

Tiermodelle der Molybdän-Cofaktor-Defizienz und  
ihre Therapie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Rita Hahnewald

aus Freital

Köln 2009

Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Schwarz  
Prof. Dr. Christian Kubisch  
Prof. Dr. Jochen Reiss

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2009

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1. Der Molybdän-Cofaktor.....	1
1.2. Die Molybdän-Cofaktor-Defizienz.....	2
1.3. Die Unterteilung der MoCo-Defizienz .....	5
1.4. Tiermodell der MoCo-Defizienz Typ A .....	5
1.5. biochemische Substitutionstherapie an <i>Mocs1</i> -defizienten Mäusen mittels cPMP.....	6
1.6. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase .....	8
1.7. Somatische Gentherapie am Modell der <i>Mocs1</i> -defizienten Mäusen.....	9
1.8. Leberzelltransplantation.....	12
1.9. Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B.....	14
1.10. Zielsetzung .....	16
2. Material und Methoden .....	17
2.1. Material .....	17
2.1.1. Chemikalien .....	17
2.1.2. Lösungen, Puffer und Medien.....	19
2.1.2.1. Nährmedien für Bakterien.....	22
2.1.2.2. Antibiotika.....	22
2.1.2.3. Sterilisation.....	23
2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....	23
2.1.4. Stämme .....	24
2.1.5. BACs (bacterial artificial chromosomes).....	24
2.1.6. Vektoren.....	24
2.1.7. Synthetische Oligonukleotide .....	25
2.1.7.1. Genotypisierung von Mäusen.....	25
2.1.7.2. <i>MOCSIAB</i> transgene Maus .....	25

2.1.7.3.	<i>MOCS2</i> human .....	25
2.1.7.4.	<i>Mocs2-Knockout</i> -Maus .....	26
2.1.7.5.	AAV-Integration .....	28
2.1.8.	Gebrauchswaren.....	29
2.1.9.	Geräte .....	29
2.1.10.	Datenbanken und Programme.....	30
2.2.	Methoden .....	31
2.2.1.	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	31
2.2.1.1.	Arbeiten mit Bakterien .....	31
2.2.1.2.	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> per Hitzeschock [71] .....	32
2.2.1.2.1.	JM109 Ultrakompetente Zellen .....	32
2.2.1.2.2.	SURE <sup>®</sup> 2 Super Kompetente und XL10-Gold <sup>®</sup> Ultrakompetente Zellen...32	
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.2.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	33
2.2.2.1.1.	Minipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Miniprep Kit</i> 33	
2.2.2.1.2.	Midipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Midiprep Kit</i> 33	
2.2.2.1.3.	Endogen freie Maxipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Maxiprep endogenfree Kit</i> .....	34
2.2.2.2.	Isolierung von BAC-DNA aus <i>Escherichia coli</i> mit Hilfe des QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Midiprep Kit</i> .....	34
2.2.2.3.	Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben .....	35
2.2.2.3.1.	DirectPCR <sup>®</sup> Lysis System .....	35
2.2.2.3.2.	DNeasy <sup>®</sup> Blood & Tissue Kit .....	35
2.2.2.4.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe mit peqGOLD TriFast <sup>™</sup> [74]...36	
2.2.2.5.	Gelelektrophorese.....	37
2.2.2.5.1.	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	37
2.2.2.5.2.	Agarosegelelektrophorese von RNA .....	37
2.2.2.5.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	38
2.2.2.6.	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen .....	38
2.2.2.7.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	39
2.2.2.8.	Aufreinigung von DNA.....	39
2.2.2.8.1.	DNA aus Agarosegelen .....	39
2.2.2.8.2.	Montage <sup>™</sup> Centrifugal Filter Devices.....	40
2.2.2.9.	Enzymatische Behandlung von DNA .....	40

2.2.2.9.1. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	40
2.2.2.9.2. Dephosphorylierung von DNA .....	40
2.2.2.10. Ligation .....	41
2.2.2.10.1. Ligation von DNA Fragmenten .....	41
2.2.2.10.2. T/A-Klonierung .....	41
2.2.2.11. Blau-Weiß-Selektion .....	42
2.2.2.12. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis <i>et al.</i> , 1987; Saiki <i>et al.</i> , 1989)...	42
2.2.2.12.1. Genotypisierung von <i>Knockout</i> -Mäusen mittels PCR .....	43
2.2.2.12.2. High-Fidelity PCR .....	44
2.2.2.12.3. Reverse Transkriptase-Reaktion [80] .....	45
2.2.2.12.4. PCR an Plasmid-oder genomischer DNA .....	46
2.2.2.12.5. <i>Randomly Primed</i> PCR-DNA Walking <i>SpeedUP</i> <sup>TM</sup> Premix Kit.....	46
2.2.2.13. DNA-Sequenzanalyse .....	48
2.2.2.14. Blot-Techniken .....	49
2.2.2.14.1. Southern Blot von DNA auf Nitrozellulose-Filter (modifiziert nach Southern, 1975) .....	49
2.2.2.14.2. Northern Blot von RNA auf Nitrozellulose-Filter .....	49
2.2.2.15. Radioaktive Markierung von DNA (modifiziert nach Feinberg und Vogelstein, 1984 [81]) .....	50
2.2.2.15.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit dem Megaprime <sup>TM</sup> <i>DNA labelling Kit</i> .....	50
2.2.2.15.2. Abtrennung nicht inkorporierter Radionukleotide.....	50
2.2.2.16. Hybridisierung (nach Denhardt, 1966).....	50
2.2.2.17. Nachweis der markierten DNA .....	51
2.2.2.17.1. Autoradiographie .....	51
2.2.2.17.2. Storage phosphor .....	51
2.2.3. Biochemische Analysen .....	52
2.2.3.1. Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	52
2.2.3.2. Immunoblot Analyse .....	52
2.2.3.3. Molybdopterin-Untersuchung .....	53
2.2.3.4. Untersuchung der Sulfitoxidaseaktivität .....	54
2.2.3.5. Sulfit-Test.....	54
2.2.4. Histologische Techniken.....	55
2.2.4.1. Perfusion.....	55
2.2.4.2. Gefrierschnitte und Färbung der Zellkerne .....	55
2.2.4.3. HE-Färbung .....	56

2.2.5.	Transgene Mäuse .....	57
2.2.5.1.	Herstellung genetisch veränderter ES-Zellen mittels homologer Rekombination.....	57
2.2.5.1.1.	Präparation von Mausfibroblasten- <i>feeder layers</i> .....	57
2.2.5.1.2.	Wachstum von ES-Zellen auf Mausfibroblasten- <i>feeder layers</i> .....	58
2.2.5.1.3.	Transfektion von ES-Zellen.....	58
2.2.5.1.4.	Wachstum von ES-Zellen für Southern Blot-Analysen.....	58
2.2.5.2.	Herstellung chimärer Mäuse mittels Injektion von modifizierten ES-Zellen in Blastocysten.....	59
2.2.5.3.	Chimäre Mäuse und Verpaarungen.....	60
2.2.6.	Substitutionstherapie mit cPMP.....	60
2.2.7.	Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase .....	60
2.2.8.	Gentherapie .....	62
2.2.8.1.	Adeno-assoziierte-Viren.....	62
2.2.8.1.1.	Aufreinigung von Adeno-assoziierten Viren .....	62
2.2.8.1.2.	Applikation der rekombinanten Viren .....	62
2.2.8.2.	Hepatozytentransplantation.....	62
2.2.8.2.1.	Schädigung der Mausleber mit Retrorsin .....	62
2.2.8.2.2.	Präparation Embryonaler Hepatozyten [93] .....	63
2.2.8.3.	Nichtvirale Gentherapie .....	63
3.	Ergebnisse.....	64
3.1.	Molekulare Therapien der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ A.....	64
3.1.1.	Biochemische Therapie am Tiermodell <i>Mocs1</i> -defizienter Mäuse- Optimierung der cPMP-Substitutionstherapie.....	64
3.1.2.	Somatische Gentherapie <i>Mocs1</i> -defizienter Mäuse.....	70
3.1.2.1.	Funktionelle Überprüfung der <i>MOCSI</i> -Expressionskassette in transgenen Mäusen	70
3.1.2.2.	Nackte Plasmid-DNA-Injektionen .....	75
3.1.2.3.	AAV-vermittelter Gentransfer .....	78
3.1.2.3.1.	Konstruktion der AAV-Vektor-Plasmide zur Herstellung der rAAV .....	78
3.1.2.3.2.	Untersuchung der Transduktionseigenschaften des AAV-Vektors .....	80
3.1.2.4.	Virale Gentherapie <i>Mocs1</i> -defizienter Mäuse.....	83
3.1.2.4.1.	Intrahepatische Applikation.....	83
3.1.2.4.2.	Intravenöse Applikation.....	88
3.1.2.4.3.	Deeskalationsstudien .....	89

3.1.2.4.4. Reapplikationen .....	90
3.1.2.4.5. Untersuchung der Induktion einer Immuntoleranz gegenüber dem viralen Vektor 91	
3.1.2.5. AAV-Integration .....	94
3.1.3. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase .....	98
3.1.4. Leberzelltransplantation.....	100
3.2. Molekulare Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B .....	105
3.2.1. humane <i>MOCS2</i> -Expression.....	105
3.2.1.1. Nachweis des alternativen Spleißmechanismus von <i>MOCS2A</i> und <i>MOCS2B</i>	105
3.2.1.2. Charakterisierung einer Deletionsmutation im <i>MOCS2</i> -Gen.....	107
3.2.2. murine <i>Mocs2</i> -Expression .....	110
3.2.2.1. Nachweis der murinen <i>Mocs2</i> -Transkripte .....	111
3.2.2.2. <i>Mocs2-Knockout</i> -Modell.....	113
3.2.2.2.1. Konstruktion des <i>Mocs2</i> - Disruptionsvektors.....	113
3.2.2.2.2. Klonierung der externen 5' Sonde .....	114
3.2.2.2.3. Homologe Rekombination des <i>Mocs2</i> -Gens .....	115
3.2.2.2.4. Generierung chimärer Mäuse.....	116
3.2.2.2.5. Analyse der <i>Mocs2</i> -Expression in <i>Knockout</i> Mäusen .....	118
3.2.2.2.6. Phänotypische Analysen der <i>Mocs2-Knockout</i> Mäusen.....	120
4. Diskussion .....	122
4.1. cPMP-Substitutionstherapie am Tiermodell <i>Mocs1</i> -defizienter Mäuse .....	122
4.2. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase .....	127
4.3. Somatische Gentherapie.....	129
4.3.1. Expressionskassette.....	129
4.3.2. Nichtvirale Gentherapie .....	133
4.3.3. Virale Gentherapie .....	135
4.3.3.1. Untersuchung der Transduktionseigenschaften des AAV-Vektors .....	135
4.3.3.2. AAV-vermittelter Gentransfer in Mausmodell der MoCo-Defizienz Typ A	137
4.3.3.3. Deeskalationsstudien mit AAV- <i>MOCSI</i> .....	140
4.3.3.4. Reapplikationsstudien am Mausmodell der MoCo-Defizienz Typ A und Untersuchungen der Induktion einer Immuntoleranz gegenüber dem viralen Vektor	141
4.3.3.5. AAV-Integration .....	144
4.4. Leberzelltransplantation.....	146

---

4.5.	Molekulare Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B .....	150
4.5.1.	Das <i>MOCS2</i> -Gen .....	150
4.5.2.	<i>Mocs2</i> -Knockout-Modell .....	155
5.	Zusammenfassung .....	159
6.	abstract.....	161
7.	Literaturverzeichnis .....	163
8.	Danksagung .....	173
9.	Lebenslauf .....	175

## Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
ADH	Aldehydoxidase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosomes</i>
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cPMP	zyklisches Pyranopterin-Monophosphat
CMV	Cytomegalovirus
d	Tag
Da	Dalton
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpc	<i>day past coitus</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFP</i>	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EH	embryonale Hepatozyten
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	et alteres
EtBr	Ethidiumbromid
FL	<i>feeder layer</i>
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
<i>GEPH</i>	Gephyrin

---

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hrsg	Herausgeber
HSV	Herpes Simplex Viren
H <sub>2</sub> O	Wasser
i.h.	intrahepatisch
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
i.v.	intravenös
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molarität
Moa	<i>molybdopterin converting factor</i>
MEFs	Mausembryofibroblasten
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MoCo	Molybdän-Cofaktor
MOCS	<i>Molybdenum cofactor synthesis</i>
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MPT	Molybdopterin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PSO	pflanzliche Sulfitoxidase
r	rekombinant
®	amtlich registrierte Marke
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute

RP-PCR	<i>Randomly Primed PCR</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOX	Sulfitoxidase
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
™	<i>Trademark</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tu	Transduktionseinheiten
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WPRE	<i>woodchuck cis acting posttranscriptional regulatory element</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -Galactosid
XDH	Xanthindehydrogenase
$\mu$	Mikro
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

### **Symbole der Nukleinsäurebasen**

Name der Nukleinsäurebase	Symbol
Adenin	A (a)
Cytosin	C (c)
Guanin	G (g)
Thymin	T (t)

# 1. Einleitung

## 1.1. Der Molybdän-Cofaktor

Molybdän ist ein wichtiges Spurenelement, das von Organismen aufgenommen und in Enzyme eingebaut wird. Diesen Enzymen ist ein molybdänhaltiger Cofaktor gemeinsam, der an wichtigen Redoxreaktionen im globalen Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffhaushalt beteiligt ist. Der sogenannte Molybdän-Cofaktor (MoCo) ist für alle Molybdän-abhängigen Enzyme essentiell und wird durch den Einbau von Molybdän in ein Trägermolekül namens Molybdopterin gebildet [1]. Eine Ausnahme stellt die eubakterielle Nitrogenase dar, welche einen Eisen-Molybdän-Cofaktor besitzt und damit in der Lage ist Luftstickstoff zu fixieren [2]. Die Hauptaufgabe beider Cofaktoren stellt die Kontrolle der Redoxeigenschaften von Molybdän dar, welches über Schwefelgruppen des Pterin-Trägermoleküls räumlich koordiniert ist.

Die Bildung dieses MoCo ist ein ubiquitärer und hochkonservierter Stoffwechselweg, der zuerst in Bakterien [1] und später auch im menschlichen Organismus [3] entdeckt wurde. An der humanen MoCo-Biosynthese sind die Produkte von vier Genen beteiligt: Die von *MOCS1* (*molybdenum cofactor synthesis 1*) exprimierten Proteine MOCS1A und MOCS1B wandeln Guanosinderivate (GTP) in zyklisches Pyranopterinmonophosphat (cPMP) um. *MOCS2* kodiert für die kleine (MOCS2A) und große (MOCS2B) Untereinheit der Molybdopterinsynthase, die die Umwandlung von cPMP in das Trägermolekül Molybdopterin (MPT) katalysiert. Die Molybdopterinsynthase muss durch eine Sulfotransferase aktiviert werden, die das Produkt des *MOCS3*-Gens ist. Der letzte Schritt in der MoCo-Bildung, die Adenylierung des MPTs und der Einbau des Molybdäns, wird durch das multifunktionale Enzym Gephyrin (Produkt von *GEPH*) katalysiert. Gephyrin ist, neben seiner Funktion in der MoCo-Biosynthese [4], auch an der postsynaptischen Aggregation von Glycin-Rezeptoren beteiligt [5]. Nach der Insertion des Molybdäns wird der MoCo in das entsprechende Apoenzym eingebaut (siehe Abb. 1.1.).

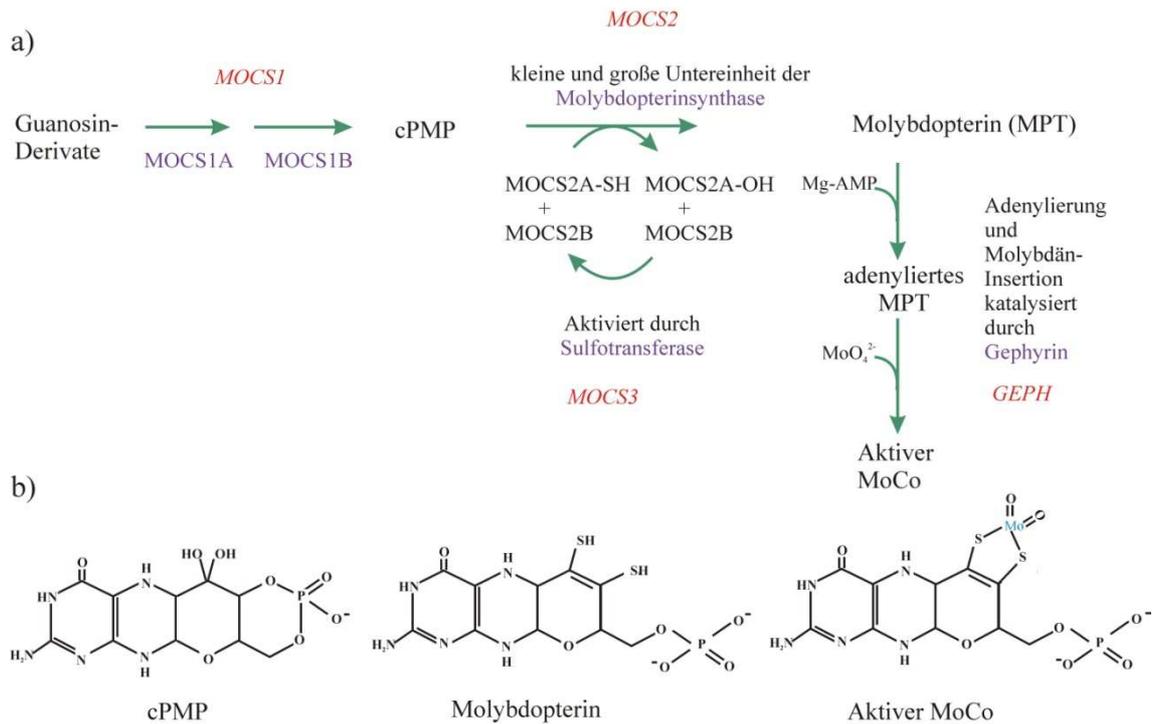


Abb. 1.1.: a) Überblick über die humane Molybdän-Cofaktor-Biosynthese b) Struktur der Zwischenprodukte des Biosyntheseweges und des Molybdän-Cofaktors [3, 6].

Mehr als 40 verschiedene Molybdän-abhängige Enzyme sind bis jetzt beschrieben wurden, drei davon im menschlichem Organismus: Sulfitoxidase (SOX), Xanthindehydrogenase (XDH) und Aldehydoxidase (ADH) [6-7].

## 1.2. Die Molybdän-Cofaktor-Defizienz

In MoCo-defizienten Patienten ist die Bildung des MoCo durch Mutationen in drei der vier beteiligten Gene (*MOCS1*, *MOCS2*, und *GEPH*) unterbrochen, was zum Verlust der humanen Enzyme SOX, XDH und ADH führt. Duran *et al.* beschrieben 1978 zum ersten Mal ein Kind mit kombinierter SOX (OMIN 272300) und XDH-Defizienz (OMIN 278300) [8]. Zwei Jahre später führten Johnson *et al.* diese Krankheit auf einen Defekt in der MoCo-Biosynthese zurück [9].

Der gemeinsame Phänotyp der MoCo- und SOX-Defizienz umfasst verschiedene neurologische Abnormalitäten, ektope Augenlinsen, Microcephalie und mentale Entwicklungsstörungen. In Abb. 1.2. sind die charakteristischen aufgedunsenen

Wangen, eine verlängerte Oberlippenrinne, die schmale Nase und eine Microcephalie zu erkennen [10].

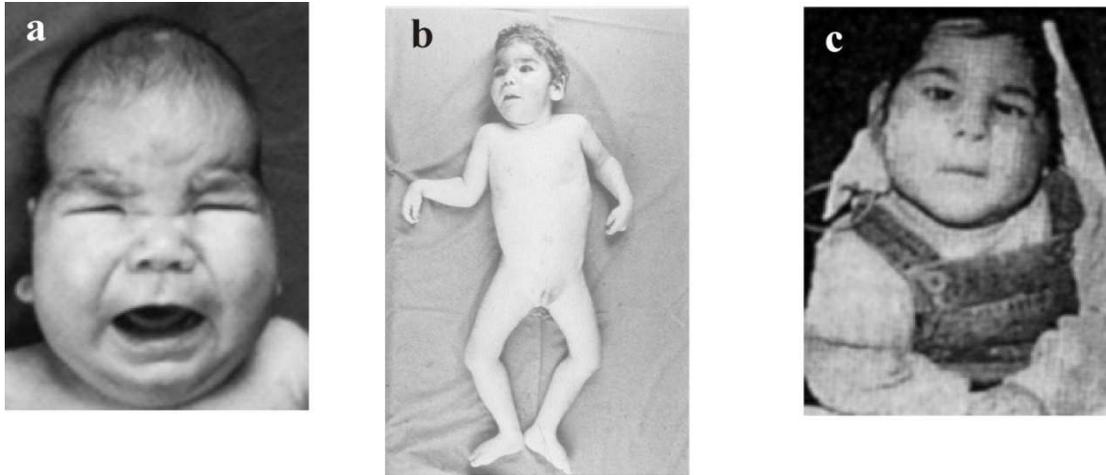


Abb. 1.2.: Patienten mit Molybdän-Cofaktor-Defizienz (a und b) oder isolierter Sulfoxidase-Defizienz (c).

Die klinischen Merkmale der MoCo-Defizienz sind vor allem auf die inaktivierte SOX zurückzuführen, da Patienten mit einer isolierten SOX-Defizienz vergleichbare Symptome aufweisen [11]. Bei beiden Patientengruppen treten erhöhte Werte von Sulfit, Thiosulfat, S-Sulfocystein und Taurin auf.

Die SOX ist am Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein sowie Methionin beteiligt und katalysiert die Oxidation von Sulfit in Sulfat [12]. Eine fehlende SOX-Aktivität führt zur Akkumulation von Sulfit und anderen Metaboliten des katalytischen Stoffwechselweges der Schwefelhaltigen Aminosäuren. Die Anhäufung von Sulfit im Organismus hat die Inaktivierung von Proteinen und Zelltod zur Folge [13-15].

Die hohen Werte von S-Sulfocystein sind auf die Reaktion von Sulfit mit Cystein zurückzuführen. S-Sulfocystein ist Glutamat strukturell ähnlich, welches einen wichtigen exzitatorischen Neurotransmitter im Gehirn darstellt, der NMDA-, AMPA- und Kainat-Glutamatrezeptoren aktiviert. Erhöhte Glutamat-Konzentrationen führen zu einer verstärkten Aktivierung der Rezeptoren und damit zu einer Exzitotoxizität [16]. Der folgende übermäßige Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt eine Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen und Synthasen [16-17], die direkt oder indirekt durch z.B. Radikalbildung die Zelle schädigen. Die bei der Überregung des NMDA-Rezeptors ausgelösten Prozesse führen zu einem verzögerten exzitotoxischen Tod der Neurone

[18]. Verstärkt wird der Effekt dadurch, dass Sulfid die Glutamatdehydrogenase in neuronalen Zellen inaktiviert. Das führt zur Anhäufung von Glutamat, zu einer verringerten ATP-Synthese, sowie zu einer eingeschränkten Verfügbarkeit von  $\alpha$ -Ketoglutarat und andern Zitronensäurezyklus-Zwischenprodukten. Aufgrund des Energieabfalls, der durch die verringerte ATP-Synthese bedingt ist, kommt es zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien und zum Zelltod [19]. Microarray-Analysen des Gehirns MoCo-defizienter Mäusen zeigten außerdem, dass 84 Gene dereguliert waren. Ein wirksamer Induktor von Apoptoseprozessen, Lipocalin 2, war zum Beispiel um das 100-fache gesteigert [20].

MoCo-defiziente Patienten zeigen auch erhöhte Mengen an Xanthin, Hypoxanthin und verringerte Mengen an Harnsäure im Urin, wodurch die biochemische Unterscheidung zwischen MoCo- und SOX-Defizienz möglich ist. Die Xanthinoxidoreduktase katalysiert den finalen Schritt des Purinabbaus, der in der Bildung der Harnsäure endet. Das Enzym kann in zwei verschiedenen Formen existieren. Die Xanthindehydrogenase (XDH) verwendet vorzugsweise Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) als Elektronenakzeptor, wohingegen die Xanthinoxidase molekularen Sauerstoff als Akzeptor nutzt [21-23]. Da im humanen Gewebe meist  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor fungiert [24-25], wird im Rahmen dieser Arbeit von der XDH gesprochen.

Die XDH katalysiert die Umwandlung von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure [23]. Hypoxanthin kann durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase zu in einem gewissen Maße recycelt werden. Wird aber Xanthin durch die XDH nicht mehr abgebaut, sammelt es sich im Blut, im Urin und in der Niere an. Xanthin besitzt eine sehr geringe Löslichkeit, so dass sich in der Niere Xanthinsteine bilden, welche, vergleichbar mit Harnsteinen, starke Schmerzen verursachen können. In einigen Fällen führt die Verstopfung der Nierentubuli durch Xanthinablagerungen zu einem akuten Nierenversagen [24].

Die ADH teilt viele biochemische Eigenschaften und Substratspezifitäten mit der XDH. Eine isolierte Form der ADH-Defizienz wurde bis jetzt noch nicht beschrieben. Patienten mit einer kombinierten ADH und XDH-Defizienz zeigten keine ernststen klinischen Konsequenzen [26]. Das deutet darauf hin, dass eine isolierte ADH-Defizienz keine klinischen Auswirkungen zur Folge hat.

### 1.3. Die Unterteilung der MoCo-Defizienz

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Genetik der MoCo-Defizienz (OMIM 252150) war die Identifizierung von zwei Komplementationsgruppen durch die Cokultivierung von verschiedenen Patientenfibroblasten [27]. Etwa 60% der Patienten gehören zur Gruppe A, die Mutationen im *MOCS1*-Gen aufweisen [3] und somit nicht mehr in der Lage sind cPMP zu synthetisieren [28]. Patienten der Gruppe B können durch eine Mutation im *MOCS2*-Gen kein Molybdopterin mehr bilden [29]. Patienten der Gruppe C tragen Mutationen im *GEPH*-Gen und können durch die ausbleibende Molybdän-Insertion keinen aktiven MoCo formen [4] (siehe Tabelle 1.1.).

Betroffenes Protein	Anzahl Patienten (n)	Häufigkeit (%)	Komplementationsgruppe
MOCS1A	40	51	A
MOCS1B	9	12	
MOCS2A	7	9	B
MOCS2B	16	21	
GEPH	1	1	C
Unbekannt	5	6	

Tabelle 1.1.: Mutationsverteilung unter 77 Patienten mit kombinierter MoCo-Defizienz (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Reiss, Universitätsklinikum Göttingen, [28, 30-32])

Bis zum heutigen Tage wurden annähernd 50 nicht miteinander verwandte Familien molekulargenetisch analysiert und über 100 Fälle der MoCo-Defizienz diagnostiziert [28]. In den an der MoCo-Biosynthese beteiligten Genen sind bis jetzt 46 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen bekannt. In fast allen Fällen führten die Mutationen zum Tod der Patienten ([10, 28, 30-32] und unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Reiss, Universitätsklinikum Göttingen).

### 1.4. Tiermodell der MoCo-Defizienz Typ A

Zur Untersuchung der molekularen Prozesse der Krankheitsentstehung und möglicher Therapien wurde ein *Knockout*-Modell für die MoCo-Defizienz Typ A etabliert. Dafür wurde ein komplettes Exon des murinen *Mocs1*-Gens, welches homolog zu dem

humanen *MOCSI*-Gen ist, durch die homologe Rekombination mit einem Disruptionsvektor entfernt. Diese *Mocs1-Knockout*-Mäuse weisen einen schweren Phänotyp auf, der die biochemischen Charakteristika der MoCo-Defizienz Typ A widerspiegelt. Die murine MoCo-Defizienz mit Mutationen im *Mocs1*-Gen wird, wie bei der humanen Form, als monogenetische, autosomal-rezessive Krankheit vererbt. Wie beim Menschen zeigten die heterozygoten *Mocs1*-defizienten Mäuse keine Anzeichen für eine MoCo-Defizienz. Aber die homozygoten Tiere starben zwischen d 1 und d 11 nach der Geburt. Biochemische Analysen der homozygot *Mocs1*-defizienten Mäuse zeigten, dass weder Molybdopterin, noch der aktive Cofaktor gebildet wurden. Wie die humanen Patienten schieden die Tiere erhöhte Sulfit- und Xanthin-Mengen mit dem Urin aus. Die homozygoten Tiere zeigten die gleichen biochemischen Abnormalitäten, wie sie für Menschen mit MoCo-Defizienz Typ A beschrieben wurde [33]. Die *Mocs1*-Knockout-Mäuse konnten somit für die Untersuchung therapeutischer Konzepte für diese bisher unheilbare Krankheit verwendet werden.

### **1.5. biochemische Substitutionstherapie an *Mocs1*-defizienten Mäusen mittels cPMP**

Eine mögliche Therapieform ist das Zuführen (die Substitution) des fehlenden Gen-Produkts bzw. Stoffwechselproduktes. Der MoCo selbst ist aber außerhalb der schützenden Umgebung der Molybdän-abhängigen Apoenzyme aufgrund seiner hohen Sauerstoffsensitivität extrem instabil [34] und für eine Substitutionstherapie somit nicht geeignet. Versuche, ihn synthetisch herzustellen, zeigten keine Erfolge.

Bei Patientenfibroblasten von Typ B der MoCo-Defizienz wurde beobachtet, dass sie cPMP, das Produkt der *MOCSI*-codierten Proteine, akkumulierten und ins Medium abgaben. Kultivierte man diese Zellen zusammen mit Fibroblasten von Patienten mit MoCo-Defizienz Typ A, nahmen diese das cPMP auf, was zur Restauration der Molybdän-abhängigen Enzyme führte [27]. Diese Experimente deuteten darauf hin, dass dieses Stoffwechselzwischenprodukt der MoCo-Biosynthese fähig ist Membranen zu passieren. Außerdem wurde gezeigt, dass das cPMP der humanen Fibroblasten identisch mit dem bakteriellen cPMP ist [35-36], denn die Biosynthese des Moleküls ist

in allen Organismen hochkonserviert [37-39]. So konnte cPMP aus *Escherichia coli* in einem dreistufigen HPLC-Chromatographie-Verfahren aufgereinigt und *Mocs1*-defizienten Mäusen injiziert werden. Das Hauptaugenmerk der Behandlung lag in der Restauration der SOX, da deren Aktivitätsverlust der Hauptgrund für den letalen Phänotyp der MoCo-Defizienz ist. Der Phänotyp der MoCo-Defizienz wurde durch die Behandlung erheblich verbessert (siehe Abb. 1.3.) [40].



Abb. 1.3.: cPMP-Substitutionstherapie: 6 d alte Wildtypmaus (links) im Vergleich mit *Mocs1*-defizienten Geschwistern ohne (Mitte) oder mit cPMP-Behandlung (rechts) [40].

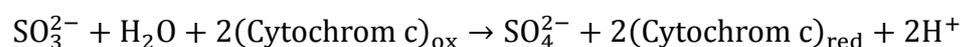
Jedoch traten in einem Alter um 70 d postnatal Probleme auf, die auf eine verminderte XDH-Aktivität zurückzuführen sind. Während die bewirkte SOX-Aktivität ausreichte, die vom Sulfid verursachten Symptome vollständig aufzuheben, führte die verminderte XDH-Aktivität in den Mäusen zu vermehrten Xanthinablagerungen in den Nieren. Was im Menschen selten Probleme bereitet, führte im murinen Organismus zum gehäuften Auftreten akuter Nierenbeschwerden [40].

Nach verschiedenen Behandlungsschemata und unterschiedlichen Mengen an cPMP wurde die Korrelation zwischen injiziertem cPMP und der Lebensdauer sichtbar. In Hinblick auf die Anwendung bei menschlichen Patienten sollte deshalb in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine weitere Erhöhung der cPMP-Menge zu einer Verlängerung der Lebensdauer führt und zur Verringerung von Xanthinablagerungen in der Niere.

## 1.6. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase

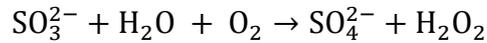
Die Substitutionstherapie mit cPMP kann bei Patienten mit Mutationen im *MOCS2*-Gen nicht angewandt werden. Da MPT, das Produkt der MPT-Synthese (Heterodimer aus *MOCS2A* und *MOCS2B*) im aufgereinigtem Zustand sehr instabil ist, muss eine Alternative für die Behandlung der MoCo-Defizienz Typ B gefunden werden. Der MoCo ist für die Enzyme SOX, XDH und ADH essentiell. Jedoch sind die phänotypischen Merkmale der MoCo-Defizienz vor allem auf den Verlust der SOX zurückzuführen [19-20, 41-42]. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Substitutionstherapie mit aufgereinigter SOX in Betracht gezogen.

Die SOX katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat mit dem physiologischen Elektronenakzeptor Cytochrom *c*. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der oxidativen Degradation von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Cystein und Methionin, und schwefelhaltiger Membran-Komponenten im tierischen Organismus. Die bedeutende Rolle der Sulfitoxidase für den Menschen bei der Detoxifizierung von Sulfit wird durch neurologische Abnormalitäten deutlich, wie sie bei der isolierten SOX-Defizienz und MoCo-Defizienz zu beobachten sind [13]. Die tierische SOX ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und liegt in seiner aktiven Form als Homodimer mit einer apparenten molekularen Masse von 101-110 kDa vor [43]. Die aus Vertebraten isolierte SOX lässt sich proteolytisch in zwei distinkte Domänen spalten [43], wobei die kleinere etwa 10 kDa große Domäne ein Cytochrom des *b5*-Typs als prosthetische Gruppe enthält und die größere C-terminal liegende Domäne (42 kDa) einer MoCo-Domäne entspricht. Sie katalysiert folgende Reaktion:



Die pflanzliche Sulfitoxidase (PSO) gehört wie die tierische SOX zur Familie der Molybdän-abhängigen Enzyme. Die Analysen der cDNA-Sequenz der PSO und der genomischen Struktur des Gens zeigten die Abwesenheit einer im Vergleich zur tierischen SOX am N-Terminus liegenden Häm- Domäne des *b5*-Typs. Die PSO ist in Peroxisomen lokalisiert und reagiert nicht mit Cytochrom *c* [44-45]. Hänsch *et al.*

(2006) identifizierten  $O_2$  als physiologischen Elektronenakzeptor der PSO [46]. Folgende Reaktion katalysiert die PSO:



Auch wenn man die tierische SOX aus Rattenlebern, Mäusen und humanen Gewebe aufgereinigt hat, könnte man diese nicht für eine Substitutionstherapie verwenden. Sie nutzen für den Sulfid-Abbau Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor, was hauptsächlich im mitochondrialen Intermembranraum vorkommt. Das von außen eingebrachte Enzym würde nicht dahin transportiert werden. Anders verhält es sich mit der PSO. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym das kleinste Molybdän-abhängige Enzym in Eukaryoten ist. Die PSO besitzt keine Häm-Domäne, sondern nur die MoCo-Domäne, die für die Detoxifizierung verantwortlich ist [45]. Auf Grund dieser Eigenschaften der PSO, stellte sich die Frage, ob eine Substitutionstherapie mit dem aufgereinigtem Enzym möglich ist.

## 1.7. Somatische Gentherapie am Modell der *Mocs1*-defizienten Mäusen

Bis lang konnte nur die cPMP-Substitutionstherapie im Mausmodell etabliert werden. Diese Therapie ist theoretisch auch beim Menschen möglich, würde aber wöchentliche Injektionen von cPMP während des ganzen Lebens erfordern. Sowohl cPMP, als auch die molybdänabhängigen Enzyme weisen eine sehr kurze Halbwertszeit auf [47-48]. Außerdem stellt die Herstellung des cPMP und dessen Verabreichung einen erheblichen finanziellen Aufwand dar, der auf ca. 200.000 Euro pro Jahr und Patient geschätzt wird (Schwarz, persönliche Mitteilung).

Die MoCo-Defizienz wird durch Mutationen in Genen verursacht, deren Produkte an der MoCo-Biosynthese beteiligt sind. Deshalb wurde die somatische Gentherapie als Behandlungsalternative zur cPMP-Injektion in Betracht gezogen, bei der das inaktive Gen ersetzt oder repariert wird.

Obwohl bereits 1995 die erste Gentherapie am Menschen beschrieben wurde [49], sind derartige Verfahren in ihrer Anwendung noch weit entfernt vom klinischen Alltag. Nach wie vor stellt das Einbringen und die langfristige stabile Expression eines rekombinanten funktionellen Gens in die entsprechenden Zielzellen das größte Problem dar. Zur Auswahl stehen verschiedene Transfermethoden, die von nackter Plasmid-DNA [50] bis zu viralen Vektoren reichen [51].

Für eine somatische Gentherapie, bei der das intakte Gen ersetzt werden soll, wird eine Expressionskassette benötigt die, wie im Falle der MoCo-Defizienz Typ A, Bestandteile des *MOCSI*-Gens enthält. In vorangegangenen Experimenten wurde eine Expressionskassette hergestellt, die die codierenden Sequenzen für die Proteine MOCS1A und MOCS1B beinhaltet. Da bislang keine geeigneten Antikörper zur Untersuchung dieser Proteine vorhanden sind, musste eine Alternative zur Überprüfung der Funktionalität der Expressionskassette gefunden werden. Aus diesem Grund wurden transgene Mäuse etabliert, welche zusätzlich zu zwei defekten *Mocs1*-Genen die *MOCSI*-Expressionskassette tragen [52]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das eingebrachte Transgen den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufheben und somit die Funktionalität nachgewiesen werden kann.

In ersten Versuchen wurde die *MOCSI*-Expressionskassette als nackte Plasmid-DNA mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektionen in *Mocs1*-defiziente Mäuse appliziert. Jedoch konnte damit der Phänotyp der MoCo-Defizienz nicht verbessert werden [52]. Die generellen Nachteile von nichtviralen Vektoren liegen in der geringeren Effektivität und der kürzeren Expressionsdauer im Vergleich zu den viralen Vektoren.

Aus diesem Grund ist es wichtig, für die somatische Gentherapie der Moco-Defizienz auch virale Vektoren in Betracht zu ziehen. Virale Vektoren basieren auf unterschiedlichen Viren und werden in integrative und nichtintegrative eingeteilt. Auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) und Retroviren (einschließlich Lentiviren und Foamyviren) basierende Vektoren besitzen die Fähigkeit ihr virales Genom in die chromosomale DNA der Wirtszelle zu integrieren und führen unter Umständen zu einer lebenslangen Genexpression. Nichtintegrative Vektoren stellen die auf Adenoviren (Ad) und Herpes Simplex Viren (HSV) basierenden Vektoren dar. Sie bringen ihr Genom ebenfalls in den Kern von Zielzellen ein, wo es dann aber episomal persistiert.

In vielen gentherapeutischen Versuchsansätzen erwiesen sich die auf AAV basierenden Vektoren als besonders geeignet. AAV ist ein Mitglied der Familie der Parvoviridae. Der Virus ist nicht in der Lage, sich selbst zu replizieren und ist nicht pathogen. Wie der Name bereits sagt, findet die Replikation nur im Zusammenhang mit einer Coinfektion von Helferviren (Ad und HSV) statt [53]. Die Abwesenheit eines Helfervirus führt zu einer dauerhaften Infektion, die eine stabile Integration des AAV-Genoms in die AAVS1-Stelle auf dem Chromosom 19 einschließen kann [54].

AAV-Virione sind kleine unverpackte Partikel (20-25 nm), die eine lineare einzelsträngige DNA mit einer Größe von 4,7 kb tragen. Aufgrund der relativ kleinen Größe werden für die Herstellung der AAV-Vektoren alle viralen Gene deletiert (siehe Abb. 1.4.).

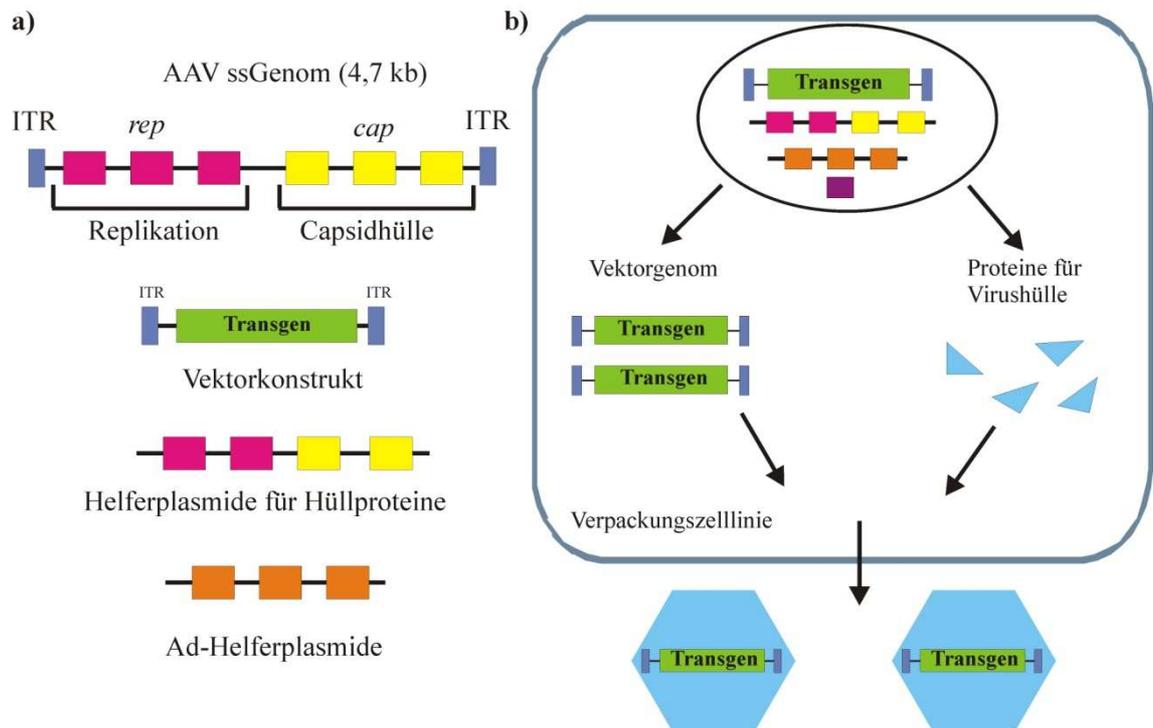


Abb. 1.4.: AAV-Vektoren. a) Das AAV-Genom besteht aus den Genen *rep* (Replikation) und *cap* (strukturelle Proteine), die von den *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert sind. Im rekombinanten AAV-Vektorkonstrukt werden die *rep*- und *cap*-Gene durch einen Promotor und transgenen Sequenzen ausgetauscht. Die *rep*- und *cap*-Gene werden während der Viruspartikel-Produktion von sogenannten Helferplasmiden exprimiert. Außerdem werden Proteine von Helferviren wie Adenoviren (Ad) benötigt, ohne die die AAV-Replikation nicht stattfinden kann. Ein Teil dieser Proteine liegt als Helferplasmide vor. Der andere Teil wird von der Verpackungszelllinie selbst exprimiert (violett). b) Der AAV-Vektor wird durch die gleichzeitige Expression des Vektorkonstruktes und der Helferplasmide hergestellt. Die einzelsträngige transgene Vektor-DNA wird in die Hüllproteine verpackt und durch Zellyse freigelassen (nach Kootstra *et al.*, 2003 [53])

Das hat den Vorteil, dass dadurch auch die Menge an immunogenem Material reduziert wird. Dennoch bleibt neben den kodierenden Sequenzen wenig Raum für optimale Promotorsequenzen [55]. Das AAV-*rep*-Protein ist für die Replikation erforderlich und dessen Deletion führt zum Verlust der Integration an einem spezifischen Locus auf dem Chromosom 19. Es wurde jedoch gezeigt, dass gerade diese *rep*-Deletion die AAV-Vektoren zu einer langfristigen episomalen Beständigkeit befähigt. Nur zu einem geringen Prozentsatz integriert der AAV in Abwesenheit des *rep*-Proteins [56]. Die Fähigkeit der AAV-Vektoren, ohne die Auslösung einer Entzündung eine Latenz in Zellen herbeiführen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden, die *MOCSI*-Expressionskassette in die Leberzellen *Mocs1*-defizienter Mäuse einzubringen und so den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufzuheben.

## 1.8. Leberzelltransplantation

Die somatische Gentherapie kann entweder *in vivo* z.B. durch Injektionen von rAAVs oder *ex vivo* angewandt werden. Bei der *ex vivo* Gentherapie werden Zellen des gewünschten Zielgewebes entnommen, außerhalb der Zelle behandelt und anschließend in den Patienten eingebracht (siehe Abb. 1.5.).

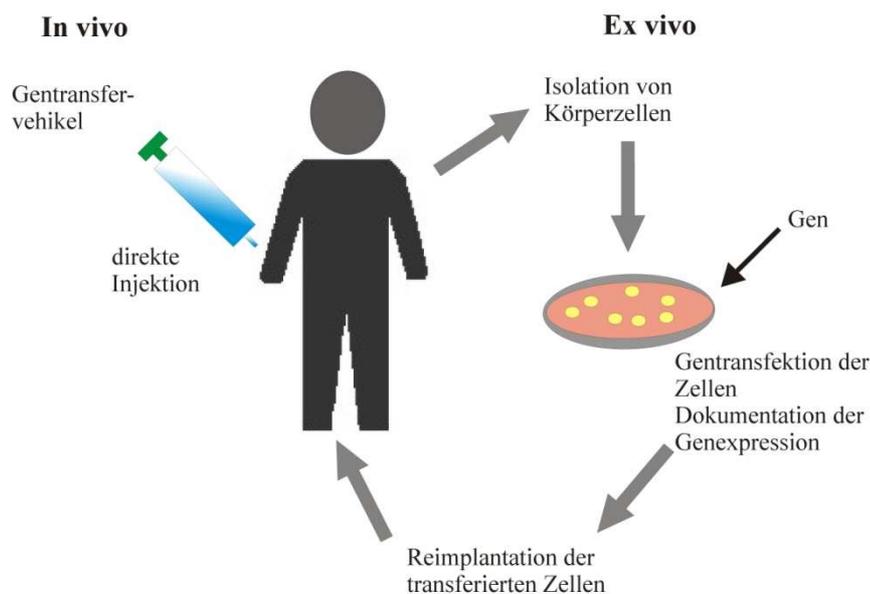


Abb. 1.5.: Übersicht über *in vivo* und *ex vivo* Gentherapie (modifiziert nach [57]).

Man unterscheidet dabei zwischen der autologen Transplantation, bei der Spender und Empfänger dieselbe Person sind, oder der allogenen Transplantation, bei der der Spender der gleichen Art angehört. Beispiele für eine erfolgreiche Therapie hereditärer Erkrankungen mittels Leberzelltransplantationen im Tiermodell sind in Tabelle 1.2. zusammengefasst.

Tiermodell	betroffenes Gen	korrespondierende Krankheit beim Menschen
Fah <sup>-/-</sup> Maus	Fumarylazetoazetathydrolase	hereditäre Tyrosinämie Typ I
Mdr2 <sup>-/-</sup> Maus	<i>Multidrug resistance protein 2</i>	Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase
uPA <sup>-/-</sup> Maus	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator	Chronische Leberschädigung
Rag2 <sup>-/-</sup> -gamma(c) <sup>-/-</sup> Maus	Interleukin 2-Rezeptor $\gamma$ -Kette	X-chromosomale SCID
DPPIV -Ratte	Dipeptidylpeptidase IV	-
Gunn-Ratte	Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase	Crigler-Najjar-Syndrom 1
Long-Evans Cinnamon-Ratte	ATPB7	Morbus Wilson

Tabelle 1.2.: Übersicht über Anwendungsbeispiele der Leberzelltransplantation [58]

Die erste erfolgreiche Transplantation, durchgeführt von der Arbeitsgruppe Fox *et al.* (1998), gelang bei einem Mädchen mit Crigler-Najjar Syndrom, dessen Bilirubin-Gesamtwert signifikant gesenkt und deren Krankheitssymptome wesentlich gemindert werden konnten [59-60]. Andere humane Applikationen folgten [61]. Die Leberzelltransplantation scheint eine erfolgversprechende Perspektive bei der Therapie verschiedenster Lebererkrankungen zu sein und bietet außerdem neue Möglichkeiten für die *ex vivo* Gentherapie. Deswegen wurde die allogene Leberzelltransplantation als ein weiterer Ansatz für eine Therapie der MoCo-Defizienz in Betracht gezogen.

## 1.9. Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B, die durch Mutationen im *MOCS2*-Gen verursacht wird. Das *MOCS2*-Gen kodiert die kleine (MOCS2A) und die große (MOCS2B) Untereinheit der Molybdopterin synthase, die cPMP in Molybdopterin umwandelt (siehe Abb. 1.1.a). Stallmeyer *et al.* (1999) und Reiss *et al.* (1999) beschrieben die genomische Struktur und die Transkripte des humanen *MOCS2*-Gens [29, 62]. Bis dahin war bekannt, dass der Biosyntheseweg und die Struktur von MPT in allen untersuchten Organismen hochkonserviert sind. Pitterle *et al.* (1993) zeigten, dass die MPT-Synthase in *E. coli* aus einer kleinen (MoaD, 10 kDa) und einer großen (MoaE, 16 kDa) Untereinheit zusammengesetzt ist [63]. Durch den Vergleich mit den bakteriellen Aminosäuresequenzen von MoaD und MoaE konnten die kleine (MOCS2A) und die große (MOCS2B) Untereinheit der humanen MPT-Synthase identifiziert werden [62]. Es zeigte sich, dass die Übereinstimmungen zwischen den humanen Proteinen und ihren *E. coli*-Homologen genauso hoch war, wie es für andere Eukaryoten bereits beschrieben wurde, und dass die gleichen Aminosäuresequenzen konserviert sind [38, 64-65].

Im Fall von MOCS2A und MOCS2B zeigten Stallmeyer *et al.* (1999), dass beide Proteine von einer einzelnen mRNA kodiert werden, deren ORFs sich auch auf chromosomaler Ebene auf einer Länge von 77 bp überlappen [29]. Bisher war als Transkript nur die Spleißform I bekannt, welche den Startpunkt für das MOCS2A-Protein in Exon 1a enthält und von Reiss *et al.* (1999) beschrieben wurde [29].

Die komplette Sequenzierung des humanen Genoms ergab zwei alternative erste Exons, welche die ungewöhnliche Expression der *MOCS2*-kodierenden Proteine erklären könnte [66]. Ein Teil dieser Arbeit war der experimentelle Nachweis der alternativen Exons im 5' Bereich des *MOCS2*-Gens.

Als ein neues Konzept der Gentherapie wurde vor einigen Jahren die intrazelluläre Reparatur eines monogenen Gendefekts durch ein einzelsträngiges Oligonukleotid vorgestellt [67] und erfolgreich *in vivo* angewandt [68-70]. Im Gegensatz zur Gensubstitution, wo ein intaktes Gen zusätzlich zu dem defekten Gen z.B. durch rAAVs in die Zellen eingebracht wird, werden bei der Genreparatur das oder die defekten Gene *in situ* repariert (siehe Abb. 1.6.).

