandlung mit Trypsin nur über etwa 2-3 min, zur Weiterkultivierung konnte auf die Zugabe von Myco-3 und Puromycin verzichtet werden. Weiterhin wurde analog zur Kultivierung der HeLa-Zellen verfahren.

2.9.1.3 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden ca. ein- bis zweimal pro Woche im Verhältnis 1:4 passagiert, die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben analog zu den HeLa-Zellen.

2.9.2 Methoden des Gentransfers

Durch Transfektion wird DNS in eukaryontische Zellen eingebracht, sodass diese das zu untersuchende Protein exprimieren. Außerdem wurde die Transfektion zur Produktion von Viren genutzt, die im Rahmen der lentiviralen Transduktion (Kap. 2.9.2.2, S. 37) als virale Vektoren eingesetzt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNS des CIC-WT und dessen Mutationen, gekoppelt an einen Expressionsvektor, in HeLa, HEK-293T und Caco-2-Zellen transfiziert bzw. die DNS mittels lentiviraler Transduktion in die Zellen eingebracht. Unterschieden wird zwischen stabiler und transients Transfektion. Während bei der stabilen Transfektion die gewünschte, linearisierte, DNS dauerhaft ins Genom der Zelle integriert wird, wird das Plasmid

bei der transienten Transfektion nur vorübergehend in die Zelle eingebracht und durch zelleigene Abbauprozesse wieder eliminiert.

2.9.2.1 Transfektion

2.9.2.1.1 Transfektion durch Lipofektion

Die Transfektion erfolgte anhand des Protokolls Effectene® Transfection Reagent und des zugehörigen Kits (Tabelle 2.1, S. 11). Am Vortag erfolgte das Aussäen von 5×10^4 Zellen pro Well in je 500 μl DMEM Kulturmedium auf einer 24-Well-Platte für die anschließend angefertigten Immunfluoreszenzen (Kap. 2.14, S. 47) und von 1×10^5 Zellen pro Well in je 1 ml DMEM auf einer 12-Well-Platte zur Durchführung von Western Blots (WB) (Kap. 2.12.4, S. 44). Über Nacht wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, sodass sie für die Transfektion in einer Konfluenz von 40-80 % vorlagen. Die Transfektion erfolgte unter dem Abzug. 0,2 μg (IF) bzw. 0,3 μg (WB) der zu transfizierenden Plasmid-DNS, gelöst in sterilem H_2O , wurden mit Puffer EC (Tabelle 2.1, S. 11) auf ein Volumen von 60 μl (IF) bzw. 75 μl (WB) aufgefüllt. Durch Zugabe von 1,6 μl bzw. 2,4 μl Enhancer, 1 s Vermengen durch Vortexen, dann Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur und kurzes Zentrifugieren von Tropfen wurde die DNS kondensiert. Anschließend kam es zur Ausbildung von Transfektionskomplexen aus DNS und Lipiden durch Zugabe von 5 μl (IF) bzw. 6 μl (WB) Effectene Transfection Reagent (Tabelle 2.1, S. 11), mehrfaches Auf- und Abpipettieren, 10 s Vortexen und Inkubation des Ansatzes für 10 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die ausgesäten Zellen einmal mit PBS gewaschen und 350 μl (IF) bzw. 800 μl (WB) DMEM hinzugefügt. Der Transfektionsansatz wurde mit 350 μl (IF) bzw. 400 μl (WB) DMEM vermischt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Komplexe wurden durch vorsichtiges Schwenken homogen verteilt und nachfolgend zur Endozytose der DNS-Lipid-Komplexe und anschließenden Expression des transfizierten Gens über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei den zusätzlich mit GFP transfizierten Zellen konnte mit einem Fluoreszenzmikroskop nach 24-48 h der Transfektionserfolg kontrolliert werden. Die Zellen wurden zum Teil direkt zur Durchführung von Immunfluoreszenzen und Western Blots verwendet oder zunächst zur Vermehrung weiterkultiviert. Zur Selektion von transfizierten Zellen erfolgte nach 24 h ein Wechsel des Mediums mit Selektionsdruck durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin in der Konzentration von 100 $\mu\text{L/L}$ Medium.

2.9.2.1.2 Calcium-Phosphat-Präzipitation

Diese Methode der Transfektion wurde verwendet, um in HEK-293T-Zellen Viren zu produzieren, die den Transfervektor mit der für die CIC-Mutationen kodierenden DNS enthalten. Diese Viren dienten anschließend als Vektor für die Transduktion der DNS in diejenigen Zellen, die das Protein für die durchzuführenden Versuche exprimieren sollten.

Das Aussäen der HEK-293T-Zellen erfolgte auf Poly-L-Lysin-beschichteten 10-cm²-Kulturplatten mit einer Zelldichte von ca. 1×10^5 Zellen pro cm² in 10 ml DMEM. Das Poly-L-Lysin diente einer besseren Anhaftung der Zellen auf dem Plattenboden. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und konnten am Folgetag transfiziert werden. Gearbeitet wurde unter dem Abzug. In einem 2-ml-Reaktionsgefäß wurden 840 µl H₂O vorgelegt. Dann wurde die DNS hinzupipettiert, bestehend aus 3,5 µg des Transfervektors (CIC-Mutationen enthaltendes Plasmid: CIC-S pR353X pLVX-GFP-IRES-Puro, pR353X pLVX-IRES-Puro, pG580C pLVX-GFP-IRES-Puro, pG580C pLVX-IRES-Puro, pT990I pLVX-GFP-IRES-Puro bzw. pT990I pLVX-IRES-Puro) und der Virus-DNS, 27,7 µg psPAX und 10,8 µg pMD2.G. PsPAX enthält die drei HIV-1-Gene *gag*, *pol* und *env*, die die Expression der viralen Proteine steuern und somit essenziell sind für die Bildung der lentiviralen Partikel. pMD2.G kodiert für ein VSV-G (Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus) exprimierendes Hüllplasmid. Zusätzlich wurden 120 µl 2 M CaCl₂ hinzugefügt und vorsichtig durchmischt. In ein 15-ml-Falcon wurden 940 µl eines 2 × DNS-Präzipitationspuffers (Tabelle 2.3, S. 16) vorgelegt, dem unter permanentem Schütteln auf einem Vortexer tropfenweise die DNS-Lösung zugeführt wurde. Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich ein Niederschlag aus Kalziumphosphat und DNS bilden konnte. Nach einem Wechsel des Mediums wurde dieses Präzipitat anschließend tropfenweise auf die ausgesäten HEK-293T-Zellen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, sodass diese die Präzipitate mit der darin enthaltenen DNS per Endozytose aufnehmen konnten. Aufgrund der erhöhten Gefahr für die Durchführenden wurden die Zellen ab diesem Zeitpunkt unter erhöhter Sicherheitsstufe eingeordnet, sodass im Folgenden die Arbeiten der lentiviralen Transduktion unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt wurden.

2.9.2.2 Lentivirale Transduktion

Bei der lentiviralen Transduktion wird DNS mit Hilfe eines Virus in Zellen eingebracht. Diese sind dazu in der Lage, die DNS ins Genom der Zelle zu integrieren, wodurch eine langfristige und damit stabile Expression erreicht wird. Die Herstellung des Virus, der die zu übertragende

DNS enthält, erfolgte durch die in Kap. 2.9.2.1.2 (S. 37) beschriebenen Calcium-Phosphat-Präzipitation.

Am Tag nach der Calcium-Phosphat-Präzipitation erfolgte ein Mediumwechsel der transfizierten Zellen. Außerdem wurden Zellen für die Transduktion ausgesät. Pro Proteinvariante wurden drei Wells einer 6-Well-Platte mit je 3×10^5 Zellen pro Well ausgesät, sodass nach Inkubation über Nacht bei 37 °C für die Transduktion am Folgetag eine Konfluenz von 50-60 % vorlag. Zunächst erfolgte die Virus-Präzipitation. Von den HEK-293T-Zellen, von denen die Viren produziert worden waren, wurde das Medium abgenommen und in ein 50-ml-Falcon überführt. Das Medium enthielt nun die Viren mit der zu transduzierenden DNS. Hinzugefügt wurden je 3,75 ml 50 % PEG 6000, 1,95 ml 4 M NaCl und 1,71 ml PBS, die Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 20 min bei 5000 x g und 4 °C, woraufhin die Viren als weißes Pellet sichtbar waren. Dessen obere Grenze wurde markiert, da das Pellet bei Erwärmung durchsichtig wird. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1,5 ml (1/10 des ursprünglichen Volumens) DMEM resuspendiert. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurde dem DMEM 1,5 µl Polybrene hinzugefügt. Für die Transduktion wurde das Medium der ausgesäten Zellen von den 6-Well-Platten abgenommen, je 1,5 ml frisches DMEM pro Well vorgelegt und je 500 µl Virus-Lösung tropfenweise hinzugefügt (drei Wells pro Proteinvariante). Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C unter S2-Bedingungen inkubiert. Durch Fusion der viralen Membran mit der Membran der Zelle kam es zur Aufnahme der Plasmid-DNS und bei erfolgreicher Transduktion zu deren Integration ins zelleigene Genom. Am nächsten Tag erfolgte nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 2 ml PBS pro Well ein Mediumwechsel und, nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37 °C, am zweiten Tag nach der Transduktion die Zugabe von Puromycin (1:10000) als Selektionsantibiotikum. Die Zellen einer Transfektion wurden vereint und zur Weiterkultivierung in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt.

2.9.2.3 Subklonierung transfizierter Klone

Nach einer Transfektion konnten durch Selektion Einzelzellklone hergestellt werden. Dies ermöglichte die Weiterkultivierung sicher transfizierter Kolonien nach initial niedriger Transfektionsrate bei Mischklonen.

Bei Transfektion mit GFP mit Bildung eines CIC-GFP-Fusionsproteins ließen sich die erfolgreich transfizierten Zellen nicht nur durch Darstellung in der Immunfluoreszenz, sondern direkt mit Hilfe einer UV-Lampe anhand der grünen Fluoreszenz identifizieren. Möglichst einzeln liegende, transfizierte Klone wurden an der Unterseite der Zellkulturschale markiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Mit einer

sterilen Pinzette wurde ein Klonierring mit Silikonfett an der Unterseite über einer der Kolonien platziert. Dies erfolgte einzeln mit jeder markierten Kolonie. In jeden Ring wurde ein Tropfen Trypsin gegeben und die Zellen für ca. 5 min bei 37 °C darin inkubiert, um sie vom Grund zu lösen. Für jede Kolonie wurde auf einer 12-Well-Platte ein Well mit 1 ml DMEM und 0,1 µl Puromycin vorbereitet und die Kolonien mit jeweils 70 µl DMEM aus den Klonierringen durch Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein Well überführt. Die Zellen wurden nach den unter Kap. 2.9.1 (S. 34) beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert und die erfolgreich angewachsenen Klone schrittweise in größere Zellkulturflaschen umgesetzt.

2.9.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen über längere Zeit lagern zu können, erfolgte die Herstellung von Cryostocks aus 75-cm²-Zellkulturflaschen. Zunächst wurden die Zellen mit 12 ml PBS gewaschen und wie bereits beschrieben durch 1,5 ml Trypsin gelöst und zentrifugiert. Mit 3 ml zuvor auf Eis gekühltem Einfriermedium (Tabelle 2.3, S. 16) wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und darauf geachtet, dass es dabei nicht zu Blasenbildung kam. Anschließend wurden drei Cryotubes mit je 1 ml Zellsuspension befüllt und in eine Einfrierbox gestellt. Diese war mit Isopropanol gefüllt, um durch ein langsames und somit schonenderes Abkühlen Zellschäden zu vermeiden. Die Lagerung erfolgte über ca. 48 h bei -80 °C und anschließend zur langfristigen Aufbewahrung in Stickstoff.

Zum Auftauen eines Cryostocks wurden zunächst 9 ml DMEM High Glucose mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einem Falcon vorgelegt, dann der Cryostock im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und zügig ins Falcon hinzupipettiert. Nach dem Zentrifugieren bei 800 rpm, wurde das Pellet in 4 ml DMEM mit oben genannten Zusätzen aufgenommen, in eine 25-cm²-Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und der Zusatz von 0,4 µl Puromycin, bei Konfluenz, nach etwa zwei Tagen, erfolgte ein Umsetzen der Zellen in eine 75-cm²-Zellkulturflasche, um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu generieren.

2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufzutrennen und so einerseits das Ergebnis einer PCR oder eines Restriktionsenzymverdaus zu überprüfen (analytisches Gel) und andererseits DNS-Fragmente einer bestimmten Länge aus dem Gel extrahieren zu können (präparatives Gel).

Zur Herstellung des Gels wurde in einem Erlenmeyerkolben Agarose in 1,5 bzw. 1%iger (Plasmid-DNS) Konzentration in TAE-Puffer (Tabelle 2.3, S. 16) für 3 min bei 600 W in der Mikrowelle aufgekocht und so darin gelöst. Unter fließendem Wasser wurde die Agarose kurz abgekühlt und dann GelRed zur Visualisierung der DNS hinzugegeben. Der Farbstoff interkaliert mit der DNS und ist unter UV-Licht als Fluoreszenz sichtbar. Anschließend wurde die Agarose in einen Gelträger gegossen und ein Kamm eingesetzt, durch den Taschen zum Auftragen der DNS-Proben entstanden. Während des Abkühlens bei Raumtemperatur polymerisierte das Gel durch ein Verflechten der Agarose-Moleküle, wodurch Poren entstanden, deren Größe abhängig ist von der Konzentration des Agarosegels. In festem Zustand wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit TAE-Elektrophoresepuffer gefüllt, sodass das Gel komplett bedeckt war. Je 2 μl DNS wurden mit 3 μl Ladepuffer (Tabelle 2.3, S. 16) in eine Geltasche pipettiert, zusätzlich wurde ein GeneRuler mit Fragmenten bekannter Länge als Größenmarker aufgetragen, anhand dessen die Länge der zu untersuchenden Fragmente abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophoresekammer wurde über ca. 45 min an eine Spannung von 85-90 V angeschlossen, sodass die negativ geladene DNS das Gel in Richtung Anode durchwanderte. Kürzere Fragmente wandern dabei schneller und längere langsamer durch das entstandene Geflecht aus Poren, sodass die DNS-Fragmente der Länge nach aufgetrennt wurden. Die Gelbilder wurden mit dem Bio Doc Analyzer (Tabelle 2.2, S. 14) dokumentiert.

2.11 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösung

Mittels NanoDropTM-Spektrophotometer wurde die Konzentration der eluierten Nukleinsäuren in ng/ μL bestimmt und zudem die Reinheit der DNS bzw. RNS überprüft. Wichtig war, dass die Lösung entweder nur DNS oder nur RNS enthielt, da die Nukleinsäuren photometrisch nicht unterschieden werden können. Zur Konzentrationsmessung wurde die OD bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt, die dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, und bei $\lambda = 280 \text{ nm}$, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Die Konzentration errechnete sich anhand der OD_{260} , der Verdünnung und einem für RNS bzw. DNS spezifischen Multiplikationsfaktor. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} beträgt bei reiner, nicht mit Proteinen verunreinigter DNS bzw. RNS etwa 1,8-2,0.

2.12 Untersuchung der Expression von CIC, FR α , RFC1 und PCFT

2.12.1 Gewinnung von Proteinproben

Um für die Expressionsanalyse eine vergleichbare Menge Protein zu erhalten, erfolgte ein Auszählen der Zellen, um anschließend für jede Proteinvariante die gleiche Anzahl an Zellen verwenden zu können. Zunächst wurden die Zellen unter dem Abzug mit PBS gewaschen, gelöst, zentrifugiert und resuspendiert, wie in Kap. 2.9.1 (S. 34) beschrieben. Dann erfolgte das Zählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und je 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Platten wurden ausgesät.

Bei Konfluenz der Zellen, nach 24-48 h, wurden die Zellen geerntet und Lysate hergestellt. Dabei konnte auf steriles Arbeiten verzichtet werden. Die Zellen wurden pro Well mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend zum Zellaufschluss mit je 100 μ l Lysepuffer (Tabelle 2.3, S. 16) behandelt. Mit einer 100- μ l-Pipette wurde das Zellmaterial geerntet und in je ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, anschließend im Wasserbad aufgetaut und bei 95 °C für 5 min im Heizblock gekocht. Durch Zugabe von Benzonase, 1:5 verdünnt mit Lysepuffer, erfolgte ein Abbau der DNS. Nach 10-15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lysate auf- und abpipettiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation über 10 min mit 13000 rpm bei Raumtemperatur und das Überführen des Überstands in neue Reaktionsgefäße.

2.12.2 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur quantitativen Bestimmung der gewonnenen Proteine erfolgte ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) unter Verwendung des BCA-Kits von Pierca (Tabelle 2.1, S. 11). Dazu wurde in einer 96-Well-Platte eine Standardkurve nach Tabelle 2.14 (S. 42) hergestellt und in Doppelwerten die Proteinprobe in Wasser verdünnt in einem Gesamtvolumen von 25 μ l pro Well pipettiert. In jedes Well wurden 200 μ l Lösung A (Tabelle 2.1, S. 11) + B (Tabelle 2.1, S. 11) im Verhältnis 50:1 hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37 °C über 30 min unter Lichtschutz wurde die 96-Well-Platte anhand des BCA-Spektrophotometers und mithilfe des Programms Gen 5 1.11 ausgelesen. Über die Messung der Absorption konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Tabelle 2.14: Pipettierschema der Standardkurve des BCA-Tests.

Eichprotein [μg]	BSA-Eichprotein [μL]	H ₂ O [μL]
0	0	25
5	2,5	22,5
10	5	20
15	7,5	17,5
20	10	15
30	15	10

2.12.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde verwendet, um die im Lysat vorhandenen Proteine der Molekülgröße nach aufzutrennen, um anschließend spezifische Proteine durch Antikörperfärbung detektieren zu können.

2.12.3.1 Herstellung von SDS-Gelen

Vorbereitend für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte die Herstellung von SDS-PAGE-Gelen, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Herstellung der beiden Komponenten erfolgte durch Zusammenfügen und Vortexen der in Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 aufgelisteten Bestandteile in angegebener Dosierung und Reihenfolge. Je nach Größe des aufzutrennenden Proteins wurde ein 8 oder 12%iges Gel verwendet. Diese unterschieden sich im Wesentlichen in ihrem Anteil an 30%-Acrylamid-Mix (Tabelle 2.1, S. 11). Mit steigendem Acrylamid-Anteil nahm die Porengröße proportional ab, für kleinere Proteine wurde entsprechend ein 12%iges und für größere Proteine, beispielsweise CIC, ein 8%iges Gel verwendet.

Zwischen zwei mit EtOH gereinigte Glasplatten, die durch Abstandhalter einen Zwischenraum für ein 0,75 mm dickes Gel hatten, wurde zunächst das Trenngel pipettiert. Um später eine gerade Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten und Schäden durch Sauerstoffradikale zu vermeiden, wurde über das Trenngel eine Schicht 100 % Isopropanol gegeben. Nach ca. 45-60 min war das Trenngel polymerisiert, das Isopropanol konnte abgegossen und Reste durch Filterpapier entfernt werden. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ohne Blaseneinschluss ein Probenkamm eingesetzt, durch den Taschen für den Probenauftrag entstanden. Nach ca. 30 min war das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert.

Tabelle 2.15: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Trenngels.