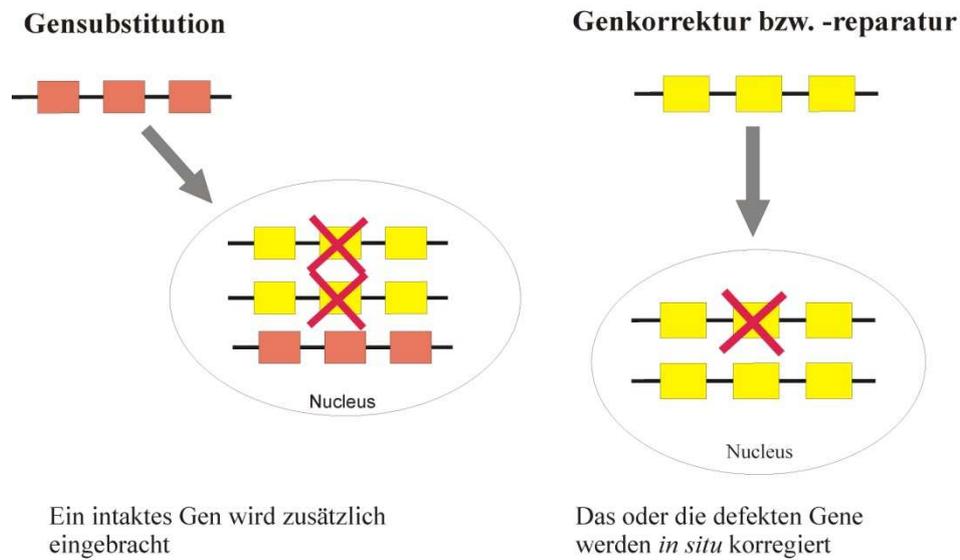


Abb. 1.6.: Übersicht über Grundprinzipien der Gensubstitution und der Genreparatur.

Zur Untersuchung des zweiten Schritts der MoCo-Biosynthese und zur Etablierung einer *in vivo* Genreparatur sollte ein *Knockout*-Modell des murinen *Mocs2*-Gens etabliert werden. Dafür wird ein Tiermodell benötigt, bei dem nicht wie im *Mocs1-Knockout*-Modell ein komplettes Exon durch homologe Rekombination mit einem Disruptionsvektor deletiert wurde, sondern bei dem die MoCo-Biosynthese durch eine Punktmutation unterbrochen ist.

## 1.10. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die bis jetzt bekannten Behandlungsmöglichkeiten der MoCo-Defizienz zu verbessern oder therapeutische Alternativen zur Substitutionstherapie mit cPMP zu finden.

Zu einem sollte die cPMP-Substitutionstherapie so optimiert werden, dass es nicht mehr durch den raschen Aktivitätsverlust der XDH zu Xanthinablagerungen in den Nieren der behandelten *Mocs1*-defizienten Mäusen kommt und die Lebensdauer erhöht wird.

Die cPMP-Substitutionstherapie kann nur bei Patienten mit MoCo-Defizienz Typ A angewandt werden. Eine Alternative, die für alle Gruppen der MoCo-Defizienz gleichermaßen verwendet werden könnte, wäre eine Substitutionstherapie mit isolierter und aufgereinigter PSO, die in dieser Arbeit auf ihre Fähigkeit untersucht wurde, die MoCo-Biosynthese zu restaurieren.

Zum anderen wurde die somatische Gentherapie für die Behandlung der MoCo-Defizienz in Betracht gezogen. Zuerst sollte die Funktionalität der *MOCS1*-Expressions-kassette anhand eines transgenen Tiermodells nachgewiesen werden, die für eine Gensubstitution benötigt wird. Vorhergehende Versuche einer nichtviralen Gentherapie konnten keine Verbesserung des Phänotyps der MoCo-Defizienz Typ A erzielen. Deshalb sollte einerseits untersucht werden, ob das Polymer Atellocollagen als Trägermaterial die Plasmid-DNA vor Nukleasen und Reaktionen des Immunsystems schützen und somit die Gentransferrate erhöhen kann. Andererseits sollten auf Adeno-assoziierte Viren basierende Vektoren genutzt werden, das intakte *MOCS1*-Gen in *Mocs1*-defiziente Mäuse einzubringen.

Ein weiterer Ansatz für eine Therapie der MoCo-Defizienz stellt die Einbringung gesunder Zellen in das Gewebe *Mocs1*-defizienter Mäuse dar. Dabei sollten Hepatozyten, die aus Wildtypembryonen gewonnen wurden, in die Leber der Mäuse transplantiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B. Dabei sollte sowohl das humane *MOCS2*-Gen, als auch das murine Homolog untersucht werden. Im Falle des humanen *MOCS2*-Gens wurden Patientenfibroblasten mit Mutationen in diesem Abschnitt der MoCo-Biosynthese untersucht. Die murine *Mocs2*-Expression sollte anhand eines *Knockout*-Modells untersucht und mittels Genreparatur behandelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Agarose	Peqlab, Erlangen
Agar-Agar	Carl Roth Co., Karlsruhe
Albumin (human)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth Co., Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Amylalkohol (ter.)	Merck, Darmstadt
Borsäure	MP Biomedicals, Eschwege
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Chloramphenicol (CAC)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Cryoblock-Gefriermedium	medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Cytochrom C	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dextransulfat	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth Co., Karlsruhe
DirectPCR <sup>®</sup> Lysis Reagent (Schwanz)	Peqlab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
DNA Längenstandard 1 kb DNA <i>Ladder</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNA Längenstandard 100 bp DNA <i>Ladder</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
Dye Terminator Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt

---

Ethanol (abs.)	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid (1 g/ml)	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN, Aurora, USA
Ficoll 400	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Formamid (99.5 %, deionisiert)	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Formaldehyd ( $\geq 37$ %)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Gancyclovir	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Glycerol	Gibco/BRL, Karlsruhe
Glykogen	Invitrogen, Karlsruhe
Glyzerin	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Kompetente JM109-Zellen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Lachssperm-DNA (10mg/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Carl Roth & Co., Karlsruhe
3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Natriumcyanid	Fluka, Buchs, CH
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumsulfit	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Neomycinsulfat	Carl Roth & Co., Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phosphate buffered saline (PBS)	PAN Biotek, Aidenbach
Pepton aus Casein	Carl Roth & Co., Karlsruhe
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen

Phenol (ss)	Biomol, Hamburg
PLATINUM <sup>®</sup> <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RNA Ladepuffer mit EtBr	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
RNA Längenstandard 0.5-10 kb RNA <i>Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase ZAP <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Rotiphorese <sup>®</sup> NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1)	Carl Roth Co., Karlsruhe
Salzsäure (HCL), rauchend 37 %	Merck, Darmstadt
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth & Co., Karlsruhe
SURE <sup>®</sup> 2 Super Kompetente Zellen	Stratagene, Amsterdam, NL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth Co., Karlsruhe
Tribromethanol	Aldrich, Steinheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth & Co., Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyronosid (X-Gal)	Peqlab, Erlangen
XL10-Gold <sup>®</sup> Ultrakompetente Zellen	Stratagene, Amsterdam, NL

### 2.1.2. Lösungen, Puffer und Medien

Albumin (human) 40 mg/ml	20 mg add 500 $\mu$ l 0.1 M Tris-HCL pH 8.5
Avertin	1 g Tribromethanol 0.81 ml Amylalkohol 71.49 ml 42°C dH <sub>2</sub> O steril filtrieren 4°C Lagerung
0.33 mM Cytochrom C	10.2 mg add 2.5 ml 0.1 M Tris-HCL pH 8.5
DEPC-H <sub>2</sub> O	0.1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat Inkubation für 24 Stunden unter Rühren, anschließend Dampfdrucksterilisation
Denaturierungslösung Southern Blot	43.66 g NaCl 10 g NaOH

	add 500 ml dH <sub>2</sub> O
Depurinationslösung Southern Blot	5.5 ml rauchende HCl 37 % add 500 ml dH <sub>2</sub> O
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dGTP 10 mM dCTP 10 mM dTTP
EB Puffer	10 mM Tris/Cl (pH 8.5)
20 mM EDTA	37.2 mg add 5 ml dH <sub>2</sub> O
Eluationspuffer	1.5 mg NaCl 20 mM Tris/HCL (pH 7.5) 10 mM Tris/HCL (pH 7.5)
Glycerol Ladepuffer I	10 mM Tris/HCL (pH 7.5) 10 mM EDTA (pH 8.0) 0.025 % Bromphenol Blau 0.025 % Xylencyanol 30 % Glycerol
Glycerol Ladepuffer II	10 mM Tris/HCL (pH 7.5) 10 mM EDTA (pH 8.0) 0.025 % Orange G 30 % Glycerol
Ligationspuffer (10 x)	10 mM EDTA (pH 8.0) 80 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT
MOPS (10 x)	41.2 g MOPS 10.9 g Natriumacetat 3.7 g EDTA pH 7 mit 1M NaOH (RNase frei) add 1000 ml DEPC-H <sub>2</sub> O steril filtrieren RT lichtgeschützt lagern
51 mM Natriumcyanid	unterm Abzug, Handschuhe und Mundschutz tragen 12.5 g add 5 ml dH <sub>2</sub> O
96 mM Natriumdesoxycholat	19.9 mg add 500µl dH <sub>2</sub> O
20 mM Natriumsulfid	6.3 g add 2.5 ml dH <sub>2</sub> O
Neutralisierungslösung Southern Blot	43.66 g NaCl 30.25 g Tris pH 7.5 mit 1M HCL add 500 ml dH <sub>2</sub> O

Puffer AE	10 mM Tris·Cl 0.5 mM EDTA pH 9.0
Puffer N3	1.5 mM NaCl 1 M Tris/HCl (pH 7.0)
Puffer P1	50 mM Tris/Cl (pH 8.0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
Puffer P2	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer P3	3.0 M K-Acetat-H-Acetat (pH 5.5)
PBS Puffer (10 x)	1.3 M NaCl (pH 7.4) 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30 mM NaH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBT Puffer	0.1 % Tween-20 in PBS (1 x)
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7.0) 15 % Isopropanol 0.15 % Triton <sup>®</sup>
Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7.0) 15 % Isopropanol
Puffer QN	1.6 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7.0) 15 % Isopropanol
Puffer TE	10 mM Tris (pH 8.0) 1 mM EDTA
RNA-Ladepuffer (Sigma)	50 µg/ml EtBr 62.5 % (v/v) Formamid 1.14 M Formaldehyd 200 µg/ml Bromphenolblau 200 µg/ml Xylencyanit 1.25 x MOPS-EDTA-NaAC-Puffer
SDS (20 %)	20 g add 100 ml
SSC (20 x)	176.46 g NaCitrat 350.64 NaCl add 2 l mit H <sub>2</sub> O
Stop-Mix	15 % Ficoll 400 200 mM EDTA 0.1 % Orange G

TAE (50 x)	242 g Tris 18.6 g EDTA pH 8 mit konz. Essigsäure (100 %) add 1000 ml dH <sub>2</sub> O
TBE Puffer (5 x)	270 g Tris 137.5 g Borsäure 18.6 g EDTA add 5 l mit H <sub>2</sub> O
0.1 M Tris-HCL pH 8.5	12.1 g Tris mit konz. HCl auf pH 8.5 einstellen, add 1l mit dH <sub>2</sub> O, 200 ml Aliquots bei -20°C lagern
Waschlösung I	2 x SSC 0.1 x SDS
Waschlösung II	0.1 x SSC 0.1 x SDS

### 2.1.2.1. Nährmedien für Bakterien

Die Nährmedien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, bei 120°C 20 min autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Für feste Medien wurde 1.5 % (w/v) *Agar bacteriological* hinzugeben. Die Antibiotika mit festgelegten Endkonzentrationen (ausgehend von den Stocklösungen) wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren der Medien und dem Abkühlen auf 50-60°C hinzugeben.

LB	0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.5
LB + Amp	0.1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium
LB + Kan	0.05 mg/ml Kanamycin in LB-Medium
LB + IPTG + X-Gal	100 µM IPTG, 0.4 % (w/v) X-Gal, 0.1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium
LB + CAC	0.017 mg/ml Chloramphenicol in LB-Medium

### 2.1.2.2. Antibiotika

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen angesetzt, die steril filtriert und bei -20°C gelagert wurden.

Stammlösung	Gelöst in	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	17 µg/ml
Gancyclovir	100 mM in PBS	2 µM
Neomycin (G 418)	40 mg/ml in PBS	400 µg/ml

### 2.1.2.3. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pascal für 60 min im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0.2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert

### 2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Advantage <sup>®</sup> -HF 2 PCR Kit	Clontech, Palo Alto., USA
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
DirectPCR <sup>®</sup> Lysis System	Peqlab, Erlangen
DNeasy <sup>®</sup> <i>Blood &amp; Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden
HotStarTaq <sup>®</sup>	Qiagen, Hilden
Megaprime <sup>™</sup> <i>DNA labelling Kit</i>	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
MicroSpin <sup>™</sup> G-25-Säulen	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Montage PCR-Kit	Millipore, Redford, USA
Omniscript <sup>™</sup> <i>Reverse Transkriptase</i>	Qiagen, Hilden
peqGOLD TriFast <sup>™</sup>	Peqlab, Erlangen
pGEM <sup>®</sup> -Teasy Vector System	Promega, Mannheim
pGEM <sup>®</sup> -T Vector System	Promega, Mannheim
Platinum <sup>®</sup> Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
ProLong <sup>®</sup> Gold antifade Reagenz mit DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
QIAGEN <sup>®</sup> <i>LongeRange PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Miniprep</i>	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> <i>Spin Midiprep Kit</i>	Qiagen, Hilden

QIAprep <sup>®</sup> Spin Maxiprep endofree Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid-hyp buffer	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
DNA Walking SpeedUP <sup>™</sup> Premix Kit	Seegene, Seoul, Korea

#### 2.1.4. Stämme

JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r <sub>K-</sub> , m <sub>K+</sub> ), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ]
SURE <sup>®</sup> 2 Super Kompetente Zellen	E14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ) <i>Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC:: Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup></i> ]
XL10-GOLD <sup>®</sup> Ultrakompetente Zellen	Tet <sup>r</sup> <i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup></i> ]

#### 2.1.5. BACs (bacterial artificial chromosomes)

Teilbereiche des murinen *Mocs2*-Gens wurden aus dem BAC-Klon RP23-218L3 amplifiziert.

#### 2.1.6. Vektoren

pRita IX	Hahnewald, Universität Göttingen
pWajaI	Wegner, Universität Göttingen
pBlueKO4R4	Hahnewald, Universität Göttingen
pGEM <sup>®</sup> -Teasy	Promega, Mannheim
pPNT	Institut für Humangenetik, Universität Göttingen
pTKneo	Institut für Humangenetik, Universität Göttingen
AAV-HBA-MOCSI	Hahnewald, Universität Göttingen
AAV-HBA-EGFP	Garrido, Neurologische Klinik, Universitätsmedizin Göttingen
AAV-HBA	Kügler, Neurologische Klinik, Universitätsmedizin Göttingen

## 2.1.7. Synthetische Oligonukleotide

### 2.1.7.1. Genotypisierung von Mäusen

BGHR1	5' CTC CCA CTG TCC TTT CCT AAT A 3'
Exon10FI	5' AGG GAC ATC GTG TTG GAG GAG 3'
MGF1	5' GGC AGA GGC TGT TCA ACA TGG 3'
MOCS 49	5' CTG GGT TCC TGT GCC ATC TAG 3'
PKG 1	5' TCT GAG CCC AGA AAG CGA AGG 3'
OriF	5' GGT AGC GCT GCG GCC GCA GGA ACC GTA AAA AGG 3'
OriR2	5' TCC TTT GAT CTT TTC TAC GCG GCC GGC CG 3'
Caro5	5' GACAGTTCTGCACATGCGAATGTG 3'
neo1	5' CCTGCGTGCAATCCATCTTG 3'
Caro16	5' TTCAGGGCAGAGCCTCCTCTGA 3'

### 2.1.7.2. *MOCSIAB* transgene Maus

BGHR1	5' CTC CCA CTG TCC TTT CCT AAT A 3'
Exon10FI	5' AGG GAC ATC GTG TTG GAG GAG 3'
GAPDHFmurin	5' CAC CAC CAA CTG CTT AGC C 3'
GAPDHRmurin	5' CGG ATA CAT TGG GGG TAG G 3'
S5	5' TGCCTCTTTGGAAACTCTGAG 3'
Z 2	5' ATT TTT GAT GTT CCA CAA TTC C 3'

### 2.1.7.3. *MOCS2* human

GranierF	5' CCTTTTATGACCACCTCTTTCT 3'
GranierR	5' GACATTTACAGAAGCAAGTAGG 3'
F28	5' TGATTCGGTCCCGCTGTCCTA 3'
R10	5' CTCCTGTTATTTTCAGCAC 3'
R11	5' CTTGAGGCACAGAAATGGTCTCTG 3'
GAPDHFhuman	5' CACCACCAACTGCTTAGCA 3'
GAPDHRhuman	5'CTGACACGTTGGCAGTGGG 3'

#### 2.1.7.4. *Mocs2-Knockout-Maus*

Caro1	5' CATTATTTTAGCCCCAGCCCTGGA 3'
Caro2	5' CCCTCAGGGAAAACCATATTCACC 3'
Caro3	5' AGATGGATCCCTAAGGATGTGCA 3'
Caro4	5' CCGGGATCCTACGCAAGCCGATGGAATACTGCTATG 3'
Caro5	5' GACAGTTCTGCACATGCGAATGTG 3'
Caro6	5' TGCTGGGCCCTGCAAACCTTCAA 3'
Caro7	5' GGCGCCCTCGAGTCTAAGAGCCCAAGTGGC 3'
Caro8	5' CCGCGGCTCGAGGTTCTATTCCGGTTCTTCCA 3'
Caro9	5' CGGTAAGGAATAGTGGATCATCTG 3'
Caro10	5' CTGAACACTGTGCACATTTA 3'
Caro11	5' GTAGGCTTTATACAGTGTGG 3'
Caro12	5' AAGCGTATGTACCGATGGCAG 3'
Caro13	5' TTCTTCCAACCTTGGAGCTG 3'
Caro14	5' GTCTTCATCCCCATCAAAGAG 3'
Caro15	5' CTCGAGGGTTTCTTTGATGTATGAGTCAGG 3'
Caro15ClaI	5' ATCGATGTATGAGTCAGGAGATAA 3'
Caro16	5' TTCAGGGCAGAGCCTCCTCTGA 3'
Caro17	5' TGGCTGATGTTAGAAACCAGGTGA 3'
Caro18	5' AGAGTATGTTCGAGCTTGGAGATCA 3'
Caro19	5' TGCCCAGAAGCACTCTTTGTTTCT 3'
Caro20	5' TTAGACTTAGCGCACCACACTTGA 3'
Caro21	5' TGTGTTAGCTATGAGATTATCAA 3'
Caro22	5' CATCTCTCAGGAACCAGTTCGCTC 3'
Caro23	5' CCGCTAATGCTACTGGGTGTTGCCAGTCC 3'
Caro24	5' GCGGGAAGTCTCCTCAGAACCACAGCCACA 3'
Eef1a1FI	5' AAGCTGAGCGTGAGCGTGGT 3'
Eef1a1FII	5' CGAGACCAGCAAATACTATGTGACC 3'
Eef1a1RI	5' TGTGGGCTGTGTGACAATCC 3'
Eef1a1RII	5' GAACAGGAGCGTAGCCAGCACTG 3'
HSV1	5' CTGGCACTTGGCGCTACACA 3'

---

HSV2	5' GCAGCGGCCAATAGCAGCTT 3'
HSV3	5' CCTGCCATCAACACGCGTCT 3'
HSV4	5' CGCGAACATCTACACCACAC 3'
HSV5	5' CCTTCCGGAGGACAGACACA 3'
HSV6	5' CAACGGCGACCTGTATAACG 3'
HSV7	5' GGCTGGCACTCTGTGCATAC 3'
HSV8	5' GCATGGACCGCATGTACTGG 3'
HSV9	5' TTGGTCACCACGGCCGAGTT 3'
HSV10	5' ACGAGATCAGCAGCCTCTGT 3'
HSV11	5' TGTGTAGCGCCAAGTGCCAG 3'
HSVtkF	5' CTCGAATTCTACCGGGTAGG 3'
HSVtkR	5' ACGGCCAGTGCCAAGCTTCT 3'
KO2F	5' GGGAAAGTGTCACAGTTGGTG 3'
KO2R	5' TTCCATATGGGCACCTTGGC 3'
KO2R2	5' CCAAGATGAGGTTGATTCTTC 3'
KO2SeqF	5' GACCCAGCCTGTGCTTTTAAGTCT 3'
KO2SeqR	5' CTGTGAGCTGAAGACACAGCAAT 3'
M2MuEx1	5' GCTTCGCGGTGTGTAGCGGGAT 3'
mseq1	5' AACTACTGTCCAGCACAGAG 3'
mseq2	5' GGCTGCATATCAGATGTCCT 3'
mseq2R	5' AGGACATCTGATATGCAGCC 3'
mseq3	5' CATCTCATGGCATGTAGCAC 3'
mseq4	5' TGGTAGTTAGCCTTGGTGAC 3'
mseq5	5' TGGTCCTCATGGCTTACTCA 3'
mseq6	5' TGGTGTTCCAGGTGTGGTTA 3'
mseq7	5' AAGAGTGGCGTTCCAGGATT 3'
mseq8	5' CCATGGAGCTCGTGTTCTGA 3'
mseq9	5' GGAATGAGATCGAGCCAAGA 3'
mseq10	5' CCGTGTTCTCTGTGCCTCAT 3'
mseq11	5' TAACTAACCAGCTCGCAGTG 3'
mseq12	5' GAGATGGCTCAGCAGTTAAG 3'

mseq12R	5' CTTAACTGCTGAGCCATCTC 3'
mseq13R	5' ATCTGCCAAGTGAGTGCTGG 3'
mseq14	5' CCTGAGTGGCTGTGAGTGAC 3'
mseq15	5' GCCTTGAGTGGTAGAGAATG 3'
mseq16	5' GTTACCTCTGCGATCCAACA 3'
neo1	5' CCTGCGTGCAATCCATCTTG 3'
neo2	5' GTCATAGCCGAATAGCCTCT 3'
neo3	5' ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG 3'
neo4	5' TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA 3'
neo5	5' TCGCCTTCTATCGCCTTCTT 3'
neo6	5' GCGTGCAATCCATCTTGTTT 3'
neo7	5' GAGCAGCCGATTGTCTGTTG 3'
neo8	5' GCTTCCTCGTGCTTTACGGT 3'
neo9	5' AGGCCTGCTCTATAACCATGT 3'
Rita1	5' TCTCAGGCCTGCTGTCTGGACACT 3'
Rita2	5' GGATCCCTGTGGAAGATATATCTTAG 3'
Rita3	5' GGATCCACTCATCTTTTTCCATATGGGCACCTTGG 3'
Rita4	5' GGATCCACTCGCCTTTTTCCATATGGGCACCTTGG 3'
Rita5	5' TCATCTCCCCGTGACAAAATGAGG 3'
Rita6	5' CTCGAGATAACATTCAGAGACTAGAAGA 3'
Rita7	5' TATGAGACAGAGGAGATGGACGGG 3'
Sp6	5' GCTATGACCATGATACGCCAAGC 3'
T7	5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACG 3'

#### 2.1.7.5. AAV-Integration

DW-ACP1	5'-ACP-AGGTC-3'
DW-ACP2	5'-ACP-TGGTC-3'
DW-ACP3	5'-ACP-GGGTC-3'
DW-ACP4	5'-ACP-CGGTC-3'
DW-ACPN	5'-ACP-GGTC-3'
TSP1	5' CCGCCAAAACCGCATCACCA 3'
TSP2	5' CAAGTAGGAAAGTCCCATAAAGGTC 3'

TSP3                    5' GTCCCTATTGGCGTTACTATGGG 3'  
 Universal-            5' TCACAGAAGTATGCCAAGCGA 3'  
 Primer

### 2.1.8. Gebrauchswaren

Alle Glaswaren	Schott, Mainz
Einmalküvetten	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
Injektionsnadeln	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
MICROSEP 50K OMEGA	PALL, Dreieich
Nitrozellulosemembran Hybond-XL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Petrischalen	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
13 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Normject, Henke, Tuttlingen
Whatman-Filterpapier GB 003	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Zentrifugationsgefäße und -röhrchen	Beckman, München

### 2.1.9. Geräte

Beckman Ultrazentrifugenrotor Optima <sup>TM</sup> TL	Beckman, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Dampfdruckautoklaven	Webeco, Bad Schwartau
Elektrophoresekammer	Omnilab, Göttingen
Feinwaage SC2020	Ohaus corp Pie Brook N.Y., USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
gene pulser <sup>TM</sup>	BioRad, München
Inkubator	Melag, Berlin
Kryotom Jung CM3000	Leica, Bensheim
Mikroskop	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Molecular Imager FX	BioRad, München

pH-Meter CG820	Schott Instruments GmbH, Mainz
Phosphoroimager <i>screen</i>	Kodak, Stuttgart
Photometer UVIKON 900 XL	Goebel, Au i. d. Hallertau
Protean™II Elektrophorese Kammer	BioRad, München
Röntgenfilmentwickler Curix 60	Agfa, Köln
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG., Schwabach
<i>Screen Eraser</i>	BioRad, München
Sequenzierer Modell MegaBACE™ 1000	Amersham, Braunschweig
Sonifier Branson 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Spannungsquellen	Medizinische Werkstätten, Göttingen
Thermocycler Primus56 Advanced	Peqlab, Erlangen
Thermocycler Primus56 Advanced Gradient	Peqlab, Erlangen
Thermocycler MWG Biotech Primus	Peqlab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Turboblotter®	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Ultrafree-20 Nanopore-Wasseranlage	Millipore, Eschborn
UV-Lampe Nu-6 KM	Benda, Wiesloch
UV-Stratalinker® 1800	Stratagene, Amsterdam, NL
UVT-25M 3022 nm UV-Leuchttisch	Bachofer, Reutlingen
Video graphic Printer	Sony Deutschland, Köln
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.10. Datenbanken und Programme

Für Nukleotidsequenzanalysen wurden Programme wie BLAST, BLAST2, MEGABLAST und andere des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) genutzt.

Für die technische Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurde die Computersoftware *Cell<sup>^</sup>F Fluorescence imaging software* (Olympus, Hamburg) verwendet.

Die Erstellung von Restriktionskarten und Klonierungsstrategien erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes NEBcutter V2.0 der Firma New England Biolabs, Frankfurt a. M. (Homepage: <http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>).

Bestellinformationen und die Sequenzen von BAC-Klonen wurden über die Homepage des BACPAC Resource Center (BPRC, Oakland, Californien, US) bezogen (<http://bacpac.chori.org/>)

Für die Untersuchung von Spleißvarianten wurde das *Splice Site Prediction*-Programm des Neural Network ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) genutzt.

Aminosäuresequenz-Vergleiche und der phylogenetische Stammbaum wurden mit dem Sci Ed Central-Programm (Scientific & Educational Software Cary, NC, USA) erstellt.

Die Bilder wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, mit dem Programm CoreDRAW® Graphics Suite X3 erstellt (Unterschleißheim, Deutschland).

## **2.2. Methoden**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders benannt, im Wesentlichen nach den Standardmethoden ausgeführt, die in „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1998) und „Molecular cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben wurden.

### **2.2.1. Mikrobiologische Arbeitsmethoden**

#### **2.2.1.1. Arbeiten mit Bakterien**

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium versetzt mit dem entsprechenden Antibiotika. Für Kulturen von 3 ml wurden 13 ml Röhren (Sarstedt), für 50 oder 100 ml Kulturen Erlmeyerkolben (500 ml Fassungsvermögen) verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht im 37°C-Schüttler. Die Zelldichte wurde per Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt.

### **2.2.1.2. Transformation kompetenter *Escherichia coli* per Hitzeschock [71]**

Die Transformation dient der gezielten bakteriellen Aufnahme von Fremd-DNA. Um Plasmide zu vereinzeln und zu amplifizieren, wurden die Plasmide in kompetente *E.coli* Zellen transformiert.

#### **2.2.1.2.1. JM109 Ultrakompetente Zellen**

Ein bei -70°C gelagertes 100 µl Aliquot kompetenter JM109-Zellen von Promega wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der entsprechenden Plasmid-DNA oder Ligationenreaktion (volumenabhängig von der Konzentration, maximal 10 µl pro 100 µl der kompetenten Zellen) erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis und der Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Anschließend folgte eine Abkühlung für 90 s auf Eis und eine Erholungsphase in 400 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C. In diesem Zeitraum erfolgt die Expression der plasmidcodierten Antibiotika-Resistenz. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.1.2.2. SURE<sup>®</sup> 2 Super Kompetente und XL10-Gold<sup>®</sup> Ultrakompetente Zellen**

SURE<sup>®</sup> 2 Super Kompetente Zellen von Stratagene besitzen kein RecA-Protein. Die homologe Rekombination kann daher nicht stattfinden, und es wird so eine höhere Plasmidstabilität erreicht. XL10-Gold<sup>®</sup> Ultrakompetente Zellen wurden für eine verbesserte Transformationseffizienz von großen Molekülen hergestellt. Diese Zellen weisen den Hte Phänotyp auf, der die Transformationseffizienz von ligierter und großer DNA steigert. Ein bei -70°C gelagertes 100 µl Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 4 µl β-Mercaptoethanol dazu gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der gewünschten Plasmid-DNA (volumenabhängig von der Konzentration, maximal 10 µl bei 100 µl der kompetenten Zellen) erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis und ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s. Nach einer Abkühlung auf Eis für 2 min folgte eine Erholungsphase in 900 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C. In diesem Zeitraum erfolgt die Expression der plasmidcodierten Antibiotika-Resistenz. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung bakterieller Plasmide wurde nach einer modifizierten Form der alkalischen Lyse [72-73] durchgeführt. Beim Zellaufschluss durch SDS und NaOH wird die DNA denaturiert und die Proteine solubilisiert. Durch die schnelle Zugabe einer Neutralisationslösung bilden Proteine und chromosomale DNA große Komplexe, während die weitaus kleinere Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

#### 2.2.2.1.1. Minipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit

Die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab erfolgte nach dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit Protokoll. Dabei wurden 3 ml LB Medium einschließlich entsprechenden Antibiotikums mit plasmidhaltigen Bakterien aus einer Einzelkolonie oder aus einer DMSO-Kryokultur inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 1.5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1500 x g, 1.5 min, RT). Das Pellet wurde in 250 µl P1 resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl P2 hinzugeben und vorsichtig geschwenkt. Danach erfolgte die Zugabe von 350 µl N3 und sofortiges Umschwenken. Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA wurden abzentrifugiert (15000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde auf eine QIA<sup>®</sup>prep Säule überführt und diese für den analytischen Maßstab mit den Puffern PB (500 µl) und PE (750 µl) gewaschen. Die Elution erfolgte in 50 µl Puffer EB.

#### 2.2.2.1.2. Midipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Midiprep Kit

Die über Nacht angesetzte 50 ml-Kultur Plasmid-tragender Zellen wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 4 ml Puffer P2 erfolgte die Lyse. Das Falcon-Röhrchen wurde vorsichtig 4-6-mal geschwenkt. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von 4 ml Neutralisationspuffer P3 und eine Inkubation auf Eis für 15 min. Durch Zentrifugation (20000 x g, 30 min, 4°C) wurden Membranfragmente, Proteine und die chromosomale DNA sedimentiert. Nach der Äquilibrierung der Qiagen<sup>®</sup>-Säule mit 4 ml QBT Puffer wurde der Plasmid-haltige Überstand auf die Säule gegeben. Nach

dem gravitationsbedingten Durchfluss wurde die Säule zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Eluation der DNA erfolgte durch Zugabe von 5 ml Puffer QF, wobei ein Glas-Röhrchen mit 3.5 ml Isopropanol unter der Säule platziert wurde. Die Isopropanol-gefällte Plasmid-DNA (30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) wurde abzentrifugiert ( $15000 \times g$ , 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

#### **2.2.2.1.3. Endogen freie Maxipräparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Maxiprep endogenfree Kit**

Die über Nacht angesetzte 100 ml Kultur Plasmid-tragender Zellen wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und bei  $6000 \times g$ , 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer P2 erfolgte die Lyse für 5 min bei RT. Das Falcon-Röhrchen wurde vorsichtig 4-6-mal geschwenkt. Währenddessen wurde eine Qiagen<sup>®</sup> Filterspritze vorbereitet. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von 10 ml eisgekühltem Neutralisationspuffer P3 und eine Inkubation für 10 min bei RT. Das Gemisch wurde nun in die Qiagen<sup>®</sup> Filterspritze gegeben, und 2.5 ml Puffer ER dem Filtrat zugegeben, 10-mal geschwenkt und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen erfolgte die Äquilibrierung einer Qiagen<sup>®</sup>-Säule mit 10 ml QBT Puffer. Anschließend wurden Membranfragmente, Proteine und die chromosomale DNA von der plasmidhaltigen Lösung getrennt, indem die Lösung durch den Filter gedrückt und auf eine Qiagen<sup>®</sup>-Säule gegeben wurde. Nach dem gravitationsbedingten Durchfluss wurde die Säule zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Eluation der DNA erfolgte durch Zugabe von 15 ml Puffer QN, wobei ein Glas-Röhrchen mit 10.5 ml Isopropanol unter der Säule platziert wurde. Die Isopropanol gefällte Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert ( $15000 \times g$ , 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das Pellet wurde mit 5 ml 70 % endogenfreien Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in Puffer TE gelöst.

#### **2.2.2.2. Isolierung von BAC-DNA aus *Escherichia coli* mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Midiprep Kit**

Eine einzelne BAC-Kolonie wurde in eine Starterkultur mit 5 ml selektiven LB-Medium überführt (über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert). Davon wurde eine 100 ml-Kultur angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt.

Die Kultur wurde geteilt, in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C). Die Pellets wurden in je 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer P2 erfolgte die Lyse der Zellen. Das Falcon-Röhrchen wurde vorsichtig 4-6-mal geschwenkt. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von 10 ml vorgekühlten Neutralisationspuffer P3 (sofort 4-6-mal geschwenkt) und eine Inkubation auf Eis für 15 min. Durch zwei Zentrifugationsschritte (20000 x g, 30 min, 4°C und 20000 x g, 15 min, 4°C) wurden Membranfragmente, Proteine und die chromosomale DNA sedimentiert. In der Zwischenzeit wurde die Qiagen<sup>®</sup>-Säule mit 4 ml QBT Puffer äquilibriert. Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf die Säule gegeben. Nach dem gravitationsbedingten Durchfluss wurde die Säule zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Eluation der DNA erfolgte durch Zugabe von 5 x 1 ml Puffer QF, wobei ein Greiner-Röhrchen mit 3.5 ml Isopropanol unter der Säule platziert wurde. Zur Erhöhung der Ausbeute an BAC-DNA wurde der Puffer QF auf 65°C erwärmt. Die Isopropanol-gefällte Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (15000 x g, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in TE-Puffer (pH 8.0) gelöst.

### **2.2.2.3. Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben**

#### **2.2.2.3.1. DirectPCR<sup>®</sup> Lysis System**

Das DirectPCR<sup>®</sup> Lysis System wurde für die Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen eingesetzt. Diese Methode funktioniert ohne Fällung und der Verlust an genomischer DNA wird vermindert. Auf eine Schwanzbiopsie von 0.2-0.4 cm Länge wurde 150 µl DirectPCR Lysispuffer, der 0.1-0.3 mg/ml Proteinase enthielt, gegeben. Die Reagenzgefäße wurden auf einem Thermomixer bei 55°C und 350 rpm bis zur vollständigen Lyse der Schwanzbiopsien inkubiert. Das Rohlysat wurde dann für 45 min in ein 85°C temperiertes Wasserbad gestellt. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 16000 x g konnten nun 2 µl des Lysates ohne weitere Aufreinigung in eine PCR eingesetzt werden.

#### **2.2.2.3.2. DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit**

Das DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit von Qiagen wurde für die Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen genutzt. Maximal 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in ES-Zell-Medium wurden bei

300 x g für 5 min abzentrifugiert und in 200 µl 1 x PBS und 20 µl Proteinase K (600 mU/ml) resuspendiert. Zum Abbau der ebenfalls mit aufgereinigten RNA, die folgende Enzymreaktionen beeinträchtigen kann, wurden der Lösung 4 µl RNase (100 mg/ml) zugegeben, durch Vortexen gut gemischt und bei RT 2 min inkubiert. Die eigentliche Lysereaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl Puffer AL und einer Inkubation von 10 min auf 56°C gestartet. Nach der Zugabe von 400 µl 100 % EtOH wurde die Lösung gründlich gemischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 6000 x g folgten zwei Waschschriffe mit 750 µl 70 % EtOH. Um den EtOH vollständig zu entfernen folgte eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g und eine Trocknung bei 56°C für max. 3 min. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 100-200µl Puffer AE für mindestens 1 h gelöst.

#### **2.2.2.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe mit peqGOLD TriFast™ [74]**

Für RT-PCR und Northern Blot Analysen wurde Gesamt-RNA aus Gewebe (z.B. Leber, Herz, Lunge) gewonnen. RNA ist sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch endo- und exogene RNasen. Aus diesem Grund wurden alle Glasgeräte und Einmal-Plastikartikel nur mit Handschuhen berührt. Die Arbeitsschritte wurden nach Möglichkeit auf Eis durchgeführt. Die Organe für die RNA-Präparationen wurden mit sterilem Präparationsbesteck entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung der RNA wurde mit dem peqGOLD TriFast™ Reagent der Firma Peqlab (Erlangen) durchgeführt. Bis zu 100 mg Gewebe wurde mit 1 ml TriFast™ versetzt, mit einem Teflon-Homogenisator homogenisiert und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min mit 12000 x g bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, mit 200 µl Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 4000 x g auf 4°C zentrifugiert. Dadurch trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für 15 min auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g (4°C) sedimentiert und einmal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden anschließend bei 12000 x g (4°C) für 10 min abzentrifugiert, die Pellets bei 65°C getrocknet und in 10-

50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Das Lösungsvolumen war abhängig von der eingesetzten Gewebemenge.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch und die Intaktheit wurde mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Der Nachweis der Amplifizierbarkeit und dem Gehalt an gleichen RNA-Mengen wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, welche spezifisch für die konstitutiv exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sind, getestet.

### **2.2.2.5. Gelelektrophorese**

#### **2.2.2.5.1. Agarosegelelektrophorese von DNA**

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen bei einem pH-Wert von über 3 negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Als Trägermaterial für ihre elektrophoretische Auftrennung bei 140 V (15-30 min je nach Laufstrecke und Konzentration) wurde Agarose, ein Polysaccharid aus Rotalgen, verwendet. Die Laufstrecke ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Mit Hilfe eines Größenstandards (1 kb DNA-*Ladder* oder 100 bp DNA-*Ladder*) kann die Länge von DNA-Fragmenten ermittelt werden. Um die DNA in der Trägermatrix anzufärben, wurde Ethidiumbromid verwendet, eine unter UV-Licht (302 nm) sichtbare Verbindung, die zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix interkaliert. Im Allgemeinen diente 1 x TBE als Elektrophoresepuffer. Bei bestimmten Anwendungen störte das Borat im TBE-Puffer. In diesem Fall wurde 1 x TAE als Laufpuffer verwendet. Da TAE eine geringere Pufferkapazität besitzt und Gele leicht schmelzen, erfolgte die Auftrennung bei 40 V über Nacht.

#### **2.2.2.5.2. Agarosegelelektrophorese von RNA**

Einzelsträngige RNA-Moleküle besitzen oft komplementäre Regionen, die sekundäre Strukturen ausbilden können. Aus diesem Grund wird die RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wird mit einem Ladepuffer versetzt, der 1.14 M Formaldehyd und 62.5 % (v/v) Formamide enthält, und für 10 min auf 65°C erhitzt, um die sekundären Strukturen aufzulösen. 2.8 g Agarose wurden in 144 ml Ampuwa in einem sterilen Erlmeyerkolben aufgeköcht. Nach einer kurzen Abkühlung wurden 20 ml 10 x MOPS-Puffer und 36 ml 37 % Formaldehyd unter Schwenken dazu

gegeben. Das Gel wurde in einer mit RNase ZAP<sup>®</sup> gereinigten und dH<sub>2</sub>O-gespülte Apparatur gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V für 6 h.

#### **2.2.2.5.3. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Mit Hilfe von Polyacrylamidgelen wurden kleine DNA-Fragmente separiert und analysiert. Das Auflösungsvermögen wird durch den Anteil an Acrylamid (3.5 %-12 %) bestimmt. Ein 5 % PAGE-Gel wurde wie folgt angesetzt:

10 ml Acrylamid 40 %  
15 ml 5 x TBE  
50 ml H<sub>2</sub>O  
250 µl APS (10 % w/v)  
70 µl TEMED

In Anwesenheit von TEMED bildet APS freie Radikale, die die Polymerisierung von Acrylamid einleiten. Der Einschluss von Luftblasen wurde durch die Verwendung von vertikalen Glasplatten für das Gelgießen verhindert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 5 h in der Apparatur Protean<sup>TM</sup>II von BioRad, München. Um die DNA in der Trägermatrix anzufärben, wurde Ethidiumbromid verwendet.

#### **2.2.2.6. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen**

Alkoholische Lösungen haben im Vergleich zu wässrigen Lösungen niedrige Dielektrizitätskonstanten, die Bildung großer Molekülaggregate wird dadurch begünstigt. Durch Zugabe monovalenter Kationen (1/10 Vol 3 M Natriumacetat) und 2 Vol Ethanol (p.a.) bzw. 1 Vol Isopropanol werden die negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats der DNA abgesättigt, die Abstoßung zwischen Molekülen dabei verringert und die Aggregatbildung weiter verstärkt; die DNA fällt aus. Die Lösung wurde 20 min bei -80°C gelagert und dann 10 min bei 4°C zentrifugiert (4000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Entfernung von Salzresten mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in der gewünschten Menge TE oder Wasser gelöst.

### 2.2.2.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgelegt werden. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz korreliert die Konzentration der Nukleinsäuren linear mit der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine  $OD_{260nm}$  von 1, gemessen in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm, entspricht einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  und einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ . Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte  $2.0 \pm 0.2$  betragen. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden Verdünnungen der DNA verwendet.

### 2.2.2.8. Aufreinigung von DNA

#### 2.2.2.8.1. DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (Länge 70 bp bis 10 kb) aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick<sup>®</sup> *Gel Extraction Kit*. Die Methode beruht auf dem Prinzip des Anionenaustauschs in einer Silikat-Gel-Membran [75]. Durch einen Hochsalzpuffer wird die DNA gebunden und durch einen Niedrigsalzpuffer eluiert. So wird sie von Primern, Nukleotiden, Enzymen, Mineralöl, Salzen, Agarose und Ethidiumbromid befreit. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (s. Kapitel 2.2.2.5.1.) wurde das Gelstück mit dem gewünschten Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Um die Agarose aufzulösen, wurden 3 Vol des Puffers QG dazugeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Um die DNA zu binden wurde die Probe, nach dem vollständigen Auflösen des Gelstücks, auf eine QIAquick<sup>®</sup>-Säule gegeben und für 1 min bei 4000 x g zentrifugiert. Die Reinigung der DNA von Salzresten erfolgte in einem Waschschrift mit 0.75 ml Puffer PE. Die Eluation der DNA von der Säule erfolgte, indem 30  $\mu\text{l}$  Puffer EB (10 mM Tris/Cl, pH 8.5) auf das Zentrum der QIAquick<sup>®</sup>-Säule aufgebracht und für 1 min bei 4000 x g zentrifugiert wurde.

#### **2.2.2.8.2. Montage™ Centrifugal Filter Devices**

Mit Hilfe dieser Methode konnten Plasmid-DNA oder PCR-Produkte von Salzresten, nicht inkorporierten dNTPs oder Primern befreit werden. Die dabei verwendete Montage™-Säule hat eine für niedermolekulare Verunreinigungen, nicht aber für DNA permeable Membran. Die DNA-Probe wurde mit Wasser in einem Gesamtvolumen von 500 µl auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (1000 x g, 15 min, RT). Das Eluat wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend verworfen. Nach der umgekehrten Montage der Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die DNA mit der gewünschten Menge Wasser oder TE durch Zentrifugation (1000 x g, 5 min, RT) eluiert.

#### **2.2.2.9. Enzymatische Behandlung von DNA**

##### **2.2.2.9.1. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen besitzen die Fähigkeit DNA sequenzspezifisch zu spalten. Hierbei erkennen sie spezifische, meist palindromische Sequenzen von 4 bis 10 Nukleotiden, in denen sie die Phosphodiesterbrücken des DNA-Rückgrates spalten. Bei der Hydrolyse der DNA können je nach Art der Restriktionsendonuklease glatte (*blunt ends*) oder kohäsive (*sticky ends*) Enden entstehen. In Abhängigkeit von der DNA-Konzentration und dem Gesamtvolumen des Ansatzes (10-50 µl) wurden in der Regel 5-10 U der Endonuklease pro 1 µg DNA, sowie eine vom Hersteller angegebene Menge des entsprechenden Puffers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Die Analyse der Ansätze erfolgte durch Auftragen eines Aliquots auf ein TBE-Agarosegel (siehe Kapitel 2.2.2.5.1) und gegebenenfalls eluiert (siehe Kapitel 2.2.2.8.1.).

##### **2.2.2.9.2. Dephosphorylierung von DNA**

Zur Abspaltung der 5' Phosphatgruppe von DNA wurde die Antarktische Phosphatase (AP) von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) verwendet. AP-behandelte Fragmente können nicht mit sich selbst religieren. Der Anteil an religierten Vektoren ohne Fremd-DNA bei Klonierungen wird vermindert. Abhängig von der eingesetzten DNA-Menge und des Ansatzvolumens, wurden 5 U AP pro µg Vektor-DNA, sowie eine vom Hersteller angegebene Menge des entsprechenden Puffers eingesetzt. Anschließend

folgte eine Inkubationszeit von 15 min bei 37°C. Durch eine 5 minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C wurde die enzymatische Wirkung abgestoppt, was eine anschließende DNA-Aufreinigung unnötig macht.

### **2.2.2.10. Ligation**

#### **2.2.2.10.1. Ligation von DNA Fragmenten**

DNA-Fragmente können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden unter Hydrolyse von ATP verbunden werden, wobei diese Reaktion durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert wird.

Für die Ligasereaktion wurden restriktionsenzymatisch behandelte Insert-DNA und der entsprechende restriktionsenzymatisch vorbehandelte und dephosphorylierte Vektor zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer und max. 0.1 x Vol T4-DNA-Ligase (6 U/μl) in einem 10 μl Reaktionsansatz gemischt und inkubiert. Das optimale Vektor:Insert Verhältnis musste für die jeweilige Ligationsreaktion ermittelt werden. Da der für die Reaktion benötigte Ligationspuffer ATP enthält, wurde er nach dem ersten Gebrauch in Aliquots eingefroren. Jedes Aliquot wurde nur einmal verwendet.

#### **2.2.2.10.2. T/A-Klonierung**

Viele Polymerasen besitzen eine Terminale Transferase Aktivität, wodurch ein dATP an die 3' Enden des PCR-Amplifikats angehängt wird. Diese Eigenschaft der Polymerasen HotStarTaq<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) und Advantage<sup>®</sup>-HF 2 Polymerase (Clontech, Palo Alto., USA) wurde zum Klonieren eingesetzt, indem ein T-Vektor mit je einem dTTP am 3'-Ende beider Schnittenden verwendet wurde (Clark, 1988). Diese Überhänge sind kompatibel mit den dATP der PCR-Produkte. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden die pGEM<sup>®</sup>-T und pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektorsysteme der Firma Promega (Mannheim) benutzt. Ligation und Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.10 (Ligation) und 2.2.1.2 (Transformation) beschrieben.

Reaktionsansatz: 50 ng T-Vektor  
1-3 facher molarer Überschuss Insert (zum Vektor)  
1 µl 10 x Puffer (T4 DNA Ligase *high conc.*)  
0.5 µl T4 DNA Ligase *high conc*  
x µl H<sub>2</sub>O  
add 10 µl

#### 2.2.2.11. Blau-Weiß-Selektion

Plasmide enthalten in der Regel eine Klonierungsstelle mit zehn bis zwanzig Restriktionsendonukleaseschnittstellen. Man spricht auch von einer *multiple cloning site*. Liegt diese in einem Gen, wird dieses durch Einfügen von DNA-Fragmenten inaktiviert. Diese Inaktivierung kann, wie im Falle der Blau-Weiß-Selektion durch die Unterbrechung des lacZ-Gens, sichtbar gemacht werden und vermindert die Zahl der zu untersuchenden Bakterienklone. LacZ kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase, das alleine keine β-Galactosidaseaktivität besitzt. Bringt man es aber mit dem ebenfalls inaktiven C-terminalen ω-Fragment zusammen, welches die für die Transformation verwendeten Bakterien exprimieren, wird die Aktivität des Enzyms wieder hergestellt. Dieser Vorgang wird α-Komplementation genannt (Ullmann und Perrin 1970). Bakterienkolonien, in denen das α-Fragment unterbrochen ist, bleiben nach der Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß. Klone ohne Insertion exprimieren das α-Fragment und färben sich blau.

#### 2.2.2.12. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1989)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient u.a. der *in vitro* Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA. Die hitzestabile Polymerase stammt aus dem thermophilen Archebakterium *Thermus aquaticus* [76]. Durch Aufschmelzen der Wasserstoffbrückenbindungen wird zunächst die DNA bei 95°C in Einzelstränge überführt. Die Spezifität der Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren, und sich nach der Hitzedenaturierung an den komplementären Strang anlagern. Die optimale Anlagerungstemperatur der Primer wurde rechnerisch ermittelt [77]: ( $T_n = 69.3 + 0.41 \times G/C - 650/n$ ; n entspricht dabei

der Länge der verwendeten Oligonukleotide), musste aber empirisch optimiert werden. Die Elongation erfolgte bei 72°C. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer („Annealing“) und DNA-Synthese („Elongation“) wird eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragments erreicht. Im Anschluss wurde die Temperatur mehrere Minuten bei 72°C gehalten, um die Elongation aller Fragmente zu gewährleisten. Durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-Polymerase wird die Automatisierung der PCR in Thermocyclern ermöglicht.