	Mengenangaben für ein 8%iges SDS-Trenngel in [ml]	Mengenangaben für ein 12%iges SDS-Trenngel in [ml]
H ₂ O	2,3	1,6
30 % Acrylamid Mix	1,3	2,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3	1,3
10 % SDS	0,05	0,05
10 % Ammoniumpersulfat	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002

Tabelle 2.16: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Sammelgels.

	Mengenangaben für ein 5%iges SDS-Sammelgel in [ml]
H ₂ O	0,68
30 % Acrylamid Mix	0,17
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,13
10 % SDS	0,01
10 % Ammoniumpersulfat	0,01
TEMED	0,001

2.12.3.2 Durchführung der SDS-PAGE

Für den Probenauftrag wurde jeweils die gleiche Menge Protein vorgelegt (zwischen 15 und 20 µg), auf 20 µl mit Lysepuffer aufgefüllt und mit 4-fach-Laemmli-Puffer (Tabelle 2.3, S. 16), versetzt mit β-Mercaptoethanol im Verhältnis 10:1, hinzupipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min im Heizblock gekocht und dann kurz zentrifugiert. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Laufpuffer (Tabelle 2.3, S. 16) gefüllt und nach Entfernung der Kämme wurden die Geltaschen mit je 20 µl Probe beladen. Zusätzlich wurde ein Größenmarker aufgetragen, um die Größe der später angefärbten Proteine abschätzen zu können. An die Elektrophoresekammer wurde über ca. 30 min eine Spannung von 75 V angeschlossen, bis die negativ geladenen Proteine nach unten, Richtung Anode, das Sammelgel durchlaufen und eine Lauffront gebildet hatten. Je nach Molekulargewicht der Proteine und Dichte der Gele wurden über 1,5 bis 2 h 90 V angelegt, bis die Lauffront unten aus dem Gel herausgelaufen war und die Proteine der Größe nach aufgetrennt waren. Kleinere Proteine befanden sich durch ein schnelleres und somit weiteres Durchlaufen des Gels unten und größere oben.

2.12.4 Western Blot

Nach Übertragung der in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran, wird durch Western Blot der immunologische Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörperbindung ermöglicht.

2.12.4.1 Elektrophoretische Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Der Transfer der Proteine erfolgte mittels Semidry-Blotting. Zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden wurde dabei eine homogene Proteinübertragung ermöglicht. Zunächst wurden die für den Transfer benötigten Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer (Tabelle 2.3, S. 16) mit 0,1 % SDS getränkt. Die Zugabe von SDS kann die Effizienz des Transfers größerer Proteine wie CIC erhöhen und das im Transferpuffer enthaltene Methanol ermöglicht eine verbesserte Bindungsfähigkeit an die Membran. Auf die Anode (unten) wurden drei Filterpapiere gelegt, darauf die Membran, darauf das Gel und wiederum drei Filterpapiere. Um einen unvollständigen Proteintransfer zu vermeiden, wurden mögliche Luftblasen aus dem Stapel herausgestrichen. Oben wurde als Deckel die Kathode aufgesetzt und beschwert. Für den Transfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde über 75 min eine Stromstärke von 65 mA pro Membran angelegt.

2.12.4.2 Überprüfen des Transfererfolgs

Unmittelbar nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran für wenige Sekunden in Ponceau-S-Lösung (Tabelle 2.1, S. 11) geschwenkt. Dieser rote Farbstoff bindet reversibel an sämtliche Proteine und färbt Proteinbanden sichtbar an. Mit kalkfreiem Wasser wurde die Membran so lange abgespült, bis das Bandenmuster deutlich zu erkennen war und fotografisch dokumentiert werden konnte.

2.12.4.3 Immundetektion

Um die Bindung weiterer Proteine an unspezifische Bindungsstellen der Membran zu verhindern, erfolgte zunächst über 60 min ein Blockieren der Membran mit Blockier-Puffer (Tabelle 2.1, S. 11) auf dem Schwenktisch. Zum Nachweis von CIC, FR α , RFC1 und PCFT wurden monoklonale Antikörper (Tabelle 2.5, S. 19) verwendet. Diese binden als primäre Antikörper spezifisch an das jeweilige Protein. Für den CIC-AK erfolgte eine Verdünnung von 1:1000 und für FR α , RFC1 und PCFT von 1:500. Jede Membran wurde mit je 2 ml Antikörper-Lösung luftdicht in Folie verschweißt und über Nacht bei 4 °C im Drehrad inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper abpipettiert und bei 4 °C verwahrt. Die Membranen wurden mit

TBS-T (Tabelle 2.3, S. 16) abgespült und dann dreimal für je 10 min auf dem Schwenktisch in TBS-T geschwenkt, um restliche Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen über 60 min in 10 ml einer im Verhältnis 1:10000 verdünnter Sekundärantikörper-Lösung (Tabelle 2.3, S. 16) inkubiert. Jeweils passend zum primären Antikörper wurde zum Nachweis von CIC, RFC1 und PCFT als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen-Antikörper und für FR α ein Anti-Maus-Antikörper verwendet, die an die kristallisierbare Fragmentregion (Fc-Region) des jeweiligen Primärantikörpers binden. Die sekundären Antikörper waren konjugiert mit einer Meerrettichperoxidase (HRP), einem Reporterenzym. Dieses katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion, deren Lichtreaktion den Nachweis der zu detektierenden Proteine ermöglichte. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Membranen erneut dreimal für 10 min in TBS-T und einmal für 5 min in TBS (Tabelle 2.3, S. 16) gewaschen.

Als Substrat für die HRP wurden die beiden Lösungen aus dem Lumi-Light-Western-Blotting-Substrate-Kit (Tabelle 2.1, S. 11) 1:1 durch Auf- und Abpipettieren vermischt und 2 ml auf die Membran gegeben, gleichmäßig verteilt und nach 1 min vorsichtig durch Ausstreichen entfernt. Der Marker wurde mit dem Glow-Writer visualisiert. Mit Hilfe des Fuji Film Luminescent Image Analyzers LAS 4000 (Tabelle 2.2, S. 14) konnte die enzymatische Umsetzung des Substrats durch die HRP sichtbar gemacht und somit die zu untersuchenden Proteine nachgewiesen werden. Da die aufgetragenen Lysate stets die gleiche Menge Protein enthielten, war ebenfalls ein quantitativer Vergleich der Proteinbanden möglich. Eine genaue Auswertung der Bandenstärke mit Rückschluss auf die Proteinmenge erfolgte mit dem Programm ImageJ 1.49v.

2.12.4.4 Strippen der Nitrozellulosemembran

Durch das Strippen konnten die gebundenen Antikörper wieder von der Membran gelöst werden, um die Membran erneut, mit einem anderen Antikörper zu verwenden. Die Membran wurde kurz mit TBS-T abgespült, dreimal für 10 min in Stripping-Puffer (Tabelle 2.3, S. 16) geschwenkt und dreimal für 10 min auf dem Schwenktisch mit TBS-T gewaschen.

2.12.4.5 Kontrollimmundetektion

Es erfolgte die Darstellung eines Kontrollproteins, um zu überprüfen, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge vorhanden ist. Um bei Abweichungen Fehler in der Auswertung zu vermeiden, wurde die Intensität der Bande des Kontrollprotein zur Normalisierung der Proteinmengen von CIC, FR α , RFC1 bzw. PCFT verwendet. In der Regel konnte β -Aktin als Kontrollprotein genutzt werden. Auf den Membranen, die der Darstellung von CIC dienten, wurden stattdessen auch die größeren Proteine Tubulin und Vinculin verwendet, da β -Aktin

aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts zum Teil nicht mit CIC auf derselben Membran abgebildet werden konnte. Gemein haben diese Kontrollproteine, dass sie ubiquitär und hoch exprimiert werden und somit als Kontrolle für die Expression der untersuchten Proteine geeignet waren.

Nach einem erneuten 60-minütigen Blocken, wie bereits beschrieben, wurde die Membran mit 3 ml 1:3000 (β -Aktin) bzw. 1:10000 (Tubulin und Vinculin) verdünnter Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen, dann 60 min in 1:10000 verdünnter Sekundärantikörper-Lösung (anti-Maus) geschwenkt, anschließend noch dreimal für je 10 Min. mit TBS-T und einmal für 5 Min. mit TBS gewaschen. Dann wurde die mit neuen Antikörpern besetzte Membran analog zur bereits beschriebenen Immundetektion mit dem Fuji Film Luminescent Image Analyzers LAS 4000 entwickelt, um die Proteinbanden des Kontrollproteins darzustellen.

2.13 Untersuchung der Folsäurebindung

2.13.1 Radioaktives Bindungsassay

Mit Hilfe von ^3H -gekoppelter Folsäure als Ligand konnte im Isotopenlabor der Einfluss der CIC-Mutationen auf die Folsäurebindung der membranständigen Folsäurerezeptoren in HeLa-Zellen untersucht und mit dem CIC-WT verglichen werden. Für jede Mutation, den Wildtyp und den Leervektor wurden in je zwei Wells einer 6-Well-Platte je $4,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, sodass für das Bindungsassay am Folgetag eine vollständige Konfluenz der Zellen vorlag. Während des Versuchs wurden die 6-Well-Platten auf Eis gelagert. Zunächst wurde mit einer Pasteurpipette das Medium aus den Wells entfernt und die Zellen zweimal für 5 min pro Well mit je 1 ml zuvor auf Eis gekühltem PBS (Tabelle 2.3, S. 16) gewaschen. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen über 5 min mit ebenfalls je 1 ml eisgekühltem Acid-Puffer (Tabelle 2.3, S. 16), um oberflächengebundene Folsäure zu lösen und mit dem Puffer zu entfernen. Um den pH-Wert wieder zu neutralisieren, wurden die Zellen dann zweimal für 5 min mit je 1 ml eisgekühltem HBS (Tabelle 2.3, S. 16) gewaschen. Anschließend wurden je zwei Wells jedes Zellmodells mit je 5 nM ^3H -gekoppelter Folsäure in HBS („heiß“) und die jeweils übrigen zwei Wells mit 5 nM ^3H -gekoppelter Folsäure und zusätzlich 500 nM nicht radioaktiv markierter Folsäure in HBS („kalt“) über 20 min inkubiert. Die unspezifische Bindung entspricht der noch detektierbaren Bindung durch radioaktiv markierte Folsäure nach Absättigung der spezifischen Bindungsstellen durch die „kalte“ Folsäure. Die spezifische Bindung konnte so indirekt als Differenz aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung ermittelt werden. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein dreimaliges Waschen mit je 1 ml HBS pro Well, um überschüssige,

ungebundene Folsäure zu entfernen. Die an den Folsäurerezeptoren gebundene Folsäure wurde anschließend durch 10-minütiges Schwenken in je 1 ml Acid-Puffer gelöst. Der Puffer mit der darin enthaltenen Folsäure wurde in Szintillationsröhrchen überführt, in denen bereits je 4 ml Szintillationsflüssigkeit vorgelegt war. Die Szintillationsröhrchen wurden geschüttelt, sodass die Probe sich homogen verteilen und ein möglichst genaues Zählergebnis durch einen Szintillationsdetektor erreicht werden konnte. Verwendet wurde die Flüssigkeitsszintillation, die sich zum Nachweis energiearmer β -Strahlung eignet, wie sie beim Zerfall des verwendeten Tritiums entsteht. Diese β -Strahlung regt Lösungsmittelmoleküle an, die ihre Energie auf einen Szintillator übertragen. Dieser strahlt die Energie in Fluoreszenzlicht ab, das in elektrische Impulse umgewandelt und aufgezeichnet werden kann. Die Radioaktivität jeder Probe wurde über eine Zählzeit von 10 min ermittelt. Über die unspezifische Bindung konnte nun indirekt die spezifische Bindung von Folsäure bestimmt werden.

2.13.2 Bestimmung der Proteinmenge durch Kontroll-BCA-Assay

Um die Menge an oberflächengebundener Folsäure pro mg Protein bestimmen zu können, wurde für jedes Zellmodell zur selben Zeit und mit derselben Konfluenz ein weiteres Well einer 6-Well-Platte ausgesät wie für das radioaktive Bindungsassay. Diese Zellen wurden zunächst mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend über 5 min mit 200 μ l 0,2 M Natriumhydroxid 5 min lysiert. Das Zelllysat wurde in kreisenden Bewegungen mit der Pipette gesammelt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min mit 1800 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Konzentration des Überstands wurde mithilfe eines BCA-Assays bestimmt.

2.14 Untersuchung der Lokalisation von CIC

Die Darstellung von CIC und an welcher Lokalisation der Zelle das Protein exprimiert wird, erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Eingesetzt wurde ein primärer Antikörper, der spezifisch an CIC bindet und ein sekundärer Antikörper, der an die Fc-Region des primären Antikörpers bindet und zusätzlich mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Diese gebundenen Antikörper konnten im Fluoreszenzmikroskop detektiert und so das gesuchte Protein in den transfizierten Zellen lokalisiert werden.

Unter dem Abzug wurden von jeder Proteinvariante in je zwei Wells 5×10^4 Zellen auf einer 24-Well-Platte ausgesät und jeweils 500 μ l Medium mit 0,05 μ l Puromycin hinzugefügt. Vor Zugabe der Zellen wurde in jedes Well ein rundes Deckgläschen mit einem Durchmesser von 11 mm gelegt, auf dem die Zellen anhafteten und für die Färbung verwendet werden konnten. Für die spätere Darstellung der Zellen war es in der Immunfluoreszenz sinnvoll, die Zellen in

einer Konfluenz von lediglich 30-40 % zu fixieren, da so die Zellen einzeln liegend betrachtet werden konnten. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Vorbereitung zur mikroskopischen Darstellung der CIC-Expression erfolgte in drei Schritten, auf steriles Arbeiten konnte dabei verzichtet werden.

Schritt 1, Fixierung: Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 0,5 ml PBS pro Well gewaschen und anschließend zur Fixierung am Deckgläschen über 20 min bei Raumtemperatur in PBS mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Zur Inaktivierung der Aldehydgruppen erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS die Zugabe von 500 µl 50 mM NH₄Cl in PBS. So konnte eine spätere Bindung des Antikörpers an jene Aldehydgruppen verhindert werden. Nach 10 min wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Schritt 2, Permeabilisierung: Um die Zellwände permeabel zu machen und so ein Eindringen der Antikörper zu ermöglichen, erfolgte über 15 min eine Inkubation der Zellen in 0,5 % Triton in PBS. Um eine weitere Zerstörung der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Schritt 3, Blockierung und Färbung: Zum Blockieren wurde zunächst eine 1 %-Milchpulver-Lösung (Tabelle 2.3, S. 16) in PBS angesetzt, diese bei 4000 rpm über 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon überführt. Je 500 µl dieser Lösung wurden pro Well auf die Zellen gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und so unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Danach konnte die Inkubation mit dem primären AK erfolgen, der gegen das zu untersuchende Protein CIC gerichtet war. Pro Deckgläschen wurden je 30 µl des endogenen CIC-Antikörpers in einer Konzentration von 1:250 auf Parafilm pipettiert. Jedes Deckgläschen wurde vorsichtig mit einer Pinzette auf einen Tropfen der Antikörper-Lösung gelegt. Die mit den Zellen besetzte Seite kam nach unten gewendet, direkt auf der AK-Lösung zu liegen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am Folgetag wurden die Deckgläschen dreimal mit je 500 µl gewaschen. Überschüssiger AK wurden so entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einem sekundären anti-Kaninchen-AK inkubiert, der gegen die Fc-Region des primären AK gerichtet war. Zusätzlich war dieser mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelt, das in der Immundetektion rot erscheint. Wie zuvor beschrieben, wurden die Deckgläschen auf einen 30-µl-Tropfen der Sekundär-AK-Lösung gelegt und für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde erneut PBS in die vorherigen Wells vorgelegt und die Zellen darin dreimalig mit PBS gewaschen und so auch verbleibende Sekundärantikörper entfernt. Abschließend wurden die Deckgläschen einzeln erst in H₂O und dann in EtOH getaucht, kurz getrocknet und mit 4 µl Dapi mit Moviol als Eindeckmedium gelegt und auf einem Objektträger platziert. Durch das Moviol wurden die

Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert und die Zellen konserviert. In diesem Zustand konnten die Zellen im Kühlschrank gelagert und für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden. Repräsentative Zellen wurden zur Dokumentation und Beurteilung fotografiert.

Wie Cy3 diente auch Dapi als fluoreszierender Farbstoff, dieser erscheint im Fluoreszenzmikroskop blau. In Zellen, die das GFP-Tag enthielten, war dieses namensgebend als grüne Fluoreszenz sichtbar. GFP war an das Zielprotein CIC gekoppelt, wodurch dieses als Fusionsprotein in der Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls lokalisiert und mithilfe des Programms Axio Vision LE (Tabelle 2.2, S. 14) dargestellt werden konnte.

2.15 Expressionsanalyse auf RNS-Ebene

Um die Genexpression auf RNS-Ebene untersuchen zu können, musste zunächst die RNS aus den Zellkonstrukten extrahiert und aufgereinigt werden, anschließend erfolgte eine Übersetzung in komplementäre DNS (cDNS), die als Template für eine quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt werden konnte. Diese beruht auf dem Prinzip der bereits beschriebenen PCR, ermöglicht aber zudem eine quantitative Analyse der Genexpression.

2.15.1 RNS-Extraktion

Durch Zellyse wurde RNS aus kultivierten Zellen gewonnen und über mehrere Waschstschritte von allen anderen Zellbestandteilen isoliert. Für jede Proteinvariante wurden 3×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach Inkubation im 37 °C-Wärmeschränk erfolgte nach 24 h die RNS-Extraktion anhand des Protokolls RNA purification from cultured cells and tissue von Macherey und Nagel und dem zugehörigen Kit (Tabelle 2.1, S. 11). Vorbereitend wurden Arbeitsplatz, Handschuhe und Arbeitsmaterialien mit RNase Away behandelt, um eine Zerstörung der labilen RNS durch ubiquitär vorkommende RNasen während der Extraktion zu verhindern. Unter dem Abzug wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS pro Well gewaschen, mit je 500 µl Trypsin gelöst und bei 800 rpm über 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen im Überstand auf Eis gelagert, die weiteren Arbeitsschritte erfolgten am RNase-dekontaminierten Arbeitsplatz. Die Zellen wurden in je 1 ml PBS resuspendiert und in je ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, erneut über 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspension in je 350 µl Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol pro Reaktionsgefäß lysiert. Die Resuspension erfolgte stets mit unten abgeschnittenen Pipettenspitzen, um die Öffnung zu vergrößern und so Scherkräfte zu reduzieren, die die RNS beschädigen könnten. Außerdem

wurden ausschließlich RNase-freie, gestopfte Spitzen verwendet. Direkt nach der Lyse wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und langsam auf Eis wieder aufgetaut. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat homogenisiert, auf einen NucleoSpin® Filter gegeben und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert, wodurch Zellbestandteile von der RNS getrennt und die Viskosität reduziert werden konnte. Die RNS befand sich nun im Überstand. Um ihre Bindungsfähigkeit zu verbessern, wurde diese mit je 350 µl 70%igem EtOH fünfmal auf- und abpipettiert und anschließend auf eine NucleoSpin® RNS-Säule gegeben, an die die RNS während erneuter Zentrifugation bei 11000 x g über 30 s gebunden wurde. Die RNS-besetzte Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen überführt, vorsichtig mit 350 µl Membranentsalzungspuffer (MDB) benetzt und über 1 min bei 11000 x g zentrifugiert, wodurch die Membran der Säule entsalzt und so die Effizienz des nachfolgenden DNS-Verdaus erhöht werden konnte. Für den Verdau wurde eine rDNase-Reaktions-Lösung aus 10 µl rDNase und 90 µl Reaktionspuffer für rDNase vorbereitet, 90 µl der Lösung auf die Membran pipettiert und über 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. So konnte sichergestellt werden, dass die RNS später nicht mit ribosomaler DNS kontaminiert war, die andernfalls ein mögliches Template in der qRT-PCR wäre und anstatt der neu generierten cDNS hätte vervielfältigt werden können. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe. Zunächst wurden 200 µl Puffer RAW2 auf die Membran gegeben, diese für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert und so die rDNase inaktiviert. Durch Zugabe von zunächst 600 µl Puffer RA3 und Zentrifugation für 30 s bei 11000 x g, dann Zugabe von 250 µl Puffer RA3 und Zentrifugation über 2 min bei 11000 x g, wurden zuvor verwendete Lösungen von der RNS-besetzten Säule entfernt und die Membran getrocknet. Dann wurde der Filter in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gestellt, 40 µl RNase-freies H₂O auf die Membran pipettiert und durch Zentrifugation bei 11000 x g über 1 min die isolierte RNS darin eluiert. Bis zur Verwendung konnte die RNS bei -80 °C gelagert werden.