### 2.2.2.12.1. Genotypisierung von *Knockout*-Mäusen mittels PCR

Alle Nachkommen der mutanten Mäuse wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert. Für die Amplifikation der Wildtyp- und der mutanten Allele wurde die DNA aus Mäuseschwänzen (Präparation siehe Kapitel 2.2.2.3.1) genutzt, und es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

<i>Mocs1</i> -defiziente Mäuse	2 µl DNA (300-500 ng) 0.5 µl Primer MGF1 (10 pmol/µl) 0.5 µl Primer MOCS49 (10 pmol/µl) 0.5 µl Primer PGK1 (10 pmol/µl) 0.5 µl dNTPs (10 mM <i>each</i> ) 2.5 µl 10 x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer 0.75 µl MgCl <sub>2</sub> (50mM) 0.5 µl Platinum <sup>®</sup> <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl) in 25 µl Gesamtvolumen
<i>Mocs2</i> -defiziente Mäuse	2 µl DNA (300-500 ng) 1 µl Primer neo1 (10 pmol/µl) 1 µl Primer Caro16 (10 pmol/µl) 1 µl Primer Car5 (10 pmol/µl) 0.5 µl dNTPs (10 mM <i>each</i> ) 2.5 µl 10x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer 0.5 µl MgCl <sub>2</sub> (50mM) 0.5 µl Platinum <sup>®</sup> <i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl) in 25 µl Gesamtvolumen
<i>MOCS1A/B</i> transgene Mäuse	2 µl DNA (300-500 ng) 0.5 µl Primer OriF (10 pmol/µl) 0.5 µl Primer OriR (10 pmol/µl) 0.5 µl dNTPs (10 mM <i>each</i> )

2.5 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer  
 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> (50mM)  
 0.5 µl Platinum<sup>®</sup>*Taq*-Polymerase (5U/µl)  
 in 25 µl Gesamtvolumen

Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

*Mocs1*-defiziente Mäuse und *Mocs2*-defiziente Mäuse:

Denaturierung	94°C für 5 min	
	94°C für 45 s	Denaturierung
35x	60°C für 45 s	Primeranlagerung
	72°C für 1 min 1 s	Elongation
Extension	72°C für 10 min	

*MOCS1A/B* transgene Mäuse

Denaturierung	94°C für 5 min	
	94°C für 45 s	Denaturierung
35 x	65°C für 45 s	Primeranlagerung
	72°C für 1 min 1 s	Elongation
Extension	72°C für 10 min	

#### 2.2.2.12.2. High-Fidelity PCR

Das Advantage<sup>®</sup>-HF2-System von Clontech wurde genutzt, um genomische Templates mit einer hohen Genauigkeit zu amplifizieren. Tabelle 2.1. zeigt einen Vergleich der Fehlerraten von handelsüblichen Polymerasen. Die Genauigkeit des Systems beruht auf der Verwendung eines speziellen Polymerasegemischs. Der Advantage-HF2-Polymerase-Mix enthält die BD-Titanium<sup>™</sup>*Taq*-DNA-Polymerase, eine Nuklease-defiziente N-terminale Deletion der *Taq*-Polymerase. Dieses Enzym liefert höhere Erträge als die *Taq*-Polymerase und enthält zusätzlich BD-TaqStart<sup>™</sup>-Antikörper für einen einfachen, integrierten *Hot Start* bei jeder Reaktion. Außerdem enthält der Mix eine kleine Menge einer zweiten Polymerase mit *proofreading*-Aktivität für eine gesteigerte Genauigkeit. Der Prozess der homologen Rekombination bei der Herstellung von *Knockout*-Mäusen wird erheblich durch inkorporationsbedingte Sequenzfehler beeinträchtigt, deren Anzahl durch die Verwendung des Advantage<sup>®</sup>-HF2-Systems gesenkt wird. Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

1  $\mu$ l DNA (300-500 ng)  
1  $\mu$ l Primer A (10 pmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l Primer B (10 pmol/ $\mu$ l)  
4  $\mu$ l 10 x HF 2 Puffer  
5  $\mu$ l 10 x HF 2 dNTPs  
1  $\mu$ l 50 x Advantage-HF 2 Polymerase Mix  
in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l

Nach 1 min initialer Denaturierung bei 95°C erfolgte die PCR mit 55 Zyklen im Thermocycler Peqlab Primus 56 nach folgenden Programm:

94°C für 30 s    Denaturierung  
68°C für 6 min    Anlagerung der Primer und Elongation

### 2.2.2.12.3. Reverse Transkriptase-Reaktion [78]

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird zur Generierung einer zur mRNA komplementären cDNA genutzt. Analog zu einer regulären PCR wird ein durch einen Primer festgelegtes Fragment der mRNA amplifiziert. Die RT-PCR wurde mit dem Omniscript™ *Reverse Transkriptase Kit* (Zweischrittsynthese) von Qiagen durchgeführt. Die Erststrangsynthese wurde im Thermomixer durchgeführt. Als erstes wurden 1-2  $\mu$ g Gesamt-RNA mit dem gewünschten Primer (1  $\mu$ l einer 100 pmol/ $\mu$ l Lösung) für 5 min bei 65°C denaturiert und für 1 min auf Eis abgekühlt. In diesem Schritt erfolgte die Anlagerung der Primer an die mRNA. Die spezifizierte cDNA-Strangsynthese wurde bei 37°C für 1 h durchgeführt. Dazu wurde dem Ansatz folgendes zugegeben:

1  $\mu$ l    10 x Puffer  
1  $\mu$ l    dNTP-Mix (5 mM)  
1  $\mu$ l    DTT (330 mM)  
0.5  $\mu$ l    Omniscript™ Reverse Transkriptase  
add 10  $\mu$ l RNase-freies Wasser

Die anschließende PCR mit 1  $\mu$ l der cDNA als Matrize entsprach dem in Kapitel 2.2.2.12.4 beschriebenen Programm. Die Reverse Transkriptase von Omniscript™ besitzt neben der RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität auch eine RNaseH-Aktivität und degradiert somit RNA-cDNA-Hybride.

#### 2.2.2.12.4. PCR an Plasmid-oder genomischer DNA

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder genomischer DNA wurde das HotStarTaq<sup>®</sup> PCR-System von Qiagen (Hilden) und sequenzspezifische Primer verwendet. Das System enthält die HotStarTaq-DNA-Polymerase, die eine modifizierte Form der rekombinanten 94kDa *Taq*-Polymerase von Qiagen darstellt. Bei Raumtemperatur hat das Enzym keine Polymeraseaktivität. Dadurch werden die unspezifische Anlagerung von Oligonukleotiden und Primer-Dimeren verhindert. Durch eine 15 minütige Inkubation bei 95°C wird das Enzym aktiviert (*Hot Start*). Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Plasmid-DNA (30-50 pg) oder genomische DNA (500 ng)  
 12.5 µl HotStarTaq Master Mix  
 1 µl *forward*-Primer (10 pmol/µl)  
 1 µl *revers*-Primer (10 pmol/µl)  
 in einem Gesamtvolumen von 25 µl

Nach 15 minütiger initialer Denaturierung zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase bei 95°C erfolgte die PCR mit 35 Zyklen gemäß folgendem Programm:

94°C	für 45 s	Denaturierung
55-65°C	für 45 s	Anlagerung der Primer
72°C	für 1 min pro 1 kb	Elongation

Zum Abschluss des letzten Elongationsschritts wurde die Reaktion für weitere 10 min bei 72°C fortgesetzt.

#### 2.2.2.12.5. *Randomly Primed PCR-DNA Walking SpeedUP™ Premix Kit*

Das DNA Walking *SpeedUP™* Premix Kit von Seegene (Seoul, Korea) beinhaltet einen PCR *Master Mix* und DNA Walking ACP (*Annealing-control-primer*)-Primer, die zur direkten Amplifizierung unbekannter flankierender Bereiche bis zu 3 kb dienen. Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

1.PCR:	x $\mu$ l DNA (100 ng) 4 $\mu$ l 2.5 $\mu$ M DW-ACP1-4 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M TSP1 x $\mu$ l dH <sub>2</sub> O 25 $\mu$ l 2 x SeeAmp™ACPT™Master Mix II in einem Gesamtvolumen von 50 $\mu$ l
2.PCR:	2 $\mu$ l aufgereinigte DNA aus 1.PCR (1-4) 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M DW-ACPN 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M TSP2 x $\mu$ l dH <sub>2</sub> O 25 $\mu$ l 2 x SeeAmp™ACPT™Master Mix II in einem Gesamtvolumen von 20 $\mu$ l
3.PCR:	2 $\mu$ l aufgereinigte DNA aus 2.PCR (1-4) 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M Universal-Primer 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M TSP3 x $\mu$ l dH <sub>2</sub> O 25 $\mu$ l 2 x SeeAmp™ACPT™Master Mix II in einem Gesamtvolumen von 20 $\mu$ l

Zwischen den einzelnen PCR-Reaktionen wurde das Produkt mit dem QIAquick® PCR Purifikation Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

Folgende PCR-Bedingungen wurden genutzt:

1.PCR	1 x	94°C	5 min
	1 x	42°C	1 min
	1 x	72°C	2 min
		94°C	30 s
	35 x	55°C	30 s
		72°C	100 s
2.PCR	1 x	72°C	7 min
	1 x	94°C	3 min
		94°C	30 s
	35 x	55°C	30 s
		72°C	100 s
3.PCR	1 x	72°C	7 min
	1 x	94°C	3 min
		94°C	30 s
	35 x	60°C	30 s
		72°C	100 s

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1.5 % Gel aufgetragen, geextrahiert und in den T-Vektor pGEM®-Teasy der Firma Promega kloniert.

### 2.2.2.13. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.*(1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) auf alle Positionen verteilten Unterbrechungen der DNA-Neusynthese. Für die Sequenzierung wurde der DYEnamic ET-Terminator-Mix der Firma GE Healthcare, Buckinghamshire verwendet. Dieser Mix enthält dNTPs, mit vier verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markierten ddNTPs, DNA *Taq*-Polymerase sowie Reaktionspuffer. Die eingesetzte Menge zu sequenzierender Template-DNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$m \text{ (ng)} = \frac{x \text{ (bp)}}{5}$$

Die Reaktion fand in 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäßen statt. Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

x µl DNA (m = abhängig von der Fragmentgröße)  
0.5 µl Primer  
2.5 µl DYEnamic ET-Mix  
in einem Gesamtvolumen von 10 µl

Nach 1 minütiger initialer Denaturierung bei 95°C erfolgte die Kettenabbruchreaktion mit 25 Zyklen gemäß folgendem Programm:

95°C	20 s	Denaturierung
55°C	30 s	Anlagerung der Primer
60°C	2 min	Elongation
75°C	5 min	finale Extension

Nach Beendigung des PCR-Programmes erfolgte die Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O zu jedem Sequenzieransatz, um das Probenvolumen für die anschließende Aufreinigung über eine Sephadex-Säule zu vergrößern. Die Sequenzierung und Auswertung erfolgte über den automatischen Kapillar-Sequenzierer vom Modell MegaBace1000 (Amersham Bioscience, Freiburg).

#### **2.2.2.14. Blot-Techniken**

##### **2.2.2.14.1. Southern Blot von DNA auf Nitrozellulose-Filter (modifiziert nach Southern, 1975)**

Nach der Auftrennung der DNA in einem TAE-Agarosegel (siehe Kapitel 2.2.2.5.1.) folgte die Färbung mit EtBr. Anschließend wurde das Gel mit einem Fluoreszenzlineal fotografiert und in einer Fotoschale für 10 min in einer 0.125 M HCl-Lösung depuriniert. Nach Abgießen der HCl-Lösung wurde das Gel kurz mit deionisiertem Wasser abgespült und 30 min in der Denaturierungslösung geschwenkt. Nach einem erneuten Abspülen des Gels mit dH<sub>2</sub>O schloss sich eine 30 minütige Neutralisierung an. Der Transfer der DNA auf die Nitrozellulosemembran (Hybond-XL, GE Healthcare) erfolgte mit dem Turboblotter™ von Schleicher & Schüll. Zuerst wurden 26 trockene und ein in 20 x SSC getränktes Whatman-Filterpapier in die Bodenwanne des Blotters gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit 2 x SSC äquilibriert und auf den Stapel gelegt. Das Agarosegel wurde nach der Behandlung darauf platziert und mit drei in 20 x SSC getränkten Whatman-Papieren bedeckt. Der mit 20 x SSC gefüllte Pufferbehälter wurde nun auf der Bodenwanne platziert und durch eine Whatmanbrücke mit dem Stapel verbunden. Nach dem Transfer der DNA über Nacht wurde der Filter in 2 x SSC gewaschen und durch UV-Licht-Bestrahlung im UV-Crosslinker (Typ 1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Nitrozellulosemembran gebunden.

##### **2.2.2.14.2. Northern Blot von RNA auf Nitrozellulose-Filter**

Nach der Auftrennung der RNA wurde das Agarosegel (siehe Kapitel 2.2.2.5.1.) mit einem Fluoreszenzlineal fotografiert und in einer Fotoschale zweimal für 10 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Da die Auftrennung der RNA im Agarosegel bereits unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, schließt sich der Transfer auf die Nitrozellulosemembran (Hybond-XL, GE Healthcare) direkt an. Hier wurde ebenfalls der Turboblotter™ von Schleicher & Schüll genutzt (siehe Kapitel 2.2.2.14.1.).

### **2.2.2.15. Radioaktive Markierung von DNA (modifiziert nach Feinberg und Vogelstein, 1984 [79])**

#### **2.2.2.15.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit dem Megaprime™ DNA labelling Kit**

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP erfolgte mit dem Megaprime™ DNA labelling Kit von GE Healthcare, Buckinghamshire. Die Methode beruht auf dem Zufallsprimer (*random primer*)-Prinzip von Feinberg und Vogelstein, 1984. Das Reaktionssystem beinhaltet eine Primerlösung mit Zufallsnukleotid-Primern in wässriger Lösung, konzentrierten Megaprime Reaktionspuffer mit dATP, dGTP und dTTP sowie das DNA-Polymerase I Klenow-Fragment (1 U/ $\mu$ l). 200 ng der zu markierenden DNA wurden mit Ampuwa auf ein Volumen von 30  $\mu$ l aufgefüllt, dazu wurden 5  $\mu$ l Primerlösung pipettiert. Der Ansatz wurde 7 min gekocht, abzentrifugiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 10  $\mu$ l Reaktionspuffer, 2  $\mu$ l Klenow-Enzym (1 U/ $\mu$ l) und 5  $\mu$ l (50  $\mu$ Ci) [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (3000 Ci/mmol). Der Ansatz wurde kurz gemischt und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.2.15.2. Abtrennung nicht inkorporierter Radionukleotide**

Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit MicroSpin™ G-25-Säulen von GE Healthcare, Buckinghamshire, abgetrennt. Zunächst wurden die Sephadex-Säulen gut gemischt und der Deckel etwas geöffnet. Nach Abbrechen des unteren Endes wurden die Säulen in ein leeres 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt und 2 min bei 800 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Probe aufgetragen. Nach einer Zentrifugation bei 800 x g für 1 min 30 s wurde die Aktivität der Sonde im Reaktionsgefäß und die der nicht inkorporierten Radionukleotiden in der Säule mit dem Geiger-Müller-Zählrohr bestimmt. Die markierte Sonde sollte eine höhere Aktivität als die Säule vorweisen und mehr als 40 % der eingesetzten Radioaktivität beinhalten.

### **2.2.2.16. Hybridisierung (nach Denhardt, 1966)**

Die zu hybridisierenden DNA-Filter wurden aufgerollt und in einen mit 2 x SSC gefüllten Hybridisierungszylinder geschoben. Dabei wurde der Filter mit der beschrifteten DNA/RNA-Seite nach innen so eingelegt, dass er luftblasenfrei direkt an der Zylinderwand anlag. Die 2 x SSC-Lösung wurde abgegossen und durch 6 ml auf

*Rapid-hyb buffer* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ersetzt. 250 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) wurden mit 500 µl *Rapid-hyb buffer* 10 min bei 96°C denaturiert, 2 min auf Eis gestellt und zur Hybridisierungslösung pipettiert. Der Filter wurde daraufhin mindestens 4 h im Hybridisierungsöfen bei 65°C inkubiert. Die Vorhybridisierung vermeidet unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran. Anschließend wurde die markierte Sonde zusammen mit 250 µl Lachssperm-DNA (10 mg/ml) im Wasserbad für 7 min bei 96°C denaturiert, für 2 min auf Eis gestellt und zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 65°C im Hybridisierungsöfen. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung in den radioaktiven Abfall verworfen, bzw. in einem Plastikgefäß zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Der Hybridisierungszylinder wurde mit 2 x SSC gefüllt, der Filter in die auf 65°C vorgeheizte Waschlösung I überführt und bis ca. 20 Bq/cm<sup>2</sup> Restaktivität gewaschen. Zwischenzeitlich wurde die Aktivität des Filters mit dem Geiger-Müller-Zählrohr gemessen. Es folgte ein erneuter Waschvorgang in Waschlösung II. Die Filterwaschung wurde solange fortgesetzt, bis eine Restaktivität auf dem Filter verblieb, die sich nach der Größe des Filters und zu erwartender Bandenzahl richtete, jedoch ungefähr 2-5 Bq/cm<sup>2</sup> betrug. Der noch leicht feuchte Filter wurde in Frischhaltefolie eingeschweißt und in eine Expositionskassette gelegt.

### **2.2.2.17. Nachweis der markierten DNA**

#### **2.2.2.17.1. Autoradiographie**

Der radioaktiv markierte Filter wurde in eine Autoradiografiekassette eingelegt und bei Rotlicht ein Röntgenfilm aufgelegt. Um die Signalintensität abschätzen zu können wurde der Film zunächst für einen Tag bei -80°C exponiert. Anschließend wurde dieser mit dem automatischen Röntgenfilmentwickler Curix 60 (Agfa, Köln) entwickelt. Ein weiterer Film wurde entsprechend der Signalintensität bis zu 10 Tagen exponiert.

#### **2.2.2.17.2. Storage phosphor**

Der Filter wurde in einer Expositionskassette mit aufgelegtem Phosphorimager *screen* (Kodak, Stuttgart) bei RT exponiert. Die Strahlungsenergie der hybridisierten Sonden wurde dabei in der Kristallstruktur des Films gespeichert. Man benötigt dazu einen mit BAFBr:Eu-Kristallen beschichteten Schirm, in dessen Kristalle Elektronen durch ionisierende Energie in einen angeregten, aber stabilen Zustand (Eu→Eu<sup>2+</sup>) versetzt

werden können. Nach erfolgreicher Exposition mit der hybridisierten Membran werden die Kristalle von einem Laserstrahl abgetastet und dabei noch mehr angeregt, diesmal aber in einen instabilen Zustand ( $\text{Eu}^{2+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ ) überführt, woraufhin die Elektronen in ihren Grundzustand zurückfallen ( $\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Eu}$ ). Dabei geben sie Lichtquanten ab, welche gemessen werden. Die Methode ist 10 bis 100mal empfindlicher als Röntgenfilme. Der lineare Signalbereich geht über 5 Größenordnungen (100000:1) und ist daher für Quantifizierungen besser geeignet. Die Daten werden auf dem Computer erfasst und können densitometrisch ausgewertet werden. Die Filme wurden je nach Signalstärke nach 1-3 Tagen mit dem PhosphorImager™ von Biorad gescannt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *Quantity One* von Biorad. Anschließend wurden die *screens* durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im *Screen Eraser* (Biorad, München) gelöscht und erneut für 1-3 Tage exponiert.

### 2.2.3. Biochemische Analysen

#### 2.2.3.1. Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinproben wurden durch das diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsystem, bestehend aus Sammel- und Trenngel unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt [80]. Der Acrylamidgehalt des Sammelgels betrug 4 % (w/v), der des Trenngels 12 %. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im kleinen Gelsystem (Hoefer) für 1-1,5 h bei 250 V unter Wasserkühlung.

#### 2.2.3.2. Immunoblot Analyse

Die Immunoblot-Analysen wurden von Silke Leimkühler von der Universität Potsdam durchgeführt. Für eine spezifische Detektion gereinigter oder sich in Rohextrakten befindender Proteine wurde die Immunoblot-Analyse angewendet. Dabei transferiert man die Proteine nach erfolgter Größentrennung in der Nativen-Polyacrylamid-Elektrophorese auf eine Trägermembran (Polyvinylidene Difluorid-Membran, GE-Healthcare), auf der die immobilisierten Proteine dann mittels Antikörper detektiert werden können. Der Proteintransfer wurde in einer Biometra-Blotapparatur im kontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem durchgeführt und konnte anschließend

mittels einer reversiblen Färbung mit 5 % (v/v) Ponceau S visualisiert werden. Der immunologische Nachweis spezifischer Proteine wurde nach einer einstündigen Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an der Membran durch eine 5 % (w/v) BSA (Rinderserumalbumin) in TBS mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT bzw. ÜN bei 4°C initiiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 10 min mit TBSTXS (0,1 % BSA; 0,1 % Triton X-100; 0,05 % SDS; in 1 x TBS) entfernt und die Membran erneut blockiert. Anschließend wurde die Membran mit einem, gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse) inkubiert. Dieser war mit der alkalischen Phosphatase markiert, die die Detektion der Proteine durch den enzymatischen Umsatz der Substrate NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium) und BCIP (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin) ermöglichte.

### 2.2.3.3. Molybdopterin-Untersuchung

Die Untersuchung des Molybdopterin-Gehalts in Lebern von Mäusen wurde von Prof. Dr. Günter Schwarz (Institut für Biochemie, Universität zu Köln) durchgeführt.

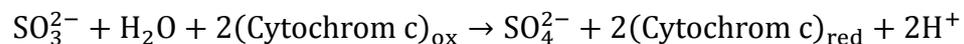
Die Rekonstitution der Nitratreduktase (NR) im *Neurospora crassa nit-1* Test wurde genutzt, um den Molybdopteringehalt in der Leber zu bestimmen. Die NR-defiziente Mutante *nit-1* [81-82] kann kein Molybdopterin bzw. Moco bilden, wodurch es zu einer Akkumulation des cPMPs kommt. Im zellfreien Extrakt kann die NR-Aktivität durch Zugabe von externem MPT/Moco komplementiert werden. Die beiden Stoffe können so detektiert und quantifiziert werden [83-84]. *N. crassa nit-1* Extrakt wurde hergestellt wie von Nason *et al* (1971) [84] beschrieben und durch Gelfiltration über eine PD-10-Säule entsalzt. Um den Enzymrohextrakt aus Mäuselebern zu erhalten, wurde dem Organ 2 Vol Puffer *nit-1* (50 mM Na-Phosphat, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.2) zugegeben, mit Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert. Gemäß des linearen Wertebereiches des Testes wurden 2 µl verschiedener Leberextraktverdünnungen mit 20 µl Puffer *nit-1*, der 5 mM Natrium-Molybdat und 2 mM reduziertes Glutathion enthielt, inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei RT unter anaeroben Bedingungen inkubiert, gefolgt von der Rekonstitutionsreaktion bei 4°C über Nacht. Nach der Zugabe von 20 mM NADPH (reduziertes NicotinamidAdenin-Dinukleotid-Phosphat) und einer Inkubationszeit von 10 min wurde die NADPH-Nitrat-Reduktase-

Aktivität gemessen. Eine Einheit MPT-Aktivität entspricht der rekonstituierten *nit-1* Nitratreduktase, welche die Absorption bei 540 nm pro 20 min um 1.0 OD erhöht. Die Aktivität wird in Einheiten pro mg Protein im Rohextrakt ausgedrückt.

#### 2.2.3.4. Untersuchung der Sulfitoxidaseaktivität

Die Untersuchung der Sulfitoxidaseaktivität in Lebern von Mäusen wurde von Prof. Dr. Günter Schwarz (Institut für Biochemie, Universität Köln) durchgeführt.

Das Enzym Sulfitoxidase (SOX) ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Hier katalysiert es folgende Reaktion:



Durch eine Homogenisierung des zu untersuchenden Lebergewebes wurde die SOX freigesetzt, und die beschriebene Reaktion, anhand der Reduktion des Cytochrom C, verfolgt und photometrisch gemessen. Die Menge an oxidierten Cytochrom C ist direkt proportional zur Aktivität der SOX. Die Kinetik der Reaktion wird mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Als erstes erfolgten die Aufreinigung der Proteine und die Vorbereitung der Proben für den Test. Der Leberrohextrakt wurde durch die Sonifizierung in 500 µl 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) präpariert. Die Enzymaktivität wurde in einem Reaktionsvolumen von 300 µl gemessen, das versetzt war mit 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.17 mM Natriumdesoxycholat, 50 µM Kaliumcyanat, 0.2 mg Cytochrom c und 160 µM Natriumsulfit. Die Messung der Enzym-Aktivität erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm unter der Aufnahme der Enzymkinetik über einen bestimmten Zeitraum. Dabei entsprach eine Unit einer Enzymmenge, die pro Minute eine Absorptionsänderung von 1 OD bei 550 nm und 25°C, bezogen auf 1 mg Protein, erreicht [40]. Als Referenzwert wurde immer eine frische Leber von Wildtyp-Tieren verwendet. Eine Leber einer unbehandelten *Mocs1*-defizienten Maus hatte eine SOX-Aktivität von 0.

#### 2.2.3.5. Sulfit-Test

Zur Bestimmung des Sulfitgehalts im Urin wurden die Analysestäbchen der Firma Merck (Darmstadt) genutzt. Die Reagenzzone des Stäbchens, welches mit Nitroprussid-

Natrium, Kaliumhexacyanoferrat(II) und Zinksulfat imprägniert ist, färbt sich in Abhängigkeit von der Konzentration der vorhandenen Sulfitionen rosa bis ziegelrot. Bevor die zu prüfende Lösung auf die Testzone aufgebracht wurde, musste der pH-Wert des Mäuseurins von 5 auf 7 angehoben werden. Dafür wurde in Abhängigkeit des vorliegenden Volumens 10 % einer 1 M Tris-Lösung (pH 8.0) zugegeben. Anhand der beiliegenden Farbskala konnte nun der Gehalt an freiem Sulfid in mg/ml abgelesen werden.

## **2.2.4. Histologische Techniken**

### **2.2.4.1. Perfusion**

Bei der Fixierung und dem Mikroskopieren von Organen ist es notwendig die Blutzellen zu entfernen, da sie die eigentliche Fluoreszenzfärbung verdecken. Eine Möglichkeit ist das Spülen des Blutkreislaufes mit einer Waschlösung. Dazu wurden den Tieren intraperitoneal 0.02 ml bis 0.03 ml Avertin pro g Körpergewicht injiziert, wobei darauf zu achten war, dass der Kreislauf stabil blieb. Der Brustkorb wurde geöffnet und das Herz freigelegt. Um den Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung zu ermöglichen, wurde ein kleiner Schnitt in den rechten Vorhof des Herzens gemacht. In den linken Ventrikel wurde, von der Herzspitze aus, eine feine Kanüle hineingeschoben. Mit einem leichten, gleichbleibenden Druck wurden nun 50-100 ml 1 x PBS injiziert. Nach der vollständigen Entfernung des Blutes wurde eine 4 % Formaldehyd-Lösung durch den Körper geleitet, um die Organe von innen zu fixieren. Während der Perfusion starb das Versuchstier schmerzfrei. Anschließend wurden die Organe präpariert und in 25 ml 4 % Formaldehyd (50 ml Falcon) bei 4°C über Nacht fixiert. Nach der Postfixierung wurden die Organe in 30 %-iger Succrose (w/v) in 1 x PBS bei 4°C über Nacht aufbewahrt. In dieser Lösung wurde dem Gewebe osmotisch Wasser entzogen, wodurch die Bildung von Gefrierartefakten, in Form einer Kristallbildung im Gewebe beim Einfrieren, verringert wurde. Nach dem Einfrieren auf Trockeneis wurden die Organe bis zum Schneiden auf -80°C gelagert.

### **2.2.4.2. Gefrierschnitte und Färbung der Zellkerne**

Nach dem Fixieren und Einfrieren der Organe, wurden diese in ein vorbereitetes Blockschälchen gelegt und mit Einbettmedium (Cryoblock, medite Medizintechnik

GmbH, Burgdorf) übergossen. Anschließend wurde das Schälchen für 10 Sekunden auf Trockeneis durchgefroren. Die so gewonnenen Blöcke wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zum Schneiden wurden die gefrorenen Blöcke bei einer Kammertemperatur von  $-23^{\circ}\text{C}$  im Kryotom Jung CM3000 (Leica, Bensheim) auf dem Schneidetisch fixiert und dann Schnitte mit einer Dicke von 3-5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern SuperFrost®Plus (Menzel-Gäser, Braunschweig) aufgebracht. Nach einer 30 minütigen Trocknungszeit wurden die Proben mit ProLong® Gold antifade-Reagenz mit DAPI fixiert. Nach 24 h trockener, dunkler Lagerung bei RT wurden die Ränder der Deckelgläschen mit Nagellack verschlossen und die Objektträger bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zum Mikroskopieren gelagert.

### 2.2.4.3. HE-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Präparate in den Färbegestellen manuell in einer Färbereihe gefärbt (siehe Tabelle 2.1.). Nach der Trocknung der Gewebeschnitte bei  $56^{\circ}\text{C}$  ü.N. erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin (nach Mayer, Merck). Nach Spülung der Objektträger in Leitungswasser wurde mit Eosin gegengefärbt. Das Eindecken der Schnitte mit Deckgläschen erforderte eine nochmalige Entwässerung der geschnittenen und gefärbten Präparate. Dazu wurde die Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge bis zum Xylol verwendet. Abschließend wurden die Organschnitte mit Hilfe des Schnelleindeckmittels Eukit (Fluka) und Deckgläsern eingedeckt. Dazu wurde ein Tropfen des Eindeckmittels mit einem Glasstab auf dem Deckglas verteilt und fest auf den Objektträger gedrückt, um Luftbläschen zu vermeiden. Nach Trocknung wurden die Schnitte in Präparatemappen aufbewahrt.

Reagenz	Inkubationszeit
dH <sub>2</sub> O	2 s
Hämatoxylin	5 min
Leitungswasser	1 min
Eosin	1 min
Leitungswasser	30 s
50 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min

Xylol	5 min
Xylol	5 min

Tabelle 2.1.: Protokoll der HE-Färbung

## 2.2.5. Transgene Mäuse

### 2.2.5.1. Herstellung genetisch veränderter ES-Zellen mittels homologer Rekombination

#### 2.2.5.1.1. Präparation von Mausfibroblasten-*feeder layers*

Die undifferenzierten Stammzellen (ES-Zellen) wurden auf einer *feeder layer* Zellschicht in Kulturmedium (DMEM) kultiviert. *Feeder layer* Zellen (FL) sind konfluent wachsende Fibroblasten, die den undifferenzierten Status der ES-Zellen aufrecht erhalten. Mitomycin verhindert die Ausbildung des Spindelapparates. Dadurch können sich die behandelten Fibroblasten nicht mehr teilen. Ein gefrorenes Aliquot Mausembryofibroblasten (MEFs) wurde bei 37°C aufgetaut, in 10 ml FB-Medium transferiert und in 250 ml Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Wenn die Zellen eine konfluente Einzelzellschicht ausgebildet hatten, wurden zwei Kulturflaschen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde den Flaschen 10 ml FB-Medium und 100 µl Mitomycin (1 mg/ml) zugegeben und für 2-3 h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 24-Well-Platten mit 0.1 % Gelatine für 2 h bei 37°C behandelt und anschließend wieder abgenommen. Mitomycin-behandelte Zellen können nicht mehr anwachsen, sondern werden nur durch die Gelatine am Boden der Petrischalen fixiert. Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen und zweimal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Nach der Trypsinierung mit 500 µl TrypLE™ Express (Invitrogen) und der Vereinigung der Zellen für 5 min bei 37°C wurde 10 ml FB-Medium zugegeben, gut resuspendiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g wurde das Pellet in 12 ml FB-Medium resuspendiert und mit 500 µl pro Well ausplattiert. Für 10 cm Platten wurden entsprechend mehr Zellen verwendet. Anschließend folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Inkubator, damit die Fibroblasten auf den Boden absinken konnten.

#### **2.2.5.1.2. Wachstum von ES-Zellen auf Mausfibroblasten- *feeder layers***

Ein Reaktionsgefäß mit eingefrorenen ES-Zellen wurde bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 9 ml ES-Zell-Medium überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 300 x g wurde das Zellpellet in 1 x PBS gewaschen und in 5 ml ES-Zell-Medium resuspendiert. Die ES-Zellen wurden anschließend auf 60 mm MEF-Petrischalen ausplattiert und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 2-3 Tagen wurden die ES-Zellen in 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl TrypLE™ Express für 5 min inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Untergrund gelöst hatten, wurde 5 ml ES-Zell-Medium zugegeben, resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g wurde das Pellet in 7 ml ES-Zellmedium aufgenommen und in eine vorbereitete 10 cm MEF-Platte (siehe Kapitel 2.2.5.1.1.), mit 1 x PBS gewaschen, 3 ml ES-Zell-Medium vorgelegt) überführt.

#### **2.2.5.1.3. Transfektion von ES-Zellen**

Für die Elektroporation wurde eine vollbewachsene 10 cm Platte mit ca.  $2 \times 10^7$  ES-Zellen trypsinisiert und in 20 ml 1 x PBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 300 x g wurde das Zellpellet in 600 µl 1 x PBS resuspendiert und zusammen mit 40 µg linearisiertem, aufgereinigtem DNA-Konstrukt in die Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V, 500 µF mit dem BIO RAD gene pulser™. Anschließend wurde die Küvette für 20 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde von der Küvette in 20 ml ES-Zell-Medium überführt und auf 10 cm Platten mit FL-Zellen ausplattiert. Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen mit selektivem ES-Zell-Medium, 400 µg/ml Neomycin (G418) und 2 µM Gancyclovir beinhaltend, behandelt. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Nach ca. 8 d wurden Kolonien resistenter Klone sichtbar und konnten für weitergehende Analysen vereinzelt werden.

#### **2.2.5.1.4. Wachstum von ES-Zellen für Southern Blot-Analysen**

Einzelne Klone, die die Selektion mit Neomycin und Gancyclovir 8 d überlebt haben, wurden mit einer 20 µl Gilson Pipette unter einem Mikroskop von der Platte aufgenommen und in eine 24-Well-Platte mit FL-Zellen und 500 µl ES-Zell-Medium überführt. Nach zwei Tagen wurden die ES-Zellen unter Zugabe von 100 µl Trypsin

und einer Inkubation von 5 min bei 37°C abtrypsiniert und in 500 µl ES-Zell-Medium resuspendiert. Jeweils die Hälfte der Zellsuspension wurde auf zwei verschiedene mit 24-Well-Platten mit FL-Zellen ausplattiert. Eine Platte diente als *Master-Platte*, wurde mit 250 µl Gefriermedium versetzt und bei -80°C eingefroren. Die zweite Platte, auch DNA-Platte genannt, wurde 2-3d bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraus wurde anschließend DNA isoliert.

#### **2.2.5.2. Herstellung chimärer Mäuse mittels Injektion von modifizierten ES-Zellen in Blastocysten**

Diese Schritte wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Die Maushaltung erfolgte unter üblichen Bedingungen (Temperatur 21-23 °C, Luftfeuchtigkeit 45-60 %, Tag-Nacht-Rhythmus: 12 h Licht/12 h Dunkelheit) [85]. Durch Gonadotropingaben kann die Anzahl der ovulierten Eizellen pro Zyklus um das Fünffache erhöht werden (Hogan *et al.* 1994). Hierzu wurde das Pregnant Mare's Serum als Ersatz für follikelstimulierendes Hormon und das humane Choriongonadotropin als Ersatz für das luteinesierende Hormon verwendet. Es wurden jeweils 5 U der Hormone mit einem Intervall von ca. 48 h in 40 Weibchen intraperitoneal injiziert. Vier Tage vor Blastozystengewinnung wurden 40 C57BL/6N-Weibchen gegen 16 Uhr verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Mäuse mit einem Vaginalpfropf von den übrigen Tieren separiert. 3.5 d *post coitus* wurden die Blastozysten isoliert und die rekombinanten ES-Zellen injiziert [85]. Der Aufbau der Mikroinjektions-Anlage sowie die Durchführung der Mikroinjektion der ES-Zellen in die Blastozysten erfolgten nach den Angaben von Hogan *et al.* (1994). Während der Injektion wurden die ES-Zellen bei einer Temperatur von ca. 10°C gehalten. Der Mikroinjektion schloss sich eine Inkubation der Blastozysten von 1 h bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank an. Danach erfolgte der Transfer in pseudoträchtige C57BL/6N Mäuse. Dafür wurden zwei Tage vor der Blastozystenisolierung 20 weitere C57BL/6N-Weibchen im Alter von 10-20 Wochen mit zehn vasktomierten Männchen verpaart, und am nächsten Tag der Vaginalpfropfkontrolle unterzogen. Tiere mit einem Vaginalpfropf wurden bis zur Blastozystenimplantation gesondert gehalten. Durch die Verpaarung mit den vasktomierten Männchen wurde der Reproduktionstrakt der Weibchen für die Aufnahme der befruchteten Eizellen vorbereitet. Diesen pseudoträchtigen Weibchen wurden am d 2.5 oder 3.5 *post*

*cohabitationem* die vorbereiteten Blastozysten unter Injektionsnarkose mit Ketavet/Rompun implantiert [85].

### 2.2.5.3. Chimäre Mäuse und Verpaarungen

Die ES-Zellen wurden aus Tieren des Mausstammes 129/SVJ isoliert, deren Fell eine braune Färbung aufweist (Agouti-Fellmarker). Die bei der Aggregation eingesetzten Blastocysten wurden aus 40 C57B/6N-Weibchen isoliert, welche eine schwarze Fellfärbung zeigen. Sind ES-Zellen an der Entwicklung der reimplantierten Embryonen involviert, können die chimären Tiere anhand einer gescheckten Fellfärbung identifiziert werden. Chimäre Mäuse mit einem Anteil an 129/SVJ-Fellfarbe von mindestens 80 % wurden auf C57B/6N Mäuse zurückgekreuzt.

### 2.2.6. Substitutionstherapie mit cPMP

Das cPMP wurde, wie in Schwarz *et al* (2004) beschrieben, überexprimiert und aufgereinigt [40]. Die Injektion von cPMP erfolgte intrahepatisch. Aufgrund der geringen Stabilität von cPMP bei RT, erfolgte die Durchführung bis zur Injektion zügig und auf Eis. Nach dem Auftauen wurde das cPMP auf einen pH-Wert von ca.7 durch die Zugabe von 10 x PBS und H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 ng/μl in 2 x PBS mit einem Injektionsvolumen von 25-400 μl gebracht. Die Injektion erfolgte mit einer 30 G x 1/2, 0.3 mm x 13 mm-Kanüle und einer 1 ml Einmalspritze.

### 2.2.7. Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase

Die Aufreinigung und PEGylierung der pflanzlichen Sulfitoxidase wurde von Abdel Ali Belaidi (Universität zu Köln) durchgeführt.

Die pflanzliche Sulfitoxidase (PSO) aus *Arabidopsis thaliana* wurde als Fusionsprotein mit einem His-tag in *Escherichia coli* überexprimiert und aufgereinigt. Die Fusion eines Histidin-tags an das Protein ermöglichte dessen Aufreinigung durch eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer Nickel-NTA Matrix. Nach einer anschließenden Anionenaustausch-Chromatographie wurde die hochkonzentrierte Proteinlösung mittels Gelfiltrationchromatographie (in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl äquilibriert) nach der Molekulargewichtsgröße aufgetrennt (siehe Hänsch *et al* 2006) [46]. Zum Schutz vor einer Immunantwort auf

das artfremde Protein und zur Stabilisierung des Enzyms wurde die PSO mittels PEGylierung modifiziert. Dafür wurde das Methyl-PEO<sub>n</sub>-NHS-Reagent der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet, das aus einem N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester besteht, an dem ein Spacer aus Polyethylenglykol mit einer terminalen Methylgruppe (Methyl-PEO<sub>n</sub>) gebunden ist. NHS reagieren sehr effizient mit primären Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>) von Proteinen, wodurch das Methyl-PEO<sub>n</sub> daran gebunden und der NHS-Ester abgespalten wird (siehe Abb. 2.1.).

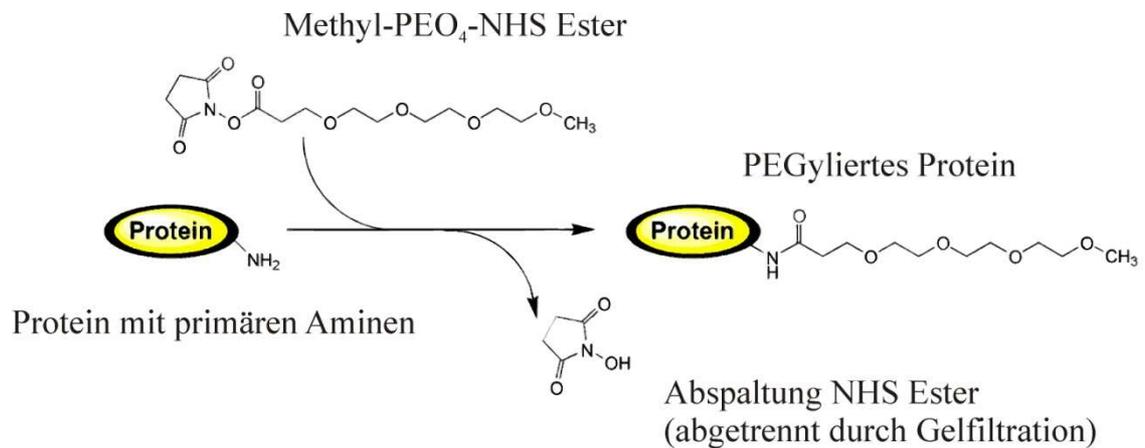


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der Protein-PEGylierung mit Methyl-PEO<sub>4</sub>-Ester.

Der abgespaltene NHS-Ester wurde mittels Gelfiltration abgetrennt und die Proteinlösung auf 100 µmol/ml in 1 x PBS ankonzentriert. Die Struktur und das Molekulargewicht der PEG-Gruppe können variiert werden. Für die PEGylierung der PSO wurde ein 0.5 kDa lineares PEG und ein 4.5 kDa verzweigtes PEG verwendet. Vergleichende Studien an 2 Mäusen, die jeweils 5.148 nmol PEG-PSO verabreicht bekamen, zeigten, dass das unterschiedliche Molekulargewicht der PEG-Modifikation keine Auswirkung auf die Lebensdauer hatte. Die anschließenden Deeskalationsstudien mit 0.5, 0.05 und 0.005 nmol PEG-PSO wurden mit dem 4.5 kDa verzweigtes PEG durchgeführt. Kontrollversuche zeigten, dass die PEGylierung hatte keine Auswirkung auf die Aktivität der PSO hatte.

## 2.2.8. Gentherapie

### 2.2.8.1. Adeno-assoziierte-Viren

#### 2.2.8.1.1. Aufreinigung von Adeno-assoziierten Viren

Die Herstellung der rekombinanten Viren geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Kügler, Universitätsmedizin Göttingen.

Rekombinante AAV-Partikel wurden durch das Verpacken eines AAV2 basierenden Genoms in ein AAV1/2 chimäres Capsid verpackt [86-87]. Es konnte gezeigt werden, dass AAV1/2 eine hohe Transduktionseffizienz für die Leber und den Muskel aufweist [88]. Ein Verhältnis von 50:50 aus AAV-1 und AAV-2 Verpackungsplasmiden wurde dafür genutzt. Die Vektoren wurden zuerst durch eine Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation [89] aufgereinigt und durch eine Heparin-Affinitätschromatographie ankonzentriert (Amersham). Nach einer extensiven Dialyse gegen PBS, wurden die Vektoren bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert. Die Genomkopien wurden mittels quantitativer PCR ermittelt und die > 99 % Reinheit auf einem PAGE-Gel überprüft. Der Titer infektiöser Viren (Transduktionseinheiten, tu) wurde durch die Transduktion primärer Neuronen untersucht und ein Verhältnis von 1:30 (tu : Genom) für den AAV-*EGFP* Vektor festgestellt. Da der AAV-*MOCS1* Vektor auf die gleiche Weise präpariert wurde, wurde für diese Konstrukt das gleiche tu : Genom Verhältnis angenommen.

#### 2.2.8.1.2. Applikation der rekombinanten Viren

Für die intrahepatische Applikation der rekombinanten Viruspartikel wurden die Mäuse im Rücken fixiert. Der Einstich erfolgte unterhalb des Rippenbogens in den vorderen Leberlappen der Mäuse. Die intravenöse Injektion erfolgte über die Schwanzvene von sedierten Mäusen. Dazu wurden den Tieren intraperitoneal 0.02 ml bis 0.03 ml Avertin pro g Körpergewicht injiziert, wobei darauf zu achten war, dass der Kreislauf stabil blieb. Alle Injektionen erfolgten mit einer 30 G x 1/2, 0.3 mm x 13 mm-Kanüle und einer 1 ml Einmalspritze.

### 2.2.8.2. Hepatozytentransplantation

#### 2.2.8.2.1. Schädigung der Mausleber mit Retrorsin

Retrorsin ist ein in Pflanzen natürlich vorkommendes Pyrrolizidinalkaloid und blockiert den hepatischen Zellteilungszyklus [90]. Die Retrorsinlösung wurde wie folgt hergestellt:

50 mg Retrorsin (Sigma) wurden in 5 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2.5 eingestellt. Nach dem vollständigen Lösen des Retrorsinpulvers wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH 6.5 eingestellt und steril filtriert. Die Retrorsinlösung wurde den Mäusen intraperitoneal mit einer Applikationsmenge von 30 mg/kg Körpergewicht injiziert.

#### **2.2.8.2.2. Präparation Embryonaler Hepatozyten [91]**

(in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. K. Guan und Dr. K. Streckfuss, Universitätsmedizin Göttingen)

Ein schwangeres C57B/6N-Weibchen wurde am d 15 *post coitus* abgetötet. Das Lebergewebe aus 12 Embryonen wurde in Ca<sup>2+</sup> freien 1 x PBS mit 10 % FKS, 10 mmol/l HEPES, 0.5 mmol/l EDTA und 2 U/ml Heparin zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C in 0.5 % Kollagenase und 2 U/ml Heparin für 15 min. Das verdaute Gewebe wurde durch eine Nylonmembran mit 70 µm Porengröße filtriert und bei 40 x g zentrifugiert. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypan-Blau-Test bestimmt. Nach dem Waschen mit 0.05 % DNase I in 1 x PBS wurden die vereinzelt Zellen in DMEM-Medium mit 1.0 x 10<sup>2</sup> U/ml Penicillin G, 0.2 mg/ml Streptomycin, 10 % FKS, 10 ng/ml *Hepatocyte Growth Factor*, 300 ng/ml Insulin, 1 % Glutamin, auf Petrischalen mit einer Zelldichte von 5.0 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml ausplattiert. Nach einer Inkubation von 16 h wurden die Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 40 x g für 10 min abzentrifugiert und im gleichen Medium mit einer Zelldichte von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/25 µl resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer 27 G x ½, 0.40 x 12 mm-Kanüle und einer 1 ml Einmalspritze entweder intrahepatisch oder intravenös appliziert.

#### **2.2.8.3. Nichtvirale Gentherapie**

Atellocollagen ist ein Typ I-Kollagen, das Telopeptid-frei ist und dadurch keine Immunreaktion in der Maus hervorruft [92]. Für die Versuche wurde das Atellocollagen der Firma GfN (Wald-Michelbach, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0.05 % und das entsprechende Plasmid (aufgereinigt mit QIAprep<sup>®</sup> *Spin Maxiprep endogenous free Kit*) in 1 x PBS gemischt und den Mäusen intrahepatisch injiziert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Molekulare Therapien der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ A

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Mocs1*-defiziente Mäuse als Tiermodell für molekulare Therapien genutzt. Bei diesen Mäusen ist ein Bereich im *Mocs1*-Gen deletiert, der zum Verlust der Proteine MOCS1A und MOCS1B führt. Dadurch sind die Mäuse nicht mehr in der Lage cPMP, das erste Stoffwechselprodukt der MoCo-Biosynthese, zu bilden. Wie bei Patienten mit der Molybdän-Cofaktor-Defizienz vom Typ A führt das dazu, dass der MoCo und damit auch die MoCo-abhängigen Enzyme Sulfitoxidase (SOX), Xanthindehydrogenase (XDH) und Aldehydoxidase (ADH) nicht mehr gebildet werden.

#### 3.1.1. Biochemische Therapie am Tiermodell *Mocs1*-defizienter Mäuse-Optimierung der cPMP-Substitutionstherapie

In vorangegangenen Experimenten konnte eine Substitutionstherapie mit dem ersten Zwischenprodukt der MoCo-Biosynthese, cPMP, etabliert werden. Verschiedene Behandlungsschemata führten zu dem Schluss, dass intrahepatische cPMP-Injektionen jeden dritten Tag mit 2 µg in den ersten drei Wochen und 4 µg cPMP ab der 4. Woche die optimale Dosis sei [40]. Anhand der unterschiedlichen Mengen cPMP und der daraus resultierten Lebensdauer, wurde deutlich, dass diese mit einander korrelieren. Der Phänotyp der MoCo-Defizienz konnte mit dieser Behandlung jedoch nicht vollständig verhindert werden. Die XDH-Aktivität wurde geringer restauriert als die SOX. Während die bewirkte SOX-Aktivität ausreichte, die vom Sulfid verursachten Symptome vollständig aufzuheben, führte die verminderte XDH-Aktivität in den Mäusen zu vermehrten Xanthinablagerungen in den Nieren. Was im Menschen selten Probleme bereitet, führte im murinen Organismus zum gehäuftem Auftreten akuter Nierenbeschwerden [40]. Ein Ziel dieser Arbeit war es die cPMP-Gabe dahingehend zu optimieren, dass die Lebensdauer der Mäuse weiter erhöht wird und dass die

Xanthinablagerungen in der Niere (siehe Abb. 3.1.) verringert bzw. verhindert werden konnten.

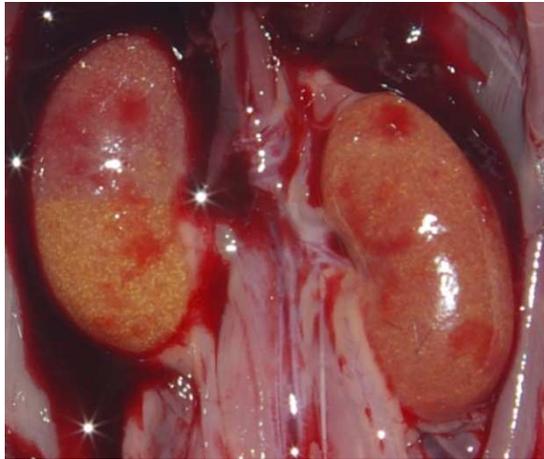


Abb. 3.1.: Xanthinablagerungen in den Nieren von cPMP-behandelter *Mocs1*-defizienter Maus.

Ursache der Xanthinablagerungen ist der rasche Aktivitätsverlust der XDH, welcher schon nach 24 h eintritt [40]. Um diesen Aktivitätsverlust entgegen zu wirken bekamen 17 *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse täglich, anstatt jeden dritten Tag, erhöhte Dosen cPMP intrahepatisch injiziert (siehe Behandlungsschema Tabelle 3.1.). Als Vergleich dienten die 18 *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die jeden dritten Tag mit 2 µg cPMP in den ersten drei Wochen nach der Geburt und ab der 4. Woche mit 4 µg cPMP behandelt wurden (Daten veröffentlicht in Schwarz et al, 2004)

	Woche	1	2	3	4	5	6-∞	
Niedrigdosis <sup>1</sup>	jeden 3. Tag	2	2	2	4	4	4	cPMP- Menge in µg
Hochdosis	täglich	2	4	8	12	16	20	

Tabelle 3.1 Behandlungsschema cPMP-Dosis-Experimente, 1 = veröffentlicht in Schwarz et al. (2004)

Aus beiden Gruppen wurden jeweils zwei Tiere am d 52 abgetötet, um den MPT-Gehalt in der Leber zu messen (siehe Abb. 3.2.). In den Mäusen, die jeden dritten Tag cPMP intrahepatisch injiziert bekamen, wurde ein MPT-Gehalt von 16 % im Vergleich zum Wildtyp gemessen. In der Gruppe, die täglich mit höheren cPMP-Dosen behandelt wurden, wurde ein MPT-Wert von 33 % im Vergleich zum Wildtyp gemessen.

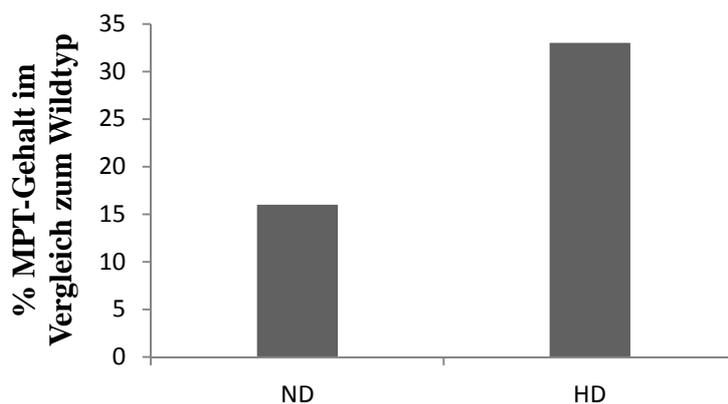


Abb. 3.2.: MPT-Gehalt in der Leber cPMP-behandelter *Mocs1*-defizienten Mäusen: ND = Niedrigdosis (n = 2) (veröffentlicht in Schwarz *et al.*, 2004 [40]), HD = Hochdosis (n = 2), MPT-Gehalt ist angegeben in % Gehalt im Vergleich zum Wildtyp (n = 2).

Während die Lebensdauer von Mäusen, die mit der niedrigen Dosis cPMP behandelt wurden, durchschnittlich 91,8 d betrug, verlängerte sich die Lebensdauer der Tiere mit der erhöhten cPMP-Gabe auf durchschnittlich 160 d (siehe Abb. 3.3.).

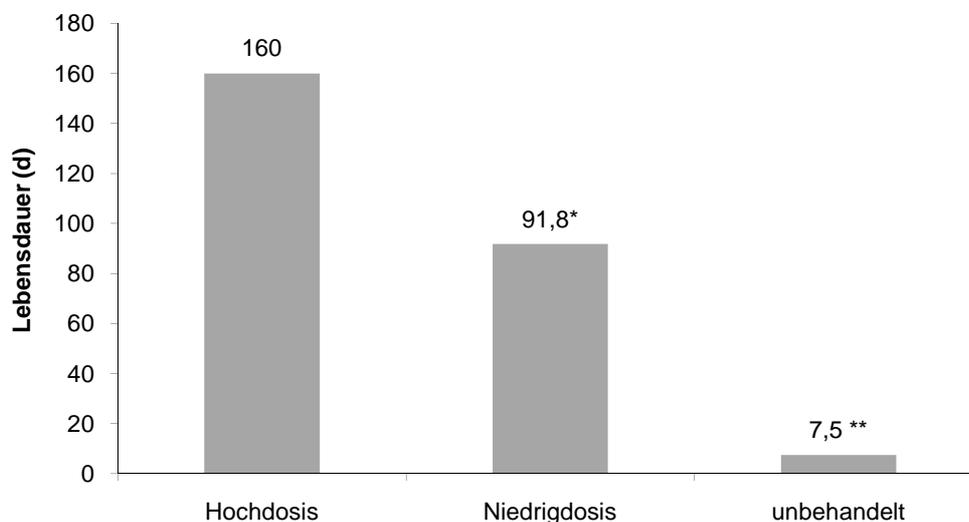


Abb. 3.3.: Vergleich der Lebensdauer der mit unterschiedlichen Dosen cPMP behandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen, Negativkontrolle unbehandelte *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse (\* veröffentlicht in Schwarz *et al.*, 2004 [40]; \*\* veröffentlicht in Lee *et al.*, 2002 [33]).

Im Hinblick auf die Behandlung von Patienten wurde eine weitere Applikationsform, die orale Gabe des cPMPs, untersucht. Dazu wurden 6 *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse bis zum d 81 intrahepatisch mit der erhöhten täglichen cPMP-Dosis vorbehandelt. Danach erfolgte

die Umstellung auf die orale Gabe, bei der täglich mittels einer gebogenen Knopfkanüle 20 µg cPMP in den Rachenraum der Mäuse eingeführt wurden. Um die orale Gabe mit den intrahepatischen Injektionen vergleichen zu können, erhielten 6 weitere Tiere tägliche intrahepatische Injektionen mit 20 µg cPMP. Bei einer dritten Gruppe mit drei Tieren wurde die Behandlung am d 81 beendet, um die Lebensdauer der Mäuse auf die fortgeführte cPMP-Gabe und nicht auf mögliche Speichereffekte im Gewebe zurück führen zu können. Abb. 3.4. zeigt den Vergleich der Lebensdauer der Tiere der drei Gruppen.

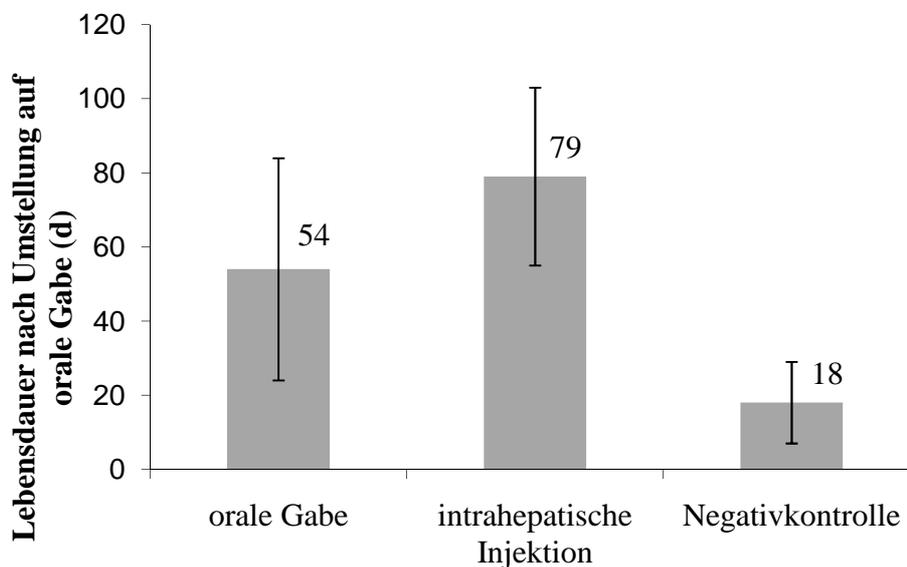


Abb. 3.4.:Vergleich der Lebensdauer von *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen nach Umstellung am d 81 auf orale Gabe im Vergleich zu fortgeführter intrahepatischer Injektion (Hochdosis cPMP). Negativkontrolle = Lebensdauer von *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen, bei denen am d 81 die cPMP-Behandlung abgesetzt wurde.

Die Gruppe von Mäusen, denen oral cPMP verabreicht wurde, erreichte eine durchschnittliche Lebensdauer von  $54 \pm 30$  d und die intrahepatisch injizierten Tiere starben  $79 \pm 16$  d nach der Umstellung am d 81. Nach durchschnittlich  $18 \pm 11$  d waren bei der Negativkontrollgruppe die cPMP-Reserven im Körper aufgebraucht und die Tiere starben. Die Ergebnisse zeigen, dass intrahepatische Injektionen für die Substitutionstherapie mit cPMP besser geeignet sind, als die orale Verabreichung.

Um die Effektivität der unterschiedlichen Behandlungen genauer zu untersuchen, wurde der MPT-Gehalt in der Leber gemessen. Zwei Tiere aus der Gruppe der oralen Gabe und zwei aus der Gruppe der intrahepatisch behandelten Tiere wurden aus diesem

Grund am d 62 nach der Umstellung der Behandlung abgetötet (siehe Abb. 3.5.). Als Kontrolle dienten zwei Wildtypmäuse.

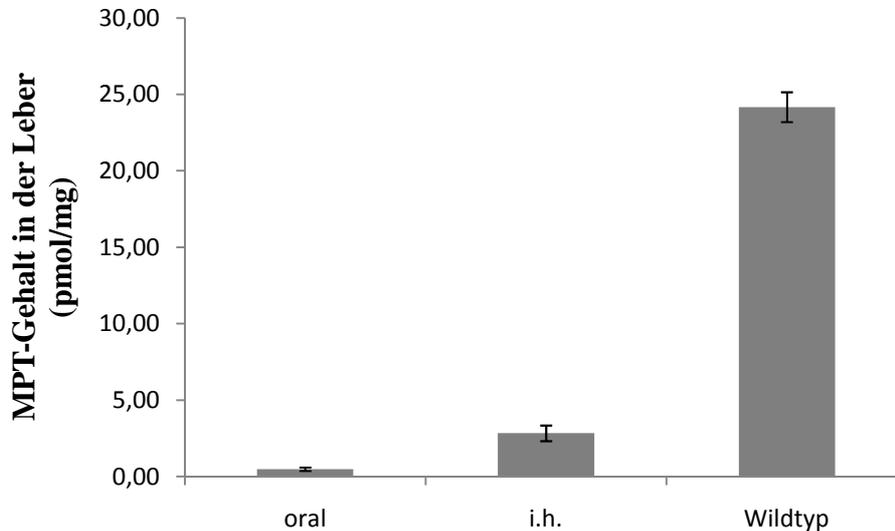


Abb. 3.5.: Vergleich des MPT-Gehalts (pmol/mg) in der Leber von *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen, die am d 62 nach der Umstellung auf orale Gabe abgetötet wurden, im Vergleich zu fortgeführter intrahepatischer Injektion und *Mocs1*<sup>+/+</sup> sowie +/- Mäusen.

Die biochemische Untersuchung zeigte, dass die intrahepatisch behandelten Mäuse einen MPT-Gehalt von 11.8 % (2.84 pmol/mg) im Vergleich zum Wildtyp (24.17 pmol/mg) in der Leber aufwiesen. Die orale Gabe erzielte einen MPT-Wert in der Leber von 2 % (0.49 pmol/mg) im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Präparation der Mäuse zeigte sich, dass es in den Nieren der oral behandelten Tiere zu erhöhten Ablagerungen von Xanthin gekommen war, was in einer Maus bereits zur Lyse des Nierengewebes geführt hatte (siehe Abb. 3.6.). Im Vergleich dazu wiesen die Nieren der intrahepatisch behandelten Mäuse keine Xanthinablagerungen oder andere Veränderungen auf. Das zeigte, dass die intrahepatischen Injektionen die MoCo-Biosynthese effektiver restaurieren als die orale Gabe, obwohl gleiche Mengen an cPMP eingesetzt wurden.

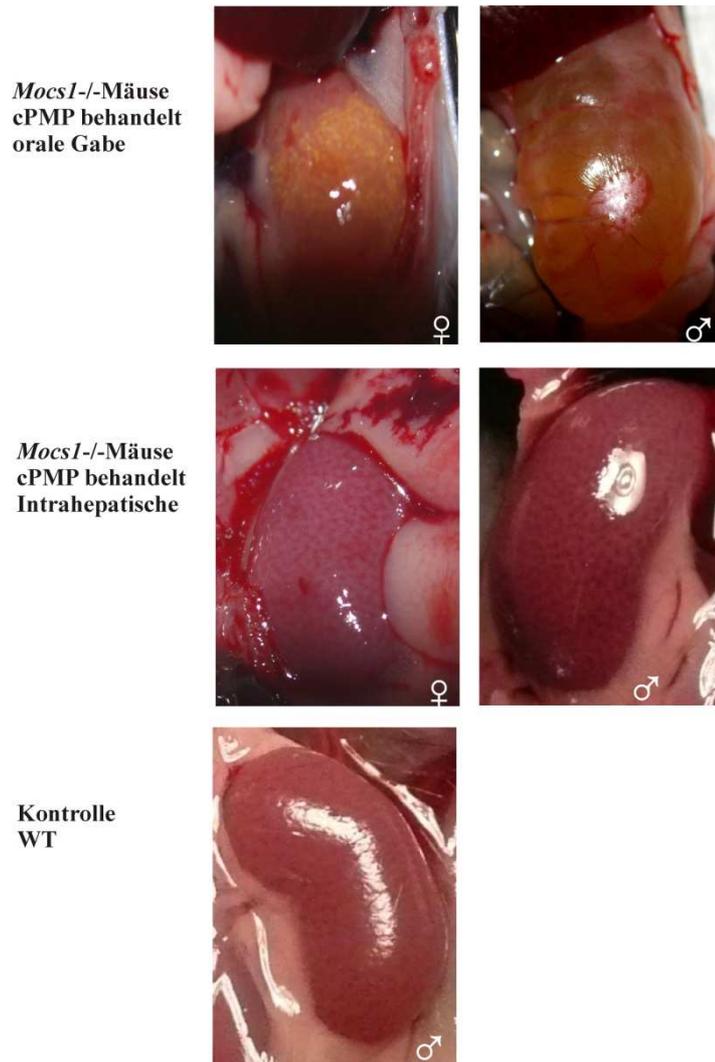


Abb. 3.6.: Vergleich der Nieren mit oraler Gabe und intrahepatischer Injektion von cPMP. Die Tiere wurden abgetötet am d 62 nach Umstellung auf orale Gabe im Vergleich zu fortgeführter intrahepatischer Applikation von cPMP und einem unbehandelten Wildtyp (WT) im gleichen Alter.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass eine gesteigerte cPMP-Gabe zu einer Erhöhung des MPT-Gehalts in der Leber führt und damit auch zur Zunahme der Enzymaktivitäten von SOX und XDH. Durch die erhöhte XDH-Aktivität konnten die Xanthinablagerungen in der Niere verhindert werden. Die orale Gabe von cPMP verhindert ebenfalls den Phänotyp der MoCo-Defizienz, jedoch ineffektiver als die intrahepatischen Injektionen. Die geringere Restaurationsrate der Enzymaktivitäten nach der oralen Gabe führte im Mausmodell erneut zu Xanthinablagerungen in der Niere und damit zu einer verringerten Lebensdauer im Vergleich zur intrahepatischen Applikation.

### 3.1.2. Somatische Gentherapie *Mocs1*-defizienter Mäuse

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Substitutionstherapie mit cPMP den Phänotyp der MoCo-Defizienz erfolgreich aufheben kann (siehe [40] und Kapitel 3.1.1.). Diese Therapie würde aber lebenslange, wöchentliche Injektionen von cPMP erfordern, was einen erheblichen finanziellen Aufwand darstellt. Aus diesem Grund wurden andere Behandlungsalternativen, wie die somatische Gentherapie, in Betracht gezogen. Als Modell dienten *Mocs1*-defiziente Mäuse, die nicht mehr in der Lage waren cPMP, das erste Produkt der MoCo-Biosynthese zu bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl nichtvirale als auch virale Methoden untersucht. Für beide Arten der Gentherapie wurde eine Expressionskassette benötigt, die die codierenden Sequenzen für die Proteine MOCS1A und MOCS1B beinhaltet.

#### 3.1.2.1. Funktionelle Überprüfung der *MOCS1*-Expressionskassette in transgenen Mäusen

In vorangegangenen Experimenten wurde das Plasmid pRitaIX kloniert, welches die humane *MOCS1*-Expressionskassette beinhaltet [52]. Die für die somatische Gentherapie verwendete Expressionskassette enthält den CMV-Enhancer, den humanen  $\beta$ -Aktin-Promotor, das humane *MOCS1*-Gen und die BGH-Poly-A-Sequenz. Für das *MOCS1*-Gen wurden drei verschiedene mRNA-Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen in der 5' Region des Gens entstehen. Sie unterscheiden sich in sich gegenseitig ausschließenden Startpunkten und einem fakultativen Intron im Exon 1. Die hier benutzte Isoform entspricht, wie in Gross-Hardt und Reiss (2002) beschrieben, der „Reiss“-Variante und beinhaltet Exon 1b,1c und 1d [93]. Außerdem enthält die *MOCS1*-Expressionskassette Exon 2 bis Exon 9, eine verkürzte Form des Intron 9, sowie Exon 10. Intron 9 ist für das alternative Spleißen im 3' Bereich erforderlich, welches zur Expression der beiden Proteine MOCS1A und MOCS1B führt (siehe Abb. 3.7.) [39].

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine geeigneten Antikörper für die Untersuchung der MOCS1A- und MOCS1B-Proteine zur Verfügung stehen, wurde die Funktionalität der Expressionskassette und des Alternativen Spleißens *in vivo*, sprich im transgenen Tiermodell, untersucht.

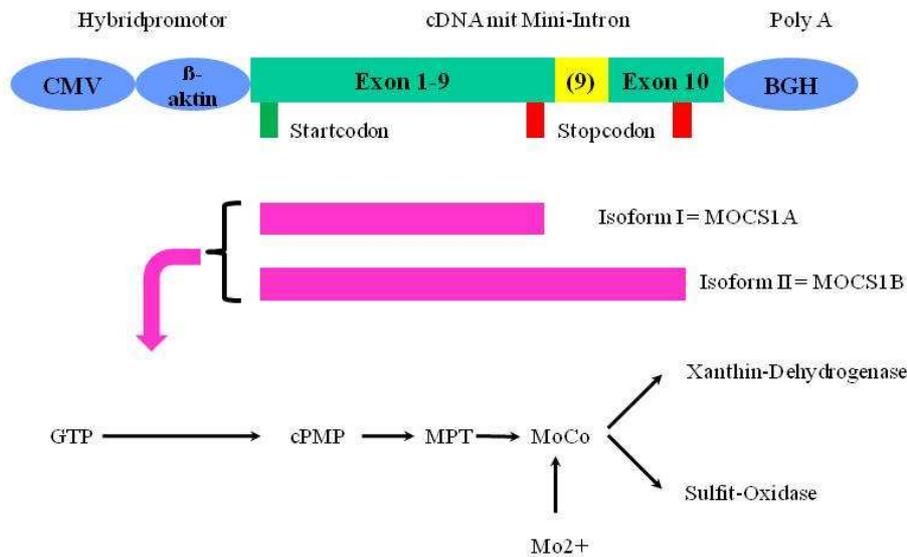


Abb. 3.7.: *MOCS1*-Expressionskassette. Die Expressionskassette des *MOCS1*-Gens mit Exon 1 bis 10 ist grün dargestellt. Das für das alternative Spleißen erforderliche Intron 9 ist gelb. Die transkriptionsregulierenden Elemente (CMV-Enhancer,  $\beta$ -Aktin-Promotor, BGH Poly-A-Sequenz) sind blau.

Transgene Tiere, die in jeder Zelle den linearisierten Vektor pRitaIX enthielten, wurden mit heterozygoten *Mocs1*-defizienten *Knockout*-Mäusen verpaart. Damit wurden homozygote *Mocs1-Knockout*-Mäuse hergestellt, welche zusätzlich in jeder Zelle den linearisierten Expressionsvektor im Genom integriert (rhuman+) hatten [52].

Teil der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob die Vektor-exprimierten Proteine den Phänotyp der Moco-Defizienz aufheben können. Fünf Verpaarungen von jeweils zwei Mäusen mit dem Genotyp *Mocs1*<sup>+/-</sup> rhuman+ resultierten in 56 Nachkommen. Davon waren 15 Tiere *Mocs1*<sup>-/-</sup> (27 %). Von diesen 15 Tieren trugen 10 das rekombinante Transgen (rhuman+). Die verbleibenden *Mocs1*<sup>-/-</sup>-rhuman- Mäuse starben im Alter von 4 bis 12 d, was der bereits beschriebenen Lebenserwartung *Mocs1*-defizienter Mäuse entspricht [33]. In den transgenen Mäusen konnte die Expression des humanen *MOCS1*-Gens mittels RT-PCR (siehe Abb. 3.8.), sowie die Funktion des darin beinhalteten alternativen Spleißmechanismus im 3' Bereich des Transkripts (siehe Abb. 3.9.) nachgewiesen werden.

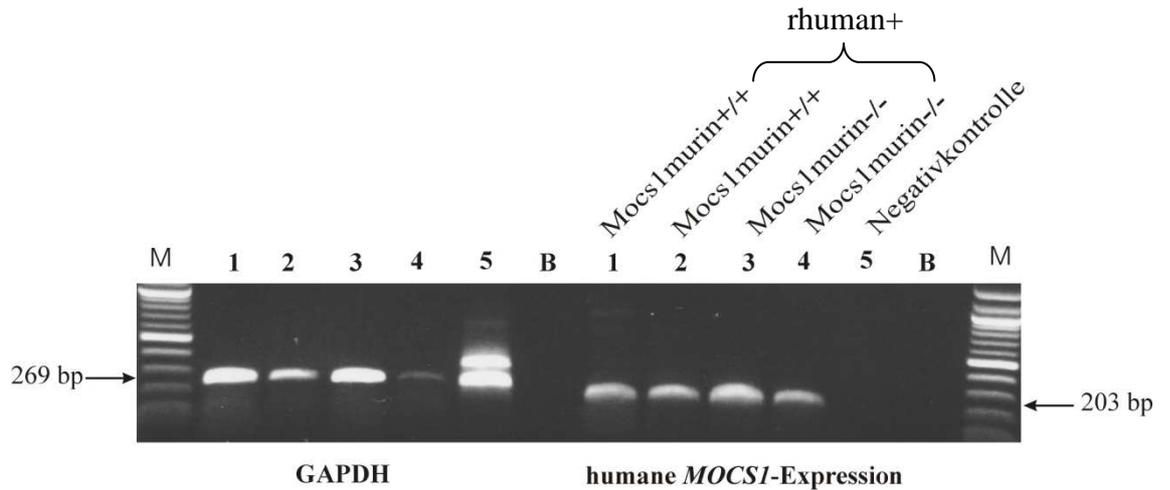


Abb. 3.8.: RT-PCR Humane *MOCS1*-Expression (rhuman+) im Hintergrund *Mocs1*-defizienter Mäuse, links: Kontroll-RT-PCR GAPDH erwartetes Fragment 269 bp, rechts: humane *MOCS1*-Expression erwartetes Fragment 203 bp; Tier 1-4 rhuman+, Tier 5 = Negativkontrolle *MOCS1*murin<sup>-/-</sup>-rhuman-, M=100 bp *Ladder*, B =Leerkontrolle

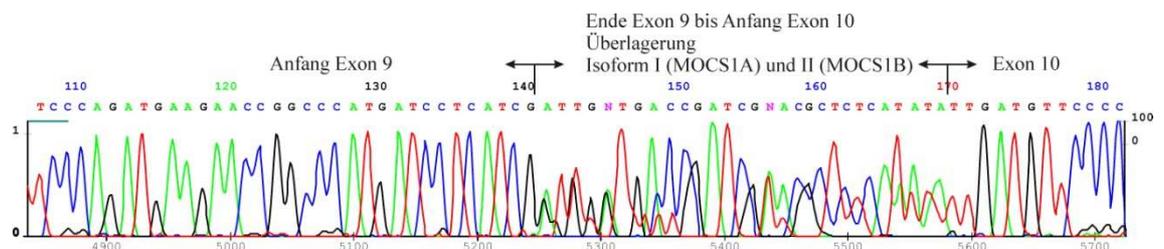


Abb. 3.9.: Sequenznachweis des humanen alternativen Spleißmechanismus in transgenen Mäusen mit integrierter humaner *MOCS1*-Expressionskassette.

Homozygot *Mocs1*-defiziente Mäuse, die das rekombinante Transgen trugen, waren von ihren gesunden Geschwistern in ihrer körperlichen Entwicklung (Abb. 3.10.) nicht zu unterscheiden. Abb. 3.11. zeigt die Gewichtsentwicklung der transgenen Mäuse.

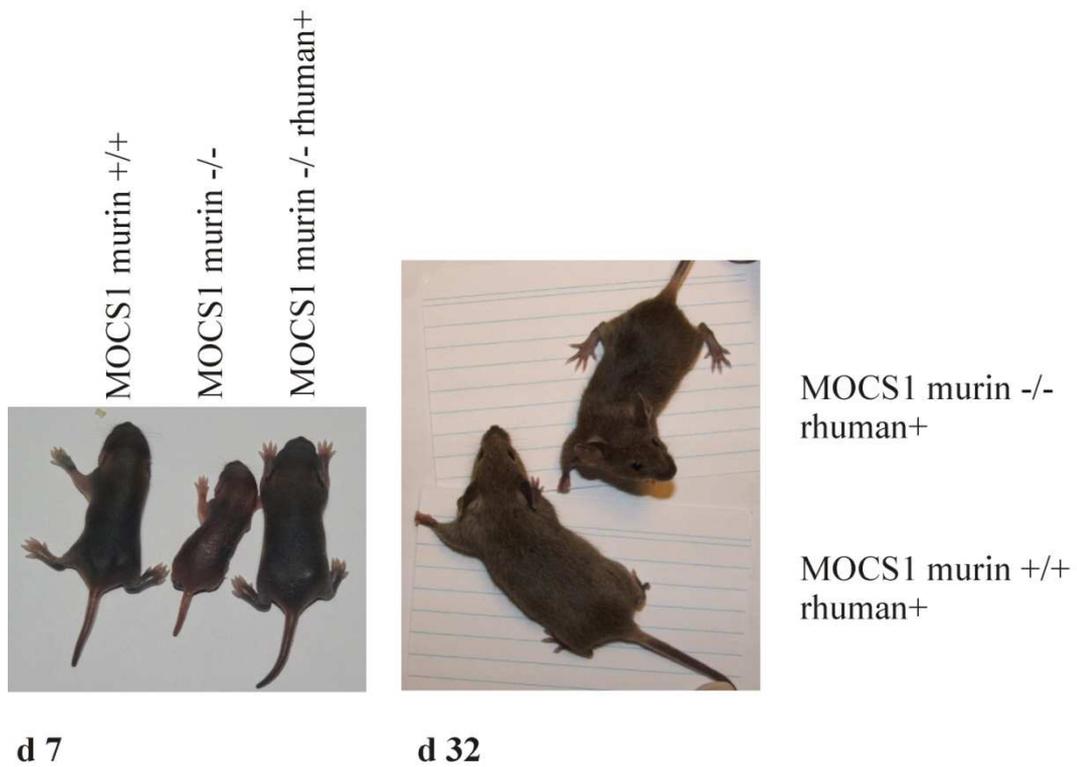


Abb. 3.10.: Vergleich homozygoter *Mocs1*-defizienter Mäuse, die das rekombinante Transgen tragen, mit ihren gesunden *Mocs1*+/+ und kranken *Mocs1*-/- Geschwistern am d 7 und d 32.

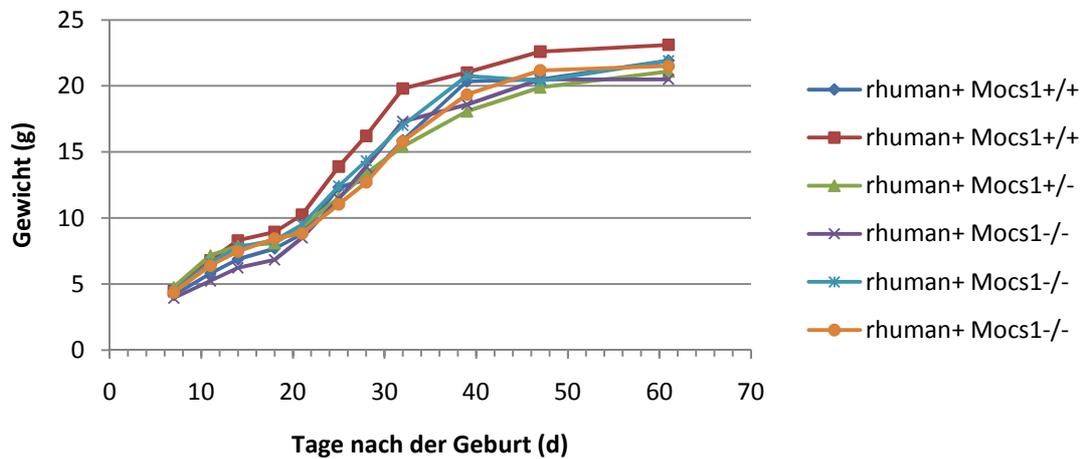


Abb. 3.11.: Gewichtsvergleich *Mocs1*-defizienter Mäuse mit dem Transgen rhuman+ im Vergleich zu gesunden Geschwistern

Weiterhin wurden die Tiere daraufhin untersucht, ob das eingebrachte Transgen Auswirkungen auf das Verhalten hatte. Dazu wurde der sogenannte *open field*-Test

angewandt. Dabei handelt es sich um eine Fläche von 100 x 100 cm, die in 100 Quadrate eingeteilt und mit einer 20 cm hohen Begrenzung umgeben ist. In einem Zeitraum von 5 min wurde gezählt, wie oft die Tiere die Begrenzungen der Quadrate übertraten (Bewegung). Zusätzlich wurde gezählt, wie oft sich die Tiere an die Außenwand lehnten (Anlehnen), sich aufrichteten (Aufrichten), erstarrten (Erstarren), putzten oder Kot absetzten. Abb. 3.12. zeigt das Ergebnis des Verhaltenstests von *Mocs1*<sup>-/-</sup>-*rhuman*<sup>+</sup> Tieren (n =6) im Vergleich zum Wildtyp (n = 6).

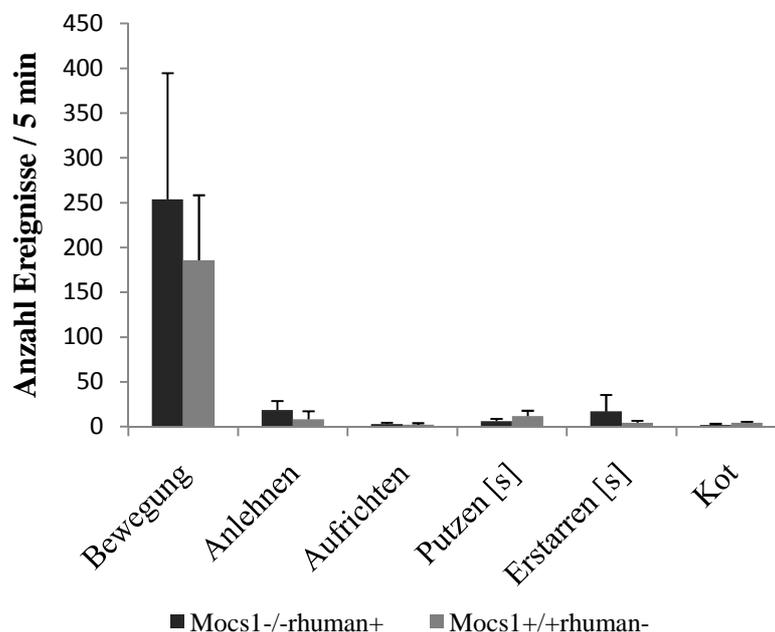


Abb. 3.12.: Verhaltenstest (*open field*) homozygoter *Mocs1*-defizienter Mäuse, die das rekombinante Transgen *rhuman*<sup>+</sup> tragen im Vergleich mit *Mocs1*<sup>+/+</sup> Mäuse ohne *rhuman*<sup>+</sup>, Lokomotion = Bewegung, Leaning = Anlehnung, Rearing = Aufrichten, Freezing = Erstarren.

Die transgenen Mäuse wiesen keine Verhaltensänderungen im Vergleich zu Wildtypmäusen auf.

Im Alter von 43 d wurden zwei *Mocs1*<sup>-/-</sup>-*rhuman*<sup>+</sup> Tiere für biochemische Analysen abgetötet. Die Untersuchung des Lebergewebes zeigte eine 50 % SOX-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Level (siehe Abb. 3.13.).

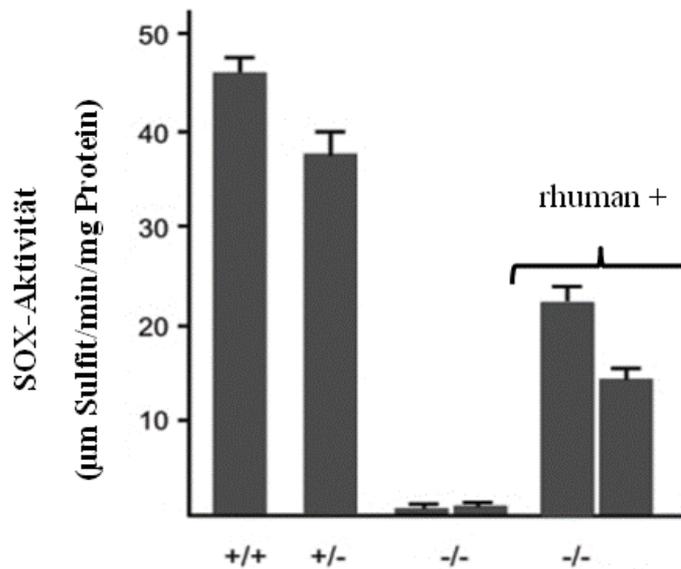


Abb. 3.13.: SOX-Aktivität in Lebergewebe von *Mocs1*-defizienten homozygoten sowie heterozygoten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp und Mäusen, die das rekombinante Transgen (rhuman+) tragen. Eine Säule entspricht dem Mittelwert einer dreifachen Messung der Leberenzymwerte eines Tieres.

Die verbleibenden 8 Tiere erreichten ein durchschnittliches Alter von 720 d. Die Expression der rekombinanten *MOCSI*-Kassette führt somit zur stabilen und langfristigen Aufhebung des Phänotyps der MoCo-Defizienz, was die Funktionalität des Konstrukts beweist.

### 3.1.2.2. Nackte Plasmid-DNA-Injektionen

Eine Möglichkeit der nichtviralen Gentherapie stellt die Injektion nackter Plasmid-DNA dar. Vorangegangene Experimente, bei denen pRitaIX mittels hydrodynamischer Schwanzveneninjektion in *Mocs1*-defiziente Mäuse eingebracht wurde, führten nicht zur Verbesserung des Phänotyps der MoCo-Defizienz [52]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Verwendung von Atellocollagen (AC) als Trägermaterial für die Plasmid-DNA die Gentransferrate erhöhen kann.

AC stellt eine Abwandlung von Kollagen, ein im Menschen und Tieren vorkommendes Strukturprotein des Bindegewebes, dar. Das Polymer hat ein sehr geringes Potential Immunreaktionen auszulösen. Unter physiologischen Bedingungen bildet es ähnliche Fasern aus wie natürliches Kollagen, was dazu führt, dass es lange Zeit im Körper stabil

vorliegt. Untersuchungen zeigten auch, dass nach der Abgabe des zu transportierenden Therapeutikums, AC auf dem gleichen Weg abgebaut wird, wie das körpereigene Kollagen [94]. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet es sich hervorragend als Vehikel für die somatische Gentherapie.

Für die Versuche wurde das Atellocollagen der Firma GfN (Wald-Michelbach, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0.05 % und das Plasmid pRitaIX mit der *MOCSI*-Expressionskassette in 1 x PBS gemischt und *Mocs1*-defizienten Mäusen intrahepatisch injiziert.

Die Behandlung fand entweder am d 4 nach der Geburt oder am d 40 statt. Da unbehandelte *Mocs1*-defiziente Mäuse unfähig sind cPMP, das erste Stoffwechselprodukt der MoCo-Biosynthese, zu bilden, sterben sie im Alter von durchschnittlich 7.5 d. Aus diesem Grund wurden die am d 40 behandelten Tiere mit intrahepatischen cPMP-Injektionen vorbehandelt (2 µg 1. Woche, 4 µg 2. Woche, 8 µg 3. Woche, 16 µg 4. Woche, 32 µg ab der 5. Woche täglich). Die am d 4 behandelten Tiere erhielten am d 2 eine einzelne Injektion mit 2 µg cPMP.

Als Kontrolle wurde ein Plasmid verwendet, bei dem *MOCSI* durch eine *enhanced green fluorescence protein (EGFP)* -Expressionskassette ausgetauscht wurde (pWajaI). Tabelle 3.2. zeigt eine Übersicht der Injektionsgruppen:

Genotyp	Alter	Expressionskassette	Atellocollagen	Anzahl	Lebensdauer d
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	d 40	<i>MOCSI</i>	+ AC	2	10 ± 1*
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	d 4	<i>MOCSI</i>	+ AC	8	17.8 ± 0.9
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	d 40	-	- AC	2	12 ± 1*
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	d 4	-	- AC	3	15.2 ± 5.5
<i>Mocs1</i> <sup>+/+</sup>	d 4	<i>EGFP</i>	+ AC	4	
<i>Mocs1</i> <sup>+/+</sup>	d 4	<i>EGFP</i>	- AC	2	
<i>Mocs1</i> <sup>+/+</sup>	d 4	-	+ AC	1	

Tabelle 3.2.: Übersicht Experimente nichtvirale Gentherapie mit Plasmid-DNA und Atellocollagen: *MOCSI* = pRitaIX; *EGFP*= pWajaI; \* Lebensdauer nach der Plasmidinjektion am d 40 und Absetzen der cPMP-Vorbehandlung.

Wie in Abb. 3.14. zu sehen ist, konnte nach der Injektion von pWajaI und Atellocollagen nur in einem von 4 behandelten Tieren eine schwache *EGFP*-Expression nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz konnte keiner Struktur des Lebergewebes zugeordnet werden. Vermutlich handelt es sich um den Einstichkanal.

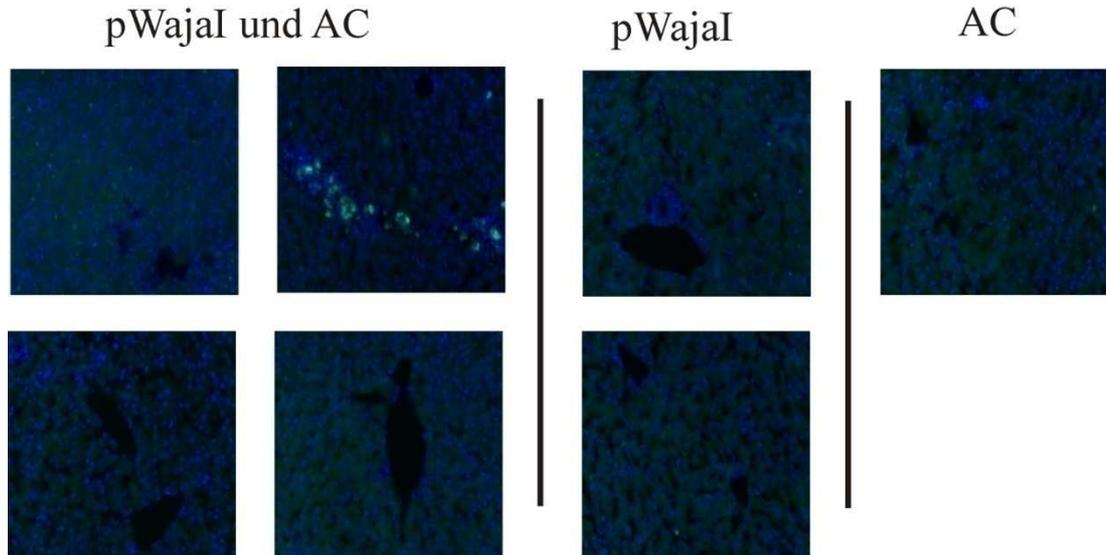


Abb. 3.14.: *EGFP*-Expression in der Leber von Wildtypmäusen nach nichtviraler Gentherapie mit nackter Plasmid-DNA und Atellocollagen als Carrier. pWajaI = Plasmidvektor mit *EGFP*-Expressionskassette, AC = Atellocollagen. Die Tiere wurden eine Woche nach der Behandlung mit 4 % Formaldehyd perfundiert. Die Leber wurde in PBS-Sucrose kryofixiert und Schnitte mit 3  $\mu$ m Dicke angefertigt. Die Fluoreszenz ist eine Überlagerung von EGFP (grün) und DAPI (blau). Expositionszeit 500 ms für DAPI, 500 ms für EGFP (1 s für negative Expression).

Die Lebensdauer der *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere, die eine intrahepatische Injektion von pRitaIX und Atellocollagen erhielten, war im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen nicht erhöht. Die Behandlung war sowohl am d 4 als auch am d 40 nicht in der Lage den Phänotyp der MoCo-Defizienz zu verbessern.

Zusammenfassend ist zuzusagen, dass die Verwendung von AC als Trägermaterial für Plasmid-DNA die Gentransferrate in Lebergewebe nicht erhöhen konnte.

### 3.1.2.3. AAV-vermittelter Gentransfer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, neben der Substitutionstherapie mit cPMP und der nichtviralen Gentherapie, die Möglichkeit eines viralen Gentransfers untersucht.

Virale Vektoren basieren auf unterschiedlichen Viren. Allen ist gemeinsam, dass die Genome codierende Regionen und *cis*-aktive regulatorische Elemente enthalten. Die codierenden Sequenzen schließen die genetischen Informationen für die viralen Proteine ein, die für die Verbreitung des Virus notwendig sind. Die *cis*-aktiven Sequenzen sind für das Verpacken und die Integration in die Wirtszelle verantwortlich. Für die Herstellung nichtreplikativer viraler Vektoren werden die kodierenden Regionen, ohne die *cis*-aktiven Sequenzen zu verändern, durch therapeutische Gene ersetzt. Die anschließende Einbringung des Vektors in Zellen wird durch die strukturellen viralen Proteine vermittelt, welche *in trans* von Helferplasmiden oder Helferviren codiert werden [53].

Aufgrund der geringen Genotoxizität wurden für die virale Gentherapie der MoCo-Defizienz rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) verwendet.

#### 3.1.2.3.1. Konstruktion der AAV-Vektor-Plasmide zur Herstellung der rAAV

Für die Herstellung der rAAV wurde ein Plasmidvektor benötigt, der das Transgen, welches in die Zellen eingeschleust werden soll, enthält. Zusätzlich zu der Expressionskassette enthält das Vektor-Plasmid AAV-HBA-*MOCSI* *cis*-aktive Elemente wie die *inverted terminal repeats* (ITRs) und das *woodchuck cis acting posttranscriptional regulatory element* (WPRE), die für die Transkription in der Zielzelle notwendig sind (siehe Abb. 3.15.). Im Rahmen der viralen Therapie wurde die *MOCSI*-Expressionskassette verwendet, deren Funktionalität, wie in Kapitel 3.1.2.1. beschrieben, im Mausmodell überprüft wurde. Als Kontrolle diente die *EGFP*-Expressionskassette, die anstelle von *MOCSI*, in das Plasmid kloniert wurde (AAV-HBA-*EGFP*, siehe Abb. 3.15.).

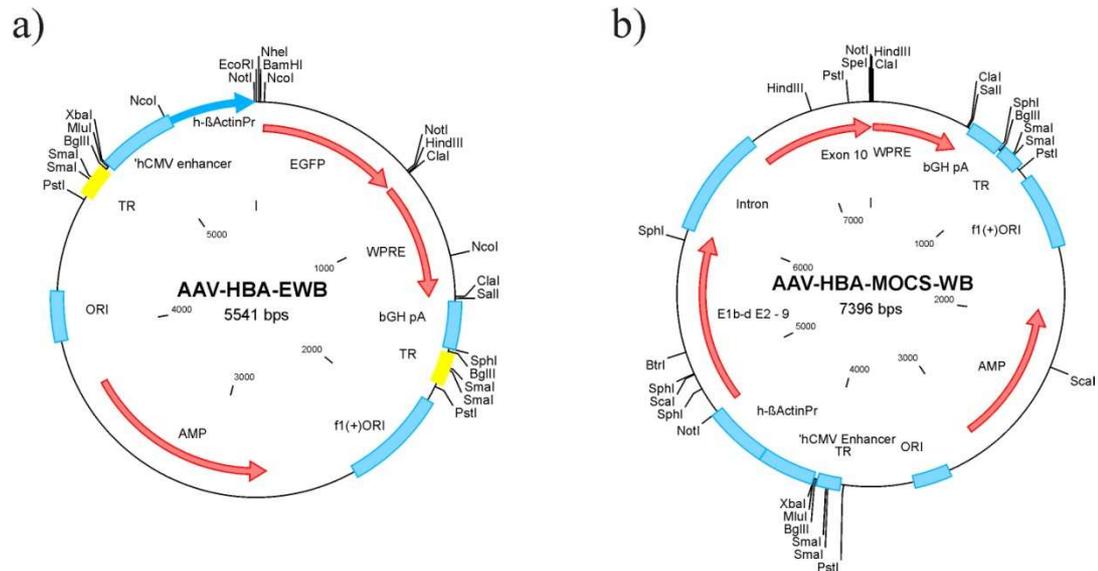


Abb. 3.15.: Übersicht Vektorplasmide für die rAAV-Herstellung TR = *inverted terminal repeats*, WPRE = *woodchuck cis acting posttranscriptional regulatory element*, EGFP = *enhanced green fluorescence protein*,

Die *MOCS1*-Expressionskassette wurde aus pRitaIX mit *NotI* herausgeschnitten und in das mit *NotI* linearisierten Plasmid AAV-HBA (bereitgestellt von Dr. Sebastian Kügler, Neurologische Klinik, Universitätsmedizin Göttingen) ligiert. In den ITRs kann es zu Rearrangements der DNA kommen, die zur Inaktivierung der Transkription in der Zielzelle führen. Aus diesem Grund wurde nach jedem Klonierungsschritt die Intaktheit über einen Restriktionsverdau überprüft. Die ITRs beinhalten vier *SmaI*-Schnittstellen. Das Plasmid wird in vier Fragmente geschnitten, wenn es zu keinen Rearrangements gekommen ist (siehe Abb. 3.16.: 4361 bp, 3013 bp und zweimal 11 bp (nicht sichtbar)). Andernfalls wird der Vektor nur linearisiert und ein 7396 bp Fragment entsteht. Das Plasmid konnte zur AAV-Produktion verwendet werden, wenn die Menge an linearisierten Fragmenten die zweifach geschnittenen nicht überstieg. Die rAAV-Partikel-Herstellung wurde von Dr. Sebastian Kügler durchgeführt.

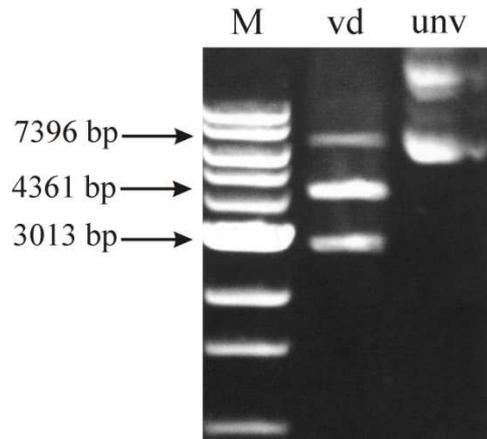


Abb. 3.16.: *SmaI*-Verdau zur Kontrolle der ITRs der AAV-Vektor-Plasmide. vd = AAV-HBA-MOCS1, 4361 bp, 3013 bp = alle *SmaI*-Schnittstellen vorhanden; 7396 bp = nicht mehr alle Schnittstellen intakt, dadurch Plasmid nur linearisiert; unv = Kontrolle unverdaut.

### 3.1.2.3.2. Untersuchung der Transduktionseigenschaften des AAV-Vektors

Das Ziel der Gentherapie ist die Restauration der MoCo-Biosynthese und damit auch der MoCo-abhängigen Enzyme SOX und XDH. Das Hauptproblem bei der MoCo-Defizienz ist der Mangel an SOX, deren Aufgabe es ist Sulfit in Sulfat umzuwandeln. Durch den Verlust der SOX-Aktivität reichern sich Sulfit, S-Sulfocystein und Thiosulfat im Organismus an, was zur Inaktivierung von Proteinen und letztendlich zum Zelltod führt. Die SOX findet man hauptsächlich in der Leber, wo das Enzym im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist [95]. Aus diesem Grund war es wichtig einen viralen Vektor zu verwenden, der hauptsächlich die Leber transduziert.

In dieser vorliegenden Arbeit wurden deshalb chimäre rAAV genutzt, für deren Herstellung AAV-Helferplasmide der Serotypen 1 und 2 in einem Verhältnis von 50:50 gemischt wurden. Der chimäre AAV1/2 Vektor zeigte in vorangegangenen Experimenten einen hohen Tropismus sowohl für die Leber als auch für Muskelgewebe [86]. Zur Überprüfung der Transduktionseigenschaften wurde ein AAV1/2-Vektor verwendet, der die *EGFP*-Expressionskassette trug (*AAV-EGFP*).

Der erste Teilversuch diente der Untersuchung, ob die Applikationsform einen Einfluss auf die Gewebeverteilung hat. Der *AAV-EGFP*-Vektor wurde intravenös und intrahepatisch in adulte C57B/6N Mäuse (d 40) injiziert und nach einem Monat Gefrierschnitte der Gewebe angefertigt. Die Applikation von  $1 \times 10^{10}$  tu rAAV führte

zur vollständigen Transduktion der Leber. Andere Organe, wie die Lunge, das Herz und das Gehirn zeigten nur eine schwache *EGFP*-Expression (siehe Abb. 3.17. a). Die intravenösen und intrahepatischen Applikationen des rAAV mit dem Serotyp 1/2 führten zu keinen Unterschieden in der Gewebeverteilung.

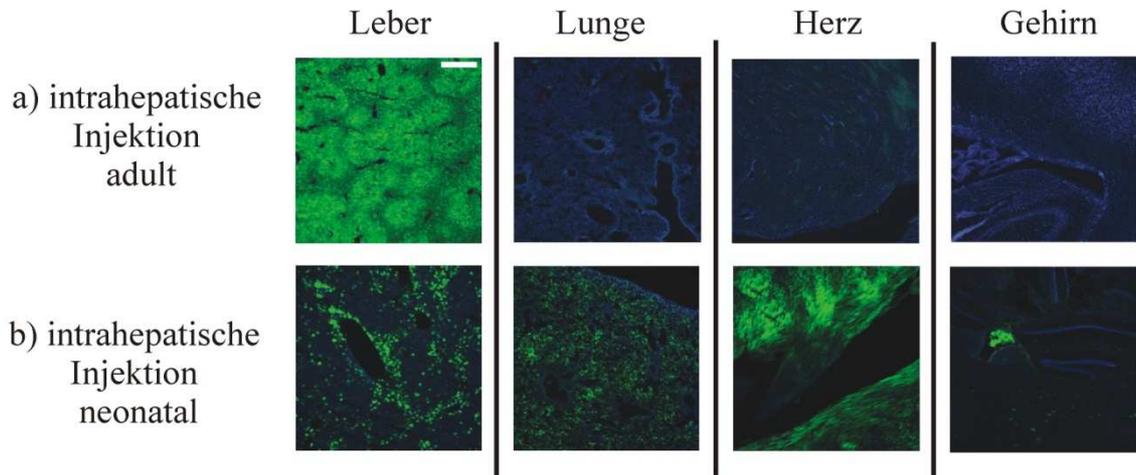


Abb. 3.17.: Transduktionseigenschaften des rekombinanten AAV1/2-Vektors einen Monat nach der Applikation. a) Wildtypmäuse erhielten eine AAV-EGFP-Injektion mit  $1 \times 10^{10}$  tu am d 40. b) Wildtypmäuse erhielten eine AAV-EGFP-Injektion mit  $4.5 \times 10^9$  tu am d 6. Jeweils nach einem Monat wurden die Mäuse mit 4 % Paraformaldehyd perfundiert. Das Gewebe wurde in PBS-Sucrose kryofixiert und Schnitte mit 3  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Die Fluoreszenz ist eine Überlagerung von EGFP (grün) und DAPI (blau). Die Bilder wurden mit einer Expositionszeit von 500 ms für DAPI und 500 ms für EGFP (1 s für negative Expression) und dem Fluoreszenzmikroskop BX60 von Olympus aufgenommen. Maßstabsbalken = 400  $\mu\text{m}$

Ein weiterer Versuch sollte klären, ob der Zeitpunkt der Injektion eine Auswirkung auf die Gewebeverteilung hatte. Aus diesem Grund erhielten 12 Wildtypmäuse (C57B/6N) am d 6 nach der Geburt eine intrahepatische Injektion mit  $5 \times 10^9$  tu AAV-EGFP.

Um die Gewebeverteilung des AAV-EGFP zu untersuchen wurden von drei Mäusen Gefrierschnitte hergestellt. Abb. 3.17. b zeigt, dass die neonatale Injektion des rAAV nicht nur zu einer Transduktion der Leber führt, sondern auch in der Lunge, im Herzen und im Gehirn. Vor allem in den Kardiomyocyten des Herzmuskels war eine starke Expression zu verzeichnen.

Zur Untersuchung der Langzeitexpression des rAAV wurden von jeweils drei Mäusen nach einer Woche, zwei Monaten und 10.5 Monaten Gefrierschnitte von Leber, Herz, Gehirn und Niere angefertigt.

In der ersten Woche nach der Injektion wurde die vollständige Transduktion der Leber nachgewiesen. Jedoch sanken die Transgen-exprimierenden Hepatozyten innerhalb des

ersten Monats bis auf 5 % der Zellen ab. Ab dem Zeitpunkt von einem Monat blieb die Anzahl der exprimierenden Leberzellen konstant (siehe Abb. 3.18. a). Im Gegensatz dazu sank die Expression in den Kardiomyocyten nach 10.5 Monaten nur auf ein Level von 50 % ab (siehe Abb. 3.18. b).