2.15.2 Photometrische Konzentrationsmessung und Kontrollgel

Wie bereits für DNS beschrieben (Kap. 2.11, S. 40), erfolgte auch für die isolierte RNS die Konzentrationsmessung und eine Kontrolle auf Reinheit mit dem NanoDrop™. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ betrug bei reiner, nicht mit Proteinen oder DNS verunreinigter, RNS etwa 1,8-2,0.

Durch Agarose-Gelelektrophorese konnte zudem die Intaktheit der RNS überprüft werden. Eingesetzt wurden 500 ng RNS in 5 µl RNase-freiem H₂O und 5 µl 2 × RNA Loading Dye. In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden die Lösungen vorsichtig auf- und abpipettiert, für 10 min in einem 70 °C-Heizblock inkubiert, anschließend auf Eis heruntergekühlt, abgefugt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein GeneRuler aufgetragen, mit dessen

Referenzbanden später die Größe der RNS-Banden bestimmt werden konnte. Das Agarosegel wurde in einer Elektrophoresekammer zunächst über 10 min an 80 V und anschließend über 95 min an 95 V angeschlossen, wodurch die RNS-Fragmente Richtung Anode wanderten und ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Durch die im RNA Loading Dye enthaltenen Bestandteile Bromphenolblau, Xylencyanol und Ethidiumbromid wurden die RNS-Banden im Gel angefärbt und konnten unter UV-Licht dargestellt werden. Bei Integrität der RNS waren auf dem Gel eine 18 Svedberg (S) und eine 28 S-Bande in doppelter Stärke zu erkennen, entsprechend der ribosomalen RNS eukaryotischer Zellen. Es war darauf zu achten, dass die beiden Banden voneinander isoliert und ohne Schmierfilm als Korrelat einer Degradation abgebildet waren. Nur dann konnte die extrahierte RNS für die cDNS-Synthese und die anschließende qRT-PCR verwendet werden.

2.15.3 cDNS-Synthese

Die zuvor aus Zellen isolierte RNS diente als Template für die Synthese einer dazu komplementären Erststrang-DNS mithilfe einer reversen Transkriptase (RT), einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase. Im Sinne einer PCR erfolgte die Synthese mit ausgewählten Primern und Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Im Gegensatz zu natürlicherweise in Eukaryoten vorkommender DNS enthält die anhand einer RNS generierte cDNS keine Introns.

Die cDNS-Synthese erfolgte mithilfe des SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System. Sämtliche Lösungen des Kits wurden während der Durchführung des Protokolls auf Eis gelagert. Eingesetzt wurden je 2 µg RNS, 1 µl 50 mM oligo(dt)-Primer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und Diethylprocarbonat(DEPC)-behandeltes Wasser, mit dem der Reaktionsansatz auf 10 µl aufgefüllt wurde. Im Thermocycler wurde der Ansatz zur RNS-Denaturierung zunächst für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf 4 °C heruntergekühlt. Dann wurden 10 µl eines cDNS-Synthese-Mix¹ hinzugefügt, bestehend aus 2 µl 10 × RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol, 1 µl RNaseOUTTM (40 U/µL), ein RNase-Inhibitor, um zu diesem Zeitpunkt noch eine Degradation der RNS zu verhindern, und 1 µl SuperScript[®] III RT (200 U/µL). Bei Inkubation bei 50 °C über 50 min erfolgte, wie bereits bei der PCR beschrieben, das Annealing der Primer und die eigentliche Synthese der cDNS durch die reverse Transkriptase. Durch weiteres Erhitzen auf 85 °C über 5 min wurde die Reaktion gestoppt und erneut auf 4 °C heruntergekühlt. Das Ergebnis war zunächst ein an die als Template dienende RNS synthetisierter DNS-Strang. Um diesen als isoliertes Produkt zu erhalten, erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe von 1 µl RNase H, die unter Inkubation bei 37 °C für 20 min die RNS abbaute. Die synthetisierte cDNS wurde mit 180 µl H₂O auf 200 µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.15.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) erfolgte nach der Zwei-Schritt-Methode. Nach der bereits erfolgten cDNS-Synthese erfolgte mit einem Aliquot des Produkts in einem neuen Reaktionsansatz die qRT-PCR. Diese beruht auf dem Prinzip der bereits beschriebenen PCR, ermöglichte jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der DNS bzw. der Expressionsrate der zugrundeliegenden RNS. Diese erfolgte anhand von Messungen der Fluoreszenz, die während der exponentiellen Phase der Amplifikation proportional zur DNS-Menge zunimmt. Da nach jedem Zyklus die Menge der Produkte bestimmt wird, war es möglich, die Menge der zu Beginn vorhandenen DNS-Menge zu bestimmen.

Untersucht wurde die Amplifizierung der Genabschnitte, die für die Proteine CIC und die drei Folattransportproteine FR α , RFC1 und PCFT kodieren, außerdem die Amplifikation der beiden Referenzgene für die *ribosomal protein lateral stalk subunit P0* (*RPLP0*) und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), die als interne Mengenkontrolle zur relativen Quantifizierung dienten. Für jedes der Proteine wurden jeweils Triplikate der cDNS von Leervektor, CIC-WT und den drei Mutationen untersucht. Der Reaktionsansatz wurde in einer 96-Well-PCR-Platte vorbereitet. Eingesetzt wurden pro Well jeweils 5 μ l der verdünnten cDNS, 6,5 μ l H₂O, je 0,5 μ l eines zu den zu untersuchenden Proteinen passenden *Forward* und eines *Reverse*-Primers und 12,5 μ l eines qRT-PCR-Mastermix (Tabelle 2.1, S. 11). Dieser enthielt eine DNS-Polymerase, die als Bausteine für die DNS-Synthese benötigten dNTPs, MgCl₂ als Coenzym zur Optimierung der Reaktion sowie SYBR Green. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der mit der DNS interkalierte und mit Hilfe eines Detektionssystems als Fluoreszenz sichtbar gemacht und so die Menge der synthetisierten Produkte ermittelt werden konnte. Für jedes Protein wurden zusätzlich je drei Negativkontrollen untersucht, die statt cDNS weitere 5 μ l H₂O enthielten. Beim Pipettieren wurde darauf geachtet, dass es nicht zur Bildung von Luftblasen kam, die die Messung hätten beeinflussen können. Mit einer Folie wurden die Wells dicht verschlossen und die Well-Platte anschließend für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Mit Hilfe des MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection Systems und des dazugehörigen Programms BioRad IQ5 erfolgte die Vervielfältigung der eingesetzten cDNS und nach jedem Zyklus eine Quantifizierung der PCR-Produkte anhand von Fluoreszenzsignalen. Es erfolgten 40 PCR-Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C. Nach Ablauf der PCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse der amplifizierten Produkte durchgeführt, wodurch die Länge der Fragmente und somit deren Spezifität bestimmt werden konnte. Graphisch ergaben sich in Betrachtung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Anzahl der abgelaufenen Zyklen sigmoidal verlaufende Kurven. Für den Vergleich der Werte relevant war hier der Teil der Kurve, der eine exponentielle

Zunahme der Fluoreszenz als Korrelat der Zunahme der Amplifikationsprodukte darstellte. Dieser Bereich entspricht dem Verlauf einer PCR unter optimalen Bedingungen, unter denen die DNS nach jedem Zyklus verdoppelt wird. Für den letztendlichen Vergleich der Expression wurde ermittelt, nach wie vielen Zyklen ein bestimmter Schwellenwert des Fluoreszenzsignals überschritten wurde, dieser Wert wird als Ct-Wert bezeichnet. Die Menge der mRNA wurde angegeben als n-fache Expression des Leervektors unter Verwendung der Formel $2^{\Delta CT}$. Durch den Einsatz von *GAPDH* und *RPLP0* als internen Standard konnte eine relative Quantifizierung der Expression der untersuchten Proteine unter Einfluss der verschiedenen Mutationen erfolgen.

2.16 Datenanalyse

Alle Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Verwendet wurde die Software GraphPad Prism 8.4.2 (Tabelle 2.2, S. 14). Die statistische Analyse der Unterschiede wurde durchgeführt mittels einfacher Varianzanalyse (*One-way ANOVA*), gefolgt von einem Tukey-Test als *post hoc* Verfahren für multiple Vergleiche. Für signifikante Unterschiede wurde der *p*-Wert angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von stabilen GFP-CIC-Mutanten in HeLa-Zellen

Um einen möglichen Einfluss des Proteins CIC auf den zerebralen Folattransport zu untersuchen, wurden stabile Klone für den CIC-WT und die beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I sowie die Stopmutation p.R353X generiert. Mittels Expressionsvektoren wurden die Gensequenzen, die für CIC und dessen Mutationen kodieren, durch stabile Transfektion bzw. lentivirale Transduktion in HeLa-Zellen integriert. Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurde ein GFP-Tag ebenfalls transfiziert, sodass ein CIC-GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde. Zunächst wurde die Expression von CIC und drei verschiedenen Folattransportproteinen mittels Western Blot Analyse unter dem Einfluss der Mutationen untersucht. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Vektor transfiziert worden waren.

3.1.1 Untersuchung der Expression von CIC in HeLa-Zellen durch Western Blot Analyse

Um Vorgänge zu untersuchen, die *in vivo* insbesondere in epithelialen Zellen wie denen des Plexus choroideus erfolgen, wurden HeLa-Zellen verwendet, menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Diese weisen eine hohe Teilungsrate auf und zeichnen sich bereits durch eine standardisierte Verwendung für molekularbiologische Versuche aus. In der Regel wurden Mischklone verwendet, für die Stopmutante p.R353X wurden zudem Einzelklone selektioniert, um die Versuche an einer möglichst homogenen Zellpopulation durchzuführen. Das Protein CIC ließ sich nachweisen mit dem polyklonalen CIC-Antikörper (Tabelle 2.5, S. 19) und ebenso mit dem monoklonalen GFP-Antikörper (Tabelle 2.5, S. 19), da CIC und GFP als Fusionsprotein gemeinsam detektiert und angefärbt werden konnten. Letzterer färbte jedoch z.T. auch unspezifisch Banden an, weshalb die mit dem GFP-Antikörper angefärbten Western Blots nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. In den Proteinvarianten des CIC-WT und der beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I wurden Proteinbanden mit einer Masse von ca. 277 kDa detektiert, wie in der Abbildung 3.1 (S. 55) in den Linien a ersichtlich. Lu et al. beschrieben, dass CIC-S (164 kDa) einen Komplex bildet mit dem DNS-Bindeprotein Ataxin 1 (87 kDa) (Lu et al. 2017). In sämtlichen Produkt-Datenblättern zu CIC-AKs wird eine sichtbare Bande bei ca. 250 kDa beschrieben, die auf diese Interaktion mit Ataxin 1 zurückgeführt wird. Gemeinsam mit GFP (27 kDa) ergibt sich eine Proteinmasse, die mit der im Western Blot detektierten Bande übereinstimmt. In der Stopmutante p.R353X wurde mit dem CIC-Antikörper eine Bande bei 66 kDa detektiert, korrelierend zu dem unvollständig exprimierten Protein. β -

Aktin (42 kDa) konnte in allen Proteinvarianten detektiert werden und diente der anschließenden Quantifizierung der Proteinexpression. Eindeutig ist der Einfluss der Stopmutante p.R353X auf die Expression des Proteins CIC, das in sämtlichen Western Blots der Stopmutante mit einem deutlich geringeren Molekulargewicht detektiert wurde.

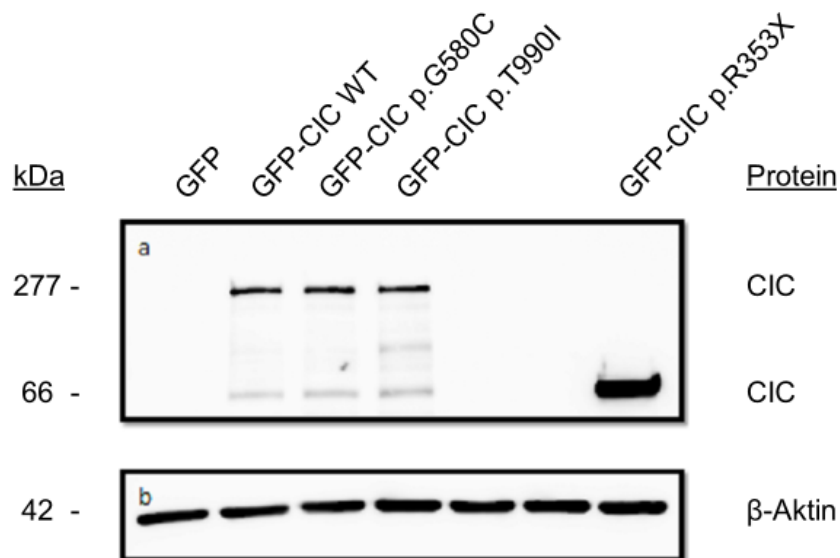


Abbildung 3.1: Western Blot Analyse stabil transfizierter HeLa-Zellen zum Nachweis der Expression des CIC-Wildtyps und der CIC-Mutanten p.G580C, p.T990I und p.R353X als Fusionsprotein mit GFP. a) Die Immundetektion erfolgte mit dem polyklonalen CIC-Antikörper (Verdünnung 1:1000) und einem sek. Anti-Kaninchen-AK (Verdünnung 1:10000). b) Außerdem erfolgte die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin mit einem monoklonalen Mausantikörper (Verdünnung 1:3000) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000). CIC ist im WT und den Mutanten p.G580C und p.T990I als Protein mit einer Masse von 277 kDa abgebildet, die Stopmutation p.R353X führt zu einer Verkürzung des Proteins mit einer verringerten Molekülmasse von 66 kDa, ersichtlich in der letzten Spalte.

Die Quantifizierung der Proteinintensitäten erfolgte durch die Analyse der Ergebnisse von jeweils mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Mit Hilfe des Programms ImageJ 1.49v wurde aus den im Western Blot abgebildeten Proteinbanden die Intensität der einzelnen Banden ermittelt und auf die Bandenintensität von β -Aktin normalisiert, was einen quantitativen Vergleich der Proteinexpressionen ermöglichte. Hier zeigten sich ähnliche Intensitäten für CIC-WT und die beiden Mutationen p.G580C und p.T990I. Das verkürzte CIC-Protein der Stopmutante p.R353X hingegen zeigt eine etwa sechsfach stärkere Intensität der Bande und damit eine signifikant höhere Expression als der Wildtyp, ersichtlich in Abbildung 3.2 (S. 56).

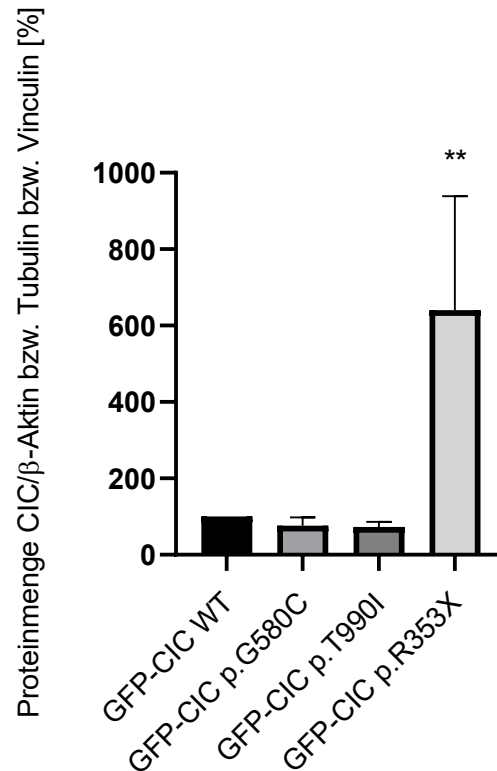


Abbildung 3.2: Quantifizierung der Proteinintensitäten von CIC für CIC-WT und die CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen. Die CIC-Expression wurde normiert auf die Expression von β-Aktin/Tubulin/Vinculin. n = 3, ** $p = 0,0013$ im Vergleich zum WT. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test.

3.1.2 Untersuchung der Expression von *FOLR1* unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse

Untersucht wurde der Einfluss von CIC und dessen Mutationen auf die Expression des hauptsächlich in den Epithelzellen vorkommenden Folatrezeptors $FR\alpha$ (Steinfeld et al. 2009). Auch diese Versuche erfolgten zunächst in HeLa-Zellen mit Konstrukten, die CIC-GFP exprimierten. Der Nachweis der Expression von $FR\alpha$ gelang mit dem monoklonalen IgG-Antikörper NCL-L-FRalpha. Das ca. 35 kDa große Protein konnte in allen fünf Proteinvarianten, dem CIC-WT, den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X sowie dem Leervektor, detektiert werden. Aufgrund der kovalenten Bindung an einen Lipidanker, den GPI-Anker, und mehrerer Glykosylierungen wird für den $FR\alpha$ keine klare Bande abgebildet (Galian et al. 2012). Exemplarisch ist eines der Western Blot Ergebnisse in Abbildung 3.3 (S. 57) dargestellt.

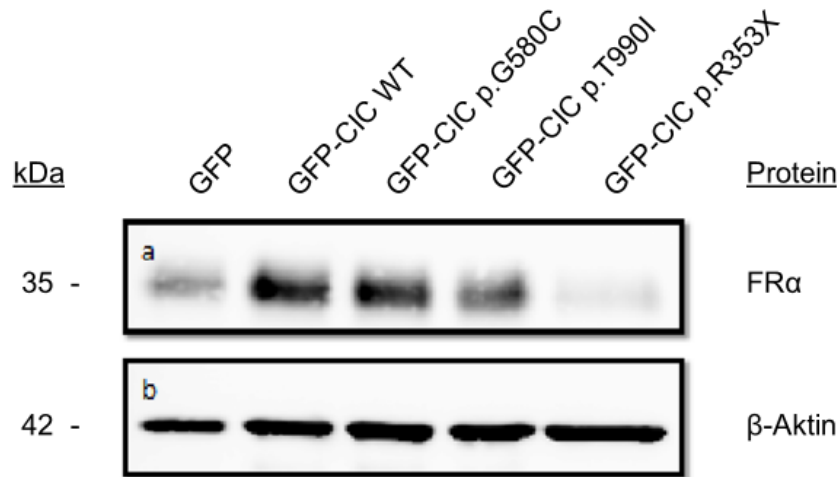


Abbildung 3.3: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X. a) Die Immundetektion des FR α erfolgte mit dem monoklonalen IgG-Antikörper NCL-L-FR α (Verdünnung 1:500) und einem sek. Anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10000). b) Die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper (1:3000 verdünnt in 1 % Milchpulver in TBS-T) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000).