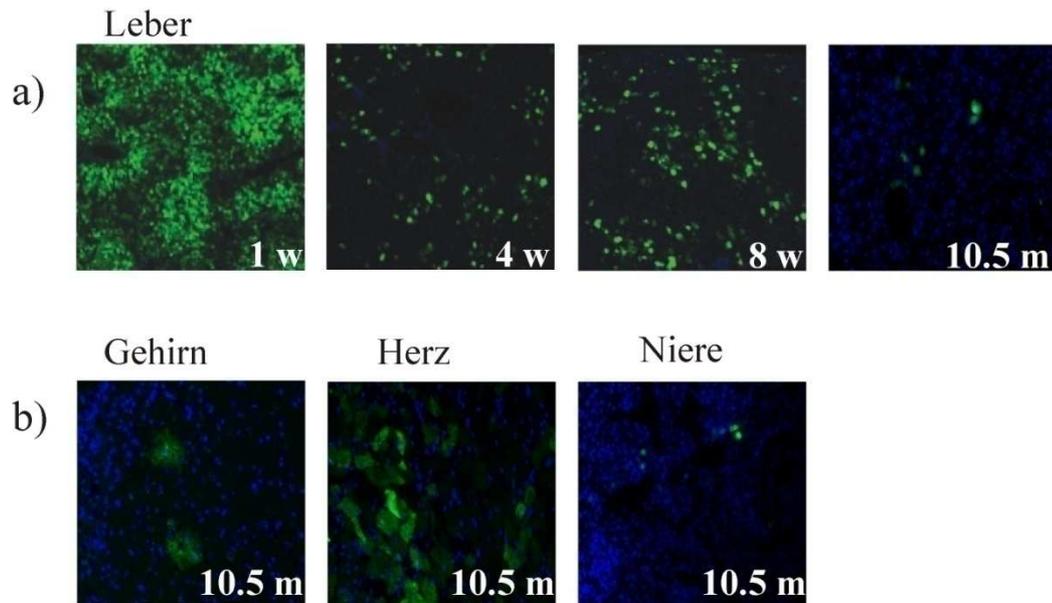


Abb. 3.18.: *EGFP*-Langzeitexpression nach AAV1/2-Transduktion. Wildtypmäuse erhielten eine AAV-*EGFP*-Injektion mit  $4.5 \times 10^9$  tu am d 6. Nach einer Woche, 4 Wochen, zwei und 10.5 Monaten wurden die Mäuse mit 4 % Paraformaldehyd perfundiert. Das Gewebe wurde in PBS-Sucrose kryofixiert und Schnitte mit  $3 \mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Die Fluoreszenz ist eine Überlagerung von *EGFP* (grün) und DAPI (blau). Die Bilder wurden mit einer Expositionszeit von 500 ms für DAPI und 500 ms für *EGFP* (1 s für negative Expression) und dem Fluoreszenzmikroskop BX60 von Olympus aufgenommen.

Die unterschiedlichen Applikationsarten in Form der intrahepatischen oder intravenösen Injektion spielten keine Rolle für die Gewebeverteilung des viralen Vektors. Jedoch hatten die Applikationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Mausentwicklung einen großen Einfluss darauf, welche Gewebe transduziert wurden. Eine Injektion des rAAV im neonatalem Entwicklungsstadium hatte eine weitverbreitete Transduktion der Gewebe zur Folge. Bei den Tieren, die im adultem Entwicklungsstadium behandelt wurden, begrenzte sich die Transduktion dagegen hauptsächlich auf das Lebergewebe.

#### 3.1.2.4. Virale Gentherapie *Mocs1*-defizienter Mäuse

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen AAV-EGFP-Applikationsversuche zeigten, dass der Serotyp 1/2 die Leber und damit das Hauptzielorgan für eine Behandlung der MoCo-Defizienz transduzierte. Der nächste Schritt war die Behandlung *Mocs1*-defizienter Mäuse mit dem AAV-MOCSI.

Die Untersuchungen mit AAV-EGFP zeigten außerdem eine unterschiedliche Gewebeverteilung zwischen Mäusen, die im neonatalem oder adultem Entwicklungsstadium mit rAAV behandelt wurden. Aus diesem Grund wurden zwei Gruppen *Mocs1*-defizienter Mäuse in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit dem AAV-MOCSI-Vektor behandelt.

##### 3.1.2.4.1. Intrahepatische Applikation

Die erste Gruppe *Mocs1*-defizienter Mäuse wurde im neonatalem Entwicklungsstadium behandelt, das heißt am d 1 und d 4 nach der Geburt.

Heterozygote *Knockout*-Mäuse (*Mocs1*<sup>+/-</sup>) wurden verpaart und alle Nachkommen am d 1 nach der Geburt mit  $1 \times 10^9$  tu entweder mit AAV-MOCSI (n = 9) oder AAV-EGFP (n = 10) behandelt. Nach der Genotypisierung wurden die homozygoten *Knockout*-Mäuse (*Mocs1*<sup>-/-</sup>) am d 4 mit  $4 \times 10^9$  tu der entsprechenden Viruspräparation wiederholt behandelt. Die AAV-EGFP-injizierten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere starben nach durchschnittlich 8,4 d (siehe Abb. 3.19.). Dagegen erreichten die AAV-MOCSI-behandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere eine durchschnittliche Lebensdauer von 302 d und eine maximale Lebensdauer von 666 d. Die Autopsien der verstorbenen Tiere zeigten eine Veränderung der Nieren, die wie in Kapitel 3.1.1. (siehe Abb. 3.1.) bereits beschrieben, auf eine verminderte Aktivität der XDH zurückzuführen war.

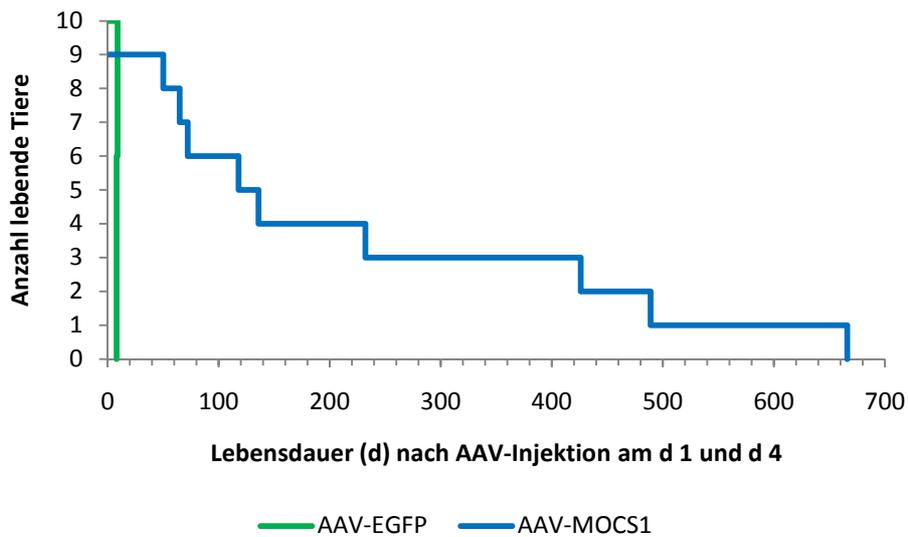


Abb. 3.19.: Lebensdauer von d1 und d4 AAV-MOCSI-behandelten *Mocs1*-defizienten Mäusen (blaue Linie), Kontrolle AAV-EGFP-behandelte *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere (Grüne Linie)

Bis auf die obstruierten Nieren, die nach dem Abtöten der Mäuse beobachtet wurden, waren die AAV-MOCSI-behandelten Tiere nicht von ihren gesunden Geschwistern zu unterscheiden (siehe Abb. 3.20.)

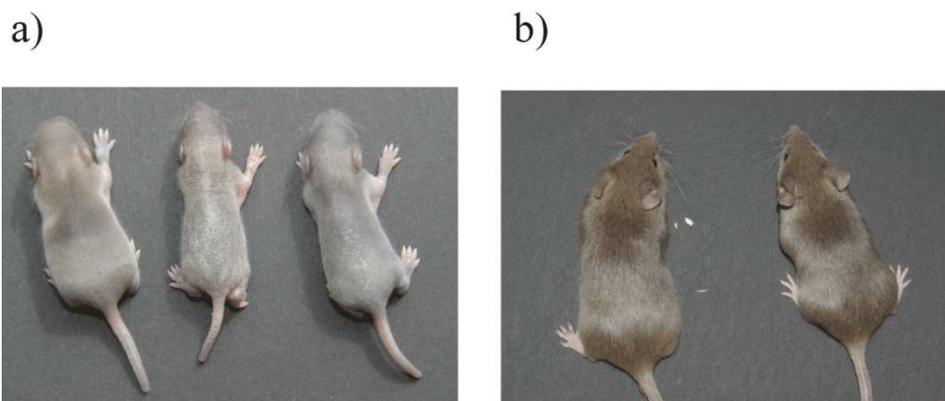


Abb. 3.20.: Phänotyp homozygoter *Mocs1*-defizienter Mäuse nach der Behandlung mit AAV-MOCSI. a) Gesunde heterozygote Maus im Alter von 8 d (links), im Vergleich mit gleichaltriger AAV-EGFP-injizierter homozygoter *Mocs1*-defizienter Maus (Mitte) und einem am d1 und d4 AAV-MOCSI-behandeltem homozygoten *Mocs1*-defizienten Tier (rechts). b) die gleichen Tiere (rechts und links in a) im Alter von 66 d, Das AAV-EGFP-behandelte Tier starb am d 9.

Um den Erfolg der Gentherapie zu verifizieren, wurden sowohl die Enzymaktivitäten als auch das Verhalten der Mäuse untersucht. Zwei AAV-MOCSI-behandelte Mäuse wurden zusammen mit zwei gesunden Geschwistern (*Mocs1*<sup>+/+</sup> und *Mocs1*<sup>+/-</sup>)

abgetötet (d 73 und d 64). Die Lebern wurden präpariert und biochemisch untersucht. Es wurde eine SOX-Aktivität von 5 % im Vergleich zum Wildtypniveau gemessen (siehe Abb. 3.21.). Der Sulfitwert im Urin war vergleichbar mit den Werten, die bei den transgenen *Mocs1*<sup>-/-</sup>-rhuman<sup>+</sup> Mäusen beobachtet wurden (50 mg/Liter). Im *open field*-Test zeigten die AAV-*MOCSI*-behandelten Tiere keine Unterscheide zu Wildtyptieren, wobei die Parameter Bewegung, Putzen, Anlehnen, Aufrichten und Erstarren zu Grunde gelegt wurden. Alle Mäuse der neonatal behandelten Gruppe wurden untereinander in unterschiedlichen Kombinationen verpaart. Jedoch wurde nur ein Tier geboren, welches bereits am d 1 nach der Geburt verstarb.

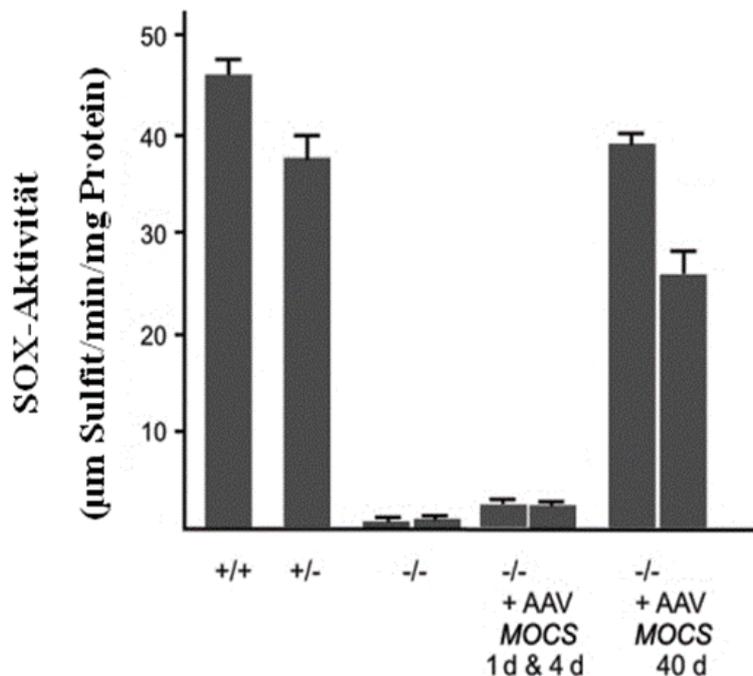


Abb. 3.21.: SOX-Aktivität AAV-*MOCSI*-behandelter *Mocs1*-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren

Die Therapie der *Mocs1*-defizienten Mäuse mit AAV-*MOCSI*-Injektionen am d 1 und d 4 nach der Geburt konnten den Phänotyp der MoCo-Defizienz verbessern. Die behandelten Tiere erreichten eine durchschnittliche Lebensdauer von 302 d. Der Erfolg der Behandlung wurde aber dadurch gemindert, dass Verpaarungen der behandelten Tiere keine Nachkommen hervorbrachten und 5 von 9 Mäusen bereits in einem Alter unter 200 d starben.

Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die Behandlung von *Mocs1*-defizienten Mäusen mit AAV-*MOCS1* am d 40 den Phänotyp der MoCo-Defizienz besser aufheben konnte.

Neun *Mocs1*-defiziente Mäuse wurden am d 40 mit jeweils  $1 \times 10^{10}$  tu AAV-*MOCS1* behandelt. Da *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse unbehandelt im Alter von durchschnittlich 7.5 d sterben, war es notwendig die Mäuse bis d 40 täglich mit cPMP-Injektionen zu behandeln (2 µg 1. Woche, 4 µg 2. Woche, 8 µg 3. Woche, 16 µg 4. Woche, 32 µg ab der 5. Woche täglich). Als Kontrolle dienten 10 *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die mit  $1 \times 10^{10}$  tu AAV-*EGFP* behandelt wurden. Diese Tiere starben im Durchschnitt 11 d nach der Behandlung mit rAAV. Die AAV-*MOCS1*-behandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup>-Mäuse erreichten eine durchschnittliche Lebensdauer von 356 d und die maximale Lebensdauer betrug 499 d (siehe Abb. 3.22.).

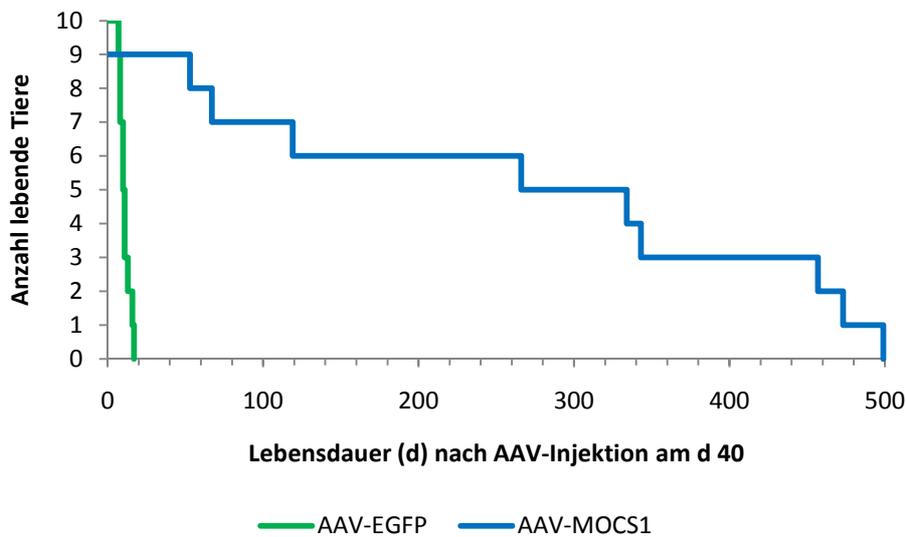


Abb. 3.22.: Lebensdauer von am d 40 AAV-*MOCS1*-behandelten *Mocs1*-defizienten Mäusen (blaue Linie), Kontrolle AAV-*EGFP*-behandelte *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere (Grüne Linie)

8 Tiere dieser Gruppe wurden verpaart und waren fertil. Alle Nachkommen (n = 95) starben zwischen d 1 und d 13 (durchschnittlich 7.5 d, siehe Abb. 3.23.).

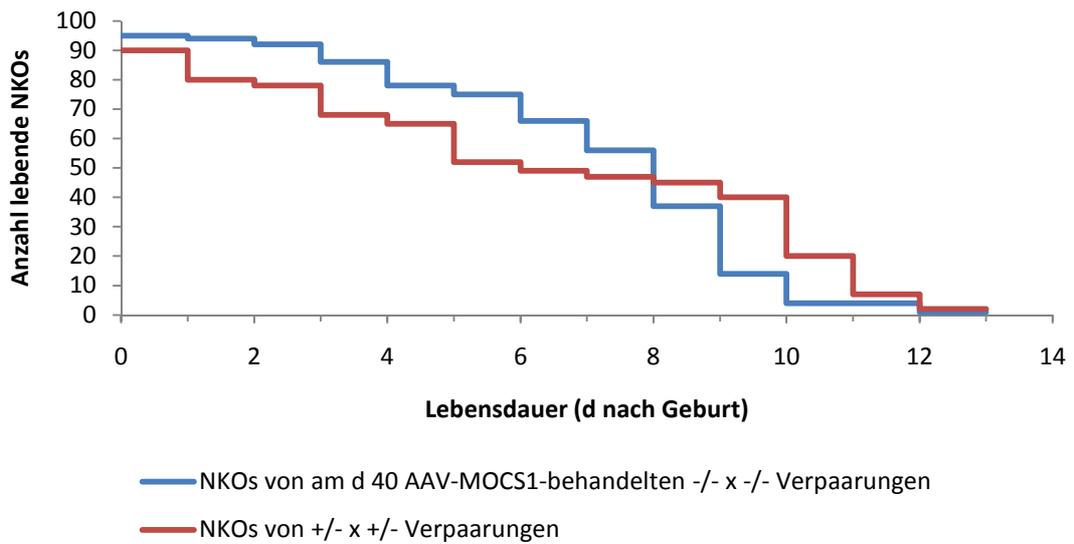


Abb. 3.23.: Lebensdauer NKOs AAV-*MOCS1*-behandelter *Mocs1*<sup>-/-</sup> Verpaarungen im Vergleich zu *Mocs1*<sup>-/-</sup> NKOs heterozygoter *Mocs1*-Knockout-Mäuse.

Wie die am d 1 und d 4 mit AAV-*MOCS1* behandelten Tiere, zeigten die am d 40 behandelten Mäuse im *open field*-Test keine Unterschiede zu Wildtypmäusen. Zwei Mäuse wurden für biochemische Untersuchungen abgetötet (d 60 und d 80). Der MPT-Gehalt in der Leber betrug ~50 % und die SOX-Aktivität 75 % im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 3.21.). Der Sulfitwert im Urin war vergleichbar mit den Werten, die bei den transgenen *Mocs1*<sup>-/-</sup>rhuman<sup>+</sup> Mäusen gefunden wurden (50 mg/Liter).

Die Behandlung *Mocs1*-defizienter Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung hatte keine große Differenz in der Lebensdauer zur Folge. Tiere die am d 1 und d 4 behandelt wurden erreichten durchschnittlich 302 d und am d 40 behandelte Mäuse erreichten 356 d. Der Unterschied zwischen den zwei Zeitpunkten lag darin, dass die Tiere, die im adultem Alter die AAV-*MOCS1*-Injektionen bekamen, eine wesentlich höhere SOX-Aktivität in der Leber aufwiesen. Die Behandlung mit AAV-*MOCS1* am d 40 konnte somit die MoCo-Biosynthese effektiver restaurieren als die Behandlung am d 1 und d 4. Das äußerte sich auch darin, dass nur die am d 40 behandelten Tiere Nachkommen zeugten.

### 3.1.2.4.2. Intravenöse Applikation

Vergleichende Studien mit AAV-*EGFP* (siehe Kapitel 3.1.2.3.2.) zeigten, dass sowohl die intrahepatische als auch die intravenöse Applikation zur Transduktion der gleichen Gewebetypen führte. Vorhergehende Studien zeigten, dass der Erfolg einer viralen Gentherapie von der Applikationsart abhängig sein kann [96]. Aus diesem Grund wurde auch die Möglichkeit einer intravenösen AAV-*MOCSI*-Injektion untersucht.

Die intravenöse Injektion von AAV-*MOCSI* erfolgte über die Schwanzvene von sedierten Mäusen. Für diese Applikationen mussten die Mäuse ein Mindestgewicht von 15 g aufweisen, was einem Alter von ca. 40 d entspricht. Aus diesem Grund wurden die *Mocs1*-defizienten Mäuse bis d 40 mit täglichen intrahepatischen cPMP-Gaben vorbehandelt (2 µg 1. Woche, 4 µg 2. Woche, 8 µg 3. Woche, 16 µg 4. Woche, 32 µg ab der 5. Woche täglich), um eine entsprechende Größe der Tiere zu erreichen. Am d 40 erhielten 5 Tiere eine intravenöse Injektion mit  $4 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI*. Zwei Tiere aus der Gruppe erreichten nach dem Absetzen der cPMP-Behandlung eine Lebensdauer von durchschnittlich 500 d (siehe Abb. 3.24. blaue Linie). Die anderen drei Tiere wurden ab d 152 für weitergehende Reapplikationsstudien genutzt (siehe Kapitel 3.1.2.4.4. Reapplikation).

Als Negativkontrollen dienten 10 Mäuse, die den viralen Vektor AAV-*EGFP* injiziert bekamen, bei dem die *MOCSI*-Expressionskassette mit dem *EGFP*-Reportergen ausgetauscht war. Die Tiere starben im Durchschnitt 11 d nach der letzten cPMP-Injektion.

Alle intravenös AAV-*MOCSI*-behandelten Tiere wurden verpaart und waren fertil. Die Nachkommen aus diesen Verpaarungen (n = 64) starben im Durchschnitt 5.35 d nach der Geburt. Das entsprach der geringen Lebenserwartung unbehandelter *Mocs1*-defizienter Mäuse, die im Durchschnitt am d 7.5 nach der Geburt sterben.

Die intravenöse Injektion von AAV-*MOCSI* am d 40 konnte den Phänotyp der MoCo-Defizienz erfolgreich aufheben. Kein Tier starb unter 200 d und alle waren fertil. Das sprach dafür, dass es keinen Unterschied gab, ob die Tiere am d 40 mit intrahepatischen oder intravenösen Injektionen behandelt wurden (siehe Abb. 3.22. blaue Linie und Abb. 3.24. blaue Linie)

### 3.1.2.4.3. Deeskalationsstudien

Für eine erfolgreiche Gentherapie ist es nicht nur notwendig zu wissen, zu welchem Zeitpunkt die Injektion erfolgen sollte, und welche Applikationsart für das Zielgewebe am eigensten ist. Es ist auch wichtig zu bestimmen, welche Dosis an viralen Vektoren notwendig ist, um den Phänotyp der zu behandelten Krankheit aufzuheben.

Aus diesem Grund wurde die geringste Dosis für eine Aufhebung der MoCo-Defizienz im Tiermodell bestimmt. 20 *Mocs1*-defiziente Mäuse wurden bis d 40 mit cPMP vorbehandelt. Am d 40 erhielten sie eine intravenöse Schwanzveneninjektion mit verschiedenen Dosen an AAV-*MOCSI*. Die erste Gruppe erhielt eine Injektion mit  $1.5 \times 10^8$  tu AAV-*MOCSI* ( $n = 8$ ), was einer 30fach reduzierten Dosis im Vergleich zu der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Injektion von  $4 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI* entspricht. Die Mäuse dieser Gruppe starben im Durchschnitt  $28.75 \pm 6.5$  d nach der Beendigung der cPMP-Vorbehandlung und der AAV-*MOCSI*-Injektion (siehe Abb. 3.24. rote Linie). Die 30fach reduzierte Dosis reichte also nicht aus, den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufzuheben.

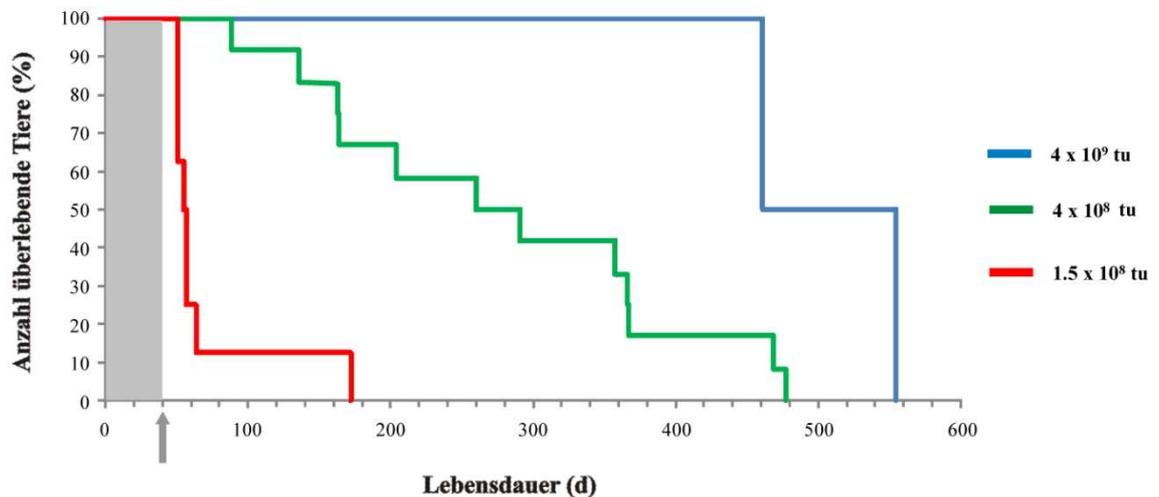


Abb. 3.24.: AAV-*MOCSI*-Deeskalationsstudien. Lebensdauer *Mocs1*-defizienter Mäuse, die bis d 40 mit cPMP (grauer Balken) vorbehandelt wurden und am d 40 verschiedene Mengen AAV-*MOCSI* injiziert bekamen. Gruppe A (blaue Linie) wurde mit  $4 \times 10^9$  tu behandelt ( $n=2$ ). Gruppe B (rote Linie) erhielt  $1.5 \times 10^8$  tu AAV-*MOCSI* ( $n=8$ ). Gruppe C (grüne Linie) wurde mit  $4 \times 10^8$  tu AAV-*MOCSI* behandelt ( $n=12$ ).

In einem weiteren Versuch wurde die Verabreichung einer intermediären Dosis von  $4 \times 10^8$  tu AAV-*MOCSI* ( $n = 12$ ) untersucht. Die Tiere dieser Gruppe starben im Durchschnitt  $238.5 \pm 124.4$  d nach der AAV-*MOCSI*-Injektion und dem Absetzen der

cPMP-Vorbehandlung am d 40 (siehe Abb. 3.24. grüne Linie). Alle Mäuse dieser Gruppe wurden verpaart. Nur ein Tier aus der Gruppe erzeugte Nachkommen, die innerhalb der erwarteten Lebensdauer für *Mocs1*-defiziente Mäuse starben.

Die Dosis von  $4 \times 10^8$  tu AAV-*MOCSI* reicht zwar, dass der Phänotyp der MoCo-Defizienz verbessert wird. Für die vollständige Aufhebung ist sie jedoch zu gering.

#### 3.1.2.4.4. Reapplikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die MoCo-Defizienz erfolgreich mit einer viralen Gentherapie behandelt werden konnte. Das murine Tiermodell kann aber nur eine Vorhersage für 2-3 Jahre machen. Die Notwendigkeit einer wiederholten Behandlung der Patienten mit MoCo-Defizienz kann somit nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde die Möglichkeit einer wiederholten Injektion des rAAV in Hinblick auf unterschiedliche Zeitpunkte für die Erstapplikation im Hintergrund des *Mocs1-Knockout*-Modells untersucht. *Mocs1*-defiziente Mäuse erhielten zu verschiedenen Zeitpunkten eine Injektion mit AAV-*MOCSI*. Der Erfolg der Injektion konnte so durch die Überlebensrate der Mäuse überprüft werden. Für die zweite Applikation wurde der rAAV-Vektor mit dem gleichen Serotyp 1/2 und dem Reporter gen *EGFP* verwendet. So konnte die erfolgreiche Transduktion des Gewebes mittels Fluoreszenz nach wiederholten Injektionen nachgewiesen werden.

Im ersten Experiment erfolgte die Konfrontation mit dem viralen Vektor im adulten Entwicklungsstadium der Tiere (siehe Abb. 3.25. a.). Dazu wurden 5 *Mocs1*-defiziente Mäuse mit cPMP-Injektionen bis d 40 vorbehandelt (2 µg 1. Woche, 4 µg 2. Woche, 8 µg 3. Woche, 16 µg 4. Woche, 32 µg ab der 5. Woche täglich). Am d 40 erhielten die Tiere eine intravenöse Injektion mit  $4 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI*. Die Reapplikation des rAAV-Vektors erfolgte drei Monate später. Dazu wurden drei Tieren aus der Gruppe  $4 \times 10^9$  tu AAV-*EGFP* intravenös injiziert. Die zwei verbliebenen Tiere dienten als Kontrolle für die AAV-*MOCSI*-Injektion und bekamen keine AAV-*EGFP*-Injektion. Sie erreichten eine durchschnittliche Lebensdauer von 500 d, was die erfolgreiche Erstapplikation bestätigt. Als Positivkontrolle für die zweite Injektion mit AAV-*EGFP* dienten zwei Wildtyp-Mäuse, die ebenfalls  $4 \times 10^9$  tu AAV-*EGFP* intravenös injiziert bekamen. Die Negativkontrolle für die *EGFP*-Expression waren zwei unbehandelte Wildtyp-Mäuse. Zwei Monate nach der AAV-*EGFP*-Injektion wurden die drei Tiere,

die AAV-EGFP erhielten, und die zwei unbehandelten Wildtypmäuse mit 4 % Formaldehyd-Lösung perfundiert und Gefrierschnitte der Leber angefertigt. Wie in Abb. 3.25. a zu sehen ist, war nach der zweiten rAAV-Injektion keine EGFP-Expression in der Leber zu beobachten, wenn die erste Konfrontation mit dem viralen Vektor im adulten Stadium (d 40) stattfand.

Des Weiteren untersuchten wir die Reapplikationsmöglichkeiten nach einer ersten Konfrontation mit dem viralen Vektor im neonatalem (d 1) und juvenilem (d 10 und d 20) Entwicklungsstadium der Mäuse (siehe Abb. 3.25 b-d). Jeweils drei *Mocs1*-defiziente Mäuse erhielten eine intrahepatische Injektion mit  $1 \times 10^9$  tu AAV-MOCSI entsprechend der Gruppen am d 1, d 10 oder d 20. Zwei Monate nach der ersten Injektion bekamen die Mäuse AAV-EGFP intravenös injiziert. Pro Gruppe dienten zwei Wildtyptiere als Positivkontrollen und erhielten zum gleichen Zeitpunkt eine intravenöse Injektion mit  $1 \times 10^9$  tu AAV-EGFP. Zwei unbehandelte Mäuse dienten als Negativkontrollen. Zwei Monate nach der AAV-EGFP-Injektion wurden alle Tiere mit 4% Formaldehyd-Lösung perfundiert und Gefrierschnitte der Lebergewebe angefertigt. Bei den Tieren, die am d 10 und d 20 die erste Injektion mit rAAV bekamen, konnte nach der AAV-EGFP-Injektion keine EGFP-Expression in der Leber nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25. b, c). Während bei den Mäusen, die am d 1 erstmals mit dem viralen Vektor konfrontiert wurden, eine starke Expression des Fluoreszenzmarkers nach der AAV-EGFP-Injektion dokumentiert werden konnte (siehe Abb. 3.25. d).

#### **3.1.2.4.5. Untersuchung der Induktion einer Immuntoleranz gegenüber dem viralen Vektor**

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass eine Reapplikation dann möglich war, wenn die erste Konfrontation mit dem viralen Vektor im neonatalem Entwicklungsstadium (d 1) stattfand. Da die Produkte der hier verwendeten *MOCSI*- und *EGFP*-Expressionskassetten keine Kreuzreaktionen untereinander in der Immunantwort auslösen, konnte untersucht werden, ob die neonatalen Injektionen eine Immuntoleranz gegenüber dem AAV-Capsid induzieren konnten. Aus diesem Grund bekamen zwei Tiere, zusätzlich zu der intrahepatischen Injektion von  $1 \times 10^9$  tu AAV-MOCSI am d 1, eine weitere intrahepatische AAV-MOCSI-Injektion am d 10 mit der gleichen Menge an Viruspartikeln ( $1 \times 10^9$  tu). Wie bei den vorhergehenden Versuchen

bekamen die Tiere zwei Monate später eine intravenöse Injektion mit  $1 \times 10^9$  tu AAV-*EGFP*. Zwei Wildtypiere wurden als Positivkontrolle für den Fluoreszenzmarker ebenfalls mit einer intravenösen  $1 \times 10^9$  tu AAV-*EGFP*- Injektion behandelt. Nach zwei weiteren Monaten wurden die Tiere mit 4 % Formaldehyd perfundiert und von den Lebern Gefrierschnitte angefertigt (siehe Abb. 3.25. e).

Im Gegensatz zur einer einzelnen AAV-*MOCSI*-Injektion am d 1 führte eine zweimalige Behandlung mit AAV-*MOCSI* am d 1 und am d 10 zu keiner EGFP-Expression in den Leberzellen *Mocs1*-defizienter Mäuse nach der zwei Monate späteren Injektion von AAV-*EGFP*. Eine Injektion des rAAV im neonatalem Entwicklungsstadium der Maus konnte keine Toleranz des Immunsystems gegenüber den rekombinanten Viruspartikeln induzieren.

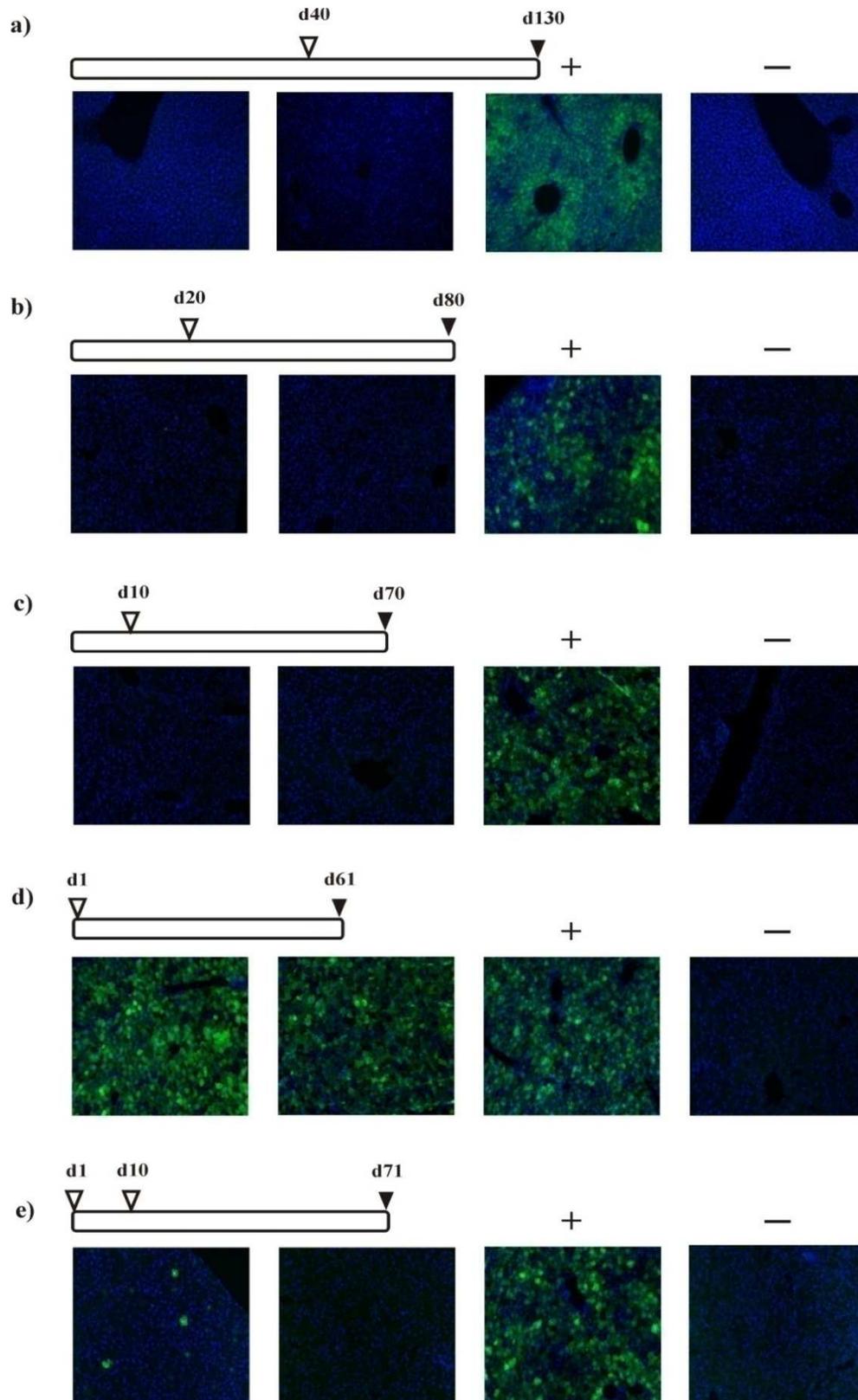


Abb. 3.25.: *EGFP*-Expression in Lebergewebe nach rAAV-Reapplikationen in verschiedenen Entwicklungsstadien: Die Tiere erhielten eine intrahepatische AAV-MOCSI-Injektion (offene Dreiecke) in verschiedenen Entwicklungsstadien entsprechend der Dreiecke über den Balken, gefolgt von einer AAV-EGFP-Injektion (Schwarze Dreiecke) zwei bzw. drei Monate nach der AAV-MOCSI-Injektion. += Positivkontrollen erhielten eine einzelne AAV-EGFP-Injektion. -= Negativkontrollen erhielten kein rAAV.

### 3.1.2.5. AAV-Integration

Bei den Versuchen mit den rekombinanten Virusvektoren, die die *MOCSI*- oder die *EGFP*-Expressionskassette trugen, war ein signifikanter Anstieg maligner Ereignisse in den Mäusen festzustellen: Von den insgesamt 19 intrahepatisch mit AAV-*MOCSI*-behandelten Tieren entwickelten drei Leberkrebs und ein Tier Darmkrebs. In der Gruppe der insgesamt 25 intravenös behandelten Tiere bildeten drei Hauttumore aus. Ein Tier verstarb in Folge eines Nierentumors. In der Kontrollgruppe der 12 AAV-*EGFP*-behandelten Wildtypiere bekam ein Tier einen Lebertumor.

Vier AAV-behandelte Tiere wurden auf eine mögliche AAV-Integration als Auslöser der malignen Ereignisse hin untersucht (siehe Tabelle 3.3.). Dazu wurden den verstorbenen Tieren Lebergewebe entnommen und genomische DNA isoliert. Die DNA wurde entweder mit dem Restriktionsenzym *BglIII*-verdaut oder unverdaut auf einem TAE-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) geblottet. Die Southern Blots wurden mit einer <sup>32</sup>P-markierten Sonde hybridisiert, die aus dem CMV-Enhancer und dem  $\beta$ -Aktin-Promotor der *MOCSI*-Expressionskassette bestand (siehe Abb. 3.26.).

Tier	Menge rAAV	Gruppe
1	4 x 10 <sup>9</sup> tu AAV- <i>MOCSI</i>	Deeskalation siehe S. 89
2	4 x 10 <sup>8</sup> tu AAV- <i>MOCSI</i>	Deeskalation siehe S. 89
3	5 x 10 <sup>9</sup> tu AAV- <i>MOCSI</i>	i.h. d 1 und d 4 siehe S. 83
4	1 x 10 <sup>10</sup> tu AAV- <i>MOCSI</i>	i.h. d 40 S. siehe S. 83
5	-	<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup> rhuman+ siehe S. 70
6	-	Wildtyp

Tabelle 3.3.: AAV-Integration: Übersicht der untersuchten Tiere, i.h. = intrahepatisch

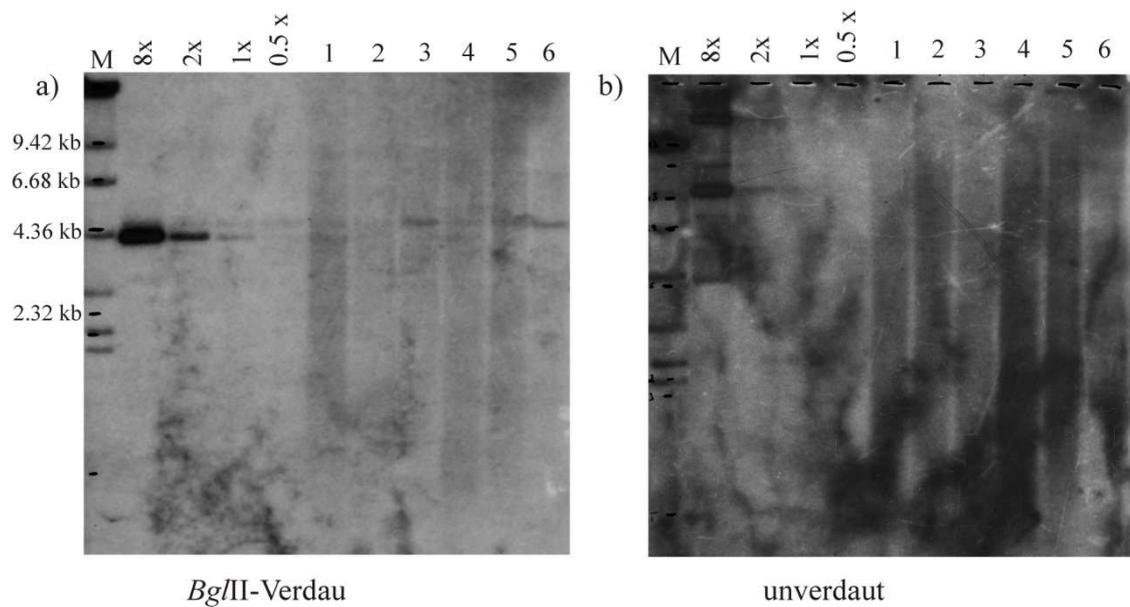


Abb. 3.26.: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA aus Lebern AAV-*MOCSI* behandelte Tier siehe Tabelle 3.3 a) Restriktionsverdau mit *Bgl*III, erwartetes Fragment 4223 bp b) DNA unverdaut aufgetragen.  $^{32}$ P-markierte Sonde: CMV Enhancer und  $\beta$ -Aktin-Promotor der *MOCSI*-Expressionskassette, Kontrollen: Verdünnungsreihe mit Plasmid AAV-HBA-*MOCSI*. M =  $\lambda$ Hind (Invitrogen)

Durch den Verdau wurde die *MOCSI*-Expressionskassette aus dem Virus-Vektor freigesetzt, jedoch nicht bei dem *Mocs1*<sup>-/-</sup> rhuman<sup>+</sup> Tier. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit dem Plasmid AAV-HBA-*MOCSI* gemischt mit 10  $\mu$ g genomischer Wildtyp-DNA, die die gleiche Behandlung erfuhr wie die genomische DNA der AAV-*MOCSI* behandelten Tiere.

Nach der Transduktion der Zelle wird die lineare einzelsträngige Vektor-DNA mit der Zeit in eine doppelstränge Ringform umgewandelt, die dann in großen Konkatemeren über 12 kb vorliegt [97]. Wie im Abb. 3.26. a zu sehen ist, enthielten die Lebern der AAV-*MOCSI*-behandelten Tiere jedoch nur noch geringe Mengen der Vektor-DNA. Tier 2 und 3 enthielten 0.5 Kopien, Tier 1 und 4 eine Kopie pro Genom der Maus. Nach dem Verdau der DNA der *Mocs1*<sup>-/-</sup> rhuman<sup>+</sup> Maus wurde eine Bande mit einer Größe von ca. 9 kb detektiert. Die Wildtyp-DNA enthielt keine Sequenzen, die mit der für die *MOCSI*-Expressionskassette spezifischen Sonde nachgewiesen werden konnten.

Der Southern Blot mit den unverdauten DNAs sollte klären, ob die detektierten Banden episomalen oder integrativen Ursprungs waren. Das Fehlen der Banden bei allen untersuchten Tieren spricht dafür, dass die detektierte DNA in integrierter Form vorlag.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine *randomly primed* (RP)-PCR genutzt, um ausgehend von der *MOCSI*-Expressionskassette, die flankierenden Bereiche zu untersuchen. Dafür wurde genomische DNA aus Tier 3, das mit  $1 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI* intrahepatisch am d 1 und d 4 behandelt wurde (d 426 abgetötet), sowie aus Tier 4, dessen Behandlung am d 40 (d 473 abgetötet) erfolgte, eingesetzt. Bei der RP-PCR wurden zuerst 4 verschiedene *Annealing Control Primer* (ACP) (Seegene, Korea) eingesetzt, die so entwickelt wurden, dass sie an unbekannte Sequenzen binden. Ein für das zu untersuchende DNA-Stück spezifischer Primer sorgte dafür, dass die flankierende Zielregion amplifiziert wurde. Zwei darauf folgende *Nested-PCRs* dienten dazu, die Amplifikationsprodukte zu spezifizieren. Abb. 3.27. zeigt das Ergebnis der zweiten *Nested-PCR*.

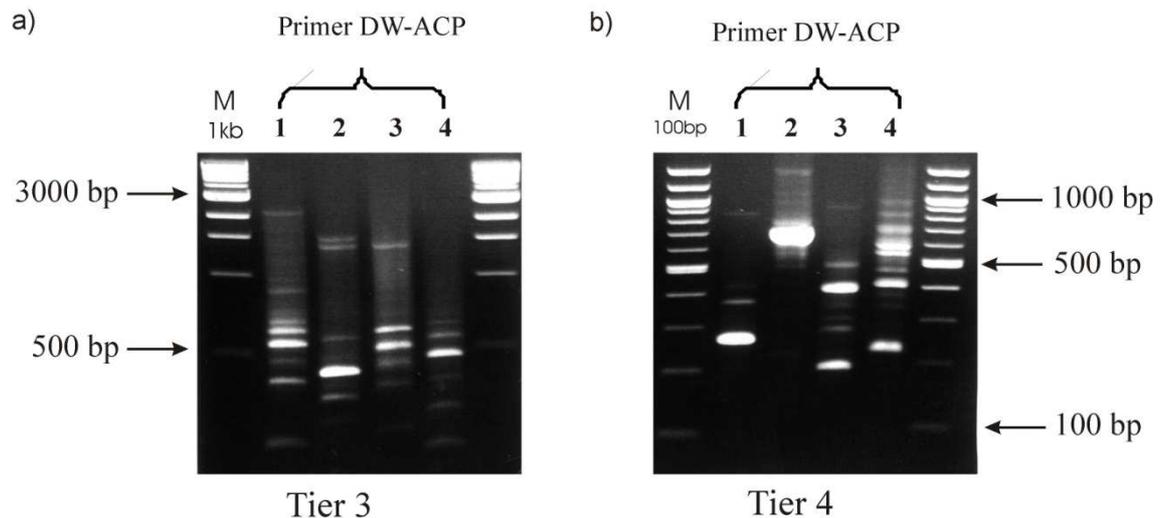


Abb. 3.27.: RP-PCR AAV-*MOCSI*-behandelter Tiere: PCR-Produkte nach zweiter *Nested-PCR*, Tier 3 intrahepatisch injiziert d 1 und d 4, d426 abgetötet; Tier 4 intrahepatisch behandelt am d 40, d 473 abgetötet; M = *Ladder*; DW-ACP = *Annealing Control Primer* 1-4

Die zu untersuchenden Banden wurden aus dem Gel extrahiert und in den T-Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy von Promega kloniert. Mit Primern in der T7 und Sp6-Promotorregion des Plasmids wurden die PCR-Fragmente sequenziert. Tabelle 3.4. zeigt eine Übersicht über die Resultate der RP-PCR.

Tier	Primer 1.PCR	Fragmentgröße	Chromosom	Ort	
3	DWACP1	600 bp	Chromosom 4	Mouse DNA sequence Klon RP23-135A21 Chromosom 4 enthält unter anderen JUN Onkogen	
		550 bp	Chromosom 9	im <i>NCAM1</i> (neural cell adhesion molecule1 Isoform 1 und 2)	
		390 bp	rAAV intern	TSP3 bis Anfang CMV-Enhancer dann <i>MOCS1</i> EK Exon 3 bis 4	
		210 bp	Chromosom 16	5'Bereich 8599 bp entfernt von Amyloid beta (A4) Precursor-Protein	
	DWACP2	400 bp	Chromosom 5	im Gen <i>Add 1</i> (Adducin 1 $\alpha$ Isoform 1 und 2)	
		350 bp	Chromosom 5	im Gen <i>Add 1</i>	
	DWACP3	600 bp	Chromosom 11	im Gen solute carrier family 22 member 4	
			Chromosom 8	im Gen carbonic anhydrase 5 $\alpha$ mitochondrial	
		500 bp	Chromosom 1	5' Bereich 2670 bp transmembran epididymal protein	
			Chromosom 11	im Gen solute carrier family 22 member 4	
			Chromosom 4	Transkriptionsfaktor MEC1	
	DWACP4	490 bp	Chromosom 16	im Gen 3-Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase	
	4	DWACP1	290 bp	rAAV intern	TSP3 bis Anfang CMV-Enhancer
		DWACP2	680 bp	rAAV intern	<i>MOCS1</i> EK Exon 3 bis 6, dann Sequenz zwischen Amp und ori auf Plasmid AAV-HBA-MOCS1 (2891 bp-3080) und pGEM <sup>®</sup> -Teasy
DWACP3		400 bp	rAAV intern	TSP3 bis Anfang CMV-Enhancer dann <i>MOCS1</i> EK Exon 1 bis 2	
		200 bp	rAAV intern	TSP3 bis Anfang CMV-Enhancer dann <i>MOCS1</i> EK Exon 10	
DWACP4		250 bp	rAAV intern	TSP3 bis Anfang CMV-Enhancer	

Tabelle 3.4.: Ergebnisse der RP-PCR AAV-behandelter Tiere: DW-ACP = *Annealing Control Primer* 1-4, TSP = *target specific primer*

In Tier 3, welches am d 1 und d 4 AAV-*MOCS1*-Injektionen erhielt, wurden 9 Integrationsorte der *MOCS1*-Expressionskassette gefunden, die sich auf 7 verschiedenen Chromosomen befanden. In zwei PCR-Fragmenten wurden Sequenzen von unterschiedlichen Chromosomen gefunden, die zu einander geordnet waren. Das

spricht für eine genomische Instabilität und dadurch bedingte Umstrukturierungen der Chromosomen, die ein häufiges Merkmal von Krebszellen sind [98]. Welches Integrationsereignis zur Entstehung des Lebertumors geführt hat, konnte nicht mehr nachvollzogen werden.

In Tier 4, das am d 40 eine AAV-*MOCSI*-Injektion bekam, wurden nur Vektor-interne DNA-Sequenzen amplifiziert, was für das episomale Vorliegen der *MOCSI*-Expressionskassette spricht.

Zusammenfassend ist zu sagen dass in 16 % der mit rAAV behandelten Mäusen maligne Ereignisse auftraten. Die Untersuchung der genomischen DNA mittels Southern Blot-Analysen einer Auswahl von erkrankten Tiere zeigte, dass entweder nur geringe Mengen an episomal vorliegender Vektor-DNA vorhanden waren, die nicht mehr detektiert werden konnten, oder keine episomale Vektor-DNA mehr in den Leberzellen vorhanden war. Die Ergebnisse der RP-PCR, bei der die DNA von zwei AAV-*MOCSI*-behandelten Tieren näher untersucht wurde, zeigte, dass die Vektor-DNA in einem Tier ins Genom integriert war und in dem anderen episomal vorlag.

Das bedeutet einerseits, dass episomale Vektor-DNA über 470 d stabil im Lebergewebe vorliegen kann. Andererseits kommt es auch zur Integration der Vektor-DNA ins Genom, was, je nach Integrationsort, zur Entwicklung von Tumoren führen kann.

### **3.1.3. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase**

Die Substitutionstherapie mit cPMP kann bei Patienten mit MoCo-Defizienz Typ B nicht angewandt werden. Eine Alternative muss somit für die Behandlung gefunden werden. In vorangegangenen Experimenten konnte die pflanzliche Sulfitoxidase (PSO) aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und aufgereinigt werden [45]. Im Rahmen dieses Versuches wurde untersucht, ob die Administration von PSO in der Lage ist, die murine MoCo-Biosynthese zu restaurieren. Zum Schutz vor einer Immunantwort auf das artfremde Protein und zur Stabilisierung des Enzyms wurde die PSO mittels PEGylierung modifiziert (siehe Kapitel 2.2.7.).

*Mocs1*-defiziente Mäuse wurden postnatal jeden zweiten Tag mit intrahepatischen Injektionen des PEG-PSO-Gemischs behandelt. Drei Gruppen mit jeweils zwei Tieren bekamen unterschiedliche Mengen an PEG-PSO: 5.148 nmol, 0.5 nmol und 0.05 nmol.

Ein Tier wurde mit 0.005 nmol PEG-PSO behandelt. Tabelle 3.5. zeigt eine Übersicht der Lebensdauer der behandelten Mäuse.

PEG-PSO	Anzahl <i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	Lebensdauer d
5.148 nmol	2	16 ± 0
0.5 nmol	2	15.5 ± 0.5
0.05 nmol	2	16 ± 1
0.005 nmol	1	11

Tabelle 3.5.: Lebensdauer der PEG-PSO-behandelten *Mocs1*-defizienten Mäusen

Die Tiere, die 0.05 nmol und mehr PEG-PSO intrahepatisch injiziert bekamen, starben alle in einem Zeitraum um 16 d. Die Maus, der 0.005 nmol PEG-PSO intrahepatisch verabreicht wurden, starb am d 11 nach der Geburt. Bis zu ihrem Tod ließen alle behandelten Tiere keine phänotypischen Anzeichen der MoCo-Defizienz erkennen. Obduktionen der gestorbenen Tiere zeigten jedoch, dass der Gastrointestinaltrakt der Mäuse hochgradig entzündet war, was in zwei von den 7 Mäusen zu einer Darmperforation führte (siehe Abb. 3.28.).

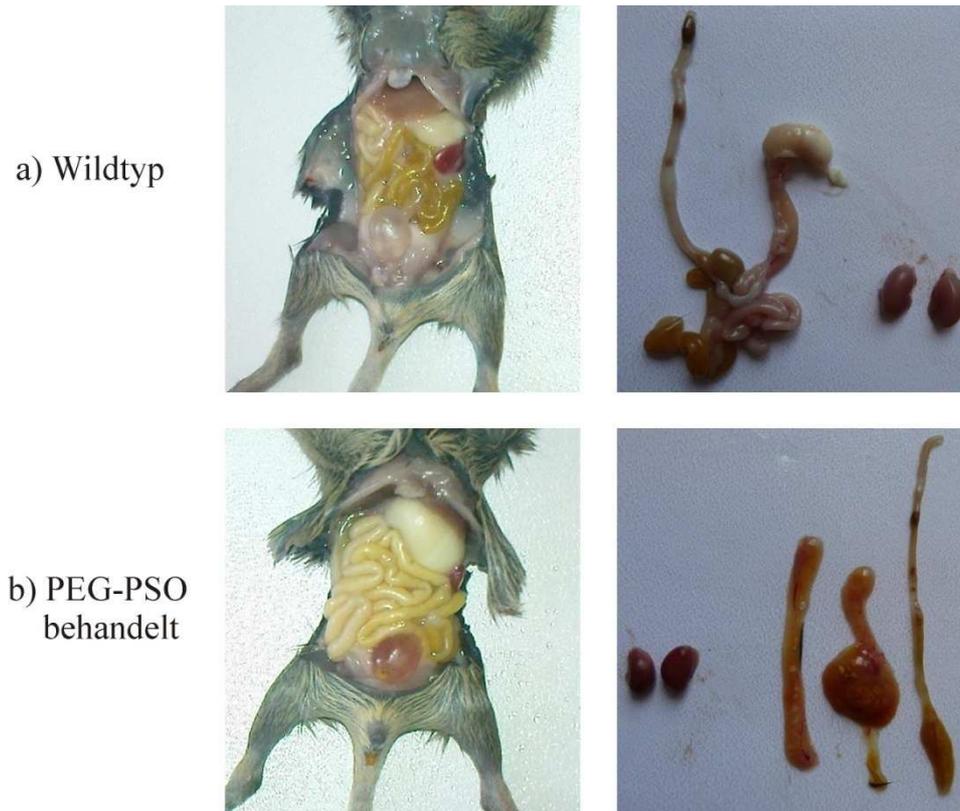


Abb. 3.28.: Bilder einer PEG-PSO-behandelten *Mocs1*-defizienten Maus im Vergleich zu einem unbehandeltem Wildtypier.

### 3.1.4. Leberzelltransplantation

Eine Alternative zur Gentherapie stellt die Einbringung gesunder Zellen in einen kranken Organismus dar. Aus diesem Grund sollte die Möglichkeit der Transplantation gesunder Embryonaler Hepatozyten (EH) in die Leber *Mocs1*-defizienter Mäuse untersucht werden. Um Abstoßungsreaktionen gegenüber den eingebrachten Zellen zu verhindern, wurden die EH aus Embryonen mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie das *Mocs1-Knockout*-Modell isoliert, in dem Fall von C57B/6N-Verpaarungen. Aus 12 Embryonen konnten insgesamt  $1 \times 10^5$  EH mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml isoliert werden.

Die erste Gruppe von 5 neonatalen *Mocs1*-defizienten Mäusen bekam am d 3 nach der Geburt jeweils  $1 \times 10^5$  EH in  $1 \times$  PBS intrahepatisch injiziert. Um mögliche Nebeneffekte der Behandlung ausschließen zu können, wurden die restlichen Zellen so aufgeteilt, dass zwei *Mocs1*<sup>+/+</sup> und 6 +/- Geschwister eine Injektion mit  $8 \times 10^4$  EH-

Zellen erhielten. Tabelle 3.6. gibt einen Überblick über die Lebensdauer der behandelten Tiere.

Gruppe		Anzahl	Lebensdauer d
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	+EH	5	9.7 ± 0.6
<i>Mocs1</i> <sup>+/+</sup>	+EH	2	> 40 d
<i>Mocs1</i> <sup>+/-</sup>	+EH	6	> 40 d
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>			7.5 <sup>1</sup>

Tabelle 3.6.: Lebensdauer der neonatal mit Embryonalen Hepatozyten (EH) behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse. 1 = veröffentlicht in Lee et al 2002 [33],

Die Lebensdauer der mit EH behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse war im Vergleich zu unbehandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht erhöht. Die behandelten gesunden Geschwister wiesen keinerlei Veränderungen auf und erreichten das adulte Alter (über 40 d).

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die transplantierten Hepatozyten einen selektiven Vorteil brauchen, um in der Empfängerleber proliferieren zu können [99]. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch untersucht, ob die Vorschädigung der Leber durch das Pyrrolizidin-Alkaloid Retrorsin zum Erfolg der Transplantation führen kann. Diese Substanz blockiert die Zellteilung der endogenen Hepatozyten und schädigt die zelluläre DNA, wobei vorerst die Funktion der Hepatozyten erhalten bleibt [100]. Die Wirksamkeit des Retrorsins wurde mittels intraperitonealer (i.p.) Injektionen mit einer Konzentration von 0.3 mg Retrorsin pro g Körpergewicht (KG) in 4 Wildtypmäusen untersucht. Die Behandlung führte zum Absterben der Mäuse nach zwei Tagen. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit einer geringeren Dosis von 0.03 mg Retrorsin pro g KG wiederholt. Die 4 Mäuse dieser Gruppe starben durchschnittlich 26 ± 4 d nach der Behandlung (Übersicht Lebensdauer siehe Tabelle 3.7.)

Retrorsin mg/g KG	Alter d	Anzahl	Lebensdauer d
0.3	3	4	5 ± 0
0.03	3	4	26 ± 4
0.03	25	3	perfundiert

Tabelle 3.7.: Hepatozytentransplantation Retrorsinvorbehandlung

Zur Kontrolle der Retrorsinwirkung wurden histologische Schnitte von Lebergewebe adulter Wildtypmäuse ( $n = 3$ ) angefertigt, denen ebenfalls 0.03 mg Retrorsin pro g KG i.p. appliziert wurde. Wie in Abb. 3.29. zu sehen ist, führte die Retrorsinbehandlung in einer Maus (1) zum Absterben der Hepatozyten. In zwei Tieren (2,3) führte die Behandlung zur Vergrößerung des zytoplasmatischen Raums der Hepatozyten, wie es bereits von Jago *et. al.* (1969) beschrieben wurde [101].

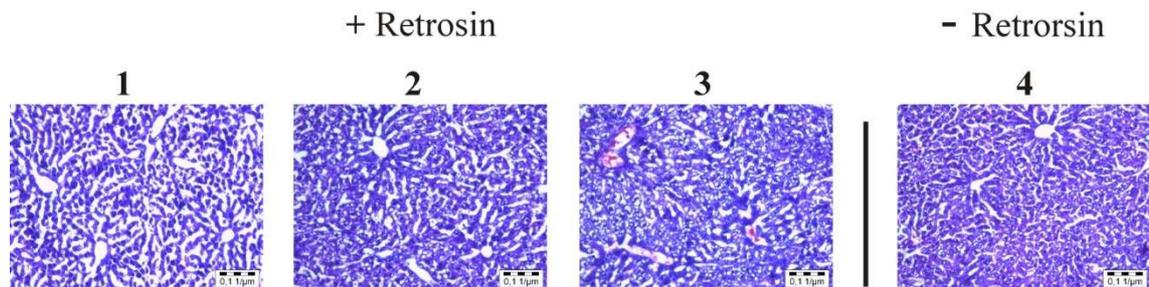


Abb. 3.29.: Gewebeschnitte von der Leber adulter Retrorsin-behandelter Mäuse: Die Tiere wurden d 25 nach der Geburt mit 0.03 mg/ g KG Retrorsin behandelt. Am d 40 wurden sie mit 4 %Formaldehyd perfundiert und in PBS-Sucrose kryofixiert. Schnitte von 3 µm wurden anschließend HE gefärbt, (Bilder 100 x Originalvergrößerung)

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die EH-Transplantation in die Leber Retrorsin-vorbehandelter adulter Mäuse. 14 *Mocs1*-defiziente Mäuse wurden bis d 40 mit cPMP vorbehandelt (2 µg 1. Woche, 4 µg 2. Woche, 8 µg 3. Woche, 16 µg 4. Woche, 32 µg ab der 5. Woche täglich). Am d 19 nach der Geburt wurden 10 Mäuse aus der Gruppe mit 0.03 mg/g KG Retrorsin behandelt. 4 Mäuse erhielten keine Retrorsin-Behandlung. Am d 40 wurden 10 Mäuse mit  $1 \times 10^5$  EH in 1 x PBS intrahepatisch injiziert. Zwei Retrorsin-behandelte Tiere erhielten eine intravenöse Injektion mit  $1 \times 10^5$  EH. Zwei

weitere *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die keine Retrorsin-Behandlung erhalten hatten, dienten als Negativkontrolle, wie lange das cPMP im Gewebe gespeichert wurde und bekamen keine EH injiziert. Die cPMP-Injektionen wurden 7 d weitergeführt und dann abgesetzt. Tabelle 3.8. zeigt eine Übersicht der behandelten Tiere und den Kontrolltieren.

Genotyp	Gruppe	Retrorsin 0.03 mg/g KG i.p.		Anzahl	Lebensdauer (d) nach Absetzen cPMP-Gabe
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	+EH	i.h.	+	4	14.5 ± 4
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	+EH	i.v.	+	4	10.3 ± 8.3
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	+EH	i.h.	-	2	15 ± 0
<i>Mocs1</i> <sup>+/+</sup>	-EH	-	+	2	> 600
<i>Mocs1</i> <sup>-/-</sup>	-EH	-	-	2	11 ± 0

Tabelle 3.8.:Übersicht der Lebensdauer nach der Hepatozytentransplantation im adulten Alter *Mocs1*-defizienter Mäuse: EH = Embryonale Hepatozyten, i.h. = intrahepatisch, i.v. = intravenös

Die unbehandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere starben im Durchschnitt 11 d nach dem Absetzen der cPMP-Gabe am d 40. Die Retrorsin-behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse starben nach der intrahepatischen Injektion der EH nach durchschnittlich 14.5 d und die intravenös behandelten Tiere nach durchschnittlich 10.3 d. Durch die EH-Transplantation konnte keine signifikante Erhöhung der Lebensdauer der *Mocs1*-defizienten Mäuse erreicht werden. Die EH-behandelten Mäuse zeigten die gleichen phänotypischen Merkmale wie unbehandelte *Mocs1*-defiziente Mäuse (siehe Abb. 3.30.)



Abb. 3.30.: Phänotyp homozygoter *Mocs1*-defizienter Mäuse nach der intrahepatischen Injektion von EH im neonatalem Alter. Gesunde heterozygote Maus im Alter von 10 d (Mitte), im Vergleich mit einer EH-injizierten *Mocs1*-defizienten Maus (links) und einer unbehandelten *Mocs1*-defizienten Maus (rechts) im gleichen Alter.

*Mocs1*<sup>+/+</sup> Tiere, die zum gleichen Zeitpunkt mit Retrorsin behandelt wurden, erreichten eine Lebensdauer von über 600 d. Dies spricht gegen eine effektive Retrorsin-Behandlung.

Nach der intravenösen Behandlung mit EH starb ein Tier 1 d nach der Injektion. Die Obduktion des Tieres zeigte, dass die Durchblutung der rechten Herzseite gestört war, was auf eine Embolie in den Herzgefäßen hinweist.

## 3.2. Molekulare Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B

### 3.2.1. humane *MOCS2*-Expression

#### 3.2.1.1. Nachweis des alternativen Spleißmechanismus von *MOCS2A* und *MOCS2B*

Die Molybdopterin (MPT)-synthase ist an der Umwandlung von cPMP in MPT beteiligt. Das heterotetramere Protein besteht aus zwei *MOCS2A* (~9.7 kDa) und zwei *MOCS2B* (~20.8 kDa) Untereinheiten. Beide MPT-Synthase-Untereinheiten werden vom *MOCS2*-Gen in zwei ORF kodiert, die sich auf genomischer Ebene um 77 bp überlappen [62]. Bisher war als Transkript nur die Spleißform I bekannt, welche den Startpunkt für das *MOCS2A*-Protein in Exon 1a enthält und von Reiss et al (1999) beschrieben wurde [29]. Die komplette Sequenzierung des humanen Genoms deckte ein mögliches neues Exon 1b auf, was die Produktion eines alternativen Transkripts zur Folge hätte (Spleißform III, GenBank, NM004531.3) [66]. Dieses neue Transkript umgeht das *MOCS2A*-Startcodon in Exon 1a und nutzt als Translationsstartpunkt das *MOCS2B*-Startcodon in Exon 3 (siehe Abb. 3.31. a).

Ein Teil dieser Arbeit war der experimentelle Nachweis der Spleißform III, und damit die Existenz des alternativen Spleißmechanismus im 5' Bereich des humanen *MOCS2*-Gens.

Aus menschlichen Fibroblasten und Lebergewebe wurde RNA isoliert und mit dem Primer R11 (Exon 2) in cDNA umgeschrieben. Mit Primern im Exon 1a (F28) und im Exon 1b (GranierF) wurden Spleißform-spezifische PCR-Produkte amplifiziert (siehe Abb. 3.31. b).

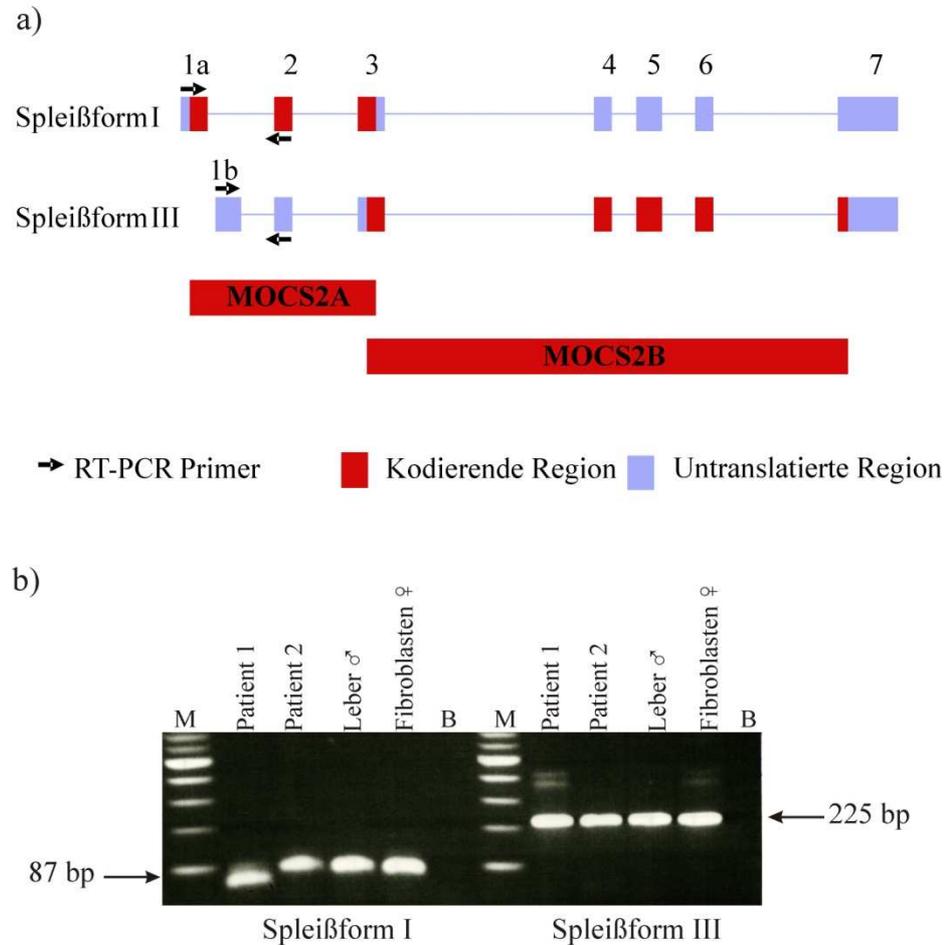
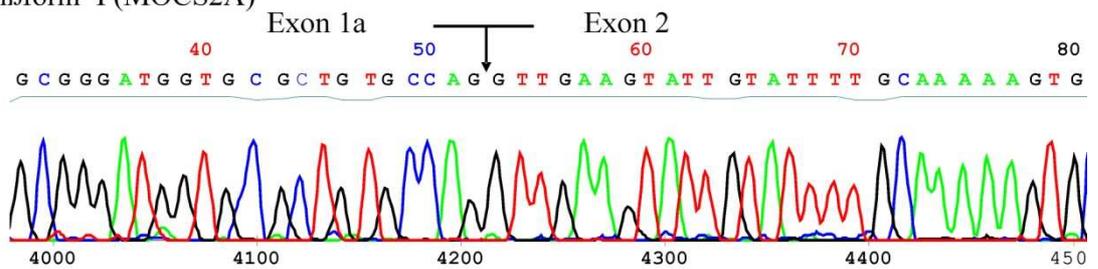


Abb. 3.31.: Genomische Struktur und Spleißformen des humanen *MOCS2*-Gens. a) Schematische Darstellung der *MOCS2*-Transkription ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&\\_Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4338&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&_Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4338&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)) b) RT-PCR: Spleißform I erwartetes Fragment = 87 bp, Spleißform III erwartetes Fragment = 225 bp, verwendete Primer gekennzeichnet in a) mit schwarzen Pfeilen, Patient 1 trägt eine homozygote 23 bp Deletion im Exon 1a (siehe 3.2.1.2.), Patient 2 trägt eine Mutation im *MOCS1A*-Gen, M = 100 bp *Ladder*, B = Leerkontrolle

Abb. 3.32. zeigt den Sequenznachweis des alternativen Spleißmechanismus im 5' Bereich des humanen *MOCS2*-Gens.

## Spleißform I (MOCS2A)



## Spleißform III (MOCS2B)

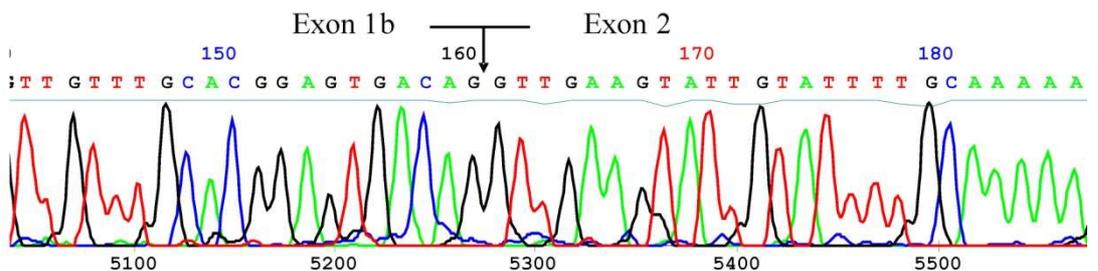


Abb. 3.32.: Alternativer Spleißmechanismus im 5'Bereich des humanen *MOCS2*-Gen mit resultierenden Exon 1a und Exon 1b, Sequenznachweis

In der humanen cDNA konnten die zwei Spleißformen des *MOCS2*-Gens nachgewiesen werden. Spleißform I umfasst Exon 1a und Exon 2 bis 7. In Exon 1a befindet sich der Translationsstartpunkt für MOCS2A. Der ORF endet in Exon 3. Spleißform III beginnt mit Exon 1b und enthält ebenfalls Exon 2 bis 7. Dieses Transkript kodiert für MOCS2B und der Translationsstartpunkt liegt in Exon 3, 77 bp vor dem Stopcodon von MOCS2A.

### 3.2.1.2. Charakterisierung einer Deletionsmutation im *MOCS2*-Gen

Mutationsanalysen eines verstorbenen MoCo-defizienten Patienten zeigten eine neue 23 bp-Deletion im Exon 1a des *MOCS2*-Gens, die den Translationsstartpunkt des MOCS2A-Proteins einschließt (genomische Sequenz Abb. 3.33.).

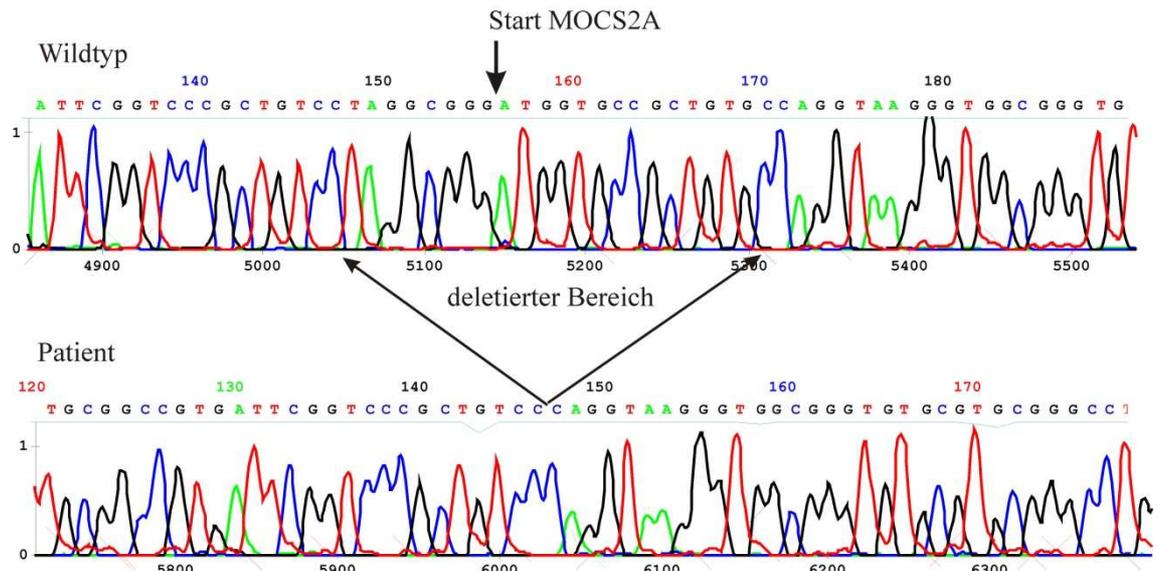


Abb. 3.33.: MOCS2-Deletionsmutation: Genomische Sequenz Exon 1a einer Kontrollperson (oben) und eines für die Mutation MOCS2del-9(23) homozygoten Patienten (unten).

Die Expression des MOCS2B-Proteins war durch die Mutation nicht betroffen. RT-PCR-Analysen der beiden *MOCS2*-Spleißformen zeigten, dass beide Transkripte detektiert werden konnten, jedoch die Spleißform I verkürzt vorlag (siehe Abb. 3.31. b Patient 1 auf 1 % Agarosegel und Abb. 3.34. auf 3.5 % PAGE-Gel)

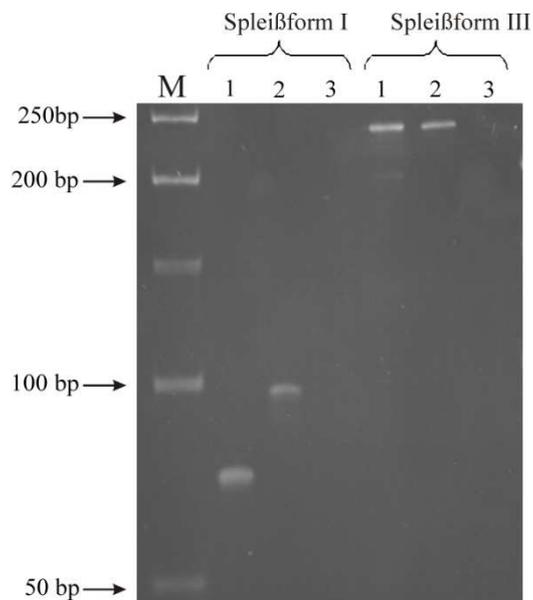


Abb. 3.34.: PAGE-Gel RT-PCR-Produkte für MOCS2A (Spleißform I) und MOCS2B (Spleißform III): 1 = Patient mit Mutation MOCS2del-9(23), 2 = gesunde WT-Kontrolle, 3 = Leerkontrolle. Spleißform I erwartetes Fragment = 87 bp, Spleißform III erwartetes Fragment = 225 bp, verwendete Primer gekennzeichnet in Abb. 3.31. a mit schwarzen Pfeilen. M = 50 bp Ladder (Fermentas)

Ein immunologischer Nachweis der *MOCS2*-Expression in der Leber sollte klären, ob sich die Mutation auf die Translationseffizienz oder die Proteinstabilität auswirkt. Dazu wurden der Leberzellextrakt des Patienten und einer gesunden Kontrollperson auf einem 12 % nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der immunologische Nachweis der Proteine wurde mit primären Antikörpern (*rabbit*) gegen *MOCS2A* und *MOCS2B* initiiert. Der sekundäre Antikörper (*anti-rabbit*) war mit alkalischer Phosphatase markiert, was die Detektion der Proteine durch den enzymatischen Umsatz des Substrates NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium) und BCIP (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin) ermöglichte (siehe Abb. 3.35.).

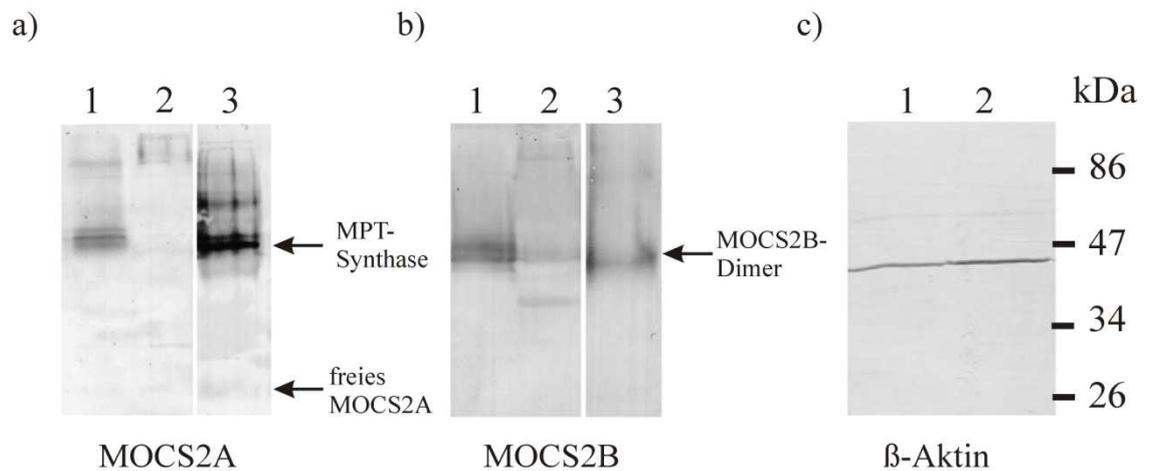


Abb. 3.35.: Nachweis von *MOCS2A* und *MOCS2B* im Leberzellextrakt. a) Nachweis des MPT-Synthase-Komplexes mit *MOCS2A*-Antiseren: 1 = 15 µg Zellextrakt einer gesunden Wildtypleber, 2 = 15 µg Zellextrakt des MoCo-defizienten Patienten, 3 = Kontrolle *in vitro* vereinigte *MOCS2A/B*-Gemisch mit 3 µg *MOCS2B* und 30 µg *MOCS2A*. b) Nachweis des MPT-Synthase-Komplexes mit *MOCS2B*-Antiseren: 1 = 15 µg Zellextrakt einer gesunden Wildtypleber, 2 = 15 µg Zellextrakt des MoCo-defizienten Patienten, 3 = Kontrolle 3 µg aufgereinigtes dimeres *MOCS2B*. c) Nachweis von β-Aktin in der Leber mittels monoklonaler Anti-Aktin Antikörper: 1 = 15 µg Zellextrakt einer gesunden Wildtypleber, 2 = 15 µg Zellextrakt des MoCo-defizienten Patienten.

Die Ergebnisse zeigen, dass *MOCS2A* im Leberzellextrakt des Patienten nicht detektiert werden konnte. Das ist darauf zurückzuführen, dass der Translationsstartpunkt von *MOCS2A* im Patienten fehlt. Außerdem wies der Zellextrakt des Patienten nur geringe Mengen *MOCS2B* im Vergleich zur gesunden Kontrolle auf. Das lässt darauf schließen, dass in der Abwesenheit von *MOCS2A*, das dimere Protein *MOCS2B* eine kürzere Halbwertszeit hatte und schneller degradiert wurde.

### 3.2.2. murine *Mocs2*-Expression

Die genomische Struktur des humanen *MOCS2*-Gens und deren Transkripte wurden weitgehend untersucht und veröffentlicht [29-30, 62]. Durch Datenbankanalysen mit der humanen MPT-Synthase wurden die homologen Proteine MOCS2A und MOCS2B in der Maus identifiziert [62]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die genomische Struktur des murinen *Mocs2*-Gens und deren Transkripte untersucht werden.

Das murine *Mocs2*-Gen befindet sich auf Chromosom 13 und umfasst 7 Exons (GeneID: 17434, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, *Mouse Genome Sequencing Consortium*). Computeranalysen sagten drei verschiedene Transkripte des Gens voraus: Spleißform I (NM 013826.3) beinhaltet alle 7 Exons und den Translationsstartpunkt von MOCS2A im Exon 1. Das Translationsende befindet sich im Exon 3. Durch alternatives Spleißen, entsteht Spleißform II (NM 001113334.1), bei der Exon 2 fehlt. Dieses Transkript kodiert für MOCS2B, wobei sich der Translationsstartpunkt im Exon 3 befindet. Die dritte vorhergesagte Spleißform III (NM 001113375.1) stellt eine Abwandlung der Spleißform II dar, die eine verkürzte Version des Exons 5 beinhaltet (siehe Abb. 3.36.).

genomische DNA *Mocs2*-Gen

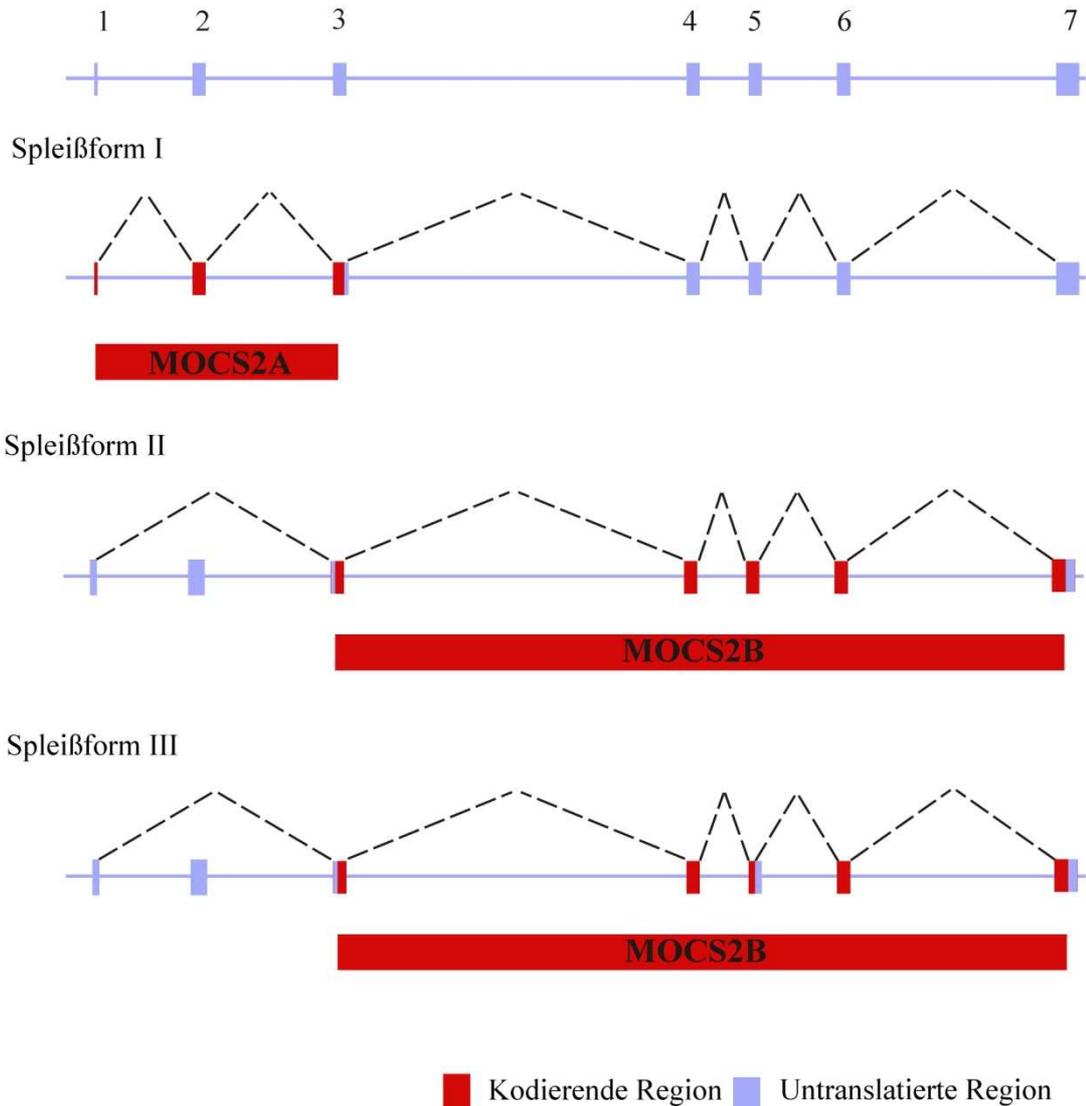


Abb. 3.36.: Genomische Struktur und Spleißformen des murinen *Mocs2*-Gens. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17434&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=17434&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)

### 3.2.2.1. Nachweis der murinen *Mocs2*-Transkripte

Aus der Leber und den Muskeln von C57B/6N-Wildtypmäusen wurde RNA isoliert und mit dem Primer Caro21 (Exon 7) in cDNA umgeschrieben. Nach der Amplifizierung mit den Primern M2MuEx1 in Exon 1 und Caro20 in Exon 7 konnten zwei verschiedene Transkripte nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.37.)

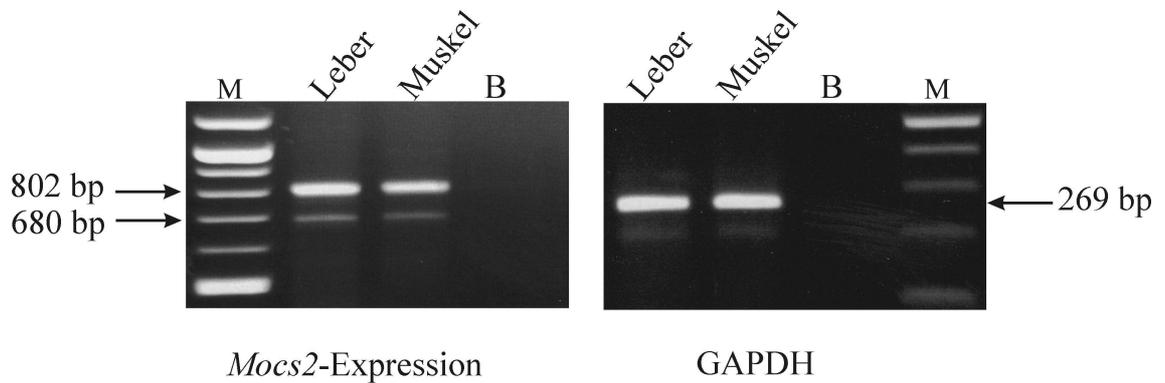


Abb. 3.37.: RT-PCR Alternativer Spleißmechanismus im 5'Bereich des murinen *Mocs2*-Gens. Links: murine *Mocs2*-Expression, obere Bande: Exon 1 bis Exon 7, erwartetes Fragment 802 bp. Untere Bande: Exon 1 bis Exon 7 ohne Exon 2, erwartetes Fragment 680 bp, rechts: Kontroll-RT-PCR GAPDH erwartetes Fragment 269 bp, M = 100 bp *Ladder*, B = Leerkontrolle

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, in den T-Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy der Firma Promega kloniert und sequenziert. Das obere Fragment mit einer Länge von 802 bp entsprach der vorhergesagten Spleißform I und enthielt die Exons 1 bis 7. Das untere 680 bp Fragment entsprach der Spleißform II mit Exon 1 bis 7, bei dem das Exon 2 herausgespleißt wurde. Spleißvariante III konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.38. Spleißvarianten um 5' Bereich des *Mocs2*-Gens).

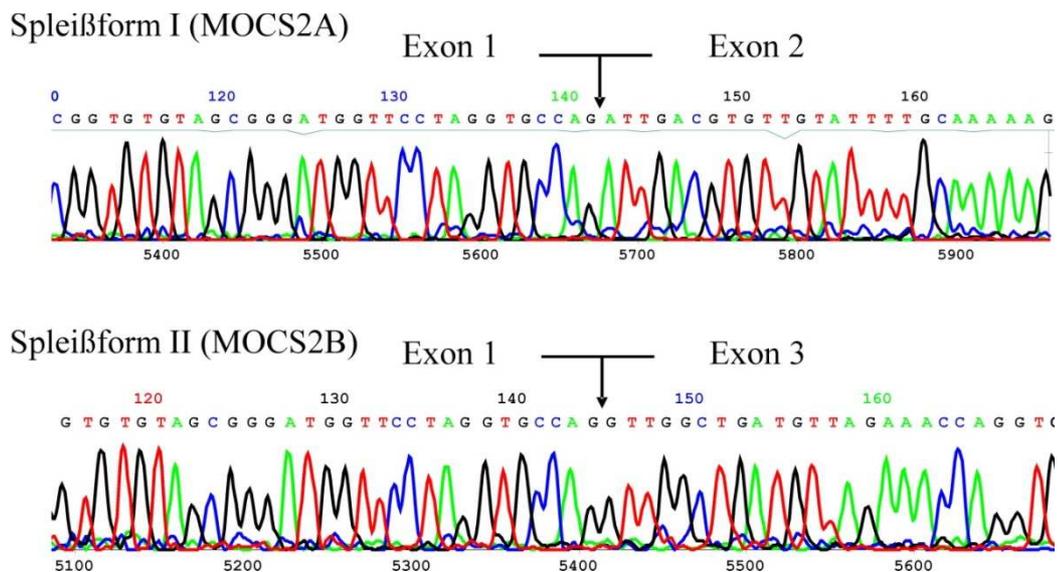


Abb. 3.38.: Alternativer Spleißmechanismus im 5'Bereich des murinen *Mocs2*-Gens, Sequenznachweis

### 3.2.2.2. *Mocs2*-Knockout-Modell

#### 3.2.2.2.1. Konstruktion des *Mocs2*- Disruptionsvektors

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer *Knockout*-Maus durch die Einbringung einer Punktmutation (167+2 T→C) in die 5' Donor-*splice site* des Introns 6 des *Mocs2*-Gens.

WT: 5' AAAGgtgagt 3'

*Knockout*: 5' AAAGg~~c~~gagt 3'

Der Disruptionsvektor mit dem Namen pBlueKO4R4 enthält zwei flankierende zu *Mocs2* homologe Bereiche, zwischen denen die eingeführte Punktmutation und die als positiver Selektionsmarker dienende Neomycin-Kassette (neo) liegen. Im 5' Bereich des Konstrukts, außerhalb der homologen Sequenzen, befindet sich die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK), die als negativer Selektionsmarker diente (siehe Abb. 3.39. Vektor).

Der 3' flankierende *Mocs2*-homologe Bereich wurde mit der Advantage<sup>®</sup>-HF2-Polymerase der Firma Clontech mit den Primern Caro7 und Rita6 aus dem BAC-Klon RP23-218L3 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über T/A-Klonierung in den T-Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy der Firma Promega ligiert und zur Kontrolle komplett sequenziert. Anschließend wurde der Bereich durch einen *XhoI*-Verdau aus dem Plasmid herausgeschnitten und in den, mit *XhoI*-linearisierten Vektor pBluescriptII (Stratagene) kloniert (Plasmid pBlueKO1).

Als nächstes wurde die Neomycin-Kassette aus dem Plasmid pTKneo (Ilona Paprotta, Humangenetik Göttingen) mit *SalI* und *BamHI* herausgeschnitten und in den, mit *SalI/BamHI* verdauten Vektor pBlueKO1 ligiert (pBlueKO2).

Der 3' flankierende *Mocs2*-homologe Bereich wurde mit der Advantage<sup>®</sup>-HF2-Polymerase von Clontech mit den Primern Rita2 und Rita4 (R4) aus dem BAC-Klon RP23-218L3 amplifiziert. Die Punktmutation in der 5' *splice site* des Introns 6 wurde mit der Amplifikation durch den Primer Rita4 eingefügt. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls in pGEM<sup>®</sup>-Teasy kloniert und zur Kontrolle komplett sequenziert. Anschließend wurde der Bereich durch einen *BamHI*-Verdau aus dem Plasmid herausgeschnitten und in den, mit *BamHI*-linearisierten Vektor pBlueKO2 kloniert (Plasmid pBlueKO3R4).

Der letzte Schritt der Klonierung war das Einfügen der HSV-TK-Kassette in den 5' Bereich des Konstrukts. Dazu wurde die HSV-TK aus dem Vektor pPNT (Ilona Paprotta, Humangenetik Göttingen) amplifiziert, in pGEM<sup>®</sup>-Teasy kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Durch einen *NotI*-Verdau wurde die HSV-TK anschließend wieder herausgeschnitten und den, mit *NotI* linearisierten Vektor pBlueKO3 kloniert (pBlueKO4R4).

Der Disruptionsvektor pBueKO4R4 wurde für die Transfektion der Embryonalen Stammzell-Linie RI an der, in der Antibiotika-Resistenz des Plasmids gelegenen *AseI*-Schnittstelle linearisiert.

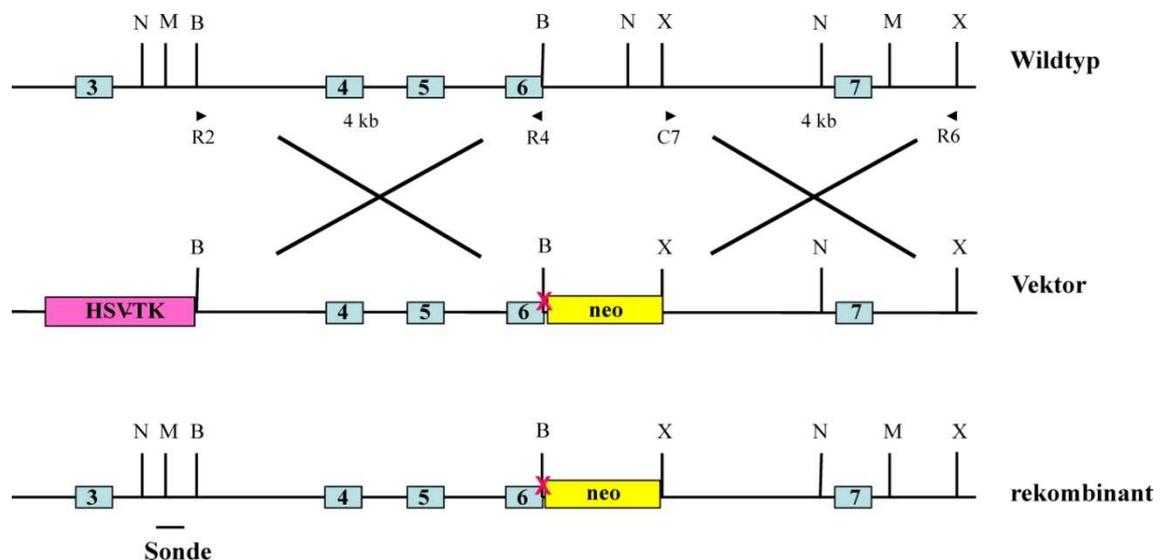


Abb. 3.39.: Rekombinationsschema für das *Mocs2*-Knockout-Modell: blau = Exons, Gelb = Neomycin-Kassette, rot = Herpes simplex-Thymidinkinase, Kreuz=Rekombinationsereignis, N = *NsiI*, M = *MfeI*, B = *BamHI*, S = *Sall*, X = *XhoI*, Schwarzer Pfeil = Primer

### 3.2.2.2.2. Klonierung der externen 5' Sonde

Mit Hilfe der Primer Caro3 und Caro4 wurde ein Bereich des *Mocs2*-Gens amplifiziert, der Intron 3 bis Exon 5 umspannt (siehe Abb. 3.40.), und über T/A-Klonierung in den T-Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy der Firma Promega ligiert (Silke Wagner, Institut für Humangenetik, Göttingen). Mit dem Primer Caro3 wurde eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *BglIII* wurde ein 626 bp großes Fragment freigelassen, welches als Sonde für die Charakterisierung der rekombinanten ES-Zell-Klone verwendet wurde.

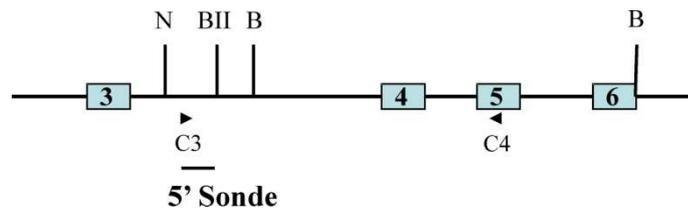


Abb. 3.40.: 5' Sonde Southern Blot, Restriktionskarte 5' Bereich des *Mocs2*-Gens, blau = Exons, N = *NsiI*, M = *MfeI* B = *BamHI*, BII = *BglII*, Schwarzer Pfeil = Primer

### 3.2.2.2.3. Homologe Rekombination des *Mocs2*-Gens

Die ES-Zell-Linie RI wurde, wie in Kapitel 2.2.5.1.2 beschrieben, kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden in 1 x PBS gewaschen, trypsiniert und in gleichen Puffer mit einer Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen /ml resuspendiert.

Aliquots dieser Zellsuspension wurden mit jeweils 50  $\mu$ g linearisierten Disruptionsvektor pBlueKO4R4 gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V, 500  $\mu$ F mit dem BIO RAD gene pulser™. Die Zellen wurden anschließend mit nichtselektivem Medium in Anwesenheit von G418-resistenten embryonalen Mausfibroblasten ausplattiert. Die Selektion erfolgte nach 36 h durch Zugabe eines selektiven Mediums (400  $\mu$ /ml G418, 2 $\mu$ M Gancyclovir). Nach 10 d Selektion wurden 121 resistente Klone in 24-well-Platten vereinzelt. Nach zwei weiteren Tagen erfolgte die Teilung der ES-Zellklone. Eine Hälfte der Zellen wurde für die DNA-Isolierung verwendet und die andere Hälfte wurde eingefroren.

Danach erfolgte die Untersuchung der vereinzelt rekombinanten ES-Zell-Klone daraufhin, ob eine homologe Rekombination zwischen dem Disruptionsvektor pBlueKO4R4 und dem *Mocs2*-Gen stattgefunden hat. Dazu wurde aus den ES-Zellen DNA isoliert, diese mit *NsiI* oder *MfeI* verdaut, auf einen TAE-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) geblottet. Die Southern Blots wurden mit der  $^{32}$ P-markierten externen 5' Sonde hybridisiert. Das Wildtypallel wies eine erwartete Fragmentlänge von 5905 bp bei *NsiI* und 7434 bp bei *MfeI* auf. Für das rekombinante Allel wurde eine Größe von 7689 bp bei *NsiI* und 8046 bp bei *MfeI* erwartet (siehe Abb. 3.41.).

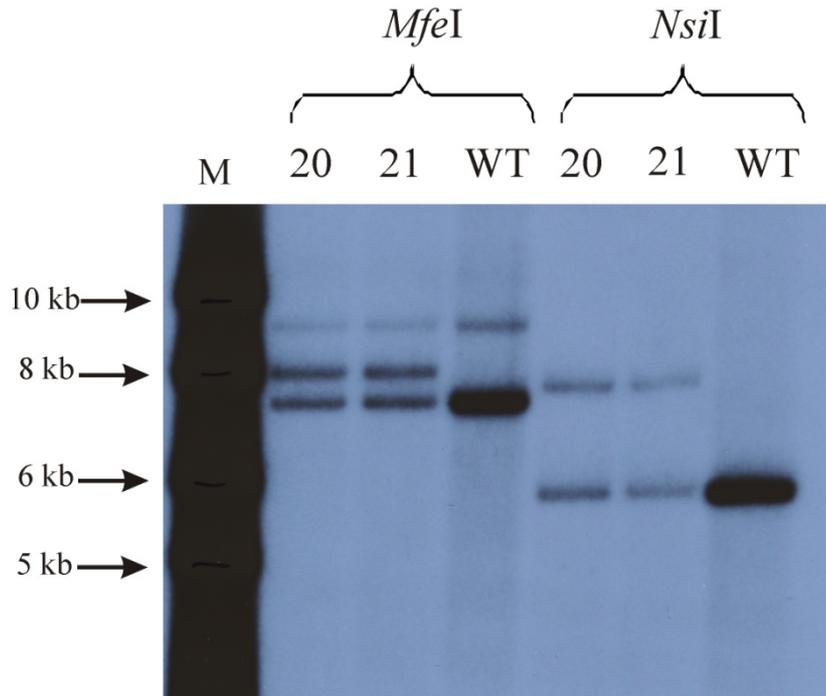


Abb. 3.41.: Southern Blot-Analyse der genomischen DNA von ES-Zellen. Die ES Zell-DNA wurde mit *NsiI* und *MfeI* verdaut und mit der 5'externen Sonde (siehe Abb. 3.40.) hybridisiert. *NsiI*-Verdau: Wildtypallel erwartete Fragmentlänge = 5905 bp, rekombinante Allel = 7689 bp; *MfeI*-Verdau: Wildtypallel erwartete Fragmentlänge = 7689 bp, rekombinante Allel = 8046 bp.

In 6 von 121 analysierten ES-Zellklonen hatte eine korrekte homologe Rekombination zwischen dem Disruptionsvektor pBueKO4R4 und der genomischen DNA des *Mocs2*-Gens stattgefunden.

#### 3.2.2.2.4. Generierung chimärer Mäuse

Die rekombinanten ES-Zellen (129/SV, Fellfarbe Agouti) wurden in 3.5 dpc C57black/6N Blastozysten (Fellfarbe Schwarz) injiziert. Zur Generierung chimärer Mäuse wurden diese Blastozysten in scheinchwangere CD1-Mäuse reimplantiert. Aus 4 unabhängigen Injektionen gingen 17 chimäre Mäuse hervor. Anhand ihrer Fellfarbe erfolgte die Bewertung hinsichtlich des Anteils rekombinanter ES-Zellen in den Mäusen. Drei Männchen der MOCS2KO4R4-21 Linie mit einem Prozentsatz von 100 % Fellfarbe Agouti wurden mit C57black/6N Weibchen verpaart. Die Keimbahnübertragung des rekombinanten Allels wurde mittels einer PCR mit den Primern Caro5, Caro16 und neo1 mit genomischer DNA von Schwanzbiopsien der NKO aus der F1-Generation überprüft (siehe Abb. 3.42.).