Mithilfe des Programms ImageJ konnte eine Quantifizierung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen erfolgen. Alle Banden wurden wie oben beschrieben mit β -Aktin normiert und auf den Leervektor mit 100 % bezogen. Damit lag die Proteinexpressionen des WT und der beiden Mutanten p.G580C und p.T990I etwa 100-150 % über der im Leervektor ermittelten Expression von FR α . Im Vergleich der beiden Missense-Mutanten untereinander liegt der Mittelwert der Expression im Zellmodell der Mutante p.T990I zehn Punkte niedriger als im Zellmodell der Mutante p.G580C. Die Expression von FR α in den Zellen, die mit der Stopmutation p.R353X transfiziert wurden, betrug dagegen nur die Hälfte der bei CIC-WT und etwa ein Drittel der in den Missense-Mutationen ermittelten Proteinexpression und ist somit signifikant niedriger, wie in Abbildung 3.4 (S. 58) graphisch dargestellt. Ein Einfluss von CIC auf die Expression des FR α im Sinne eines Aktivators kann anhand dieses Ergebnisses vermutet werden. Diese positive CIC-Regulation der FR α -Expression wird auch in Bezug auf die Stopmutante deutlich, deren Expression signifikant herabgesetzt ist.

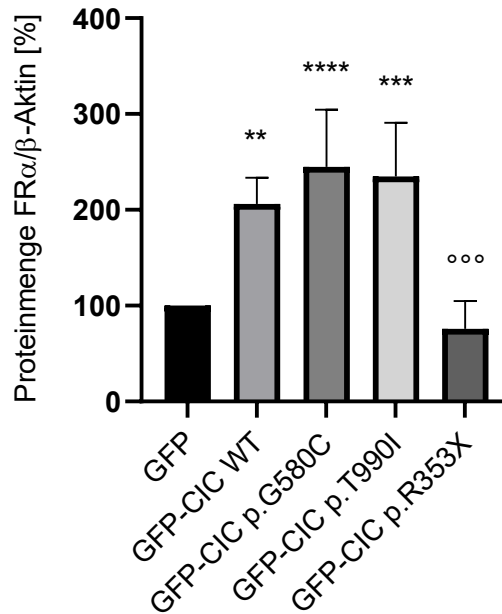


Abbildung 3.4: Quantifizierung der Proteinintensitäten des FR α im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen. Die FR α -Expression wurde normiert auf die Expression von β -Aktin. $n = 3$, **** $p < 0,0001$; *** $p = 0,0005$; ** $p < 0,006$ im Vergleich zum Vektor (GFP), ooo $p = 0,0007$ im Vergleich zum CIC-WT. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test. Die FR α -Expression des WT und der Mutationen p.G580C und p.T990I lagen 100-150 % über der Expression des Leervektors. Die FR α -Expression der Mutation p.R353X beträgt die Hälfte der Expression im WT und etwa ein Drittel der Expression der Missense-Mutationen.

3.1.3 Untersuchung der Expression von RFC1 unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse

Der Einfluss von CIC und den CIC-Mutationen wurde ebenfalls auf die Expression von RFC1 untersucht. Dieser Folattransporter wird *in vivo* vor allem in den Leberzellen exprimiert und nur zu einem geringen Teil auch in den Zellen des Plexus choroideus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression in HeLa-Zellen untersucht und die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ausgewertet. RFC1 konnte mit dem polyklonalen IgG-AK Anti-SLC19A1 nachgewiesen werden. Er wurde in allen generierten Proteinvarianten sowie im Leervektor als Proteinbande mit einer Masse von 65 kDa detektiert, wie in Abbildung 3.5 (S. 59) dargestellt.

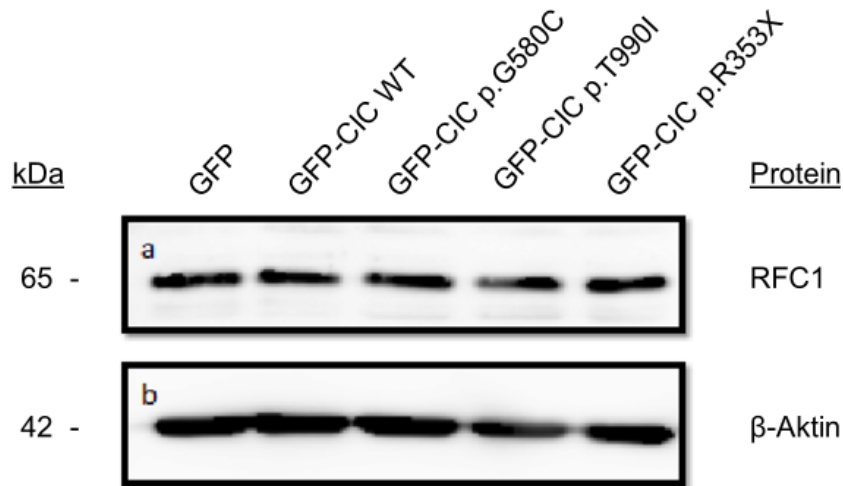


Abbildung 3.5: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X. a) Die Immundetektion des RFC1 erfolgte mit dem polyklonalen IgG-Antikörper Anti-SLC19A1 (Verdünnung 1:500) und einem sek. Anti-Kaninchen-AK (Verdünnung 1:10000). b) Die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper (Verdünnung 1:3000) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000).

Zur Quantifizierung der Expression des RFC1 wurde verfahren, wie oben für den FR α beschrieben. Zur Vergleichbarkeit der Werte wurde die Intensität der Proteinexpression auf die Intensität von β -Aktin normalisiert. Der Mittelwert wurde ermittelt und durch die Standardabweichung ergänzt, dargestellt in Abbildung 3.6 (S. 60). Die errechneten Mittelwerte der Proteinexpression sämtlicher Zellmodelle befinden sich zwischen 80 und 100 %, bezogen auf die Expression des RFC1 im Leervektor. Im Gegensatz zum FR α unterscheiden sich die Intensitäten der Banden folglich nur um bis zu etwa 20 % im Vergleich zum Leervektor. Mit Werten von 82 beim CIC-WT, 90 bzw. 91 bei den Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I und 83 % bei der Stopmutation p.R353X unterscheiden sich die Expressionen von RFC1 nicht signifikant voneinander. Ein Einfluss von CIC auf die Expression von RFC1 konnte somit nicht festgestellt werden.

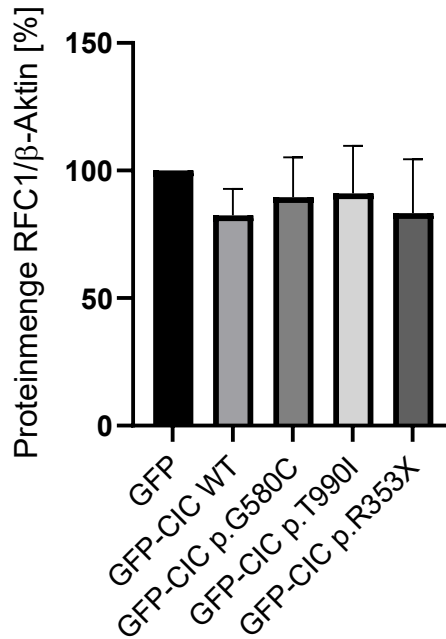


Abbildung 3.6: Quantifizierung der Proteinintensitäten des RFC1 im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen. Die RFC1-Expression wurde normiert auf die Expression von β -Aktin. n = 3. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test.

3.1.4 Untersuchung der Expression von PCFT unter dem Einfluss von CIC und dessen Mutationen durch Western Blot Analyse

Zusätzlich wurde ebenfalls die Expression des PCFT auf einen möglichen Einfluss von CIC untersucht. Der PCFT wird in hohem Grade im Intestinaltrakt exprimiert, hier vermittelt er insbesondere die Aufnahme von Folaten über den Dünndarm. Er wird jedoch auch ubiquitär im Gehirn, unter anderem in den Zellen des Plexus choroideus exprimiert (Steinfeld et al. 2009). Im Zellmodell wurde der PCFT mit dem Anti-SLC46A1-AK in HeLa-Zellen detektiert und konnte sowohl im CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X als auch in den mit dem Vektor transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Entsprechend der Masse des PCFT wurde im Western Blot eine Bande bei 54 kDa detektiert, dargestellt in Abbildung 3.7 (S. 61).

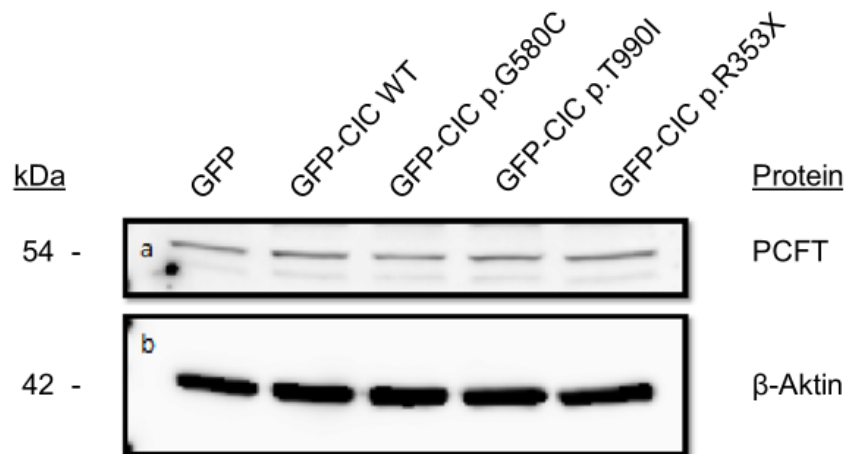


Abbildung 3.7: Western Blot Analysen stabil transfizierter HeLa-Zellen mit dem Leervektor, CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X. a) Die Immundetektion des PCFT erfolgte mit dem Anti-SLC46A1-AK (Verdünnung 1:500) und einem sek. Anti-Kaninchen-AK (Verdünnung 1:10000). b) Die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper (1:3000 verdünnt in 1 % Milchpulver in TBS-T) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000).

Die Quantifizierung der Expression des PCFT erfolgte wie bereits oben beschrieben durch Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichung aus der Analyse der durchgeführten Western Blots. Bezogen auf die Proteinexpression in den vektortransfizierten Zellen, festgelegt auf 100 %, ergaben sich für die anderen Proteinvarianten etwas niedrigere Werte von wenigstens 75 % in der Mutante p.G580C. In den Zellen der Mutation p.T990I beträgt der Mittelwert der Expression 82 % und in denen des CIC-WT und der Stopmutante p.R353X jeweils 93 %, dargestellt in Abbildung 3.8 (S. 62). Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Basierend auf diesem Ergebnis kann, wie bereits für den RFC1 beschrieben, auch für den PCFT kein Einfluss von CIC auf dessen Expression nachgewiesen werden.

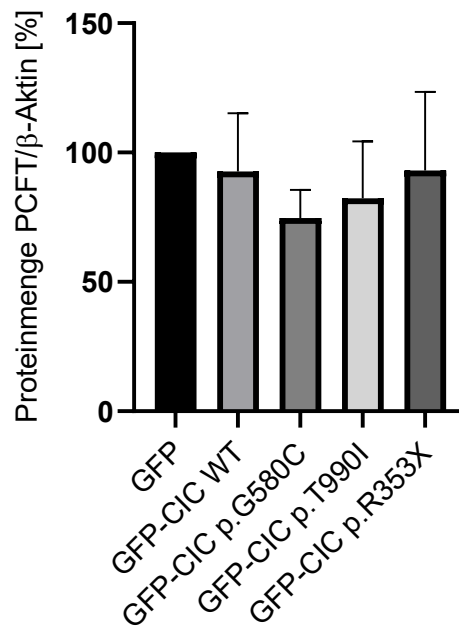


Abbildung 3.8: Quantifizierung der Proteinintensitäten des PCFT im Leervektor, CIC-WT und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X in HeLa-Zellen. Die PCFT-Expression wurde normiert auf die Expression von β -Aktin. $n = 3$. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test.

3.2 Charakterisierung der GFP-CIC-Mutanten in HeLa-Zellen

3.2.1 Lokalisation des CIC-WT und der CIC-Mutationen in HeLa-Zellen

Es wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der CIC-Mutationen auf die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle zu untersuchen. Verglichen wurde die Lokalisation von CIC mit den drei Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X mit der Lokalisation des CIC-WTs. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren. Die Untersuchung erfolgte an HeLa-Zellen, die fixiert und permeabilisiert wurden, um das Eindringen der zur Immunmarkierung verwendeten Antikörper zu ermöglichen. Verwendet wurde ein polyklonaler Kaninchen-AK, der an ein Epitop des CIC-Proteins bindet, und ein an das Fluorophor Cy3TM gekoppelter Anti-Kaninchen-AK. Durch Bindung dieses sekundären AKs an die Fc-Region des CIC-AKs konnte die Lokalisation von CIC anhand der roten Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert werden. Durch das GFP-Tag des verwendeten Expressionsvektors, das zusammen mit dem CIC-Protein exprimiert wurde, wurde die CIC-Überexpression durch grüne Fluoreszenz abgebildet. Nukleinsäuren erschienen durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI blau und kennzeichneten so die Zellkern(ZK)-Region. Für jedes Zellmodell wurde ein Bildausschnitt mit repräsentativen Zellen ausgewählt und in Abbildung 3.9 (S. 64) dargestellt.

In den vektortransfizierten Zellen zeigt sich eine innerhalb der Zelle gleichmäßig verteilte Bindung des CIC-AKs. Im Vergleich zu den anderen Zellmodellen ist die Fluoreszenz geringer ausgeprägt und entspricht am ehesten der unspezifischen AK-Bindung. In den erfolgreich transfizierten Zellen konnte zusätzlich das GFP-Tag dargestellt werden, das ebenfalls sowohl im ZK als auch im Zytoplasma detektiert wurde. Da GFP mit CIC als Fusionsprotein exprimiert wurde, entspricht dies der Lokalisation der Überexpression von CIC. In den Zellen, die mit dem CIC-WT transfiziert wurden, ist sowohl die Bindung des CIC-AKs, der auch die endogene CIC-Expression detektiert, als auch die Fluoreszenz des GFPs auf die durch die DAPI-Färbung markierte Region des ZKs begrenzt. Insbesondere in der Überlagerung wird deutlich, dass CIC ausschließlich mit den Nukleinsäuren kolokalisiert und folglich kernständig lokalisiert ist. Die Zellmodelle der beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I zeigen ein mit dem CIC-WT vergleichbares Fluoreszenzmuster. Auch hier wurde das CIC-Protein bzw. das Fusionsprotein aus CIC und GFP in einer fast ausschließlich kernständigen Lokalisation detektiert. In Zellen der Mutante p.G580C konnte eine sehr geringe Bindung des CIC-AKs zytoplasmatisch beobachtet werden. Da diese Bereiche nicht zusätzlich eine Lokalisation von GFP anzeigen, spricht dies für eine unspezifische Bindung des CIC-Antikörpers, die auch im Leervektor detektiert wurde. In den Zellen der Stopmutante p.R353X wurde CIC durch den CIC-AK und anhand der Fluoreszenz des GFP in der Überexpression des CIC-GFP-Fusionsproteins sowohl kernständig als auch zytoplasmatisch detektiert. In der Abbildung, die isoliert das Fluoreszenzmuster des CIC-AKs darstellt, zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung des Signals in ZK und Zytoplasma. Dieses Ergebnis zeigt an, dass das durch das vorzeitige Stopcodon verkürzte Protein auch eindeutig zytoplasmatisch lokalisiert ist, im Gegensatz zu allen anderen hier untersuchten CIC-Varianten.

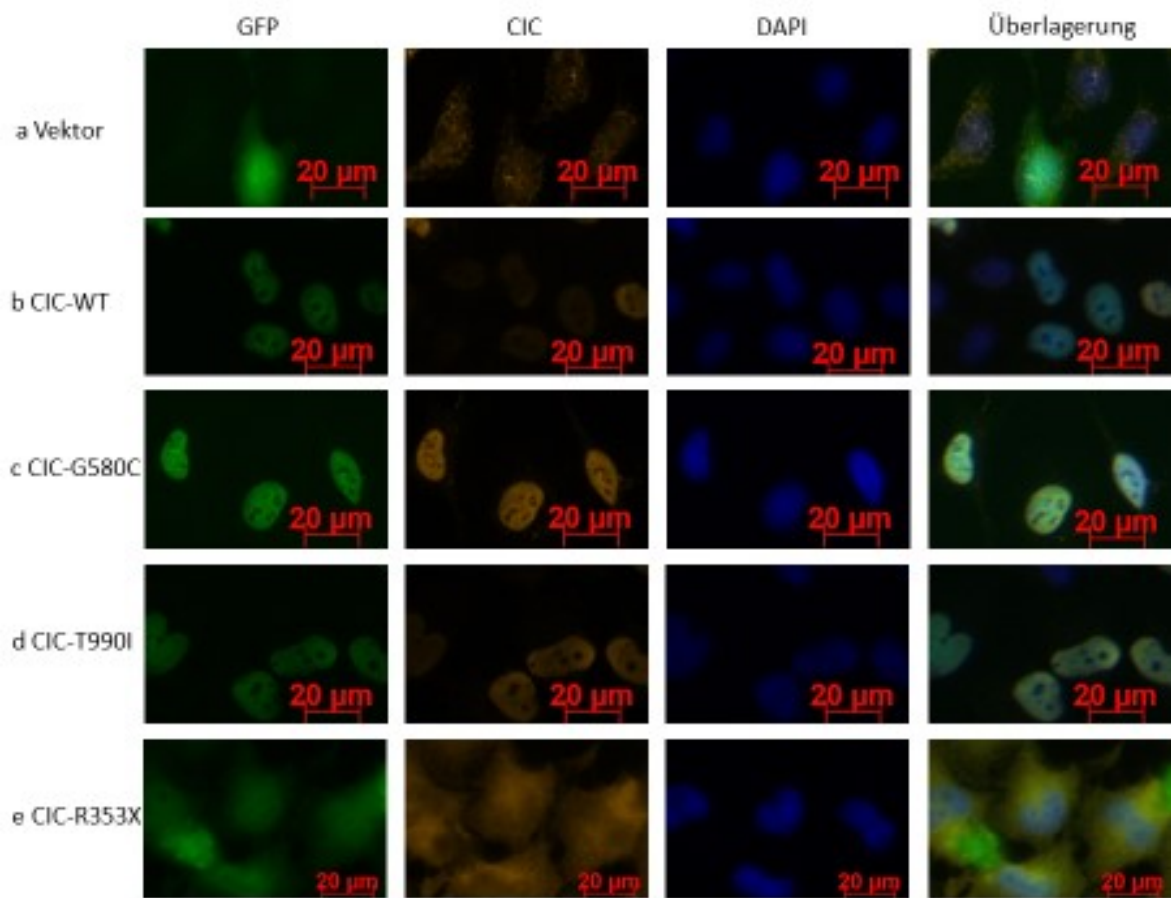


Abbildung 3.9: Lokalisationsanalyse des CIC-WT und dessen Mutanten p.G580C, p.T990I und p.R353X mithilfe von Immunfluoreszenzanalyse. Zum Vergleich dienten vektortransfizierte Zellen (a). Verwendet wurden stabil transfizierte HeLa-Zellen. Bei den Zellen der Mutation p.R353X handelt es sich um Einzelzellklone, bei allen weiteren um Mischklone. CIC wurde im WT und den Missense-Mutanten p.G580C und p.T990I kernständig detektiert, kolokalisiert mit dem Nukleinsäuremarker DAPI (b-d). Im Leervektor zeigte sich sowohl kernständig als auch zytoplasmatisch ein nur geringes Fluoreszenzsignal (a). In der Stopmutante p.R353X zeigte sich kernständig und zytoplasmatisch eine ausgeprägte, gleichmäßige Lokalisation von CIC (e). Das GFP-Signal bestätigte das Fluoreszenzsignal der indirekten AK-Markierung von CIC. Die Immunfluoreszenzmarkierung von CIC erfolgte mit dem CIC-AK (Verdünnung: 1:250 in 5 % Milch/TBS-T), die Kernlokalisation erfolgte mit DAPI durch Anfärbung der Nukleinsäuren.