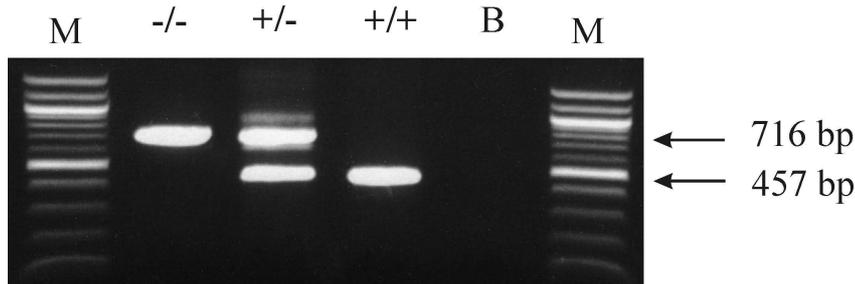


Abb. 3.42.: PCR zur Genotypisierung von Nachkommen. Wildtyp (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) *Mocs2*-Knockout-Mäuse wurden durch die Amplifikation von PCR-Produkten, die entweder spezifisch für das Wildtypallel (457 bp) oder das rekombinante Allel (716 bp) waren, identifiziert. Die Primer Caro5, Caro16 und neo1 wurden verwendet. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit EtBr angefärbt. M = 100 bp *Ladder*, B = Leerkontrolle.

Von 25 geborenen NKO's waren 14 heterozygot für das rekombinante *Mocs2*-Allel.

Die F1-Tiere, die heterozygot für den *Mocs2*-Lokus waren, wurden miteinander verpaart. Von den insgesamt 25 NKO's der F2 Generation waren 7 *Mocs2*+/+ (28 %), 11 *Mocs2*+/- (44 %) und 7 Tiere *Mocs2*-/- (28 %).

Abb. 3.43. zeigt den Sequenznachweis der mutierten Position in der genomischen DNA der F2-Generation.

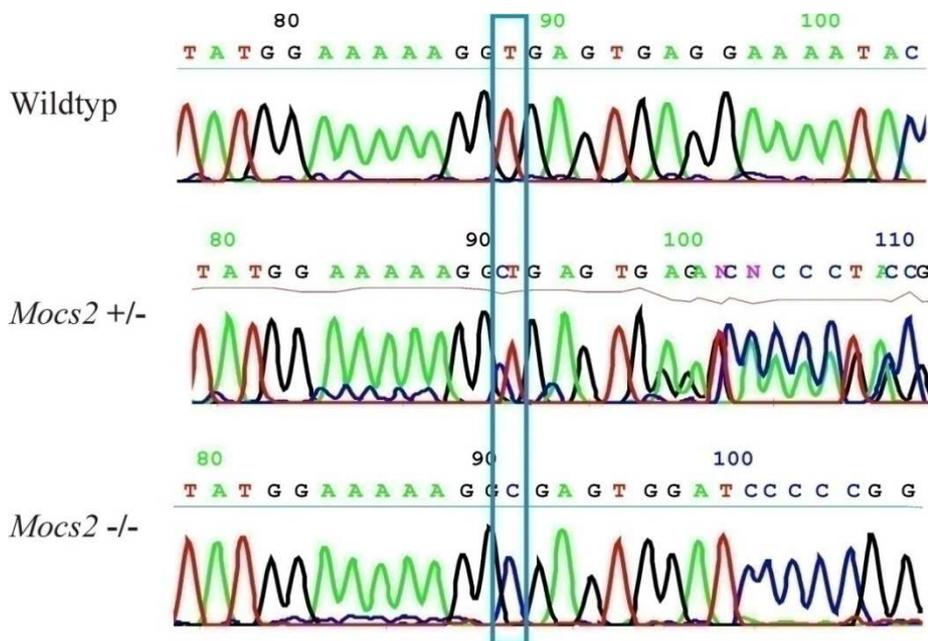


Abb. 3.43.: Sequenznachweis mutierter Position in genomischer DNA. PCR-Produkt mit Primern im Exon 6 (mseq17) und Intron 6 (Caro16), die den rekombinanten Teil überspannen. Erwartete Fragmente: 999 bp Wildtypallel, 1609 bp rekombinantes Allel. PCR-Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert.

### 3.2.2.2.5. Analyse der *Mocs2*-Expression in *Knockout* Mäusen

Von Mäusen, die homozygot für das rekombinante Allel waren (*Mocs2*<sup>-/-</sup>), wurden aus Schwanzbiopsien RNA isoliert und auf die vorhandenen mRNA-Transkripte des *Mocs2*-Gens untersucht. Analysen der veränderten 5' Donor-*splice site* des Introns 6 mit dem *Splice Site Prediction*-Programm des Neural Network ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) sagten vorher, dass Exon 6 herausgespleißt werden würde.

Die aus *Mocs2*<sup>-/-</sup> Mäusen isolierte RNA wurde mit einem Primer im Exon 7 in cDNA (Caro21) umgeschrieben. Bei der anschließenden Amplifikation mit Primern im Exon 4 (KO2F) und Exon 7 (Caro21) wurde für das Wildtyptranskript eine Fragmentlänge von 490 bp erwartet (siehe Abb. 3.44.).

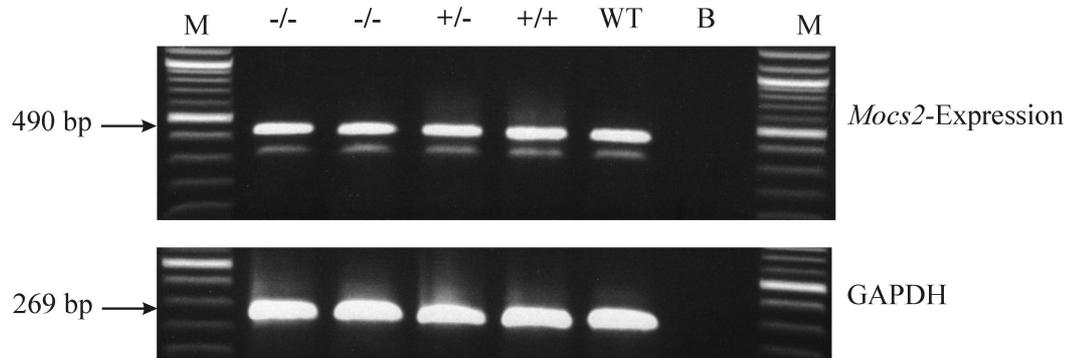


Abb. 3.44.: RT-PCR *Mocs2*-Expression in *Mocs2*-Knockout-Mäusen: oben: murine *Mocs2*-Expression, RT-Reaktion mit Primer Caro21 im Exon 7, PCR mit KO2F (Exon 4) und Caro21, erwartetes Fragment für Wildtypkontrolle = 490 bp, unten: Kontroll-RT-PCR GAPDH erwartetes Fragment 269 bp, M = 100 bp *Ladder*, B = Leerkontrolle

Wie in Abb. 3.44. zusehen ist, wurde das für den Wildtyp erwartete 490 bp Fragment nicht nur in den Kontrolltieren mit dem Genotyp *Mocs2*<sup>+/+</sup> und *+/-* amplifiziert, sondern auch in den *Mocs2*<sup>-/-</sup> Tieren. Zur genaueren Analyse wurden die Produkte der RT-PCR aufgereinigt und sequenziert (Abb. 3.45.)

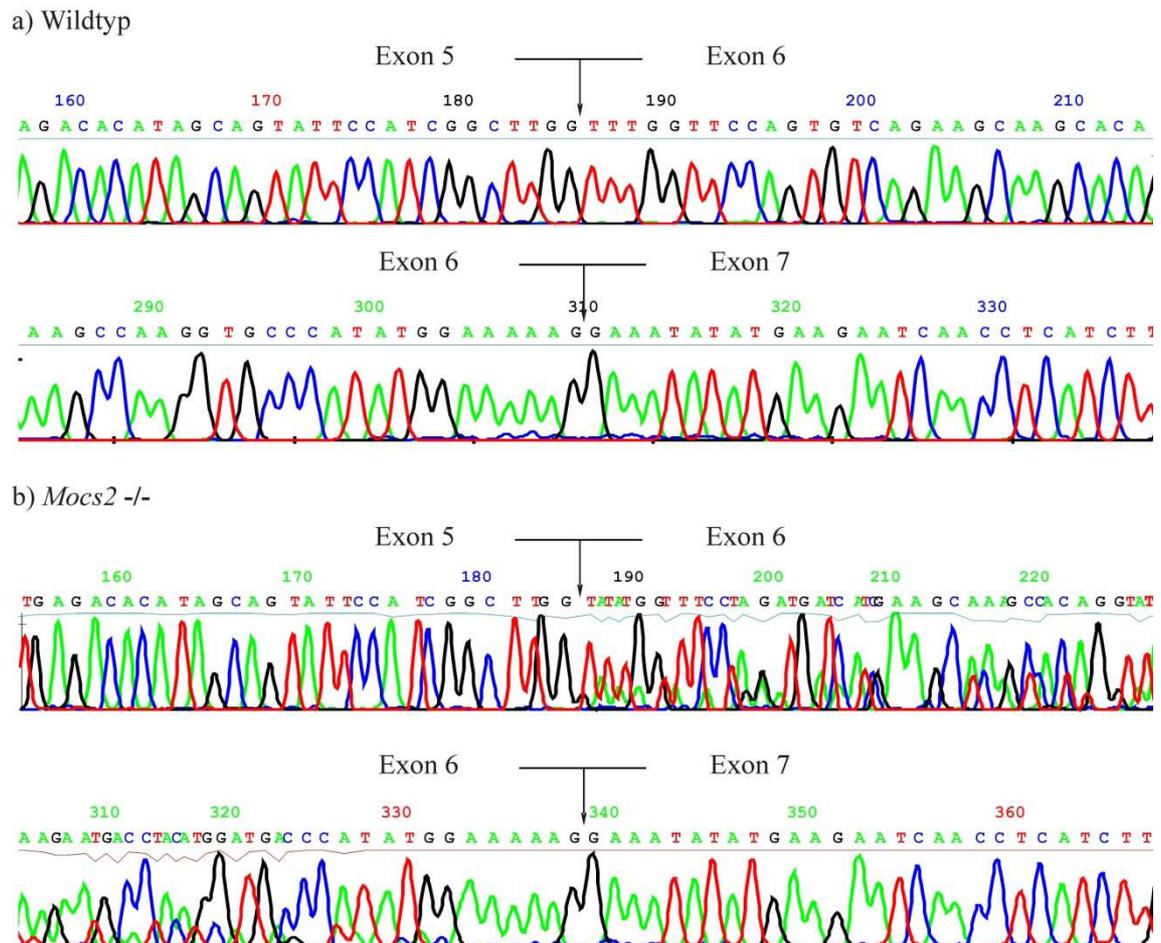


Abb. 3.45.: RT-PCR *Mocs2*-Expression in *Mocs2*-Knockout-Mäusen, Sequenznachweis der Transkripte in *Mocs2*<sup>-/-</sup> und *Mocs2*<sup>+/+</sup> Mäusen.

Die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte zeigte, dass zwei verschiedene Transkripte in den *Mocs2*<sup>-/-</sup> Mäusen vorhanden waren. Zur Vereinzelung der überlagerten Sequenzen wurden die PCR-Produkte in den T-Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy von Promega kloniert und mit Primern in der T7 und Sp6-Promotorregion des Plasmids sequenziert. Ein Fragment entsprach dem Wildtyptranskript des *Mocs2*-Gens und beinhaltete Exon 4 bis 7 mit dem Exon 6. Das zweite Fragment enthielt Exon 4, 5 und 7 ohne Exon 6, was den vorhergesagten Analysen des *Splice Site Prediction*-Programms entsprach.

Die Einbringung der Punktmutation 167+2 (T→C) in die 5' Donor-*splice site* des Introns 6 des *Mocs2*-Gens sollte zur Produktion einer mRNA führen, der die von Exon 6 kodierenden Bereiche fehlen. Jedoch wurde in den *Mocs2*<sup>-/-</sup> Mäusen, die homozygot für die Punktmutation waren, nachgewiesen, dass die mutierte 5' Donor-*splice site* des

Exons 6 in einigen Fällen doch erkannt wurde, was die Bildung des Wildtyptranskripts für die Spleißform II des *Mocs2*-Gens zur Folge hatte.

### 3.2.2.2.6. Phänotypische Analysen der *Mocs2-Knockout* Mäusen

Zur Bestätigung der Annahme, dass in den *Mocs2-Knockout*-Mäusen, die homozygot für die Punktmutation 167+2 (T→C) waren, es trotzdem zur Translation von MOCS2B kam, wurde der Phänotyp der Tiere untersucht.

Unterbrechungen des MoCo-Biosynthesewegs führen bei Patienten mit Mutationen im *MOCS1*- oder *MOCS2*-Gen zum gleichen Phänotyp. Deswegen wurde für die *Mocs2-Knockout*-Maus auch der gleiche Phänotyp wie bei der *Mocs1-Knockout*-Maus erwartet. Im Falle der *Mocs1*-defizienten Mäuse führte die Unterbrechung des MoCo-Biosyntheseweges dazu, dass sie im Durchschnitt 7.5 d nach der Geburt starben. Dabei zeigten die Mäuse bereits ab d 2 eine verminderte Gewichtszunahme [33]. Gewichtsvergleiche zwischen *Mocs2*+/, +/- und -/- Mäusen wiesen jedoch keine Unterschiede auf (Abb. 3.46.). Alle *Mocs2*-/- Tiere erreichten das adulte Entwicklungsstadium und waren von ihren gesunden *Mocs2*+/+ und *Mocs2*+/- Geschwistern nicht zu unterscheiden.

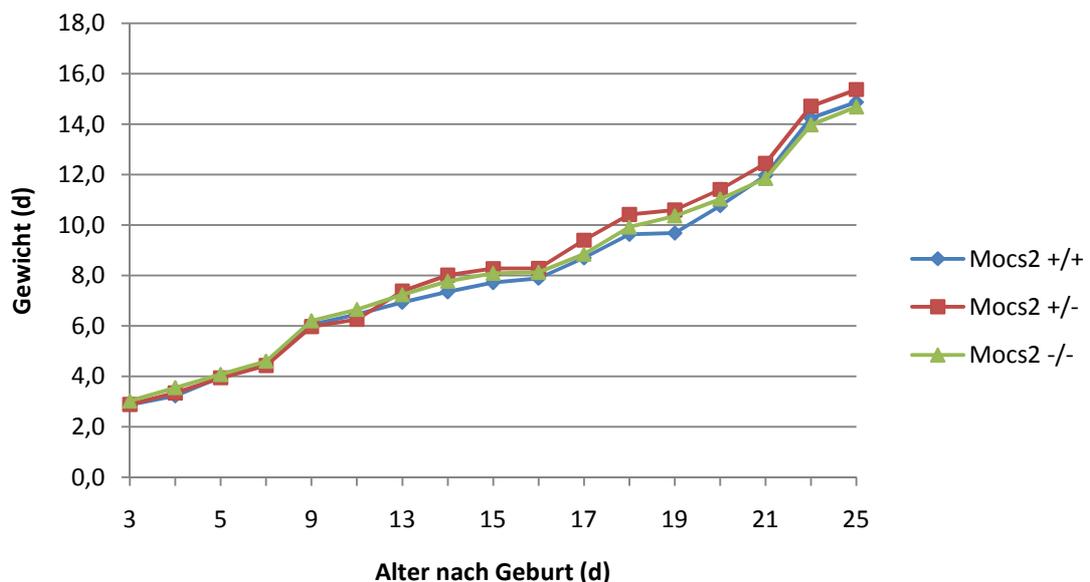


Abb. 3.46.: Gewichtsentwicklung *Mocs2* +/+, +/- und -/- Mäuse im neonatalem und juvenilen Alter.

Die mutierte 5' Donor-*splice site* des Introns 6 des *Mocs2*-Gens wird zu einem gewissen Teil noch erkannt, was in den *Mocs2*<sup>-/-</sup> Mäuse zur Bildung des Wildtyptranskript für die Spleißform II des *Mocs2*-Gens führt. *Mocs2*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten sich normal und waren von ihren *Mocs2*<sup>+/+</sup> und *Mocs2*<sup>+/-</sup> Geschwistern nicht zu unterscheiden, was dafür spricht, dass MOCS2B weiterhin translatiert wird.

## 4. Diskussion

### 4.1. cPMP-Substitutionstherapie am Tiermodell *Mocs1*-defizienter Mäuse

Die Molybdän-Cofaktor-Defizienz hat den Aktivitätsverlust der Molybdän-abhängigen Enzyme SOX, XDH und ADH zur Folge. Der daraus resultierende schwere Phänotyp beinhaltet schnell fortschreitende neurologische Schäden, die hauptsächlich durch die fehlende SOX-Aktivität verursacht werden. Betroffene Patienten kommen normalerweise kurz nach der Geburt unter klinische Kontrolle. Grund hierfür sind verzögertes Wachstum und starke Krämpfe, die schlecht auf medikamentöse Behandlungen ansprechen [6, 28]. Obwohl mildere Fälle beschrieben wurden [10, 31], sterben die meisten Patienten in der frühen Kindheit, einige überleben nur wenige Tage [28].

Zwei Drittel aller MoCo-defizienten Patienten tragen Mutationen im *MOCSI*-Gen, wodurch der erste Schritt der MoCo-Biosynthese unterbrochen wird. Anhand eines *MOCSI*-Knockout-Mausmodells sollten die molekularen Prozesse der Krankheitsentstehung untersucht und gentherapeutische Anwendungen etabliert werden [33]. Die MoCo-defizienten Mäuse wurden erzeugt, indem ein komplettes Exon des *Mocs1*-Gens durch homologe Rekombination mit einem Disruptionsvektor entfernt wurde. Daraus resultierten die Unterbrechung des murinen MoCo-Biosynthese-Weges und die komplette Inaktivierung der MoCo-abhängigen Enzyme SOX, XDH und ADH. Die MoCo-defizienten Mäuse zeigten einen ähnlich schweren Krankheitsverlauf wie menschliche Patienten mit Entwicklungsstörungen und schweren Krämpfen. Sie starben im Durchschnitt 7.5 d nach der Geburt. Die murine MoCo-Defizienz mit Mutationen im *Mocs1*-Gen wird, wie bei der humanen Form, als monogenetisch, autosomal-rezessive Krankheit vererbt [33].

Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte in den letzten Jahren bereits eine Substitutionstherapie mit cPMP, dem erstem Zwischenprodukt der MoCo-Biosynthese, etabliert werden [40]. Der Fokus der Behandlung lag in der Restauration der SOX, da deren Aktivitätsverlust der Hauptgrund für den letalen Phänotyp der MoCo-Defizienz

ist. Basierend auf der Bestimmung der SOX-Halbwertszeit von 3-4 d im Nagermodell [102] und der kalkulierten Menge an cPMP, die nötig für die *in vitro* Restauration der MPT-Biosynthese im Leberhextrakt von *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen war, wurden *Mocs1*-defiziente Mäuse mit verschiedenen cPMP-Mengen behandelt. Die in Schwarz *et al.* (2004) beschriebenen Experimente zeigten, dass die Dosis an injiziertem cPMP einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Mäuse hatte. Als optimale Menge für die cPMP-Substitution wurde die intrahepatische Injektion von 2 µg cPMP in den ersten drei Wochen jeden dritten Tag nach der Geburt, und ab der 4. Woche auf 4 µg, bestimmt. Geringere Dosen cPMP hatten eine erhöhte Sterblichkeit der Mäuse zwischen d 40 und d 70 zur Folge, was eine kritische Phase der Gehirnentwicklung darstellt. Die beschriebene cPMP-Dosis von 2 µg bzw. 4 µg jeden dritten Tag führte dazu, dass keine Maus in dem kritischen Zeitraum über d 40 starb. Sie erreichten eine durchschnittliche Lebensdauer von 91.8 d [40]. Der Phänotyp der MoCo-Defizienz, der hauptsächlich durch die fehlende SOX-Aktivität verursacht wird, konnte mit der cPMP-Behandlung verhindert werden. Es kam jedoch in *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen, die durch die cPMP-Injektion ein Alter über 70 d erreichten, zu Komplikationen, die auf eine verminderte XDH-Aktivität schließen ließ. Die XDH-Aktivität war am ersten Tag nach der Injektion höher als die der SOX, sank aber anschließend unter 4 % des Wildtypniveaus. Die geringe XDH-Aktivität verursachte die Bildung von Xanthinsteinen in den Nieren behandelter Mäuse, wie sie auch in Patienten mit klassischer Xanthinuria Typ I beobachtet wurden [24]. In einigen Fällen führte die Verstopfung der Nierentubuli durch Xanthinablagerungen zum frühen Tod der Tiere [40].

In Hinblick auf die Anwendung bei menschlichen MoCo-Patienten sollte deshalb untersucht werden, ob eine weitere Erhöhung der cPMP-Menge zur Verlängerung der Lebensdauer führt und ob dadurch die Bildung von Xanthinsteinen in den Nieren der behandelten Mäuse verhindert werden kann.

Die erste Gruppe von *Mocs1*-defizienten Mäusen erhielt in den ersten drei Wochen nach der Geburt intrahepatische Injektionen mit 2 µg cPMP jeden dritten Tag. Ab der 4. Woche wurde die Menge auf 4 µg erhöht. Mit dieser Behandlung erreichten die *Mocs1*-defizienten Mäuse eine Lebensdauer von 91.8 d und es wurde ein MPT-Gehalt von 16 % im Vergleich zum Wildtyplevel in der Leber der behandelten Tiere gemessen [40].

Die zweite Gruppe von *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tieren wurde in der ersten Woche ebenfalls mit 2 µg cPMP intrahepatisch behandelt. Ab der zweiten Woche wurde die Dosis auf 4 µg erhöht. In der dritten Woche bekamen die Tiere 8 µg, in der 4. Woche 12 µg und in der 5. Woche 16 µg cPMP injiziert. Ab der 6. Woche bis zum Lebensende erhielten die Mäuse der zweiten Gruppe 20 µg cPMP, anstatt 4 µg cPMP, injiziert. Zusätzlich zur erhöhten cPMP-Dosis sollte untersucht werden, ob die Verkürzung der zeitlichen Abstände den raschen Abfall der XDH-Aktivität ausgleichen kann. Basierend auf Untersuchungen in Mausfibroblasten, die eine Halbwertszeit der zur XDH korrespondierenden mRNA von 12 bis 16 h ergaben [103], wurde die Behandlung nicht jeden dritten Tag, sondern täglich durchgeführt.

Die Umstellung der cPMP-Substitution auf die erhöhte Dosis mit kürzeren Abständen der Verabreichung bewirkte eine Verlängerung der Lebensdauer der Mäuse auf durchschnittlich 160 d. Allerdings konnte der MPT-Gehalt in der Leber nur um die Hälfte, d.h. von 16 % auf 33 % im Vergleich zum Wildtyplevel erhöht werden, obwohl die cPMP-Menge um das 5fache erhöht wurde. Die Nieren der 6 *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die täglich cPMP injiziert bekamen, zeigten bei der Obduktion keine morphologischen Veränderungen, die auf Xanthinablagerungen hindeuteten. Die Verringerung der zeitlichen Abstände zwischen den cPMP-Behandlungen, konnte den raschen Aktivitätsverlust der XDH entgegen wirken. Die erhöhte Dosis an cPMP verlängerte die Lebensdauer der Mäuse. Jedoch scheint die Umwandlung in MPT nur bis zu einem bestimmten Punkt mit der eingebrachten Menge an cPMP zu korrelieren, da eine 5fache Erhöhung der cPMP-Dosis nur eine zweifache Erhöhung des MPT-Werts in der Leber bewirkt. Schwarz *et al.* (2004) legten dar, dass das eingebrachte cPMP sehr schnell in MPT umgewandelt wird und damit die wiederhergestellten Enzymaktivitäten am ersten Tag der Behandlung am höchsten sind. Die relativen SOX und die XDH-Aktivitäten überstiegen sogar das restaurierte MPT-Level, wenn man sie ins Verhältnis zum Wildtypwert stellte (siehe Abb. 4.1.).

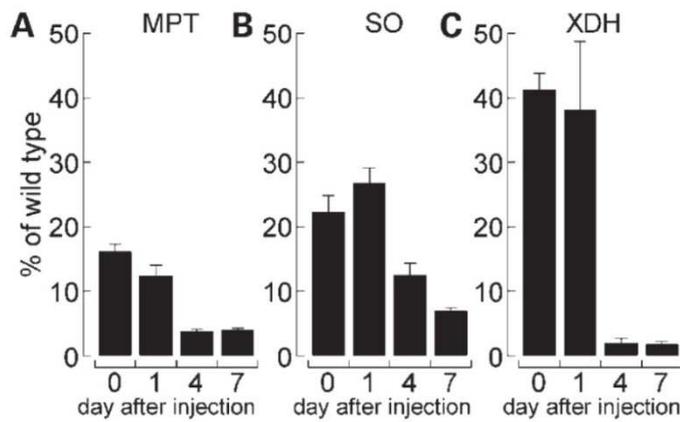


Abb. 4.1.: (aus Schwarz *et al.*, 2004) Vergleich der restaurierten Menge an MPT mit den Enzymaktivitäten der XDH und SOX im Lebergewebe cPMP-behandelter *Mocs1*-defizienter Mäuse: *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden bis d 25-55 mit cPMP behandelt (ansteigende Mengen mit 2 µg cPMP in der ersten Woche bis 8 µg nach dem Absetzen um d 20). Am d 0 (4 h nach der letzten Injektion), d 1, d 4 und d 7 nach Absetzen der cPMP-Behandlung wurden jeweils zwei Mäuse abgetötet. Jeder Wert wurde 4fach bestimmt. Der Gesamtwert an MPT inklusive MoCo (A), die SOX-Aktivität (B) und XDH-Aktivität (C) sind in Prozent korrespondierend zum entsprechenden Wildtypwert angegeben [40].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MoCo effektiv in die entsprechenden Apoenzyme eingebaut wird. Eine zweite Erklärung wäre, dass in gesunden Zellen ein gewisser Anteil an MoCo nicht in Mo-abhängige Enzyme eingebaut wird, aber essentiell für den zellulären Umsatz der Enzyme ist [40].

Entsprechende Untersuchungsergebnisse wurden schon in Fibroblasten eines MoCo-defizienten Patienten mit Mutationen im *GEPH*-Gen beschrieben. Die Zugabe von großen Mengen an Molybdat ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) in das Zellkulturmedium konnte die MoCo-Biosynthese in Abwesenheit des Gephyrins restaurieren. Es wurde dabei eine überproportional hohe SOX-Aktivität im Vergleich zur restaurierten Menge an MoCo beobachtet (siehe Abb. 4.2.) [4].

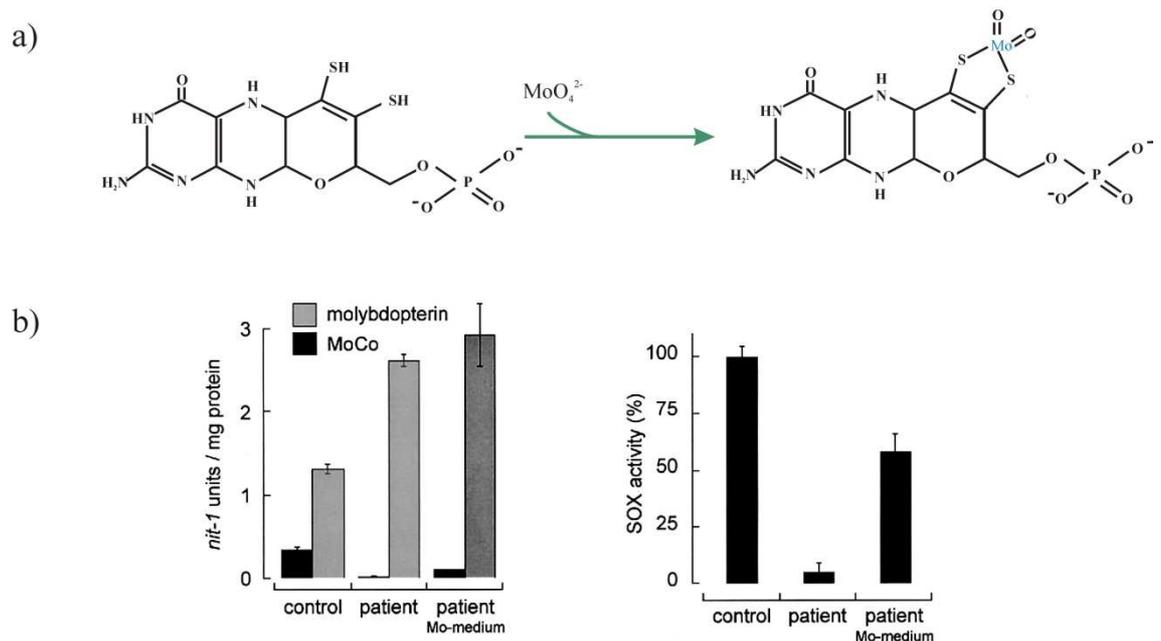


Abb. 4.2.: (aus Reiss *et al.*, 2001) Biochemische Charakterisierung von Fibroblasten mit einer Mutation im *GEPH*-Gen. a) Die MoCo-Biosynthese kann durch die Zugabe von hohen Mengen an Molybdät ins Zellkulturmedium restauriert werden, obwohl die Fibroblasten kein Gephyrin mehr bilden. b) Untersuchung des Gehalts an Molybdopterin, aktivem MoCo und der SOX-Aktivität in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (links), eines Patienten ohne (Mitte) und mit (rechts) Molybdät-Supplementierung [4].

Experimente mit verschiedenen Arten der cPMP-Injektion zeigten, dass eine intraperitoneale Injektion des cPMPs möglich ist, aber die intravenöse und die intrahepatische Applikation die beste Option darstellen [40, 104]. Für die Praktikabilität im klinischen Alltag wäre jedoch die orale Gabe von Vorteil.

Für die Applikation in Mäuse wurde das cPMP mit PBS und dH<sub>2</sub>O auf die entsprechende Konzentration und physiologischen pH-Wert eingestellt. Allerdings sind Pterine aufgrund der verschiedenen hydrophilen Gruppen schlecht wasserlöslich, was zur Bildung unlöslicher Aggregate führen könnte [105-106]. Deshalb wurde vermutet, dass die orale Gabe von cPMP die bessere Option für die Einbringung des cPMPs sein könnte [104]. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden 6 *Mocs1*-defiziente Mäuse bis d 81 mit täglichen intrahepatischen cPMP-Injektionen vorbehandelt. Anschließend wurde den Mäusen täglich cPMP oral verabreicht. Nach der Umstellung lebten die Tiere durchschnittlich  $54 \pm 30$  d. Die große Standardabweichung in der Lebensdauer der oral behandelten Tiere resultierte aus Xanthinablagerungen in den Nieren, die unter anderem zur Lyse des Nierengewebes führte und damit zum Tod der Mäuse. Messungen des

MPT-Gehalts in der Leber abgetöteter oral behandelte Tiere ergaben 2 % im Vergleich zum Wildtypniveau. Die Kontrollgruppe, die weiterhin die gleiche Menge an cPMP intrahepatisch injiziert bekam, erreichte eine durchschnittliche Lebensdauer von 79 d nach der Umstellung der Applikationsart und einen MPT-Gehalt von 11 % im Vergleich zum Wildtypniveau. Die Obduktion dieser Mäuse ergab keine morphologischen Auffälligkeiten an den Nieren.

Die eingesetzte Menge an cPMP reichte also aus, den Phänotyp der MoCo-Defizienz über einen langen Zeitraum aufzuheben. Jedoch ist die orale Gabe als Applikationsform für die cPMP-Substitutionstherapie weniger geeignet, da sie zu einem geringeren MPT-Gehalt in Leber der behandelten Mäuse und dadurch zu Xanthinablagerungen in den Nieren führte.

Kügler *et al.* (2007) vermuteten, dass der niedrigere pH-Wert des Mäuseurins [107] die Ursache für die Xanthinansammlungen sein könnte, da sich die Löslichkeit bei einem pH-Wert unter 7.0 deutlich verringert [108]. In humanen Patienten mit MoCo-Defizienz wurden keine Xanthinsteine aufgrund der fehlenden XDH-Aktivität beobachtet [109-110]. Zurzeit werden zwei MoCo-defiziente Patienten mit Mutationen im *MOCSI*-Gen mittels cPMP-Substitutionstherapie behandelt. Bei beiden Patienten wird der Phänotyp der Krankheit deutlich verbessert. Probleme, die auf eine geringe XDH-Aktivität zurückzuführen wären, traten bislang nicht auf (Prof. Dr. Günter Schwarz, persönliche Korrespondenz). Das spricht dafür, dass die physiologischen Unterschiede zwischen den Spezies die Ursache für die Xanthinablagerungen in den Mäusenieren waren und das Hauptaugenmerk der Substitutionstherapie mit cPMP weiterhin auf der Restauration der SOX liegen sollte.

## **4.2. Alternative Substitutionstherapie mit pflanzlicher Sulfitoxidase**

Eine Alternative zur cPMP-Substitution eröffnete sich mit der Identifizierung und biochemischen Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidase (PSO) aus *Arabidopsis thaliana* [45]. Im Gegensatz zur SOX ist die PSO nicht im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und verwendet, anstatt Cytochrom *c*, Sauerstoff als

Elektronenakzeptor. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde eine Substitutionstherapie mit aufgereinigter und PEGylierter PSO für die Behandlung der MoCo-Defizienz in Betracht gezogen.

*Mocs1*-defiziente Mäuse wurden ab der Geburt jeden zweiten Tag mit intrahepatischen Injektionen des PEG-PSO-Gemischs behandelt. Untersuchungen zeigten, dass 90 nmol des eingesetzten PEG-PSO der SOX-Aktivität entsprechen, die durch die Injektion von 32 µg cPMP restauriert wird (Prof. Dr. Günter Schwarz, persönliche Korrespondenz). Ausgehend davon, wurden den Mäusen 0.005, 0.05, 0.5 oder 5 nmol PEG-PSO injiziert. Dabei zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 0.05 nmol PEG-PSO alle Mäuse eine durchschnittliche Lebensdauer von 16 d mit einer geringen Abweichung erreichten. *Mocs1*-defiziente Mäuse leben im Durchschnitt 7.5 d. Die PSO-behandelten Tiere erreichten durchschnittlich 16 d. Die verlängerte Lebensdauer spricht dafür, dass die Detoxifizierung durch die PSO im murinen Organismus stattfindet.

Jedoch zeigten Obduktionen der gestorbenen Tiere, dass der Gastrointestinaltrakt der Mäuse hochgradig entzündet war, was in zwei der sieben behandelten Mäuse zu einer Darmperforation führte. Es stellte sich die Frage, was die Darmreizung auslösen konnte. Abuchowski *et al.* beschrieben bereits 1977, dass die PEGylierung eine erhöhte Wirkstoffstabilität und Verringerung der Immunogenität des Rinderserumalbumin bewirkte [111]. Zahlreiche Anwendungen wie die Behandlung von Hepatitis C mit PEGyliertem  $\alpha$ -Interferon [112] oder die Chemotherapie von Krebs mit Substanzen, die in PEGylierten Liposomen eingeschlossen waren [113], wurden bisher beschrieben. Untersuchungen zeigten, dass das PEG in Abhängigkeit von seiner Molekülgröße sehr schnell im Körper abgebaut wird und nicht toxisch ist [114]. Wahrscheinlich gelangt bei der Injektion in die Leber das PEG-PSO über die Gallengänge auch in das Darmgewebe, da das Enzym durch die PEGylierung im Körper zirkulieren konnte. Eine mögliche Erklärung für die Entzündungen könnte sein, dass bei der Detoxifizierung von Sulfid so viel Wasserstoffperoxid gebildet wurde, dass es vom murinen Organismus nicht vollständig abgebaut werden konnte und das Darmgewebe angriff. Injektionen mit unmodifizierter PSO könnten klären, ob die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung bei der Detoxifizierung das Darmgewebe angreift und die PEGylierung als Auslöser der Entzündungen ausgeschlossen werden kann.

### 4.3. Somatische Gentherapie

Hauptziel der Gentherapie ist die Wiederherstellung der Proteinexpression durch das Einbringen von funktionellen Genen in geeignete Zielzellen. Die grundlegenden Prinzipien der Gentherapie sind zwar einfach, hängen aber wesentlich von der Entwicklung geeigneter Vektoren für den Gentransfer ab. Im Verlauf der letzten Jahre wurden dafür eine Reihe von Hilfsmitteln entwickelt, die sich in zwei Kategorien einteilen lassen: virale und nichtvirale Systeme. Nichtvirale Systeme beruhen zum Beispiel auf der direkten Injektion von unverpackter oder in Trägermolekülen verpackter Plasmid-DNA. Die Nachteile dieser Vektoren liegen in der geringeren Effektivität und der kürzeren Expressionsdauer im Vergleich zu den viralen Vektoren. Virale Systeme basieren auf der Fähigkeit von replikativen Viren, genetische Informationen in Zielzellen einzuschleusen [53]. Die Verwendung dieser Vektoren ist jedoch mit Problemen, wie der endogenen Virusrekombination, onkogenen Effekten und unerwarteten Immunantworten behaftet [115].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl nichtvirale als auch virale Vektoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Phänotyp der MoCo-Defizienz zu verbessern oder aufzuheben. *Mocs1*-defiziente Mäuse dienten dabei als Modellorganismus.

#### 4.3.1. Expressionskassette

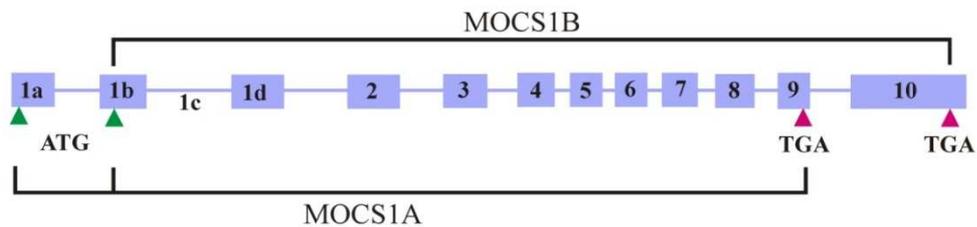
Die gentherapeutische Behandlung *Mocs1*-defizienter Mäuse erforderte eine Expressionskassette, die das funktionelle Gen für die Bildung der Proteine MOCS1A und MOCS1B zur Restauration der MoCo-Biosynthese enthielt. Da der Stoffwechselweg der MoCo-Biosynthese in allen Organismen hoch konserviert ist, wurde das humane *MOCSI*-Gen zur Behandlung der Mäuse verwendet. Das *MOCSI*-Gen weist eine ungewöhnliche bicistronische Genstruktur auf und kodiert für die zwei enzymatisch aktiven Proteine MOCS1A und MOCS1B [39].

MOCS1A und homologe Proteine gehören zur Familie der S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen radikalen Enzyme und besitzen im N- und C-terminalen Bereich des Proteins Cystein-Cluster, an die Eisen-Schwefel-Cluster gebunden sind [116]. Die katalytische Aktivität von MOCS1A benötigt ein frei zugängliches Doppel-Glycin-Motiv, das vermutlich für die Interaktion mit MOCS1B verantwortlich ist, oder in einer

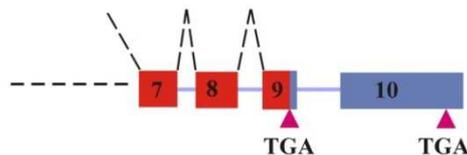
radikal-basierenden Reaktion des SAM abhängigen Proteins involviert ist. Die exakte Funktion des MOCS1B-Proteins ist bislang unbekannt [117]. Hänzelmann *et al.* (2002) spekulierten, dass es entweder als Rückgrat für die Bildung von cPMP dient, oder dass MOCS1B das sauerstoffempfindliche cPMP auf dessen Transport zur Molybdopterin-synthese schützt.

Neben der bicistronischen Spleißform I der *MOCS1*-mRNA, die für MOCS1A kodiert, wurden monocistronische Transkripte identifiziert (siehe Abb. 4.3. nächste Seite). Alternative Spleißmechanismen führen dabei unter Umgehung des MOCS1A-Stopcodons im Exon 9 zur Expression von MOCS1A-MOCS1B-Fusionsproteinen (Spleißform II und III) [39].

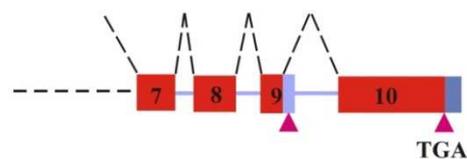
genomische DNA *MOCS1*



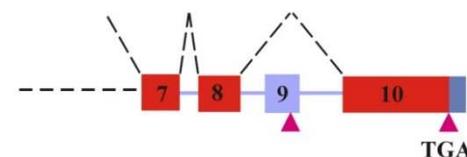
Spleißform I: bicistronisches Transkript - aktives MOCS1A



Spleißform II: monocistronisches Transkript - inaktives MOCS1A und aktives MOCS1B



Spleißform III: monocistronisches Transkript - inaktives MOCS1A und aktives MOCS1B



■ Kodierende Region ■ Untranslatierte Region

Abb. 4.3.: Genomische Struktur und Spleißformen des humanen *MOCS1*-Gens. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4337?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4337?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum)

Für die cPMP-Synthese wird die konzertierte Aktion von mono- und bicistronischen *MOCSI*-Transkripten benötigt. Vom bicistronischen Transkript wird MOCS1A mit seinem katalytisch aktiven C-terminalen Doppel-Glycin-Motiv exprimiert. MOCS1B wird von monocistronischen Transkripten in Form eines MOCS1A-MOCS1B Fusionsproteins exprimiert, bei dem das C-terminale Doppel-Glycin-Motiv fehlt [118].

Für die 5'-Region des *MOCSI*-Gens existieren vier weitere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Sie unterscheiden sich in sich gegenseitig ausschließenden Startpunkten und einem fakultativen Intron im Exon 1 (Übersicht siehe Abb. 4.4.). Exon 1 des humanen *MOCSI*-Gens besteht aus vier Abschnitten, die in Exon 1a, 1b, 1d und Intron 1c eingeteilt sind. Das Transkript der „Larin“-Variante startet mit Exon 1a, welches ein Startcodon trägt und 6 kb aufwärts von Exon 1b liegt. Durch das Fehlen einer 3'-Spleißstelle im Intronbereich aufwärts von Exon 1b wird beim Spleißen Exon 1a mit 1d verbunden. Bei der „Reiss“-Variante startet das Transkript mit Exon 1b, welches ein sich von der „Larin“-Variante unterscheidendes Startcodon trägt. Die Transkription und Translation verlaufen durch Exon 1b, 1c und 1d. Die dritte Variante nach „Gross-Hardt“ tritt im Vergleich zur „Reiss-Variante“ sehr selten auf und besteht nur aus Exon 1b und Exon 1d ohne Intron 1c. Arenas *et al.* (2009) beschrieben eine weitere Isoform, bei der das Transkript wie bei der Larin-Variante im Exon 1a startet, jedoch Exon 1d fehlt [31].

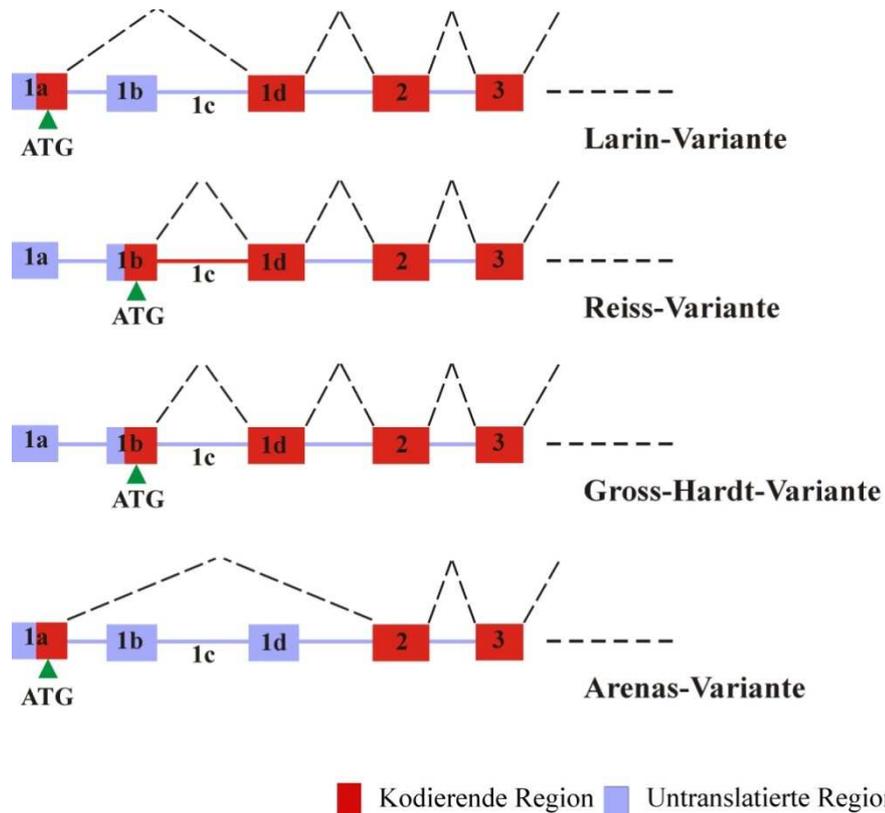


Abb. 4.4.: Spleißformen der 5'-Region des humanen *MOCSI*-Gens [31, 93].

Die Sequenzen im Exon 1 unterschieden sich stark von Organismus zu Organismus. Jedoch wies die Expression der verschiedenen mRNAs keine sichtbaren Unterschiede in den Geweben auf. Das ist einerseits durch das geringe Expressionslevel des *MOCSI*-Gens begründet und andererseits reflektiert dies anscheinend eine fehlende physiologische Notwendigkeit der verschiedenen Spleißvarianten [93]. Die vier verschiedenen Transkripte für die 5'-Region und drei Spleißformen für die 3'-Region zeigen die Komplexität des alternativen Spleißens des *MOCSI*-Gens.

In vorangegangenen Experimenten wurde eine *MOCSI*-Expressionskassette hergestellt, die Exon 1b, 1c und 1d beinhaltet, was der Reiss-Variante entspricht. Außerdem enthält sie Exon 2 bis 9, eine verkürzte Form des Introns 9, sowie Exon 10. Intron 9 ist für das alternative Spleißen im 3' Bereich erforderlich, welches zur Expression des Fusionsproteins MOCS1A-MOCS1B führt.

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Antikörper für die Untersuchung der MOCS1A und MOCS1B Proteine zur Verfügung stehen, musste eine Alternative zur Untersuchung der Funktionalität der Expressionskassette gefunden werden. Deswegen

wurden transgene Mäuse hergestellt, die in jeder Zelle die *MOCSI*-Expressionskassette enthielten. Diese Tiere wurden wiederum mit heterozygoten *Mocs1*-defizienten Mäusen verpaart. Das Ergebnis von weiteren Verpaarungen waren homozygote *Mocs1*-defiziente Mäuse, die in jeder Zelle die humane *MOCSI*-Expressionskassette trugen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Transkripte für das MOCS1A- als auch für das MOCS1B-Protein exprimiert wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression der humanen MOCS1A und MOCS1B-Proteine den Phänotyp der murinen MoCo-Defizienz vollständig aufheben konnte, was die Funktionalität des Konstrukts bewies.

#### 4.3.2. Nichtvirale Gentherapie

Die MoCo-Defizienz ist ein ideales Modell für die Gentherapie bei rezessiv vererbten Stoffwechselkrankheiten. Das begründet sich aus der Tatsache, dass geringste Transkriptmengen und Restaktivitäten in der MoCo-Biosynthese für eine ausreichende Aktivität der MoCo-abhängigen Enzyme genügen [28]. Obwohl das *MOCSI*-Gen in verschiedenen Geweben exprimiert wird, zeigte die Substitutionstherapie mit cPMP, dass im Mausmodell die Leber als Zielorgan für die Behandlung ausreicht [40]. Die Anwendung einer somatischen Gentherapie wird dadurch zusätzlich vereinfacht.

Eine Möglichkeit der gentherapeutischen Anwendung stellt die Injektion nackter Plasmid-DNA dar. In vorangegangenen Experimenten wurden hydrodynamische Schwanzinjektionen zur Einbringung des Plasmids pRitaIX mit der *MOCSI*-Expressionskassette in *Mocs1*-defiziente Mäuse verwendet [52]. Dabei wurde ein hohes Volumen einer Plasmid-PBS-Lösung in kurzer Zeit, unter hohem Druck, in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Diese Methode dient vor allem der Aufnahme von Plasmid-DNA in die Leber [119]. Dennoch konnte die hydrodynamische Injektion die MoCo-Biosynthese nicht restaurieren [52].

Obwohl der Aktivitätsverlust der *MOCSI*-exprimierten Proteine ernste Folgen hat [13], weist das *Mocs1*-Gen nur ein sehr geringes Expressionslevel auf, so dass eine minimale Expressionsrate eine Besserung des Phänotyps hervorrufen müsste. Außerdem wurde in dem Konstrukt der  $\beta$ -Aktin-Promotor und der CMV-Enhancer verwendet, die eine der am stärksten exprimierenden Promotor/Enhancer-Kombinationen in der Leber darstellt

[120]. Deshalb musste in weiteren Versuchen das Hauptaugenmerk auf die Erhöhung der Transfektionsrate des verwendeten Plasmids in die Zielzellen gelegt werden.

Die zelluläre Aufnahme der Plasmid-DNA ist eins der größten Probleme des nichtviralen Gentransfers. Wird die Plasmid-DNA nicht aufgenommen, wird sie durch Nukleasen schnell abgebaut. Daraus resultiert eine sehr geringe Expression, die von eingebrachten Plasmid-Vektoren aufgrund ihres episomalen Vorliegens in der Zelle ohne hin schon begrenzt ist. Zur Steigerung der Transfektionsrate müssen Wege gefunden werden, die die Plasmid-DNA effizient vor Nukleasen und dem Immunsystem schützen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Atellocollagen die Plasmid-DNA als Trägermaterial schützen und somit die Gentransferrate erhöhen kann. Atellocollagen ist eine Abwandlung von Kollagen, ein im Menschen vorkommendes Strukturprotein des Bindegewebes. Kollagen wird aus tierischem Gewebe wie z.B. Kälberhaut gewonnen und enthält an den Enden sogenannte Telopeptide. Da diese Peptide als Antigene vom Immunsystem erkannt werden können, werden sie durch einen Proteaseverdau abgespalten. Durch die Abspaltung der Telopeptide löst das Biomaterial kaum Immunreaktionen in der Maus aus. Aus der Literatur ist bekannt, dass Plasmid/Atellocollagen-Komplexe sehr effizient von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden, und dass die Plasmid-DNA in der Zelle durch das Atellocollagen über einen längeren Zeitraum stabil gehalten wird [121].

Für die gentherapeutische Behandlung wurde das Plasmid pRitaIX mit Atellocollagen vermischt und *Mocs1*-defizienten Mäusen im neonatalem sowie adulten Entwicklungsstadium injiziert. Jedoch hatte der Einsatz des Trägermaterials keine Verlängerung der Lebensdauer der behandelten Mäuse zur Folge. Parallelversuche mit einem Plasmid, bei dem das *MOCSI*-Gen durch eine *EGFP*-Expressionskassette ausgetauscht war, bestätigten die Ergebnisse. Nur in einem von vier behandelten Tieren wurde eine schwache *EGFP*-Expression detektiert, die aber keiner Struktur des Lebergewebes zugeordnet werden konnte.