3.2.2 Analyse der Proteine im Folattransport mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Um den Einfluss von CIC und den CIC-Mutationen auf die Transkription der für CIC und die Folattransportproteine $FR\alpha$, RFC1 und PCFT kodierenden Gene zu untersuchen, erfolgte die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR. Verwendet wurden HeLa-Zellen, die mit dem CIC-WT und den Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X stabil transfiziert wurden. Zum Vergleich dienten vektortransfizierte Zellen. Aus den Zellen wurde zunächst die RNS extrahiert. Diese wurde mithilfe einer reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben, die wiederum zur Vervielfältigung in der qRT-PCR eingesetzt wurde. Betrachtet wurde der Einfluss von CIC und

den mutierten CIC-Varianten auf die Transkription der Gene, die für das Protein CIC und die drei Folattransportproteine FR α , RFC1 und PCFT kodieren. *GAPDH* und *RPLP0* dienen der Normierung der Ergebnisse. In Abbildung 3.10 (S. 66) wurden die Werte der mRNA für *FOLR1*, *RFC1* und *PCFT* angegeben als n-faches der Genexpression im Leervektor, unter Verwendung der Formel $2^{\Delta CT}$. Für CIC diente die Expression im CIC-WT als Referenz, die auf einen Wert von 100 festgesetzt wurde. Untersucht wurde die relative Expression des für das Protein CIC kodierenden Gens. Hier konnte für alle drei Mutationen eine mit dem CIC-WT vergleichbare Expression des *CIC*-Gens festgestellt werden (Abbildung 3.10a, S. 66). Beobachtet werden konnte ein Einfluss des Proteins CIC auf die Expression des *FOLR1*-Gens (Abbildung 3.10b, S. 66). Im Vergleich zu den vektortransfizierten Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Expression der mRNA von *FOLR1* in den Zellen des CIC-WT und in den Zellen der Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I. Im Vergleich dieser drei CIC-Mutanten untereinander wiesen die Zellen, die mit der Mutante p.T990I transfiziert wurden, die niedrigste *FOLR1*-Expression auf. Der Unterschied der *FOLR1*-Expression zwischen CIC-WT und der Mutante p.T990I ist signifikant. Deutlich ist außerdem, dass die Zellen, die mit der Stopmutante p.R353X transfiziert wurden, die insgesamt niedrigste *FOLR1*-Expression zeigten. Für die Genexpression der beiden Folattransportproteine RFC1 und PCFT zeigten sich fast keine signifikanten Unterschiede zwischen den fünf untersuchten Varianten. Lediglich bzgl. der *PCFT*-Expression zeigte sich eine leicht erhöhte Expression in den Zellen der Mutante p.T990I mit schwachem Signifikanzniveau, bezogen auf den CIC-WT. Ein relevanter Einfluss von CIC auf die Transkription von *RFC1* und *PCFT* konnte hier nicht festgestellt werden. Deutlich wird, wie bereits beschrieben und in Abbildung 3.10 (S. 66) dargestellt, eine Regulation der Transkription von *FOLR1* durch das Protein CIC.

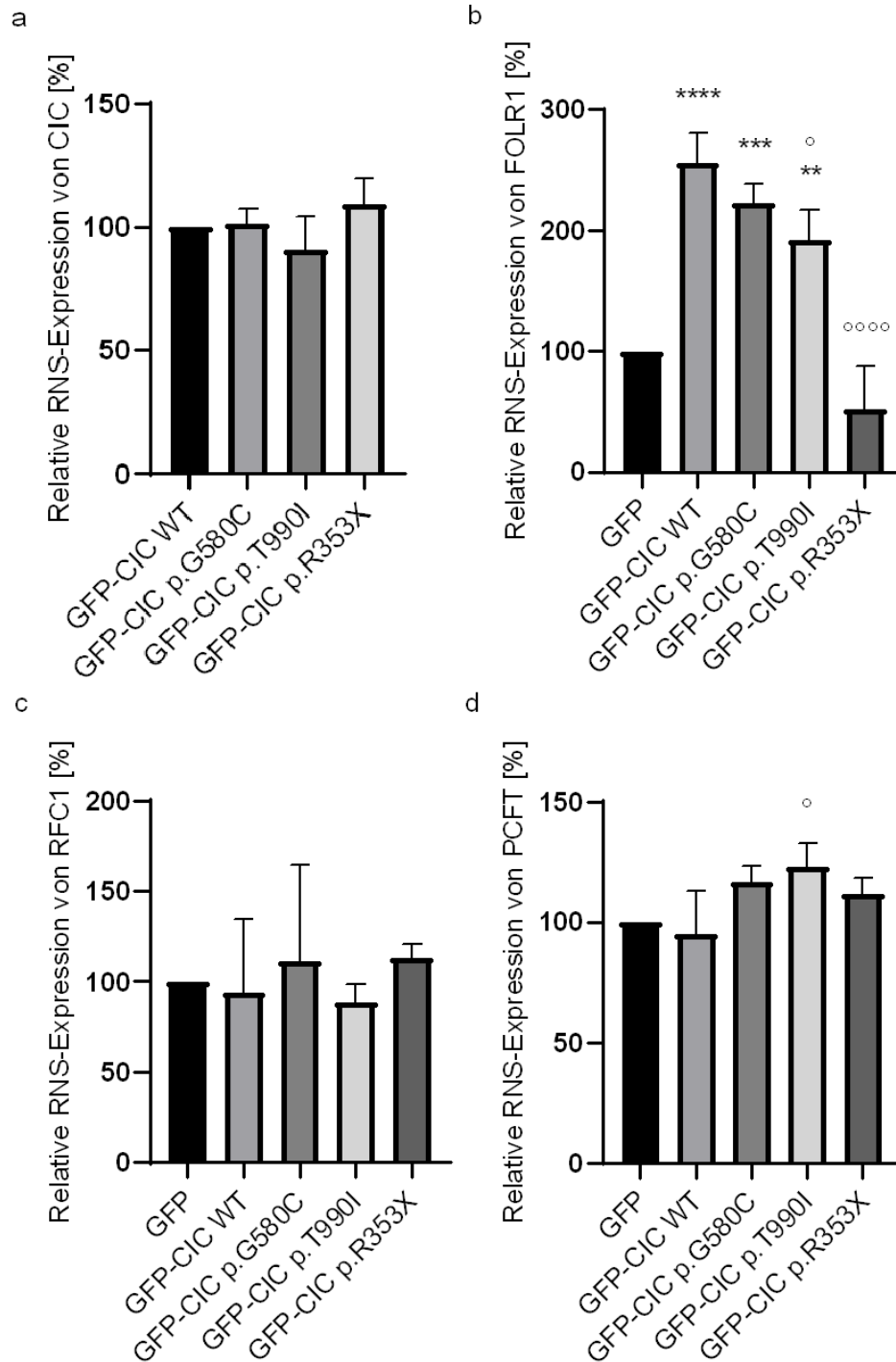


Abbildung 3.10: Analyse der Auswirkung der CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X auf die Transkription der Gene, die für CIC und die Folattransportproteine *FR α* , *RFC1* und *PCFT* kodieren, mittels qRT-PCR. Zum Vergleich dienten vektortransfizierte Zellen, dessen Transkriptionsrate auf einen Wert von 100 festgelegt wurde. Die Ergebnisse der Zellkonstrukte des Proteins CIC und dessen Mutanten wurden als Vielfaches dieses Werts angegeben. Als interner Standard wurde die Transkription der Referenzgene *GAPDH* und *RPLP0* herangezogen. $n = 3$, **** $p < 0,0001$; *** $p = 0,0005$; ** $p < 0,0045$ im Vergleich zum Vektor (GFP), **** $p < 0,0001$; ° $p < 0,045$ im Vergleich zum CIC WT. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test. a) Die RNS-Expression von *CIC* im WT und in den drei Mutanten ist vergleichbar hoch. b) Die RNS-Expression von *FOLR1* ist signifikant erhöht im WT und in den Mutanten p.G580C und p.T990I im Vergleich zum Vektor und signifikant verminderter in den Mutanten p.T990I und p.R353X im Vergleich zum WT. c) Die RNS-Expression von *RFC1* ist im WT und in den drei Mutanten vergleichbar hoch. d) Die RNS-Expression von *PCFT* im Vektor, WT und in den Mutanten p.G580C und p.R353X ist vergleichbar hoch. Die Expression in der Mutante p.T990I ist im Vergleich zum WT schwach signifikant erhöht.

3.2.3 Einfluss von CIC auf die Rezeptor-Folsäurebindung

Um den Einfluss von CIC und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X auf einer funktionalen Ebene zu untersuchen, wurden Bindungsassays mit radioaktiv gelabelter Folsäure durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluss auf die Bindung von radioaktiver Folsäure an die Folsäurerezeptoren. Verwendet wurden mit dem CIC-WT bzw. den CIC-Mutationen stabil transfizierte HeLa-Zellen, als Kontrolle dienten vektortransfizierte HeLa-Zellen, die eine natürliche Bindungsfähigkeit für Folsäure aufweisen. Durch den Einsatz von einerseits Tritiumgekoppelter Folsäure (^3H -Folsäure), deren Strahlung mit einem Szintillationsdetektor gemessen werden konnte, und andererseits nicht-markierter Folsäure im Überschuss, konnte die spezifische Bindung als Differenz aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung ermittelt werden. Ermittelt wurde die Bindung von ^3H -Folsäure pro μg Protein, die in den verwendeten Zellen enthaltene Proteinmenge wurde durch ein parallel durchgeführtes BCA-Assay bestimmt. Die ^3H -Folsäurebindung der vektortransfizierten Zellen wurde auf einen Wert von 100 % festgesetzt und die Bindungskapazität der weiteren CIC-Varianten dazu in Relation gesetzt. 100 % entsprechen in diesem Fall einer absoluten Menge von 5,8 ^3H -Folsäure pro μg Protein, das im BCA-Assay bestimmt wurde. Bei den in Abbildung 3.11 (S. 68) gezeigten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung. Anhand der Ergebnisse ließ sich ein Einfluss des Proteins CIC auf die Rezeptorfolsäurebindung feststellen. Die Zellen, die mit der cDNS des CIC-WT bzw. einer der Missense-Mutationen transfiziert worden waren, zeigten eine im Vergleich zu den vektortransfizierten Zellen deutlich höhere relative Folsäurebindung. Mit 163 %, bezogen auf die Bindungskapazität der vektortransfizierten Zellen, wiesen die Zellen des CIC-WT die insgesamt höchste relative Folsäurebindung auf. Diese entspricht einer Menge von 9,2 ^3H -Folsäure/ μg Protein. Die Zellen der mit p.G580C und p.T990I mutierten CIC-Proteine wiesen mit 155 % (entspricht 8,6 ^3H -Folsäure/ μg Protein) bzw. 154 % (entspricht 8,8 ^3H -Folsäure/ μg Protein) eine mit dem CIC-WT vergleichbar hohe Folsäurebindung auf, wobei die mit dem Gen der Missense-Mutation p.T990I transfizierten Zellen die von diesen drei Varianten niedrigste Bindung aufwiesen. Mit einem Wert von 51 % betrug die relative Folsäurebindung der mit dem Gen der Stopmutante p.R353X transfizierten Zellen nur die Hälfte der in den vektortransfizierten Zellen bestimmten natürlichen Bindungsfähigkeit für Folsäure. Dies entspricht einer Bindung von 2,8 ^3H -Folsäure/ μg Protein. Somit konnte ein Einfluss von CIC auf die Rezeptorfolsäurebindung festgestellt werden. Die Zellen der Stopmutante, die ein unvollständiges CIC-Protein exprimieren, weisen eine reduzierte Bindungsfähigkeit auf. Daraus lässt

sich ein verstärkender Effekt des funktionellen CIC-Proteins auf die Bindungsfähigkeit für Folsäure ableiten, zusammengefasst in Abbildung 3.11 (S. 68) dargestellt.

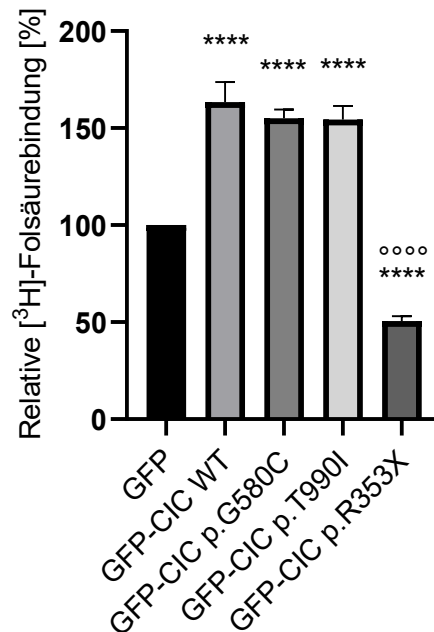


Abbildung 3.11: Analyse des radioaktiven Bindungsassays mit stabil transfizierten HeLa-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von CIC und den CIC-Mutationen p.G580C, p.T990I und p.R353X auf die [³H]-Folsäurebindung. Als Negativkontrolle dienten vektortransfizierte Zellen, deren [³H]-Folsäurebindung auf einen Wert von 100 festgesetzt wurde und als Maß für die Bindungsfähigkeit der anderen Varianten verwendet wurde. Angegeben ist die [³H]-Folsäurebindung in %, bezogen auf die Bindung der vektortransfizierten Zellen. n = 3, ****p < 0,0001 im Vergleich zum Vektor (GFP), ****p < 0,0001 im Vergleich zum CIC-WT. Die Datenanalyse erfolgte durch One-way ANOVA, gefolgt von dem Tukey post hoc Test.

3.2.4 Charakterisierung von stabilen pLVX-CIC-Mutanten in HeLa-Zellen

Für sämtliche Mutationen (p.G580C, p.T990I und R.353X) sowie den CIC-WT und den Leervektor wurden ebenfalls Mutanten ohne GFP-Tag generiert. Die Versuche erfolgten analog zu den Zellreihen mit GFP-Tag und es konnten vergleichbare Effekte auf Lokalisation, Expression von *FOLR1* und Rezeptor-Folsäurebindung beobachtet werden.

3.3 Charakterisierung von GFP, GFP-CIC WT und der CIC-Mutante p.T990I in Caco-2-Zellen

3.3.1 Generierung von stabilen GFP-CIC-Mutanten in Caco-2-Zellen

Zusätzlich zu den in HeLa-Zellen generierten CIC-Mutanten wurden ebenfalls Klone in Caco-2-Zellen erzeugt. HeLa-Zellen haben nicht den üblichen menschlichen Karyotyp, bestehend aus 46 Chromosomen. Unterschiede in den Zelleigenschaften können Auswirkung auf die

Genexpression haben, sodass die in dieser Zelllinie durchgeführten Versuche die Vorgänge im Menschen möglicherweise nur eingeschränkt widerspiegeln. Aus diesem Grund wurden zur Bestätigung der Versuchsergebnisse zusätzlich CaCo-2-Zellen verwendet. Bei Caco-2-Zellen handelt es sich um eine humane Epithelzelllinie des kolorektalen Adenokarzinoms, die erstmals isoliert wurden von Fogh et al. (1977). Im Gegensatz zu HeLa-Zellen handelt es sich um ein polares Zellmodell, das ebenfalls sehr etabliert ist im Rahmen von Untersuchungen in der Zellkultur (Sambuy et al. 2005). Polare Zellen besitzen eine bestimmte Ausrichtung und weisen eine apikale und eine basolaterale Zellmembran auf, wie auch die Zellen des Plexus choroideus. Es erfolgte eine stabile Transfektion mittels Expressionsplasmiden, die für zwei der bereits beschriebenen Mutationen kodieren. Für den Vergleich mit der Expression in HeLa-Zellen wurden für die Transfektion in Caco-2-Zellen die Missense-Mutante p.T990I sowie die Stopmutante p.R353X ausgewählt, da sich in den vorangegangenen Versuchen in HeLa-Zellen für diese beiden Mutationen die signifikantesten Ergebnisse zeigten. Somit erschien es sinnvoll, gerade diese Auffälligkeiten in einer weiteren Zelllinie zu bestätigen. Untersucht wurde die Proteinexpression von CIC und die Proteinexpression von FR α unter dem Einfluss dieser beiden CIC-Mutationen. Als Negativkontrolle und als Bezug dienten wiederum vektortransfizierte Zellen.

3.3.2 Western Blot Analyse für CIC in stabilen Caco-2-Zellen

Zunächst wurde anhand von Western Blot Analysen die Expression des Proteins CIC unter Einfluss der Mutationen p.T990I und p.R353X in Caco-2-Zellen untersucht, als Negativkontrolle wurden Zellen herangezogen, die lediglich mit der cDNS des Vektors transfiziert worden waren. Das Western Blot Ergebnis ist in Abbildung 3.12 (S. 70) dargestellt. CIC konnte nachgewiesen werden mit dem polyklonalen CIC-AK (Tabelle 2.5, S. 19). In den mit der Missense-Mutation p.T990I transfizierten Zellen wurde eine Proteinbande entsprechend einer Masse von 277 kDa detektiert, dies entspricht der addierten Masse des Fusionsproteins aus CIC und GFP sowie dem DNS-Bindeprotein Ataxin 1, mit dem CIC, wie bereits in Kap. 3.1.1 (S. 54) beschrieben, einen Komplex bildet. Eine dazu analoge Bande konnte in HeLa-Zellen sowohl für die Mutation p.T990I detektiert werden als auch in den HeLa-Varianten, die mit der cDNS für die zweite Missense-Mutation p.G580C und den CIC-WT transfiziert wurden. In den mit der Stopmutante p.R353X transfizierten Caco-2-Zellen wurde mit dem CIC-AK eine Proteinbande bei einer Masse von 66 kDa in der Immundetektion angefärbt, dies bestätigte das Ergebnis, das bereits in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte. Es reflektiert die unvollständige Expression des Proteins CIC aufgrund des verfrühten Stopcodons. Wie zu erwarten, ließ sich in den vektortransfizierten Zellen keine eindeutige Bande detektieren. β -Aktin konnte in allen Zellen

bei einer Masse von 42 kDa nachgewiesen werden und diente der anschließenden Normalisierung der zu untersuchenden Proteinbanden.

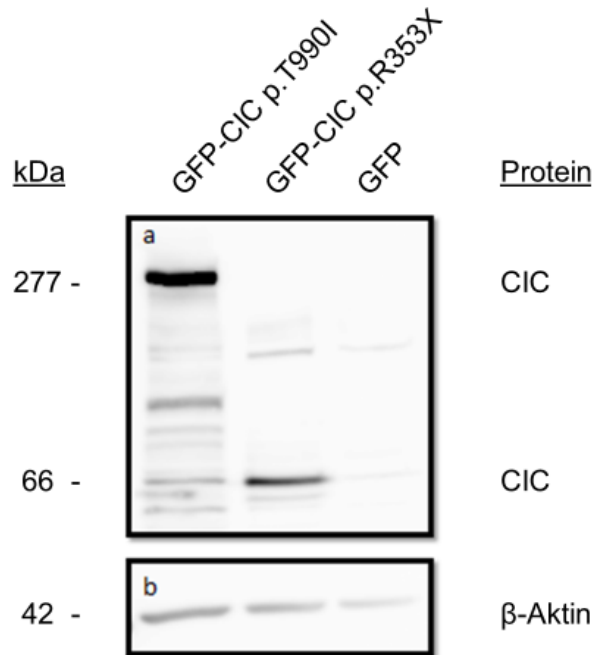


Abbildung 3.12: Western Blot Analyse stabil transfizierter Caco-2-Zellen zum Nachweis der Expression der CIC-Mutanten p.T990I und p.R353X als Fusionsprotein mit GFP. Als Negativkontrolle dienten vektortransfizierte Zellen. a) Die Immundetektion erfolgte mit dem polyklonalen CIC-Antikörper (Verdünnung 1:1000) und einem sek. Anti-Kaninchen-AK (Verdünnung 1:10000). b) Außerdem erfolgte die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin mit einem monoklonalen Mausantikörper (Verdünnung 1:3000) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000).

In der Analyse der Proteinintensitäten, zusammengefasst dargestellt in Abbildung 3.13 (S. 71), zeigte sich in den Caco-2-Zellen tendenziell ein vergleichbares Ergebnis wie im entsprechenden Versuch in HeLa-Zellen. Die Expression von CIC wurde normiert anhand der Expression von β -Aktin und die CIC-Expression in der Missense-Mutante p.T990I mit dem Wert 100 % versehen. Im Verhältnis dazu konnte in der Stopmutante p.R353X mit einem Wert von 144 % eine höhere Expression des hier verkürzt exprimierten CIC-Proteins gemessen werden. Der Unterschied ist, soweit darstellbar, milder ausgeprägt als in HeLa-Zellen.

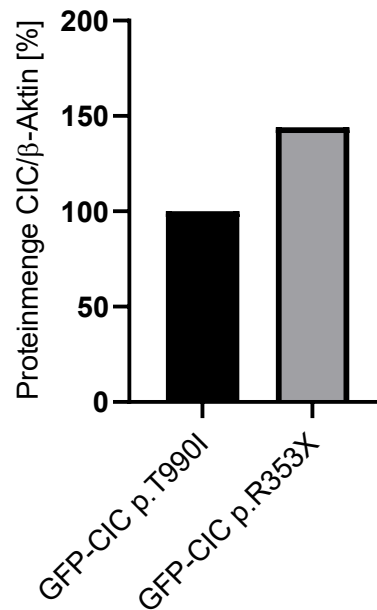


Abbildung 3.13: Quantifizierung der Proteinintensitäten von CIC für die CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X in Caco-2-Zellen. Die CIC-Expression wurde normiert auf die Expression von β -Aktin. Die Stopmutante p.R353X zeigt eine um 44 % höhere Expression des Proteins CIC als die Missense-Mutante p.T990I.

3.3.3 Western Blot Analyse für *FOLR1* in stabil transfizierten Caco-2-Zellen

Auch die Expression des Folatezeptors $FR\alpha$ wurde zusätzlich in Caco-2-Zellen untersucht, um die Ergebnisse mit den in HeLa-Zellen durchgeführten Versuchen zu vergleichen. Wie für die Expression von CIC wurden auch für den $FR\alpha$ die beiden CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X für den Vergleich herangezogen sowie auch vektortransfizierte Zellen. Die Western Blot Analyse erfolgte anhand stabil transfizierter Caco-2-Zellen. Der $FR\alpha$ wurde nachgewiesen mit dem monoklonalen IgG-AK NCL-L-FRalpha. Wie in Abbildung 3.14 (S. 72) dargestellt, konnte in allen drei Proteinvarianten eine Proteinbande bei einer Masse von 35 kDa detektiert werden, dies entspricht der Masse des $FR\alpha$. β -Aktin wurde in allen Zellen bei 42 kDa detektiert, die Intensität dieser Bande wurde zur Quantifizierung herangezogen. Das Ergebnis wird dargestellt in Abbildung 3.4 (S. 58) und spiegelt wider, dass es sich bei den Ergebnissen der in HeLa-Zellen durchgeführten Untersuchungen der Proteinexpression nicht um zelltypische Effekte handelt, da sowohl in HeLa als auch in Caco-2-Zellen vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden konnten.

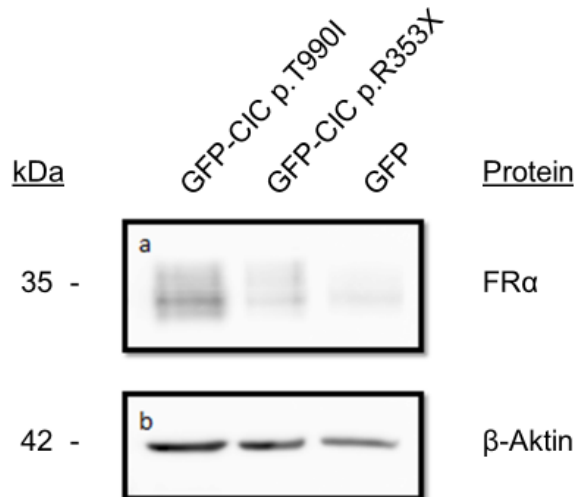


Abbildung 3.14: Western Blot Analysen stabil transfizierter Caco-2-Zellen zum Nachweis der Expression der CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X. Als Kontrolle dienten vektortransfizierte Zellen. a) Die Immundetektion des FR α erfolgte mit dem monoklonalen IgG-Antikörper NCL-L-FRalpha (Verdünnung 1:500) und einem sek. Anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:10000). b) Die Immundetektion des Kontrollproteins β -Aktin erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper (1:3000 verdünnt in 1 % Milchpulver in TBS-T) und einem sek. Anti-Maus-AK (Verdünnung 1:10000).

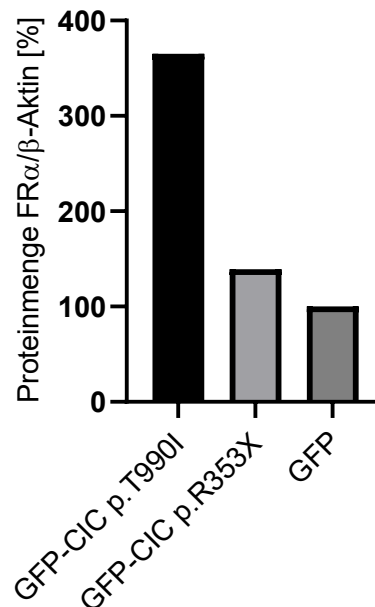


Abbildung 3.15: Quantifizierung der Proteinintensitäten des FR α im Leervektor und den CIC-Mutationen p.T990I und p.R353X in Caco-2-Zellen. Die FR α -Expression wurde normiert auf die Expression von β -Aktin. Wie in HeLa-Zellen ist die FR α -Expression in der Missense-Mutante p.T990I im Vergleich zum Leervektor deutlich erhöht und in der Mutante p.R353X vermindert, verglichen mit der Missense-Mutante. Es ist keine Standardabweichung angegeben, da die Versuche nur einmal durchgeführt wurden.

Die Analyse der Proteinintensitäten der FR α -Expression in Caco-2-Zellen zeigte ähnliche Ergebnisse wie die entsprechenden Versuche in HeLa-Zellen. Die Expression im Leervektor wurde auf einen Wert von 100 % festgelegt. Mit einem Wert von 365 % zeigte die Missense-Mutante pT990I eine ca. 3,5-fach höhere Expression. Die Stopmutante p.R353X zeigte mit

139 % eine insgesamt niedrige Expression, die aber um etwa 40 % höher ist als die des Leervektors.

4 Diskussion

Untersucht wurde der Einfluss des Proteins CIC auf die Expression verschiedener Folattransporter wie FOLR1, RFC1 und PCFT. Die CIC-Mutante p.T990I wurde in der Pädiatrie der Universitätsmedizin Göttingen identifiziert und die CIC-Mutanten p.G580C und p.R353X wurden von der Arbeitsgruppe von R. H. Finnell zur Verfügung gestellt. Die Stopmutation p.R353X wurde ursprünglich von Lu et al. (2017) in der Zeitschrift Nature Genetics veröffentlicht.

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

Der Einfluss von CIC und der Effekt der Mutationen wurde auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Durchgeführt wurden Immunfluoreszenzen zur Lokalisationsanalyse, Western Blots zum Vergleich der Proteinexpressionen, qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der RNS-Expression sowie radioaktive Bindungsassays, um die Folsäure-Bindungskapazität von Zellen unter dem Einfluss von CIC und den CIC-Mutationen auf funktionaler Ebene miteinander zu vergleichen.

Das Protein CIC konnte im CIC-WT sowie in allen CIC-Mutanten durch Antikörperbindung detektiert werden, jedoch zeigten sich Unterschiede sowohl in der Proteingröße als auch in der quantitativen Auswertung der Proteinexpression. Für die beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I konnte CIC wie im WT als vollständiges Protein und in einer mit der im CIC-WT vergleichbaren Bandenintensität detektiert werden. Diese beiden Mutationen zeigten demzufolge keinen im Western Blot darstellbaren Einfluss auf die Expression von CIC. Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich in den Zellen der Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I ein mit den Zellen des CIC-WT vergleichbares Fluoreszenzmuster. Alle drei genannten Proteinvarianten des Proteins CIC kolokalisierten mit Nukleinsäuren, also wurden kernständig detektiert (Abbildung 3.9b, c und d, S. 64). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die von Dissanayake et al. (2011) beschriebene Kernlokalisierungssequenz (NLS-Region) durch die Missense-Mutationen unbeeinflusst bleibt und CIC dem WT entsprechend in den ZK transportiert wird. Dies war zu erwarten, da sich die beiden Missense-Mutationen außerhalb der NLS-Region in Richtung N-Terminus befinden.

Mit demselben Antikörper, der zur Detektion von CIC im WT und den beiden Missense-Mutationen verwendet wurde, konnte im Western Blot der Stopmutante p.R353X eine Bande detektiert werden, die einer deutlich geringeren Proteinmasse entspricht. Dies spricht dafür, dass CIC durch die Stopmutation als unvollständiges, verkürztes Protein exprimiert wird. In der

Immunfluoreszenz zeigten sich ebenfalls Auffälligkeiten bezüglich der Lokalisation von CIC bzw. dem Fusionsprotein aus CIC, GFP und ATXN1. Im Unterschied zu den Zellen, die mit dem CIC-WT oder einer der beiden Missense-Mutationen transfiziert worden waren, zeigte sich in den mit der Stopmutante p.R353X transfizierten Zellen eine ubiquitäre Verteilung von CIC und CIC-GFP sowohl kernständig als auch zytoplasmatisch (Abbildung 3.9e, S. 64). Erklärbar ist dies dadurch, dass die NLS-Sequenz auf dem CIC-Gen der Stopmutation in Richtung C-Terminus nachgeschaltet (*downstream*) lokalisiert ist und höchstwahrscheinlich in dem verkürzten Protein nicht exprimiert wird (Abbildung 1.5, S. 10). Die Bindung des verkürzten CIC-Proteins an die Zielgene sollte theoretisch unbeeinträchtigt erfolgen können, da die DNS-Bindedomäne (HMG-Box) an Position 200-268 erhalten bleibt. Jedoch wird der direkte Transport von Proteinen in den ZK durch das Vorhandensein eines NLS bestimmt (Bedard et al. 2007). Entfällt das Signal zum Transport von CIC in den ZK, kann sich das Protein ubiquitär in der Zelle anreichern. Anzunehmen ist, dass die Stopmutante von CIC folglich nicht nur aufgrund der inkompletten Synthese, sondern auch aufgrund eines beeinträchtigten Transports in den ZK der Zellen nicht ausreichend als Transkriptionsfaktor wirken kann und somit der Einfluss auf die Target-Gene beeinträchtigt ist. Zudem fielen sämtliche Western Blots der Stopmutante dadurch auf, dass die Proteinbande von CIC eine etwa sechsfach höhere Intensität aufwies als die Banden der anderen Varianten (Abbildung 3.2, S. 56). Denkbar ist eine Störung im Abbau des verkürzten Proteins, sodass dieses in der Zelle akkumuliert. Das Fluoreszenzmuster in der Lokalisationsanalyse, das in den Zellen der Stopmutante ein ausgeprägtes Vorkommen des CIC-Proteins anzeigt, lässt ebenfalls eine Akkumulation vermuten (Abbildung 3.9e, S. 64). Da die Menge der transkribierten mRNS in allen CIC-Mutanten vergleichbar hoch ist (Abbildung 3.10, S. 66), kann als Ursache der hohen Bandenintensität in den Zellen der Stopmutation nicht von einer erhöhten CIC-Expression, sondern von einem gestörten Abbau ausgegangen werden.

Anzumerken ist, dass anhand der Western Blots keine CIC-Expression in den vektortransfizierten HeLa-Zellen detektiert werden konnte, obwohl HeLa-Zellen endogen CIC exprimieren (Cell atlas - CIC - The Human Protein Atlas 2020). Denkbar ist, dass das endogene CIC im Vergleich zur CIC-Überexpression in den CIC-transfizierten Zellen so gering ist, dass dieses im Western Blot nicht darstellbar war. Das heißt, dass die Belichtungszeit wahrscheinlich nicht ausreichend war, um die geringe AK-Bindung in den vektortransfizierten Zellen auf demselben Blot darzustellen wie die hohe AK-Bindung in den transfizierten Zellen mit CIC-Überexpression. In der Immunfluoreszenz ist diese endogene CIC-Expression sichtbar (Abbildung 3.9, S. 64). Als Korrelat einer milden endogenen CIC-Expression ist ubiquitär eine schwache Bindung des CIC-AKs zu detektieren. Das Fluoreszenzsignal ist im Bereich des ZKs am stärksten, konnte jedoch ubiquitär sowohl in der ZK-Region als auch im Zytoplasma detektiert werden.

Möglicherweise kommt es zu einer zusätzlichen, unspezifische AK-Bindung. Denkbar ist jedoch, dass CIC in geringen Mengen tatsächlich auch im Zytoplasma vorhanden ist, da durch die grüne Fluoreszenz auch eine Bindung des GFP-AKs sichtbar ist.

In der Analyse des Einflusses von CIC auf die Folattransportproteine $FR\alpha$, RFC1 und PCFT zeigte sich auf Proteinebene eine Hochregulation des $FR\alpha$ in den mit CIC-WT transfizierten Zellen (Abbildung 3.4, S. 58). Im Gegensatz zu vielen Studien, in denen CIC auf die überwiegende Anzahl von Genen als Suppressor wirkt (Jimenez et al. 2012; Simón-Carrasco et al. 2018), scheint CIC im Fall des *FOLR1*-Gens folglich als Aktivator der Transkription zu fungieren. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen konnten auf RNS-Ebene durch qRT-PCR sowie durch radioaktive Bindungsassays bestätigt werden. Die Transkriptionsrate des *FOLR1*-Gens liegt in den Zellen, die mit dem CIC-WT transfiziert wurden, deutlich über der Transkriptionsrate der vektortransfizierten Zellen (Abbildung 3.10, S. 66). Auch im Bindungsassay zeigten sich kongruente Ergebnisse zu den Analysen auf Protein- und RNS-Ebene. Die mit dem CIC-WT transfizierten Zellen zeigten eine höhere Bindungsfähigkeit als die vektortransfizierten Zellen (Abbildung 3.11, S. 68). Die aktivierende Funktion von CIC konnte folglich zusätzlich anhand der RNS-Expression und der Folsäurebindungsfähigkeit bestätigt werden.

Eine vergleichbar hohe Expression des $FR\alpha$ zeigten auch die Western Blots der Mutanten p.G580C und p.T990I (Abbildung 3.3, S. 57 und Abbildung 3.4, S. 58). Ein Einfluss dieser beiden Missense-Mutationen auf die $FR\alpha$ -Expression, der sich signifikant von dem des CIC-WT unterscheidet, war folglich im Western Blot nicht darstellbar. Im Gegensatz hierzu weisen die Ergebnisse der qRT-PCR (Abbildung 3.10, S. 66) und der Bindungsassays (Abbildung 3.11, S. 68) auf einen negativen Einfluss der Missense-Mutationen auf die $FR\alpha$ -Expression hin. Insbesondere die mRNA-Expression zeigte sich im Vergleich zu den mit dem CIC-WT transfizierten Zellen in den mit den Missense-Mutationen transfizierten Zellen erniedrigt, wobei bei der Mutante p.T990I die geringste Expression festgestellt wurde. Während die mRNA-Expression den transkriptionellen Einfluss der CIC-Mutanten auf die $FR\alpha$ -Expression widerspiegelt, hängt die $FR\alpha$ -Expression im Western Blot auch von der Stabilität der CIC-Mutante ab. Da ich ausschließlich überexprimierte CIC-Mutanten untersucht habe, ist es wahrscheinlich, dass deren transkriptionelle Restaktivität so hoch ist, dass die maximale $FR\alpha$ -Expression in diesem Zellsystem zusammen mit dem endogen exprimierten CIC erreicht wird. Das heißt, mit diesen zellbiologischen Untersuchungen konnte ein Einfluss dieser Missense-Mutationen im CIC-Gen auf den zerebralen Folattransport nicht eindeutig dargestellt werden. Allerdings weist auch die von der Missense-Mutation p.T990I betroffene Patientin ähnlich den Patienten mit einem genetischen Defekt des *FOLR1*-Gens, eine erniedrigte Konzentration an 5-MTHF im Liquor bei normwertigem Folsäurespiegel im Blut sowie die Symptome einer zerebralen Folatdefizienz auf.

Möglich ist, dass diese CIC-Mutation zwar den zerebralen Folattransport beeinträchtigt, aber dies vor allem in Zuständen niedriger Folatversorgung Bedeutung hat. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass noch weitere, möglicherweise genetische, Faktoren die beschriebene Symptomatik hervorrufen. In zwei weiteren bisher bekannten Genen, die für den Folattransport relevant sind, konnten bei der Patientin jedoch keine Mutationen detektiert werden, sodass die CIC-Mutation als mögliche Ursache einer zerebralen Folatdefizienz wahrscheinlich ist. Aber möglicherweise trägt auch eine Störung des ATXN1-CIC-Komplexes zu der Symptomatik der Patienten mit CIC-Mutationen bei (Lu et al. 2017).

Durch die Mutation p.T990I kommt es während der Translation zum fälschlichen Einbau der Aminosäure Isoleucin statt Threonin in das CIC-Protein, also zum Austausch einer hydrophilen, polaren gegen eine hydrophobe, apolare Aminosäure. Isoleucin kann somit über die Seitenkette keine Wasserstoffbrückenbindungen bilden, stattdessen können hydrophobe Bindungen eingegangen werden. So kann es zu einer veränderten Sekundärstruktur des Proteins kommen, auch eine relevante Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch den Aminosäureaustausch ist somit denkbar. Beschrieben ist, dass Missense-Mutationen u.a. Einfluss auf die Proteinestabilität nehmen und so Proteinfunktion und -interaktion beeinflussen können (Teng et al. 2010).

Unter dem Einfluss der Stopmutante p.R353X kam es zu einer deutlich verminderten FR α -Expression (Abbildung 3.4, S. 58). Es ist von einem Verlust der aktivierenden Funktion des Proteins durch die Stopmutation auszugehen, d.h., dass die Aktivierung der Transkription durch CIC in diesen Zellen entfällt. Die FR α -Expression in den Zellen der Stopmutante zeigte sogar niedrigere Werte als die der vektortransfizierten Zellen. Denkbar wäre, dass das verkürzte CIC-Protein negative Auswirkungen auf die Funktion des endogen exprimierten CIC in der Zelle hat, insbesondere da das fehlerhafte Protein, wie oben beschrieben, in der Zelle zu akkumulieren scheint (*dominant negative effect*). Auch Shoubridge, Tan et al. (2010) beschrieben eine inadäquate Proteinakkumulation bei Mutationen, die die NLS-Region betreffen und eine dadurch beeinträchtigte Zellfunktion. Die Stopmutante zeigt analog zu den Ergebnissen im Western Blot auch in der qRT-PCR einen Einfluss auf FR α im Sinne einer verminderten Transkriptionsrate des *FOLR1*-Gens von ca. 50 % bezogen auf die vektortransfizierten Zellen (Abbildung 3.10, S. 66). Auch im radioaktiven Bindungsassay zeigten sich kongruente Ergebnisse zu den Analysen auf Protein- und RNS-Ebene. Die mit der Stopmutation p.R353X transfizierten Zellen wiesen die insgesamt niedrigste Bindungsfähigkeit auf (Abbildung 3.11, S. 68). Auch anhand der Folsäurebindung lässt sich folglich die Funktion von CIC als Aktivator darstellen. Eine verminderte Bindungskapazität ohne CIC bzw. bei angenommenem Funktionsverlust in den Zellen der Stopmutante ist eindeutig.

Lu et al. untersuchten Fibroblasten des Patienten, der heterozygot ist für die Stopmutation p.R353X im *CIC*-Gen. Verglichen mit den Kontroll-Fibroblasten zeigte sich eine um ca. 50 % reduzierte Protein- und RNS-Expression von *CIC*. Dies führte zu der Annahme, dass diese Mutation zu *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) führt und einen Funktionsverlust des *CIC*-Proteins verursacht (Lu et al. 2017). Bei NMD handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Zelle, durch den eine verkürzte mRNA erkannt wird und die durch das fehlerhafte Gen entstandene mRNA degradiert. So wird die Expression verkürzter Proteine reduziert (Lewis et al. 2003). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit in HeLa-Zellen, die mit der Stopmutante p.R353X transfiziert wurden, eine sehr hohe Expression eines verkürzten *CIC*-Proteins detektiert werden. Anzumerken ist, dass im Unterschied zu den Patienten-Fibroblasten hier in den HeLa-Zellen eine Überexpression des *CIC*-Proteins mithilfe eines Vektors erfolgte, der mit dem Promotor P_{CMVIE} einen sehr effektiven Verstärker der Transkription enthält (Boschhart et al. 1985). Denkbar wäre, dass in so hohem Maße mRNA exprimiert wird, dass die Kapazität des NMD überschritten wird. Möglich wäre dementsprechend, dass hier zwar auch NMD stattfindet, dieser jedoch durch die starke Überexpression überlagert wird und nicht dargestellt werden kann. In der Untersuchung der Expression des $FR\alpha$ zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression in den Zellen der Stopmutante. Die Funktion von *CIC* als Aktivator wirkt sich in diesen Zellen folglich nicht auf die $FR\alpha$ -Expression aus. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die Stopmutation zum Funktionsverlust von *CIC* führt. Bestätigen ließe sich dies in weiterführenden Versuchen mit *CIC*-Knockout in HeLa-Zellen. Eine vergleichbar hohe Expression in *CIC*-Knockout-Zellen wie in den Zellen der Stopmutante spräche für einen durch diese Mutation verursachten Funktionsverlust von *CIC*. Da die HMG-Box auch im verkürzten Protein erhalten bleibt, wäre die Bindung an die DNS zur Beeinflussung der Transkription weiterhin möglich. Dies würde seinerseits erklären, dass sowohl die $FR\alpha$ -Expression als auch die Folsäurebindungsfähigkeit in den Zellen der Stopmutante noch niedriger ist als in den vektor-transfizierten Zellen.

Für die anderen beiden untersuchten Folattransportproteine RFC1 und PCFT ergaben sich in WB (Abbildung 3.6, S. 60 und Abbildung 3.8, S. 62) und qRT-PCR (Abbildung 3.10, S. 66) für sämtliche Varianten vergleichbar hohe Werte. Auf mRNA-Bildung und Proteinexpression von RFC1 und PCFT konnte mit unseren Methoden somit kein Einfluss von *CIC* festgestellt werden. Folglich scheint *CIC* die Expression von $FR\alpha$, nicht aber die von RFC1 und PCFT zu regulieren. Und die Steuerung der unterschiedlichen Folattransportwege scheint unabhängig voneinander stattzufinden.

Für die beiden Mutationen p.T990I und R353X wurden die Versuche zusätzlich in Caco-2-Zellen durchgeführt. Da ähnliche Ergebnisse beobachtet wurden wie in HeLa-Zellen

(Abbildung 3.13, S. 71 und Abbildung 3.15, S. 72), ist davon auszugehen, dass es sich nicht um zelltypspezifische Effekte handelt. Ein Unterschied ergibt sich in der Expression des FR α in den Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren. In Caco-2-Zellen zeigen die vektortransfizierten Zellen die niedrigste Expression. In HeLa-Zellen dagegen ist die FR α -Expression der vektortransfizierten Zellen höher als in den Zellen der Stopmutante p.R353X. Dies ließe sich dadurch erklären, dass in HeLa-Zellen die endogene CIC-Expression etwa doppelt so hoch ist wie in Caco-2-Zellen (Cell atlas - CIC - The Human Protein Atlas 2020). In Caco-2-Zellen ist somit davon auszugehen, dass die aktivierende Funktion von CIC auf die FR α -Expression in den vektortransfizierten Zellen in geringem Maße eine Rolle spielt. Eine supprimierende Wirkung der Stopmutation auf die FR α -Expression lässt sich in Caco-2-Zellen nicht erkennen.

In HeLa-Zellen wurden außerdem sowohl Mutanten mit dem Vektor pcDNA5/FRT/TO GFP als auch mit dem pcDNA5/FRT/TO GFP Vektor pLVX-IRES-Puro generiert. Die Versuche wurden zu gleichen Bedingungen durchgeführt und es konnten vergleichbare Ergebnisse bezüglich Lokalisation, Expression von *FOLR1* und Rezeptor-Folsäurebindung beobachtet werden. Das GFP-Tag scheint somit ebenfalls keinen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.

In Abbildung 1.4 (S. 9) ist dargestellt, dass die für die Folattransportproteine FR α , RFC1 und PCFT kodierenden Gene Bindungsstellen für CIC in ihren regulatorischen Regionen aufweisen, das *FOLR1*-Gen sogar zwei Bindungsstellen in der Promotorregion. Dies weist darauf hin, dass der Einfluss von CIC als Transkriptionsfaktor über diese Bindungsstellen vermittelt wird. Da lediglich ein Einfluss auf FR α , nicht aber auf RFC1 und PCFT festgestellt werden konnte, scheint die Position der Bindungsstellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Das *CIC*-Gen enthält mit dem C1-Motif eine Suppressor-Aktivitäts-Domäne (Abbildung 1.3, S. 8). Besser untersucht als die Mechanismen, die zu einem Einfluss von CIC auf die FR α -Expression führen, ist die Wirkung von CIC auf die Gene der PEA3-Transkriptionsfaktoren *ETV1*, *ETV4* und *ETV5*. Den Untersuchungen von Dissanayake et al. (2011) zufolge wirkt sich CIC hemmend auf die Transkription der Gene *ETV1*, *ETV4* und *ETV5* aus. Dahingegen führt die p90^{RSK}-vermittelte Bindung des 14-3-3-Proteins an CIC dazu, dass diese Repression verhindert wird (Dissanayake et al. 2011). Da CIC auch auf die anderen bisher untersuchten Zielgene überwiegend als Suppressor der Transkription wirkt, sollte in Betracht gezogen werden, dass CIC keinen direkten, sondern einen indirekten Einfluss auf die FR α -Expression nehmen könnte. Möglich ist, dass die Proteinwirkung auf FR α mittelbar, beispielsweise durch Interaktion mit anderen Bindungsproteinen, moduliert wird. Jedoch sollten auch DNS-bindungs-unabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden. Sollte es sich um einen direkten Einfluss handeln, müsste es sich um einen hochregulierenden Mechanismus handeln, der bisher nicht

beschrieben wurde. Welche Mechanismen in der Genregulation eine Rolle spielen, die dazu führen, dass CIC sich auf das *FOLR1*-Gen als Aktivator und nicht als Suppressor auswirkt, geht über diese Arbeit hinaus und kann eine sinnvolle Zielsetzung weiterführender Untersuchungen sein.

4.2 Klinische Relevanz

Ein besseres Verständnis der Proteine und Signalwege, die in den Folattransport und -metabolismus involviert sind, sollte letztendlich dazu beitragen, die unterschiedlichen Ursachen einer zerebralen Folatdefizienz zu erkennen und so die betroffenen Patienten besser identifizieren und behandeln zu können. Dazu gehört die Charakterisierung neuer Mutationen, die die Erkrankung verursachen bzw. mitbedingen können.

Mutationen können sich unterschiedlich auf den 5-MTHF-Spiegel auswirken und es zeigte sich, dass verschiedene Genmutationen zu unterschiedlichen Symptomen führen können (Lu et al. 2017). Beispielsweise führten Mutationen im *FOLR1*-Gen zu besonders niedrigen Folatkonzentrationen im Liquor und zu einem ausgeprägten klinischen Phänotyp (Mangold et al. 2011; Steinfeld et al. 2009; Grapp et al. 2012). Jedoch korreliert die Schwere der Symptomatik nicht zwangsläufig mit der noch vorhandenen Restfunktion des $FR\alpha$, sodass Grapp et al. (2012) davon ausgehen, dass der Phänotyp noch durch zusätzliche Faktoren beeinflusst wird. Die bisher untersuchten Patienten zeigten ein unterschiedlich gutes Ansprechen auf die Substitution von Folsäure. Für Mutationen im *CIC*-Gen stehen noch nicht ausreichend Daten zur Verfügung. Ein Ziel weiterer Untersuchungen wäre es, von der Mutation Rückschlüsse auf die klinische Ausprägung ziehen zu können, sodass individuell eine geeignete Therapie erfolgen kann. Gewisse Zusammenhänge konnten jedoch bereits durch Grapp et al. (2012) für Patienten mit einem $FR\alpha$ -Defekt dargestellt werden, bei denen es zu einer progredienten neurologischen Störung, Ataxie und zerebralen Anfällen kam und im MRT eine gestörte Myelinisierung sowie eine zerebrale und insbesondere zerebelläre Atrophie nachgewiesen werden konnte. Lu et al. (2017) beschrieben ihrerseits vier *CIC*-Stopmutationen und deren klinische Ausprägung sowie MRT-Auffälligkeiten. MR-tomographisch zeigten sich einzelne bis multiple, punktförmige, T2-hyperintense Herde im Bereich der weißen Substanz und bei zwei Patienten mit derselben Mutation ein unauffälliges MRT. Das phänotypische Spektrum zeigte v.a. Verhaltensauffälligkeiten aus dem Bereich der Autismus-Spektrum-Störungen, intellektuelle Einschränkungen sowie zerebrale Anfälle und zum Teil eine (milde) muskuläre Hypotonie.

Plausibel ist, dass Patienten mit Mutationen, die den Transport von Folat über die Blut-Liquor-Schranke (BLS) stärker negativ beeinflussen, mit einer höheren Folsäuredosis behandelt

werden müssen. Bei einer ausgeprägten Einschränkung des Transports wäre die orale Therapie nicht ausreichend, die Patienten wären auf eine intravenöse und ggf. eine zusätzliche intrathekale Gabe angewiesen. Durch Grapp et al. (2012) wurde beispielsweise eine Patientin beschrieben, die direkt bei Symptombeginn oral und intravenös mit Folsäure behandelt wurde, was zum kompletten Rückgang der Symptome führte. Es zeigte sich lediglich eine milde zerebelläre Atrophie, aber keine zerebralen Auffälligkeiten und keine signifikanten neurologischen Symptome.

Die Zellen, die mit einer der beiden Missense-Mutationen p.G580C bzw. p.T990I transfiziert wurden, ließen im Rahmen dieser Arbeit lediglich einen mäßigen Einfluss auf die Folsäurebindungsfähigkeit erkennen. Dementsprechend ließe sich vermuten, dass für Patienten mit einer dieser Mutationen geringere orale Folsäuregaben ausreichend wären, um normwertige Folspiegel im Liquor zu erreichen. Da die Zellen der Stopmutation eine deutlich reduzierte FR α -Expression und Folsäurebindungsfähigkeit zeigen, ist anzunehmen, dass Patienten mit dieser Mutation mit vergleichsweise hohen oralen/intravenösen Folsäuredosen oder sogar intrathekalen Gaben behandelt werden müssten, um ausreichend hohe zerebrale Folspiegel und einen positiven Einfluss auf den klinischen Verlauf zu erreichen. Entsprechende Studien zur Bestätigung dieser Überlegungen sind zurzeit noch ausstehend. Jedoch zeigten Untersuchungen durch Steinfeld et al. (2013) für Patienten mit Mutationen im *FOLR1*-Gen, dass die orale Folatsubstitution zur Normalisierung der Folspiegel im Liquor führten, jedoch erst die intravenöse Gabe eine klinische Besserung bezüglich Bewegungsstörungen und zerebralen Anfällen erbrachte. Bei zwei Patienten konnte eine deutliche Besserung durch intrathekale Gaben erreicht werden.

Als entscheidend zeigte sich insgesamt vor allem der frühzeitige Beginn einer Behandlung, um ein gutes Therapieansprechen zu erreichen oder sogar eine klinische Ausprägung der CFD zu verhindern (Steinfeld et al. 2009; Zhao et al. 2017; Grapp et al. 2012). Sinnvoll erscheint dementsprechend eine frühe Diagnostik inklusive genetischer Untersuchungen.

4.3 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ließen sich durch weitere lohnenswerte Untersuchungen ergänzen, um u.a. die molekularen Mechanismen des Einflusses von CIC auf den Folattransport noch besser zu verstehen. Ergänzend zu den durchgeführten Untersuchungen zu Funktion und Lokalisation bei CIC-Überexpression in verschiedenen Zelllinien, könnten weiterführende Versuche unter Ausschaltung von CIC, einem CIC-Knock-down erfolgen. Hier empfiehlt sich die Verwendung von HeLa-Zellen, da sich die Effekte der CIC-Überexpression ebenfalls in HeLa-Zellen am eindrucklichsten darstellen ließen. Ein Gen-Knock-down kann

durch RNS-Interferenz herbeigeführt werden, wobei selektiv Gene blockiert werden. Möglich ist ein transientes Gen-Silencing durch Small interfering RNA (siRNA) oder das Einbringen von Small hairpin RNA (shRNA) durch einen Vektor, was durch Integration ins Genom zu einem stabilen Gen-Silencing führt (Sliva und Schnierle 2010). Alternativ kann auch ein kompletter Gen-Knock-out durch die CRISPR-Cas9-Technologie erreicht werden. Im Gegensatz zum Knock-down wurde beim kompletten Gen-Knock-out beobachtet, dass die fehlende Proteinfunktion durch andere Gene kompensiert wurde (Rossi et al. 2015). Mit einem gezielten Knock-down des CIC-Gens könnte der Einfluss des CIC-Proteins auf die *FOLR1*-Expression und die Folatbindungsfähigkeit ergänzend untersucht werden. Zu erwarten wäre eine verminderte $FR\alpha$ -Expression bzw. eine verminderte Folsäurebindefähigkeit bei einem CIC-Knock-down im Vergleich zu den Zellen mit Überexpression des CIC-WT.

Des Weiteren gilt es in umfangreichem Rahmen zu untersuchen, durch welche Mechanismen CIC seine Wirkung auf den $FR\alpha$ vermittelt. Ob CIC die *FOLR1*-Transkription über den *FOLR1*-Promotor stimuliert, kann in Promotorstudien untersucht werden. Dafür eignet sich beispielsweise ein Luciferase-Assay.

Darüber hinaus könnten gezielt Mutationen in die CIC-Bindungsstellen der für die Folattransportproteine kodierenden Gene (Abbildung 1.4, S. 9), insbesondere *FOLR1*, eingebracht werden. So könnte überprüft werden, ob die Bindungsstellen für den Einfluss von CIC relevant sind. Andernfalls muss von einem indirekten Einfluss von CIC auf die $FR\alpha$ -Expression ausgegangen werden. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (Gade und Kalvakolanu 2012) kann weiterführend untersucht werden, ob CIC tatsächlich an die o.g. Bindungsstellen (Abbildung 1.4, S. 9) bindet, wie bereits durch Frigerio et al. (2019) berichtet. Da in den Zellen der Stopmutante noch niedrigere Werte für $FR\alpha$ -Expression und Folsäurebindungsfähigkeit festgestellt wurden als in den vektortransfizierten Zellen, wäre insbesondere interessant, ob es bei dem verkürzten CIC-Protein der Stopmutante weiterhin zu einer Bindung an die DNS kommt, so dass dieses eine supprimierende Wirkung auf die Transkription ausüben könnte. Ansonsten wäre lediglich von einem Funktionsverlust von CIC auszugehen.

Eine sinnvolle Ergänzung wäre, das Maß der endogenen CIC-Expression von HeLa-Zellen mittels qRT-PCR zu überprüfen. Eine durch qRT-PCR verifizierte CIC-Expression der vektortransfizierten Zellen spräche gegen eine lediglich unspezifische Bindung des CIC-AKs.

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die für den Einfluss genetischer Mutationen auf den Folattransport eine Rolle spielen, sollte letztendlich dazu beitragen, möglichst viele Patienten mit einer behandelbaren Ursache einer zerebralen Folatdefizienz zu identifizieren, um eine gezielte und frühzeitige Therapie einleiten zu können. Sinnvoll wären diesbezüglich Untersuchungen, die einerseits eine Korrelation von genetischer Mutation und Phänotyp der

Patienten zulassen und weiterführend eine geeignete Therapie ermöglichen. Soweit bekannt, gibt es bislang noch keine hinreichenden Untersuchungen, die von einer bestimmten Mutation auf Ausprägung bzw. Schwere der Symptome oder den Erkrankungsbeginn und -verlauf schließen lassen könnten. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die genauen Funktionen von CIC und den Einfluss auf den zerebralen Folattransport zu verstehen. Um relevante Zusammenhänge zu identifizieren, gilt es, möglichst viele Patienten mit genetischer Mutation im CIC-Gen zu untersuchen, Pathomechanismen zu erkennen und die Erkenntnisse für Diagnostik und Therapie weiterer Patienten zu nutzen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde der Einfluss des Proteins Capicua auf die Expression von Proteinen, die am transzellulären Folattransport beteiligt sind, untersucht. Hierzu wurden zwei Missense-Mutationen und eine bereits beschriebene Stopmutation sowie der Wildtyp des Capicua-Gens in verschiedenen Zelllinien exprimiert und deren Effekt auf die Expression anderer Gene verglichen.

Untersucht wurden drei Mutationen im Capicua-Gen, die bei Patienten mit zerebraler Folatdefizienz detektiert wurden. Krankheitsdefinierend ist eine erniedrigte Konzentration von 5-MTHF im Liquor bei normwertigem peripherem Folatspiegel im Serum. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in der frühen Kindheit und führt unbehandelt zu fortschreitender psychomotorischer Retardierung, dyston-ataktischer Bewegungsstörung, sensorischen Ausfällen und zerebralen Krampfanfällen. MR-tomographisch konnten eine zerebelläre und teilweise zerebrale Hirnatrophie sowie fokale Myelinisierungsstörungen in der weißen Hirnsubstanz festgestellt werden. Bei rechtzeitigem Therapiebeginn zeigte sich ein gutes Ansprechen auf eine Folatsubstitution. In der genetischen Untersuchung der o.g. Patienten konnte in den bisher bekannten, für den Transport von Folat über die Blut-Liquor-Schranke relevanten Genen, keine Mutation nachgewiesen werden. In der Genom-Sequenzierung konnten jedoch Mutationen im Capicua-Gen detektiert werden. Außerdem ist bekannt, dass die Gene der Folattransportproteine $FR\alpha$, RFC1 und PCFT in ihren regulatorischen Bereichen Bindungsstellen für Capicua enthalten. Dies führte zu der Annahme, dass CIC ein für den Folattransport relevantes Protein darstellt und eine Mutation in dessen Gen ursächlich für eine zerebrale Folatdefizienz sein kann. Untersucht wurden die Stopmutation p.R353X und die beiden Missense-Mutationen p.G580C und p.T990I. Es erfolgte die Generierung stabiler Zelllinien mittels Klonierung des CIC-Wildtyps und der Mutanten in einen Vektor mit GFP-Tag und lentiviraler Transduktion in HeLa-Zellen. Zur Charakterisierung der Mutanten wurden Immunfluoreszenzen, Western Blot-Analysen, qRT-PCR und radioaktive Bindungsassays durchgeführt. So wurde der Einfluss von CIC und dessen Mutationen auf die Lokalisation von CIC, die Expression von CIC und der Folattransportproteine $FR\alpha$, RFC1 und PCFT sowie auf die Folsäurebindungsfähigkeit der Zellen untersucht und jeweils mit vektortransfizierten Zellen verglichen. In den Zellen des CIC-WT zeigte sich eine Hochregulation der $FR\alpha$ -Expression, die sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch Nachweis erhöhter Proteinmenge nachgewiesen werden konnte. Die beiden Missense-Mutationen zeigten eine reduzierte Transkription des *FOLR1*-Gens, jedoch keine verminderte Expression des $FR\alpha$ -Proteins im Vergleich zum CIC-Wildtyp im Western Blot. Somit ergeben sich Hinweise auf eine geringgradige Funktionseinschränkung der $FR\alpha$ -Expression, die jedoch

mit unseren Methoden nur teilweise dargestellt werden konnten. Die Stopmutation führte zur Expression eines verkürzten CIC-Proteins. Durch Verlust der Kernlokalisationssequenz kam es im Gegensatz zu den anderen Proteinvarianten, die die CIC-Lokalisation ausschließlich im ZK anzeigten, bei der Stopmutante zu einer ubiquitären Anreicherung des verkürzten Proteins in der Zelle. Die FR α -Expression in den Zellen der Stopmutante war signifikant vermindert. Wahrscheinlich ist ein Funktionsverlust des CIC-Proteins und eine supprimierende Wirkung auf das endogen exprimierte CIC, da FR α -Expression und Folsäurebindungsfähigkeit noch geringer waren als in den vektortransfizierten Zellen. In qRT-PCR und den Bindungsassays zeigten sich dazu kongruente Ergebnisse. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch mit einem alternativen Expressionssystem, in dem CIC ohne Fusion mit GFP exprimiert wurde. Weiterhin konnten die mit HeLa-Zellen durchgeführten Experimente mit Caco-2-Zellen bestätigt werden, sodass nicht von einem zelltypspezifischen Effekt auszugehen ist. Für die beiden Folattransportproteine RFC1 und PCFT zeigte sich kein Einfluss. CIC scheint somit als Aktivator für die Expression von FR α , nicht aber für RFC1 und PCFT zu fungieren.

Es bleibt zu untersuchen, welche genauen molekularen Mechanismen für den Einfluss von CIC auf den Folattransport eine Rolle spielen. Da es sich bei CIC um einen Transkriptionsfaktor handelt, der sich in den meisten Studien bisher als Suppressor der Transkription zeigte, ist ein indirekter Einfluss über andere Proteine möglich. Ein besseres Verständnis der Ursachen der Erkrankung sollte letztendlich ermöglichen, betroffene Patienten leichter zu identifizieren und eine frühzeitige und individuelle Therapie beginnen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Baradie, Raidah S.; Chudary, Mohammed W. (2014): Diagnosis and management of cerebral folate deficiency: A form of folinic acid-responsive seizures. In: *Neurosciences* 19 (4), S. 312–316.
- Balint, Brittany; Jephumba, Viola Kosgei; Guéant, Jean-Louis; Guéant-Rodriguez, Rosa-Maria (2020): Mechanisms of homocysteine-induced damage to the endothelial, medial and adventitial layers of the arterial wall. In: *Biobchimie*. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.02.012.
- Bedard, James E. J.; Purnell, Jennifer D.; Ware, Stephanie M. (2007): Nuclear import and export signals are essential for proper cellular trafficking and function of ZIC3. In: *Human molecular genetics* 16 (2), S. 187–198. DOI: 10.1093/hmg/ddl461.
- Blount, B. C.; Mack, M. M.; Wehr, C. M.; MacGregor, J. T.; Hiatt, R. A.; Wang, G. et al. (1997): Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7), S. 3290–3295. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3290.
- BOSHART, M.; WEBER, F.; JAHN, G.; DORSCHHLER, K.; FLECKENSTEIN, B.; SCHAFFNER, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. In: *Cell* 41 (2), S. 521–530. DOI: 10.1016/S0092-8674(85)80025-8.
- Butterworth, C. E.; Bendich, A. (1996): Folic acid and the prevention of birth defects. In: *Annual review of nutrition* 16, S. 73–97. DOI: 10.1146/annurev.nu.16.070196.000445.
- Cell atlas - CIC - The Human Protein Atlas (2020). Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000079432-CIC/cell>, zuletzt aktualisiert am 17.04.2020, zuletzt geprüft am 17.04.2020.
- Das, K. C.; Herbert, V. (1989): In vitro DNA synthesis by megaloblastic bone marrow: effect of folates and cobalamins on thymidine incorporation and de novo thymidylate synthesis. In: *American journal of hematology* 31 (1), S. 11–20. DOI: 10.1002/ajh.2830310103.
- Dissanayake, Kumara; Toth, Rachel; Blakey, Jamie; Olsson, Olof; Campbell, David G.; Prescott, Alan R.; MacKintosh, Carol (2011): ERK/p90RSK/14-3-3 signalling has an impact on

expression of PEA3 Ets transcription factors via the transcriptional repressor capicúa. In: *Biochemical Journal* 433 (Pt 3), S. 515–525. DOI: 10.1042/BJ20101562.

Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1), S. 221–226. DOI: 10.1093/jnci/59.1.221.

Forés, Marta; Simón-Carrasco, Lucía; Ajuria, Leiore; Samper, Núria; González-Crespo, Sergio; Drosten, Matthias et al. (2017): A new mode of DNA binding distinguishes Capicua from other HMG-box factors and explains its mutation patterns in cancer. In: *PLoS genetics* 13 (3), e1006622. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006622.

Fournier, Isabelle; Ploye, Françoise; Cottet-Emard, Jean-Marie; Brun, Jocelyne; Claustrat, Bruno (2002): Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. In: *The Journal of nutrition* 132 (9), S. 2781–2784. DOI: 10.1093/jn/132.9.2781.

Frigerio, Barbara; Bizzoni, Claudia; Jansen, Gerrit; Leamon, Christopher P.; Peters, Godfridus J.; Low, Philip S. et al. (2019): Folate receptors and transporters: biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38 (1), S. 125. DOI: 10.1186/s13046-019-1123-1.

Gade, Padmaja; Kalvakolanu, Dhan V. (2012): Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 809, S. 85–104. DOI: 10.1007/978-1-61779-376-9_6.

Galian, Carmen; Björkholm, Patrik; Bulleid, Neil; Heijne, Gunnar von (2012): Efficient Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Modification of Membrane Proteins Requires a C-terminal Anchoring Signal of Marginal Hydrophobicity*. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (20), S. 16399–16409. DOI: 10.1074/jbc.M112.350009.

Grapp, M.; Just, I. A.; Linnankivi, T.; Wolf, P.; Lucke, T.; Hausler, M. et al. (2012): Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. In: *Brain : a journal of neurology* 135 (Pt 7), S. 2022–2031. DOI: 10.1093/brain/aws122.

Grapp, Marcel; Wrede, Arne; Schweizer, Michaela; Hüwel, Sabine; Galla, Hans-Joachim; Snaidero, Nicolas et al. (2013): Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. In: *Nature communications* 4, S. 2123. DOI: 10.1038/ncomms3123.

- Hyland, Keith; Shoffner, John; Heales, Simon J. (2010): Cerebral folate deficiency. In: *Journal of inherited metabolic disease* 33 (5), S. 563–570. DOI: 10.1007/s10545-010-9159-6.
- Jimenez, G.; Shvartsman, S. Y.; Paroush, Z. (2012): The Capicua repressor - a general sensor of RTK signaling in development and disease. In: *Journal of Cell Science* 125 (6), S. 1383–1391. DOI: 10.1242/jcs.092965.
- Jiménez, Gerardo; Guichet, Antoine; Ephrussi, Anne; Casanova, Jordi (2000): Relief of gene repression by Torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. In: *Genes & Development* 14 (2), S. 224–231.
- Khan, Kashif M.; Jialal, Ishwarlal (2020): StatPearls. Folic Acid (Folate) Deficiency. Treasure Island (FL).
- Khosravi, Maryam; Sotoudeh, Gity; Amini, Maryam; Raisi, Firoozeh; Mansoori, Anahita; Hosseinzadeh, Mahdich (2020): The relationship between dietary patterns and depression mediated by serum levels of Folate and vitamin B12. In: *BMC psychiatry* 20 (1), S. 63. DOI: 10.1186/s12888-020-2455-2.
- Lee, Yoontae (2020): Regulation and function of capicua in mammals. In: *Experimental & molecular medicine*. DOI: 10.1038/s12276-020-0411-3.
- Lewis, Benjamin P.; Green, Richard E.; Brenner, Steven E. (2003): Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (1), S. 189–192. DOI: 10.1073/pnas.0136770100.
- Lu, Hsiang-Chih; Tan, Qiumin; Rousseaux, Maxime W. C.; Wang, Wei; Kim, Ji-Yoen; Richman, Ronald et al. (2017): Disruption of the ATXN1–CIC complex causes a spectrum of neurobehavioral phenotypes in mice and humans. In: *Nat Genet* 49 (4), S. 527–536. DOI: 10.1038/ng.3808.
- Mangold, Sarah; Blau, Nenad; Opladen, Thomas; Steinfeld, Robert; Wessling, Britta; Zerres, Klaus; Häusler, Martin (2011): Cerebral folate deficiency: a neurometabolic syndrome? In: *Molecular genetics and metabolism* 104 (3), S. 369–372. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.06.004.
- McLean, Erin; Benoist, Bruno de; Allen, Lindsay H. (2008): Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. In: *Food and nutrition bulletin* 29 (2 Suppl), S38-51. DOI: 10.1177/15648265080292S107.

- Mensink, Gert B.M.; Weißenborn, Anke; Richter, Almut (2016): Folatversorgung in Deutschland, zuletzt geprüft am 07.04.2020.
- Milman, Nils (2012): Intestinal absorption of folic acid - new physiologic & molecular aspects. In: *The Indian Journal of Medical Research* 136 (5), S. 725–728.
- Mitchell, Herschel K.; Snell, Esmond E.; Williams, Roger J. (1941): THE CONCENTRATION OF "FOLIC ACID". In: *J. Am. Chem. Soc.* 63 (8), S. 2284. DOI: 10.1021/ja01853a512.
- Pérez-Dueñas, Belén; Toma, Claudio; Ormazábal, Aida; Muchart, Jordi; Sanmartí, Francesc; Bombau, Georgina et al. (2010): Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. In: *J Inherit Metab Dis* 33 (6), S. 795–802. DOI: 10.1007/s10545-010-9196-1.
- Phillips, G. J. (2001): Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. In: *FEMS microbiology letters* 204 (1), S. 9–18. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10854.x.
- Pieroth, Renee; Paver, Stephanie; Day, Sharon; Lammersfeld, Carolyn (2018): Folate and Its Impact on Cancer Risk. In: *Current nutrition reports* 7 (3), S. 70–84. DOI: 10.1007/s13668-018-0237-y.
- Qiu, Andong; Jansen, Michaela; Sakaris, Antoinette; Min, Sang Hee; Chattopadhyay, Shrikanta; Tsai, Eugenia et al. (2006): Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. In: *Cell* 127 (5), S. 917–928. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.041.
- Ramaekers, Vincent T.; Rothenberg, Sheldon P.; Sequeira, Jeffrey M.; Opladen, Thomas; Blau, Nenad; Quadros, Edward V.; Selhub, Jacob (2005): Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. In: *The New England journal of medicine* 352 (19), S. 1985–1991. DOI: 10.1056/NEJMoa043160.
- Ramaekers, Vincent Th; Blau, Nenad (2004): Cerebral folate deficiency. In: *Developmental medicine and child neurology* 46 (12), S. 843–851.
- Rosenberg, Irwin H. (2012): A history of the isolation and identification of folic acid (folate). In: *Annals of nutrition & metabolism* 61 (3), S. 231–235. DOI: 10.1159/000343112.

Rossi, Andrea; Kontarakis, Zacharias; Gerri, Claudia; Nolte, Hendrik; Hölper, Soraya; Krüger, Marcus; Stainier, Didier Y. R. (2015): Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. In: *Nature* 524 (7564), S. 230–233. DOI: 10.1038/nature14580.

Sambuy, Y.; Angelis, I. de; Ranaldi, G.; Scarino, M. L.; Stammati, A.; Zucco, F. (2005): The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. In: *Cell biology and toxicology* 21 (1), S. 1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.

Shenoy, Avinash R.; Visweswariah, Sandhya S. (2003): Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. In: *Analytical biochemistry* 319 (2), S. 335–336.

Shoubridge, Cheryl; Tan, May Huey; Fullston, Tod; Cloosterman, Desiree; Coman, David; McGillivray, George et al. (2010): Mutations in the nuclear localization sequence of the Aristaless related homeobox; sequestration of mutant ARX with IPO13 disrupts normal subcellular distribution of the transcription factor and retards cell division. In: *PathoGenetics* 3, S. 1. DOI: 10.1186/1755-8417-3-1.

Simón-Carrasco, Lucía; Jiménez, Gerardo; Barbacid, Mariano; Drosten, Matthias (2018): The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 17 (6), S. 702–711. DOI: 10.1080/15384101.2018.1450029.

Sliva, Katja; Schnierle, Barbara S. (2010): Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. In: *Virology journal* 7, S. 248. DOI: 10.1186/1743-422X-7-248.

Smith, Amy E.; Pinkney, Michael; Piggott, Nigel H.; Calvert, Hilary; Milton, Ian D.; Lunec, John (2007): A novel monoclonal antibody for detection of folate receptor alpha in paraffin-embedded tissues. In: *Hybridoma (2005)* 26 (5), S. 281–288. DOI: 10.1089/hyb.2007.0512.

Steinfeld, R.; Dreha-Kulaczewski, S.; Weigt-Usinger, K.; Lücke, T.; Wolf, P.; Gärtner, J. (2013): Stepwise adaptation of treatment with calcium folinate in different modes of application leads to optimal therapeutic results for patients with cerebral folate transport deficiency. In: *Neuropediatrics* 44 (02). DOI: 10.1055/s-0033-1337719.

- Steinfeld, Robert; Grapp, Marcel; Kraetzner, Ralph; Dreha-Kulaczewski, Steffi; Helms, Gunther; Dechent, Peter et al. (2009): Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. In: *American journal of human genetics* 85 (3), S. 354–363. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.08.005.
- Teng, Shaolei; Srivastava, Anand K.; Schwartz, Charles E.; Alexov, Emil; Wang, Liangjiang (2010): Structural assessment of the effects of amino acid substitutions on protein stability and protein protein interaction. In: *International journal of computational biology and drug design* 3 (4), S. 334–349. DOI: 10.1504/IJCBDD.2010.038396.
- Wang, Yanhua; Zhao, Rongbao; Russell, Robert G.; Goldman, I. David (2001): Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1513 (1), S. 49–54. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00340-6.
- Welch, A. D. (1983): Folic acid: discovery and the exciting first decade. In: *Perspectives in biology and medicine* 27 (1), S. 64–75. DOI: 10.1353/pbm.1983.0006.
- Wong, Derek; Yip, Stephen (2020): Making heads or tails - the emergence of capicua (CIC) as an important multifunctional tumour suppressor. In: *The Journal of pathology*. DOI: 10.1002/path.5400.
- Zhao, Rongbao; Aluri, Srinivas; Goldman, I. David (2017): The proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and the syndrome of systemic and cerebral folate deficiency of infancy: Hereditary folate malabsorption. In: *Molecular aspects of medicine* 53, S. 57–72. DOI: 10.1016/j.mam.2016.09.002.
- Zhao, Rongbao; Diop-Bove, Ndeye; Visentin, Michele; Goldman, I. David (2011): Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. In: *Annual review of nutrition* 31, S. 177–201. DOI: 10.1146/annurev-nutr-072610-145133.

Danksagung

Gerne möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Dr. Robert Steinfeld danke ich für die Bereitstellung meines Promotionsthemas und das Angebot, Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden, für die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei deren Fertigstellung. Ich bin sehr froh, durch die Arbeit an meiner Promotion diverse Labortechniken gelernt und einen umfangreichen ersten Einblick in die medizinische Forschung erhalten zu haben.

Als meiner direkten Betreuerin im Labor danke ich Dr. Annika Wolf, die mich mit grenzenloser Geduld in die praktische Laborarbeit einführte, mich bei den ersten Versuchen anleitete und immer eine verlässliche Ansprechpartnerin für mich war.

Dr. Kristina Lang aus meiner Arbeitsgruppe möchte ich herzlich dafür danken, dass sie meine Arbeit gelesen und mir mit Korrekturvorschlägen sehr geholfen hat. Lydia Bartsch und PD Dr. Lars Schlotawa danke ich dafür, dass sie ebenfalls jederzeit dazu bereit waren, meine Fragen zu beantworten und ihren wissenschaftlichen Erfahrungsschatz mit mir zu teilen.

Vielen Dank an Dr. Richard Finnell für das Zurverfügungstellen zweier Mutationen, die einen wichtigen Bestandteil meiner Untersuchungsgrundlagen darstellten.

Ein großer Dank gilt PD Dr. Ralph Krätzner, Corinna Dickel, Ellen Krämer, Kathrin Schreiber und Tanja Wilke für eine großartige Arbeitsatmosphäre, viele motivierende Worte und wichtige praktische Tipps, die wesentlich zum Gelingen meiner Versuche beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich bedanken bei Gerda, Thomas, Jana, Peer, Felix und Stefan für das Korrekturlesen, die Hilfe bei der Formatierung und bedingungslose Unterstützung weit über diese Arbeit hinaus.