Die Verwendung von Atellocollagen als Trägermaterial für die Plasmid-DNA konnte die Gentransferrate nicht erhöhen und somit auch keine Verbesserung des Phänotyps der MoCo-Defizienz Typ A erreichen.

### 4.3.3. Virale Gentherapie

Der generelle Nachteil der nichtviralen Gentherapie ist die geringe Transfektionseffizienz des gewünschten Zielgewebes und die kürzere Expressionsdauer im Vergleich zu den viralen Vektoren. Aus diesem Grund wurden für die somatische Gentherapie der MoCo-Defizienz virale Vektoren in Betracht gezogen.

In vielen genterapeutischen Versuchsansätzen erwiesen sich die auf AAV basierenden Vektoren als besonders geeignet, was hauptsächlich auf die lange und effiziente transgene Expression in einem weiten Spektrum an Zelltypen wie Leber, Muskeln, der Retina und den zentralen Nervensystem zurückzuführen ist [122].

Für die genterapeutische Behandlung der MoCo-Defizienz Typ A war es notwendig einen viralen Vektor zu verwenden, der einen hohen Tropismus für die Leber zeigt. Das begründet sich aus der Tatsache, dass die klinischen Hauptmerkmale der Krankheit durch den Aktivitätsverlust der MoCo-abhängigen SOX verursacht werden, die hauptsächlich in der Leber exprimiert wird [95]. Bisher sind 11 verschiedene Serotypen des AAV bekannt [123]. Die unterschiedlichen Antigene auf der Oberfläche bestimmen mit welchen Rezeptoren der Viruspartikel interagiert und so die Zellen transduziert. Von allen bekannten Serotypen zeigt AAV1 den größten Tropismus für Muskeln und Leber [124]. AAV2 ist der meist genutzte Serotyp und hat ein breites Wirtsspektrum [53].

#### 4.3.3.1. Untersuchung der Transduktionseigenschaften des AAV-Vektors

Für die virale Gentherapie der MoCo-Defizienz wurden chimäre rAAVs genutzt, deren Capsidhüllen zur Hälfte AAV1- und AAV2-Antigene trugen. Dieser chimäre rAAV zeigte in vorangegangenen Experimenten einen höheren Tropismus für die Leber und für Muskelgewebe als rAAVs mit Serotyp 1 und 2 allein [86].

Neben den Hüllproteinen die *in trans* von Helferplasmiden und Helferviren kodiert werden, wurden *cis*-aktive regulatorische Elemente wie die ITRs und das WPRE benötigt, ohne die die transgene Transkription nach dem Eindringen des rAAV in die Wirtszelle nicht stattfinden kann. So wurde ein Vektorplasmid hergestellt, das außer den *cis*-aktiven Elementen die zuvor im Mausmodell getestete *MOCSI*- Expressionskassette enthielt (AAV-HBA-*MOCSI*).

Vor der eigentlichen gentherapeutischen Behandlung der MoCo-Defizienz erfolgte die Überprüfung der Transduktionseigenschaften des rAAV vom chimären Serotyp 1/2. Einerseits wurde untersucht, welche Zielgewebe der rAAV transduzierte und ob die Applikationsform einen Einfluss auf die Gewebeverteilung hatte. Zur Detektion der transduzierten Zellen wurde ein viraler Vektor genutzt, der anstatt der *MOCSI*-Expressionskassette eine *EGFP*-Expressionskassette enthielt und entweder intrahepatisch oder intravenös in C57B/6N-Mäuse injiziert. Dabei zeigte sich, dass nach einer einzelnen AAV-*EGFP*-Injektion das Lebergewebe der behandelten Mäuse vollständig transduziert war. Andere Organe wie die Lunge, das Herz und das Gehirn zeigten nur eine schwache *EGFP*-Expression. Die intravenösen und intrahepatischen Applikationen des rAAV mit dem Serotyp 1/2 führten zu keinen Unterschieden in der Gewebeverteilung. Diese Untersuchungen fanden an Mäuse statt, die alle ein adultes Alter erreicht hatten.

Das nächste Experiment sollte zeigen, ob der Zeitpunkt der rAAV-Injektion einen Einfluss auf die Gewebeverteilung hatte. Aus diesem Grund erhielten Mäuse im neonatalem Entwicklungsstadium, d.h. am d 6 postnatal, eine intrahepatische AAV-*EGFP*-Injektion. Es zeigte sich, dass die Injektion in diesem frühen Stadium der Entwicklung nicht nur zur Transduktion der Leber führt, sondern auch in der Lunge, im Herzen und im Gehirn. Die stärkste Expression war in den Kardiomyocyten des Herzmuskels zu verzeichnen.

Die Langzeitbeobachtung der von rAAV stammenden *EGFP*-Expression zeigte, dass in den neonatal behandelten Tieren die Leberzellen nach einer Woche vollständig transduziert waren. Jedoch sank die Anzahl der Transgen-exprimierenden Hepatozyten innerhalb des ersten Monats bis auf 5 % des ursprünglichen Niveaus ab. Ab einem Monat nach dem Therapiebeginn blieb die Anzahl der exprimierenden Leberzellen konstant. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich bei der Untersuchung der Nieren und des Gehirns. Eine Ausnahme stellte die *EGFP*-Expression in den Kardiomyocyten dar, die nach 10.5 Monaten nur auf ein Level von 50 % des Anfangswerts abgesunken war.

Die beobachtete Abnahme der *EGFP*-Expression nach der Transduktion der Leberzellen in den neonatalen Mäusen kann zwei verschiedene Ursachen haben. Zum einen gaben Versuche mit transgenen Mäusen, die in jeder Zelle ihres Körpers die *EGFP*-Expressionskassette trugen, einen Hinweis darauf, dass nicht die

Transduktionsrate sondern die Persistenz der Expression für die Gewebe-spezifischen Unterschiede verantwortlich war. Sie zeigten ein ähnliches Expressionsmuster wie die neonatal mit den rAAV behandelten Mäuse (persönliche Korrespondenz Waja Wegner, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Göttingen). Zum anderem reflektiert die Abnahme der *EGFP*-Expression einen Verdünnungseffekt, der durch das Wachstum der Leberzellen hervorgerufen wird. Dieser Verdünnungseffekt scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die neonatal behandelten Mäuse eine höhere Sterblichkeit zeigen als die im adulten Alter behandelten Mäuse. AAV-Vektoren liegen nach der Transduktion des Zielgewebes in 90 % der Fälle in episomaler Form vor [125]. Aufgrund der nichtintegrierten Form gehen diese DNA-Stücke durch Zellteilungen während des Leberwachstums verloren [126]. Dies ist ein natürlicher Prozess, der die transgene Expression von AAV-Vektoren limitiert und eventuell Reapplikationen notwendig macht [123]. Doch durch das rasche Leberwachstum in juvenilem Alter der Mäuse verstärkt sich der Effekt bei den am d 1 und d 4 behandelten Mäusen, so dass der Erfolg der viralen Therapie gemindert wird.

Die Vorversuche mit *AAV-EGFP*-Injektionen zeigten, dass die Applikationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Mausentwicklung einen großen Einfluss darauf haben, welche Gewebe transduziert wurden. Eine Injektion des rAAV im neonatalem Entwicklungsstadium hatte eine weitverbreitete Transduktion der Gewebe zur Folge. Bei den Tieren, die im adultem Entwicklungsstadium behandelt wurden, begrenzte sich die Transduktion dagegen hauptsächlich auf das Lebergewebe.

#### **4.3.3.2. AAV-vermittelter Gentransfer in Mausmodell der MoCo-Defizienz Typ A**

Der Injektionszeitpunkt in der Entwicklung der Mäuse beeinflusst die Gewebeverteilung des rAAVs. Aus diesem Grund wurden zwei Gruppen *Mocs1*-defizienter Mäuse in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit dem viralen Vektor behandelt, der die *MOCSI*-Expressionskassette beinhaltet (*AAV-MOCSI*).

Die erste Gruppe wurde im neonatalem Entwicklungsstadium behandelt, das heißt am d 1 und d 4 nach der Geburt. Die Behandlung der *Mocs1*-defizienten Mäuse verlängerte die Lebensdauer von 7.5 d auf durchschnittlich 302 d. Die Autopsien der verstorbenen Tiere zeigten eine Obstruktion der Nieren, die auf eine verminderte Aktivität der XDH

zurückzuführen war. In Verhaltenstests waren die behandelten Tiere nicht von ihren gesunden Geschwistern zu unterscheiden. Alle Mäuse der neonatal behandelten Gruppe wurden untereinander in unterschiedlichen Kombinationen verpaart. Jedoch wurde nur ein Tier geboren, welches bereits am d 1 nach der Geburt verstarb.

Als nächstes wurde untersucht, in wieweit die Behandlung von *Mocs1*-defizienten Mäusen mit AAV-*MOCSI* im adulten Alter, d.h. am d 40 postnatal, den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufheben konnte. Die Tiere dieser Gruppe erreichten eine Lebensdauer von 356 d und zeigten ebenso keine Verhaltensunterschiede im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die Nieren der Mäuse wiesen keine Veränderungen auf, wie es bei den neonatal behandelten Tieren beobachtet wurde.

Die Behandlung *Mocs1*-defizienter Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung hatte keine große Differenz in der Lebensdauer zur Folge. Der Unterschied zwischen den zwei Injektionszeitpunkten lag darin, dass die Tiere, die im adultem Alter die AAV-*MOCSI*-Injektionen bekamen, eine wesentlich höhere SOX-Aktivität in der Leber aufwiesen. Während die am d 1 und d 4 behandelten Mäuse nur eine SOX-Aktivität von 5 % im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, wurde in der Leber der am d 40 behandelten Tiere ein Wert von 75 % gemessen. Die höhere SOX-Aktivität in der Leber der am d 40 behandelten Tiere korreliert mit der höheren *EGFP*-Expression, die nach der Injektion von AAV-*EGFP* in der Leber adulter Mäuse beobachtet wurde. Die klinischen Merkmale der MoCo-Defizienz sind hauptsächlich auf die fehlende SOX-Aktivität zurückzuführen. Die SOX wird hauptsächlich im Lebergewebe exprimiert [95]. Deshalb konnte die starke Expression in den Kardiomyocyten den Phänotyp der MoCo-Defizienz nur schwächer restaurieren als die starke Expression in der Leber, obwohl cPMP fähig ist, Membranen zu passieren [27]. Die Behandlung mit AAV-*MOCSI* am d 40 restaurierte die MoCo-Biosynthese effektiver als die Behandlung am d 1 und d 4, was sich auch darin äußerte, dass alle am d 40 behandelten Tiere Nachkommen zeugten. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Injektion des rAAVs zu keiner Übertragung des viralen Genoms in die Keimbahn der behandelten Mäuse führt. Die insgesamt 95 Nachkommen starben im Durchschnitt 7.5 d nach der Geburt, was der Lebensdauer unbehandelter *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäuse entspricht.

Die künstliche Veränderung der Erbinformation menschlicher Keimzellen ist in Deutschland verboten. Die Behandlung der *Mocs1*-defizienten Mäuse hatte aber keine

Übertragung des eingebrachten Transgens auf die Nachkommen zur Folge. Gesetzt den Fall, dass der rAAV bei der Anwendung im menschlichen Organismus sich ähnlich verhalten sollte wie in der Maus, würde diese gentherapeutische Behandlung der MoCo-Defizienz die Richtlinien gemäß § 5 des Embryonenschutzgesetzes erfüllen, welches die Keimbahntherapie verbietet (<http://bundesrecht.juris.de/eschg/>).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Lebensdauer der behandelten Mäuse auf die transgene Expression des rAAV und dessen Persistenz im Gewebe zurückzuführen ist. Die Unterschiede im Erfolg der viralen Gentherapie resultierten aus der Gewebeverteilung nach den Injektionen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Mäuse.

Eine intravenöse Applikation ist im klinischen Alltag leichter anzuwenden als eine intrahepatische Injektion. Aus diesem Grund wurde auch die Möglichkeit einer intravenösen AAV-*MOCSI*-Injektion untersucht. Durch die intravenöse Injektion von AAV-*MOCSI* am d 40 erreichten die behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse eine durchschnittliche Lebensdauer von 500 d. Aus den Verpaarungen dieser Tiere gingen 64 Nachkommen hervor, die im Durchschnitt 5.35 d postnatal starben. Die intravenöse Applikationsart führte somit ebenfalls zu keiner Keimbahntransmission des viralen Genoms.

Die intravenöse Injektion von AAV-*MOCSI* am d 40 konnte, wie die intrahepatische Applikation, den Phänotyp der MoCo-Defizienz erfolgreich aufheben.

Harding *et al.* (2004) zeigten ähnliche Ergebnisse am Beispiel Hämophilie B erkrankter Mäuse und Hunde [127]. In diesen Versuchen führten die intrahepatische als auch die intravenöse Applikation zur Transduktion der gleichen Gewebetypen. Zwei verschiedene Applikationsformen zu Verfügung zu haben könnte sich als Vorteil herausstellen. In den letzten Jahren verhärtete sich der Verdacht, dass die Applikationsform und die Dosis der rAAVs die Intensität und die Art der Immunantwort auf die Capsidhülle als auch die kodierten transgenen Produkte, und damit auch den Erfolg der Gentherapie beeinflusst [128].

#### 4.3.3.3. Deeskalationsstudien mit AAV-MOCSI

Um die notwendige Dosis für die Behandlung humaner Patienten abschätzen zu können, bestimmten wir die minimalste Menge an rAAVs, die benötigt wird, um den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufzuheben. Manno *et al.* (2006) beschrieben eine Korrelation zwischen der Dosis des applizierten Vektors und der gemessenen transgenen Expression in der Leber von Hämophilie B-Patienten [129]. Die Reduzierung der eingesetzten rAAVs verringert auch die Menge an Antigenen. So könnte die Immunantwort auf den viralen Vektor umgangen und damit eine langfristige transgene Expression erreicht werden [130-131]. Sun *et al.* (2003) beschrieben ebenfalls, dass die Höhe und Art der Immunantwort auf den rekombinanten Virus und das eingebrachte Transgen auch von der verwendeten Dosis abhängig sind [128].

Für die Deeskalationsstudien am Mausmodell der MoCo-Defizienz Typ A wurden drei verschiedene intravenös verabreichte Dosen zu Grunde gelegt (siehe Kapitel 3.1.2.4.3, Abb. 3.24.). Die Behandlung mit der höchsten Dosis von  $4 \times 10^9$  tu AAV-MOCSI erreichte eine Lebensdauer von 500 d. Die geringste untersuchte Dosis von  $1.5 \times 10^8$  tu reichte nicht aus die MoCo-Biosynthese zu restaurieren und die behandelten Tiere starben bereits durchschnittlich 28.75 d nach der AAV-MOCSI-Injektion. Der dritten Gruppe von *Mocs1*-defizienten Mäusen wurde eine Dosis von  $4 \times 10^8$  tu AAV-MOCSI verabreicht. Sie verbesserte zwar den Phänotyp der MoCo-Defizienz, aber vollständig aufheben konnte sie ihn nicht. Die beobachtete große Varianz in der Lebensdauer der Mäuse lässt darauf schließen, dass diese Dosis einen Grenzbereich für die Behandlung des Phänotyps der MoCo-Defizienz darstellt. Die hier verwendeten Mäuse hatten ein maximales Körpergewicht von 40 g, woraus sich eine Vektordosis von  $1 \times 10^{10}$  tu pro kg Körpergewicht errechnet. Auf ein einjähriges Kind mit einem Körpergewicht von 10 kg bezogen, würde das eine Injektion von  $1 \times 10^{11}$  tu AAV-MOCSI (umgerechnet  $3 \times 10^{12}$  Vektorpartikel (VP)) bedeuten, was im Bereich der Produktionsmöglichkeiten nach dem *Good Manufacturing Practice*-Leitfaden liegt [132]. Klinische Studien an Patienten mit Hämophilie B zeigten, dass eine systemische Verabreichung von bis zu  $2 \times 10^{12}$  rekombinanter VP mit keiner toxischen Reaktion verbunden war. Diese Studien zeigten jedoch auch, dass im Gegensatz zur langfristigen Expression in Mäusen, Ratten und Hunden mit Hämophilie, die vom viralen Vektor stammende transgene Expression bei menschlichen Patienten auf eine Zeitspanne von 8 Wochen begrenzt war [129, 133-

137]. Die Unterschiede resultierten hauptsächlich aus früheren Infektionen mit natürlichen AAVs in Kombination mit Helferviren [138]. Das führte zu der Bildung von CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen und deren Aktivierung während der erneuten Konfrontation mit dem AAV-Capsid während der viralen Gentherapie. Calcedo *et al.* (2009) untersuchten die Verteilung von neutralisierenden Antikörpern (nAK) gegen AAVs in der Weltbevölkerung. Die Prävalenz für AAV1 und AAV2 reicht von ~60 % in Afrika bis über ~30 % in Europa [139]. In früheren Studien von Halbert *et al.* (2006), die die Prävalenz für nAK gegen AAV in verschiedenen Altersgruppen untersuchten, konnten jedoch in Kindern unter drei Jahren keine nAK nachgewiesen werden. Das legte die Vermutung nahe, dass die Konfrontation mit AAV meist erst mit dem Eintritt ins Vorschulalter stattfindet [140].

Patienten mit MoCo-Defizienz werden aufgrund von Entwicklungsstörungen und schweren Krämpfen meist kurz nach der Geburt klinisch auffällig. Die progressiven Gehirnschädigungen, die vor allem auf den Verlust der SOX zurückzuführen sind, würden außerdem eine schnelle Behandlung notwendig machen [28]. Im Fall der MoCo-Defizienz sollte also die Prävalenz von nAK in der Allgemeinbevölkerung die virale Gentherapie nicht behindern.

#### **4.3.3.4. Reapplikationsstudien am Mausmodell der MoCo-Defizienz Typ A und Untersuchungen der Induktion einer Immuntoleranz gegenüber dem viralen Vektor**

Obwohl eine einzelne Injektion AAV-MOCSI ausreicht, den Phänotyp der MoCo-Defizienz aufzuheben, kann das Mausmodell aufgrund der natürlichen Lebensdauer der Tiere nur eine Vorhersage für zwei bis drei Jahre machen. Im Gegensatz zur langfristigen Expression, die in Tiermodellen beobachtet wurde [141], war die Dauer der transgenen Expression in klinischen Studien enttäuschend kurz, obwohl sie sich anfänglich sehr vielversprechend darstellte [142-143]. Die Hinweise mehren sich, dass das Immunsystem den AAV-vermittelten Gentransfer und die Expression negativ beeinflusst. Die klinischen Daten deuten außerdem darauf hin, dass für die langfristige Behandlung chronischer Krankheiten eine Reapplikation des viralen Vektors notwendig ist [123].

Deshalb wurde die Möglichkeit einer wiederholten Injektion des rAAV im Hinblick auf unterschiedliche Zeitpunkte für die Erstapplikation im Hintergrund des *Mocs1-Knockout*-Modells untersucht. *Mocs1*-defiziente Mäuse erhielten zu verschiedenen Zeitpunkten eine Injektion mit AAV-*MOCSI*. Der Erfolg der Injektion konnte so durch die Überlebensdauer der Mäuse kontrolliert werden. Für die zweite Applikation wurde der rAAV-Vektor mit dem gleichen Serotyp 1/2 und dem Reportergen *EGFP* verwendet. So konnte die erfolgreiche Transduktion des Gewebes und die daraus resultierende Expression des eingebrachten Transgens mittels Fluoreszenz nach wiederholten Injektionen nachgewiesen werden.

Im ersten Experiment erfolgte die Konfrontation mit dem viralen Vektor im adulten Entwicklungsstadium der Tiere. Mit cPMP vorbehandelte *Mocs1*-defiziente Mäuse erhielten dazu am d 40 eine intravenöse Injektion mit  $4 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI*. Kontrollexperimente bestätigten die erfolgreiche Erstapplikation. Die Reapplikation des rAAV-Vektors erfolgte drei Monate später. Dazu wurden den Tieren  $4 \times 10^9$  tu AAV-*EGFP* intravenös injiziert. Nach der zweiten rAAV-Injektion war keine *EGFP*-Expression in der Leber zu beobachten, wenn die erste Konfrontation mit dem viralen Vektor im adulten Stadium (d 40) stattfand.

Studien am Mausmodell der Hämophilie B zeigten, dass AAV-behandelte Tiere nach Injektionen *in utero* oder im neonatalem Entwicklungsalter keine nAK gegen das AAV-Capsid ausbildeten [144]. Sabatino *et al.* (2007) demonstrierten außerdem, dass es durch die Injektionen in einem frühen Entwicklungsstadium möglich war, eine Toleranz gegenüber dem humanen Faktor IX und eine langfristige therapeutische Expression des Transgens in immunkompetenten Mäusen zu etablieren. Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten Tiermodells, ist das transgene Produkt der *MOCSI*-Expressionskassette intrazellulär lokalisiert und nicht zugänglich für Antikörper. Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Zeitfenster in der Mausentwicklung existiert, in der eine Toleranz gegenüber den viralen Capsid induziert werden kann und somit eine Reapplikation möglich wird. Für die Behandlung MoCo-defizienter Patienten kommt die *in utero*-Injektion nur dann in Frage, wenn in der Familie bereits Krankheitsfälle bekannt geworden sind. Die Mehrzahl wird jedoch kurz nach der Geburt

klinisch auffällig [28], so dass für die Behandlung der MoCo-Defizienz nur eine Injektion im frühen Kindesalter in Frage kommt.

Deshalb untersuchten wir die Reapplikationsmöglichkeiten nach einer ersten Konfrontation mit dem viralem Vektor im neonatalem (d 1) und juvenilem (d 10 und d 20) Entwicklungsstadium der Mäuse. *Mocs1*-defiziente Mäuse erhielten eine intrahepatische Injektion mit  $1 \times 10^9$  tu AAV-*MOCSI* entsprechend der Gruppen am d 1, d 10 oder d 20. Zwei Monate nach der ersten Injektion wurde den Mäusen AAV-*EGFP* intravenös injiziert. Bei den Tieren, die am d 10 und d 20 die erste Injektion mit rAAV erhielten, konnte nach der AAV-*EGFP*-Injektion keine *EGFP*-Expression in der Leber nachgewiesen werden. Während bei den Mäusen, die am d 1 erstmals mit dem viralen Vektor konfrontiert wurden, eine starke Expression des Fluoreszenzmarkers nach der AAV-*EGFP*-Injektion dokumentiert werden konnte.

Eine erfolgreiche Transduktion und Expression des eingebrachten Transgens nach einer Reapplikation war also möglich, wenn die erste Konfrontation mit dem viralen Vektor im neonatalem Entwicklungsstadium (d 1) stattfand. Da die Produkte der hier verwendeten *MOCSI*- und *EGFP*-Expressionskassetten keine Kreuzreaktionen untereinander in der Immunantwort auslösen, konnte untersucht werden, ob die neonatalen Injektionen eine Immuntoleranz gegenüber dem AAV-Capsid induzieren. Aus diesem Grund bekamen zwei Tiere, zusätzlich zu der intrahepatischen Injektion von AAV-*MOCSI* am d 1, eine weitere intrahepatische AAV-*MOCSI*-Injektion am d 10 mit der gleichen Menge an Viruspartikeln ( $1 \times 10^9$  tu). Im Gegensatz zur einer einzelnen AAV-*MOCSI*-Injektion am d 1, führte eine zweimalige Behandlung mit AAV-*MOCSI* am d 1 und am d 10 zu keiner *EGFP*-Expression in den Leberzellen *Mocs1*-defizienter Mäuse nach der zwei Monate später erfolgten Injektion von AAV-*EGFP*.

Obwohl zur der Rolle der zytotoxischen T-Zell-Antwort in Mäusen noch Fragen offen sind, kann davon ausgegangen werden, dass nach der zweiten Injektion des viralen Vektors im juvenilem Alter der Mäuse Capsid-spezifische CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen expandierten und das eventuell zur Lyse der transduzierten Hepatozyten geführt hat [138]. Eine Injektion in einem frühen Entwicklungsstadium erlaubt zwar eine erfolgreiche zweite Applikation, aber induziert keine Toleranz des Immunsystems gegenüber den rekombinanten Viruspartikeln. Sabatino *et al.* (2007) zeigten, dass nach

einer in utero-Injektion keine nAK gegen den rAAV gefunden konnten. Jedoch führte eine Readministration nach der Geburt zur Bildung anti-AAV-AK [144].

Wie zu sehen war, ist der Zeitpunkt der viralen Vektor-Administration ein entscheidender Faktor in der nAK-Bildung. Die Gruppe um Petry *et al.* (2008) zeigten, dass die Menge an nAK proportional zur verabreichten Menge an Viruspartikel und die Effizienz der Readministration auch vom Titer der nAK abhängig ist, die für die erste Applikation verwendet wurde [123]. Weitergehende Experimente könnten klären, ob die Kombination einer frühen ersten Injektion und der in dieser Arbeit bestimmten minimalen AAV-Menge für die Behandlung der murinen MoCo-Defizienz zu einer erfolgreicherer AAV-Reapplikation führt. Da im Fall der MoCo-Defizienz nicht, wie im Fall der Hämophilie, das eingebrachte Transgen Immunreaktionen auslöst, muss nur eine Reaktion auf das rAAV-Capsid verhindert werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Verwendung von Immunsuppressiva während der AAV-Behandlung die Bildung von Capsid-spezifischen CD8+-Gedächtniszellen verhindern kann und weitere Reapplikation zulassen würde. Mingozi *et al.* (2007) beschrieben die Modulation der Immunantwort durch Verwendung von Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus und Daclizumab, wobei jedoch weitere Experimente notwendig sind [138].

#### 4.3.3.5. AAV-Integration

Bei den Versuchen mit den rekombinanten Virusvektoren, die die *MOCSI*- oder die *EGFP*-Expressionskassette trugen, war ein signifikanter Anstieg maligner Ereignisse in den Mäusen festzustellen: In 16 % der im Rahmen dieser Arbeit mit rAAV behandelten Mäuse traten Leber-, Haut-, Darm und Nierentumore auf.

Die Untersuchung der genomischen DNA mittels Southern Blot-Analysen einer Auswahl der erkrankten Tiere zeigte, dass entweder nur geringe Mengen an episomal vorliegender Vektor-DNA vorhanden waren, die nicht mehr detektiert werden konnten, oder aber keine episodale Vektor-DNA mehr in den Leberzellen vorhanden war. Die Ergebnisse einer *Randomly Primed* -PCR, bei der die DNA von zwei AAV-*MOCSI*-behandelten Tieren mit Tumoren in der Leber eingehender untersucht wurde, zeigten, dass die Vektor-DNA in einem Tier ins Genom integriert war und in dem anderen episomal vorlag. Das deutet einerseits darauf hin, dass episodale Vektor-DNA über

470 d stabil im Lebergewebe vorliegen konnte. Andererseits kam es auch zur Integration der Vektor-DNA ins Genom, was, je nach Integrationsort, zur Entwicklung von Tumoren führte.

Untersuchungen von Nakai *et al.* (2001) in Mäuselebern zeigten, dass ~10 % des rAAV-Genoms in das Chromatin transduzierter Hepatozyten integriert. Aber sie zeigten auch, dass die Hauptquelle der rAAV-vermittelten Expression episomal vorliegende Formen sind [125]. Southern Blot-Analysen der episomalen Konformation des rAAV-Vektorgenoms demonstrierten, dass die monomere lineare rAAV-DNA nach der Transduktion der Zielzelle in eine zirkuläre Form umgewandelt wird. Die zirkuläre Form wird dann langsam in große Konkatemere über 12 kb umgewandelt [145-148]. Die Untersuchungen von Duan *et al.* (1998) ließen darauf schließen, dass bis zu einem Zeitpunkt von 80 d nach der Transduktion der Zelle, die Größe der episomalen Konkatemere des rAAV-Genoms zunimmt [145]. Andere Studien belegten aber auch, dass das episomal vorliegende Vektorgenom durch Zellteilungen mit der Zeit verloren geht und integrierte Formen durch Zellteilungen vermehrt werden [149]. Die Southern Blot-Analysen des Lebergewebes der im Rahmen dieser Arbeit rAAV behandelten Mäuse bestätigten die Untersuchungen, dass nach einer gewissen Zeit die episomalen Formen nicht mehr detektierbar sind. *In vitro* Studien zeigten, dass rAAVs mit einer Frequenz von einer Integration pro  $10^3$  bis  $10^4$  VP ins Genom integrieren [150-151]. Weitere Studien detektierten 0.06 und 0.2 integrierte Vektorgenome pro Zelle, in dem die Lebern rAAV-behandelter Mäuse durch eine partielle Hepatektomie zum Wachstum angeregt wurden, um so die Anzahl integrierter Formen von episomalen zu unterscheiden, [125]. In zwei der AAV-*MOCSI* behandelten Tiere wurden 0.5 bis 1.0 Kopien pro Genom detektiert. PCR-Analysen sollten klären, ob sie episomalen oder integrativen Ursprung waren.

Allgemein ist die Integrationseffizienz der rAAVs mit 0.5-1 % der transduzierenden Vektorpartikel relativ gering [152]. Vorhergehende Studien deuteten aber daraufhin, dass rAAV vorzugsweise in aktive Gene integrieren [153-154], was, wie in dieser Arbeit beschrieben, zu malignen Ereignissen führen kann. Wie bereits von Miller *et al.* (2002) beschrieben [155], war die Integration des rAAV-Genoms in das Wirtschromatin in einer der untersuchten *Mocs1*-defizienten Mäuse mit chromosomalen

Rearrangements verbunden. Der Ursprungsintegrationsort konnte aus diesem Grund nicht mehr festgestellt werden.

Die PCR-Analyse der zweiten untersuchten *Mocs1*-defizienten Maus ergab keinen Hinweis auf eine Integration des rAAVs, obwohl in deren Leber maligne Veränderungen festgestellt wurden. Jedoch berichteten Donsante *et al.* (2007), die das gehäufte Auftreten von Hepatozellulären Karzinomen nach der Injektion von rAAVs im Mausmodell der lysomalen Speicherkrankheit Mukopolysaccharidose Typ VII untersuchten, dass zu einem geringen Prozentsatz auch in unbehandelten Wildtypieren Tumore in der Leber beobachtet wurden [156]. Die Entstehung des Leberzellkarzinoms muss also nicht zwangsläufig durch ein Integrationsereignis ausgelöst worden sein. Ein Beispiel, dass die Integration von rAAVs ein seltenes Ereignis ist, sind Langzeituntersuchungen an rAAV-behandelten Hämophilie-erkrankten Hunden, bei denen nach 8 Jahren keine Integrationsereignisse festgestellt werden konnten. Die Vektorsequenzen lagen nach dieser Zeit episomal in 0.1 bis 0.3 Kopien pro Genom vor [134], was ungefähr dem Wert entspricht, der bei den AAV-*MOCSI* behandelten Mäuse gemessen wurde.

Die große Mehrheit der rAAV-Transduktionen manifestiert sich in der Ausbildung von episomalen Konkatemeren des Vektorgenoms. Aber die Verwendung von rAAV kann durch Integrationsereignisse zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Wenn die zufällige Integration nicht verhindert werden kann, müssen die Situationen unter denen man rAAV verabreicht, genau beobachtet werden [157].

Aufgrund des Risikos der zufälligen Integration des rAAV-Genoms und der dadurch eventuell verursachten malignen Ereignissen, sollte für die gentherapeutische Anwendung die Möglichkeit einer *ex vivo* Therapie in Betracht gezogen werden [126].

Durch eine *ex vivo*-Selektion könnten Zellen mit einer zufälligen Integration aussortiert werden und so maligne Ereignisse verhindert werden.

#### 4.4. Leberzelltransplantation

Der *ex vivo* Gentransfer in Hepatozyten könnte verschiedenen Zwecken im Kontext der Gentherapie oder Zelltransplantation dienen: erstens könnten isolierte Hepatozyten in

Zellkultur mit den entsprechenden Transgenen transduziert werden und anschließend in den Rezipienten retransplantiert werden. Zweitens könnten Markergene eingebracht werden, die die Identifikation der transplantierten Zellen und deren Nachkommen ermöglichen. Drittens könnten Gentransfer-Techniken zur Immortalisation und Expansion der Hepatozyten in Zellkultur genutzt werden. Viertens könnte die Abstoßung von allogenen Transplantaten durch die Einbringung von immunregulierenden Genen in Hepatozyten verhindert werden [158]. Im Fall der MoCo-Defizienz sind mehrere Behandlungsmöglichkeiten denkbar. Einerseits könnten vom Patient selbst Zellen entnommen werden. Nach einer entsprechenden gentherapeutischen Behandlung könnte das autologe Gewebe wieder in den Patienten eingebracht werden. Andererseits wäre eine allogene Transplantation denkbar, bei der z.B. Hepatozyten eines gesunden Spenders dem Patienten appliziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Möglichkeit der Transplantation gesunder Embryonaler Hepatozyten (EH) in die Leber *Mocs1*-defizienter Mäuse untersucht. Die Hepatozyten wurden aus Embryonen mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie dem des *Mocs1-Knockout*-Modells isoliert, in diesem Fall von C57B/6N-Verpaarungen, um Abstoßungsreaktionen gegenüber den eingebrachten Zellen zu vermeiden. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Wege für die Einbringung der Hepatozyten in die Leber beschrieben. Die Methoden reichen von der Infusion in die Portalvene, der Injektion ins Parenchym der Milz, in die Nierenkapsel, in die Bauchhöhle oder in subkutanes Gewebe [159-161]. Ektope Einbringungsstellen, wie die Injektion in subkutanes Gewebe, zeigten keine große Effizienz hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der eingebrachten Zellen, da sie an diesen Orten nur eingeschränkten Zugang zu wichtigen Nährstoffen haben [160]. Die Infusionen in die Portalvene führten zu Nebenwirkungen wie Bluthochdruck oder Embolien in den Lungen zur Folge [162]. Die besten Resultate für das Anwachsen der eingebrachten Zellen wurden in der Milz beobachtet, wo sie durch den Blutfluss in die Sinusoide der Leber gespült werden. Bei dieser Methode verbleiben jedoch viele Zellen in der Milz, so dass eine große Anzahl an Hepatozyten verabreicht werden muss [163]. Im Fall der autologen Transplantation können solche Mengen aber oft nicht bereitgestellt werden [164].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die direkte intrahepatische Injektion für die Hepatozytentransplantation ausgewählt. Zum einen zeigte diese vergleichsweise

einfache Methode in der Hepatozytentransplantation vergleichbare Ergebnisse, wie die Injektion in die Milz [165]. Andererseits führt die intrahepatische Injektion zu keinen postoperativen Verwachsungen, wie sie in der Milz beobachtet wurde. Zwar führen sie selten zu negativen Effekten, machen jedoch oft weitere Behandlungen schwierig [166]. So wurden die aus Embryonen isolierten Hepatozyten neonatalen *Mocs1*-defizienten Mäusen postnatal am d 3 intrahepatisch injiziert. Um mögliche Nebeneffekte der Behandlung ausschließen zu können, bekamen auch einige hetero- und homozygot gesunde Geschwister eine Injektion mit EHs. Theoretisch könnte man die Behandlung auch schon in den ersten beiden Tagen nach der Geburt durchführen. Jedoch müsste man dann alle Nachkommen eines Wurfes behandeln, da in den ersten Tagen nach der Geburt die *Mocs1*-defizienten Mäuse von ihren hetero- oder homozygot gesunden Geschwistern nicht zu unterscheiden sind. Die Anzahl an embryonalen Hepatozyten war jedoch begrenzt und so wurde das Ergebnis der Genotypisierung abgewartet, welches frühestens am d 3 postnatal feststand.

Die Lebensdauer der mit EHs behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse war im Vergleich zu unbehandelten *Mocs1*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht erhöht. Die behandelten gesunden Geschwister wiesen keinerlei Veränderungen auf und erreichten das adulte Alter (über 40 d).

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die transplantierten Hepatozyten einen selektiven Vorteil brauchen, um in der Empfängerleber proliferieren zu können [99]. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch untersucht, ob die Vorschädigung der Leber durch das Pyrrolizidin-Alkaloid Retrorsin zum Erfolg der Transplantation führen kann. Diese Substanz ist ein in Pflanzen vorkommender Wirkstoff, der selektiv von der Leber aufgenommen und durch bioaktive Komponenten metabolisiert wird, die auch Proteine und DNA alkylieren [167]. Die entstehenden Abbauprodukte blockieren die Zellteilung der endogenen Hepatozyten und schädigen die zelluläre DNA, wobei zunächst die Funktion der Hepatozyten erhalten bleibt. Obwohl Pyrrolizidin-Alkaloide schnell metabolisiert werden, hält ihre Wirkung auf die Hepatozytenproliferation mehrere Wochen an [100]. Die Wirksamkeit des Retrorsins wurde mittels intraperitonealer Injektionen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Retrorsin in Wildtypmäusen im neonatalem Entwicklungsalter untersucht. Die Dosis von 0.03 mg Retrorsin pro g KG erwies sich als geeignet, die Zellteilung der endogenen Hepatozyten

zu blockieren, was sich im Absterben der im neonatalem Alter behandelten Mäuse um 26 d äußerte.

Zur Kontrolle der Retrorsinwirkung in adulten Tieren wurden histologische Schnitte vom Lebergewebe adulter Wildtypmäuse angefertigt, denen ebenfalls 0.03 mg Retrorsin pro g KG intraperitoneal appliziert wurde. Die Retrorsinbehandlung führte in einer Maus zum Absterben der Hepatozyten. In zwei Tieren führte die Behandlung zur Vergrößerung des zytoplasmatischen Raums der Hepatozyten, was ein Anzeichen für Funktionsstörungen der Zellen ist [101].

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die EH-Transplantation in die Leber Retrorsin-vorbehandelter adulter Mäuse. *Mocs1*-defiziente Mäuse wurden bis zum Erreichen des adulten Alters (d 40) mit cPMP-Injektionen behandelt. Am d 19 postnatal wurden die Mäuse mit 0.03 mg/g KG Retrorsin vorbehandelt. Eine Kontrollgruppe von Mäusen erhielt keine Retrorsinvorbehandlung, um die Notwendigkeit dieser zu überprüfen. Am d 40 wurden den Mäusen EHs entweder intrahepatisch oder intravenös injiziert. Die cPMP-Injektionen wurden 7 d weitergeführt, um den transplantierten Zellen Zeit zur Proliferation zugeben.

Unbehandelte *Mocs1*<sup>-/-</sup> Tiere, die keine EHs injiziert bekamen, starben im Durchschnitt 11 d nach dem Absetzen der cPMP-Gabe am d 40. Die Retrorsin-behandelten *Mocs1*-defizienten Mäuse starben nach der intrahepatischen Injektion der EH nach durchschnittlich 14.5 d und die intravenös behandelten Tiere dieser Gruppe nach durchschnittlich 10.3 d. Durch die EH-Transplantation konnte keine signifikante Erhöhung der Lebensdauer der *Mocs1*-defizienten Mäuse erreicht werden. Die EH-behandelten Mäuse zeigten die gleichen phänotypischen Merkmale wie unbehandelte *Mocs1*-defiziente Mäuse. Der Misserfolg der EH-Behandlung ist wohl auf die ineffektive Retrorsinvorbehandlung zurückzuführen, da *Mocs1*<sup>+/+</sup> Tiere, die zum gleichen Zeitpunkt mit Retrorsin behandelt wurden, eine Lebensdauer von über 600 d erreichten. Die intravenöse Verabreichung der EH stellte sich als ungeeignet dar, da ein Tier einen Tag nach der intravenösen Injektion verstarb. Die Obduktion des Tieres zeigte, dass die Durchblutung der rechten Herzseite gestört war, was auf eine Embolie in den Herzgefäßen hinweist. Vermutlich haben sich die injizierten Zellen in den Herzgefäßen festgesetzt und Verstopfungen verursacht, die dort zum Ausfall der Blutversorgung von einem Teilbereich des Herzens führte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine intrahepatische Injektion embryonaler Hepatozyten zu keiner Ansiedlung der Zellen in der Leber führt. Auch die Vorschädigung der endogenen Hepatozyten, die einen selektiven Wachstumsvorteil für die eingebrachten Hepatozyten bewirken sollte, zeigte keine Wirkungen. Das Retrorsin kann zwar die Repopulationsrate der Zellen erhöhen, aber nur im Zusammenhang mit anderen wachstumsfördernden Maßnahmen [100].

Zur Stimulierung der Leberzellproliferation wurden neben Retrorsin auch Techniken wie radioaktive Bestrahlung oder partielle Hepatektomien in Nager-Tiermodellen verwendet [168-169]. Jedoch sind diese Modelle nicht auf den menschlichen Patienten übertragbar, da diese Methoden mit unkalkulierbaren klinischen Risiken verbunden wären [161]. Bis heute existiert noch kein sicheres System für die Hepatozytentransplantation im menschlichen Organismus. Aus diesem Grund ist es wichtig andere Tiermodelle, wie nichtmenschliche Primaten, in Betracht zu ziehen, wo die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen einfacher ist. Weber *et al.* (2009) stellten eine Studie an Rhesusaffen vor, in der sie eine reversible Teilresektion des portalen Lebervenensystems durch Embolisation vorstellten, was die Proliferation der eingebrachten Hepatozyten anregte. Eine solche Methode wäre auch auf den Menschen übertragbar [58].

## **4.5. Molekulare Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B**

### **4.5.1. Das *MOCS2*-Gen**

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B, die durch Mutationen im *MOCS2*-Gen verursacht wird. Im Gegensatz zur Situation in *E. coli*, *A. thaliana* und *C. elegans*, wo zwei separate Gene auf verschiedenen Chromosomen für die Untereinheiten der MPT-Synthase kodieren [170-171], werden die Proteine MOCS2A und MOCS2B im Menschen von zwei verschiedenen Leserastern innerhalb des *MOCS2*-Gens kodiert. Die gleiche Situation wurde für die humanen Proteine MOCS1A und MOCS1B beschrieben [65], welche von zwei aufeinander folgenden ORFs innerhalb des *MOCS1*-Gens kodiert werden. Ihre parallele Expression wurde durch alternative Spleißprozesse erklärt [39, 118]. Im Fall von

MOCS2A und MOCS2B zeigten Stallmeyer *et al.* (1999), dass beide Proteine von einer einzelnen mRNA kodiert werden, deren ORFs sich auch auf chromosomaler Ebene auf einer Länge von 77 bp überlappen [29]. Bisher war als Transkript nur die Spleißform I bekannt, welche den Startpunkt für das MOCS2A-Protein in Exon 1a enthält und von Reiss *et al.* (1999) beschrieben wurde [29]. Die komplette Sequenzierung des humanen Genoms deckte ein mögliches neues Exon 1b auf, was die Produktion eines alternativen Transkripts zur Folge hätte (Spleißform III, GenBank, NM004531.3) [66] (siehe Kapitel 3.2.1., Abb. 3.31.a). Dieses neue Transkript umgeht das MOCS2A-Startcodon in Exon 1a und nutzt als Translationsstartpunkt das MOCS2B-Startcodon in Exon 3.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Spleißform III experimentell nachgewiesen und damit die Existenz eines alternativen Spleißmechanismus im 5' Bereich des humanen *MOCS2*-Gens. In der humanen cDNA konnten die zwei Spleißformen des *MOCS2*-Gens parallel amplifiziert werden. Spleißform I umfasst Exon 1a und Exon 2 bis 7. In Exon 1a befindet sich der Translationsstartpunkt für MOCS2A. Der ORF endet in Exon 3. Spleißform III beginnt mit Exon 1b und enthält ebenfalls Exon 2 bis 7. Dieses Transkript kodiert für MOCS2B und der Translationsstartpunkt liegt in Exon 3, 77 bp vor dem Stopcodon von MOCS2A. Exon 1a und Exon 1b schließen sich gegenseitig aus.

*In vitro* Translations- und Mutagenesestudien demonstrierten, dass jeder von *MOCS2* kodierter ORF unabhängig voneinander translatiert wird, was zur Synthese von MOCS2A und MOCS2B führt [62]. Diese Experimente zeigten auch, dass die Translation des 3' gelegenen ORFs der bicistronischen mRNA vermutlich das Resultat von *leaky scanning* ist [172]. Entsprechend dieses Modells bindet die 40 S ribosomale Untereinheit an das 5' Cap-Ende der mRNA und sucht nach dem ersten Startcodon. Wenn das erste Startcodon in einen nichtfavorisierten Kontext liegt, wird es durch einige 40 S Untereinheiten umgangen. Diese suchen dann weiter abwärts nach den nächsten Startcodon in einem geeigneteren Kontext. In Eukaryoten ist das *leaky scanning* von bicistronischen mRNAs sehr selten und wird im allgemeinen dazu verwendet, kurze nichtüberlappende 5'ORF zu umgehen, um dem Haupt-ORF zu erreichen [173]. Da das MOCS2A-Startcodon aber in einem favorisierten Kontext liegt, blieb der Grund, warum die Ribosomen die Initiationsstelle umgehen, unklar.

Der experimentelle Nachweis der Spleißform III im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass MOCS2B nicht, wie in Stallmeyer *et al.* (1999) vermutet, durch *leaky scanning* translatiert wird, sondern durch ein alternatives Transkript kodiert wird [62, 172]. In diesem Fall umgeht das neue Transkript das MOCS2A-Startcodon und bietet das MOCS2B-Startcodon als Ziel für die Scanmechanismen der Translationsinitiation an, wie sie von Kozak (2002) beschrieben wurden [174].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen eines verstorbenen MoCo-defizienten Patienten zeigten eine neue 23 bp-Deletion im Exon 1a des *MOCS2*-Gens, die den Translationsstartpunkt des MOCS2A-Proteins einschließt.

Die Expression des MOCS2B-Proteins war durch die Mutation nicht betroffen. RT-PCR-Analysen der beiden *MOCS2*-Spleißformen zeigten, dass beide Transkripte detektiert werden konnten, jedoch die Spleißform I verkürzt vorlag. Der immunologische Nachweis der *MOCS2*-Expression in der Leber zeigte, dass MOCS2A im Leberzellextrakt des Patienten nicht detektiert werden konnte. Das ist darauf zurückzuführen, dass der Translationsstartpunkt von MOCS2A im Patienten fehlt. Weiterhin war zu sehen, dass der Zellextrakt des Patienten nur geringe Mengen MOCS2B im Vergleich zur gesunden Kontrolle aufwies. Das lässt darauf schließen, dass in der Abwesenheit von MOCS2A, das Protein MOCS2B eine kürzere Halbwertszeit hatte und schneller degradiert wurde. Die Instabilität des MOCS2B-Proteins lässt eine Mikrokompartimentierung als mögliche Erklärung für die ungewöhnliche Struktur des *MOCS2*-Gens vermuten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die genomische Struktur des murinen *Mocs2*-Gens und deren Transkripte untersucht. Stallmeyer *et al.* (1999) identifizierten durch Datenbankanalysen die zur humanen MPT-Synthase homologen Proteine MOCS2A und MOCS2B in der Maus [62]. Das murine *Mocs2*-Gen befindet sich auf Chromosom 13 und umfasst 7 Exons (GeneID: 17434, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, *Mouse Genome Sequencing Consortium*). Computeranalysen sagten drei verschiedene Transkripte des Gens voraus: Spleißform I (NM 013826.3) beinhaltet alle 7 Exons und den Translationsstartpunkt von MOCS2A im Exon 1. Das Translationsende befindet sich im Exon 3. Durch alternatives Spleißen entsteht Spleißform II (NM 001113334.1), bei der Exon 2 fehlt. Dieses Transkript kodiert für MOCS2B, wobei sich der Translationsstartpunkt im Exon 3 und das Translationsende im Exon 7 befinden. Die

dritte vorhergesagte Spleißform III (NM 001113375.1) stellt eine Abwandlung der Spleißform II dar, die eine verkürzte Version des Exon 5 beinhaltet (siehe Kapitel 3.2.2., Abb. 3.36.). Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur Spleißform I und II nachgewiesen werden.

Wie in Abb. 4.5. zu sehen ist, sind die Aminosäuresequenzen des MOCS2A und MOCS2B-Proteins zwischen der Maus und dem Menschen hochkonserviert.

a) MOCS2A		b) MOCS2B	
H.s.	1 mvplcqvevlyfaksaeitgvrsetisvpq	H.s.	1 mssleisesscfsletklplapplvedsafe
M.m.	1 mvproqidvlyfaksaeiagvrsetisvpq	M.m.	1 mssleisnscfspeirlpsarqavednase
R.n.	1 mvproqievlyfaksaeiagvrsetisvpq	R.n.	1 mssleinnscfsletklpsshqavedsase
H.s.	31 eikalqlwkeietrhpgladvrnqiifavr	H.s.	31 ps-----rkdmdveeekskdvinf
M.m.	31 eikaselwkeleslhpgladvrnqvifavr	M.m.	31 psg-----kdvdvqekpkdiiqf
R.n.	31 eikasqlwqeletlhpgladvrnqvifavr	R.n.	31 psgyeakppqdtlkdvddvlekpkdiiqf
H.s.	61 qeyvelgdqllvlqpgdeiavippiisgg	H.s.	50 taeklsvdevsqglvisplcgaislfvgtrr
M.m.	61 qeyvelgdqglllqpgdevaiippiisgg	M.m.	50 taeklsvgevsqglvvsplcgavalfvgtrr
R.n.	61 qeyvelgdqglllqpgdevaiippiisgg	R.n.	61 takklsvgevsqglvvsplcgavalfvgtrr
		H.s.	80 nnfegkkvisleyeaylpmaenevrkicnd
		M.m.	80 nnfegkkvisleyeayvpmaeneirkicnd
		R.n.	91 nnfegkkvisleyeaylpmaeneirkicnd
		H.s.	110 irqkwpvkhiavfhrllglvpvseasiilav
		M.m.	110 irqkwpvvrhiavfhrllglvpvseastviav
		R.n.	121 irqkwpvvrhiavfhrllglvpvseastviav
		H.s.	140 ssahraasleavsyaidtlkakvpiwkkei
		M.m.	140 ssahraasleavsyaidslkakvpiwkkei
		R.n.	151 ssahraasleavsyaidslkakvpiwkkei
		H.s.	170 yees-stwknkecfwaans
		M.m.	170 yeestsswkrnkecfwaagd
		R.n.	181 yeestsswkrnkecfwaadd

Abb. 4.5.: Vergleich der MOCS2A- und MOCS2B-Aminosäuresequenzen von *Homo sapiens* (H.s., NP789776.1, NP004522.1), *Mus musculus* (M.s., NP038854.2, NP001106845.1) und *Rattus norvegicus* (R.n., NP001155885.1, NP001007634.1). Grau unterlegte Aminosäuren sind konserviert. Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Der Unterschied zwischen diesen beiden Spezies liegt in den Spleißprozessen im 5' Bereich der mRNAs. In Säugetieren wurde eine große Tendenz beobachtet, Funktionen der MoCo-Biosynthese zusammen zu fassen, die in Bakterien, Pflanzen und Fischen von zwei getrennten Genen kodiert werden [170-171]. Die Zusammenführung der Gene, die für die MPT-Synthase kodieren, ist bereits im Schnabeltier (*Orithorhynchus anatinus*) zu finden. In der Maus, der Ratte und dem Rind entspricht Exon 1 dem humanen Exon 1a, wobei durch Herausspleißen des Exons 2 die für

MOCS2B kodierende mRNA entsteht. Im Schimpansen, der phylogenetisch von den hier untersuchten Organismen dem Menschen am nächsten steht, findet man das zusätzliche Exon 1b (Übersicht siehe Tabelle 4.1.).

	Organismus	MOCS2A	MOCS2B	Quelle
Alternatives Exon 1b	<i>Homo sapiens</i>	Exon 1a-7	Exon 1b-7	NCBI
	<i>Pan troglodytes</i>			NCBI
Alternatives Transkript ohne Exon 2	<i>Mus musculus</i>	Exon 1a-7	Exon 1a-7 ohne Exon 2	NCBI
	<i>Rattus norvegicus</i>			NCBI
	<i>Bos taurus</i>			NCBI
	<i>Orithorhynchus anatinus</i>	Exon 1a bis Exon 3	Mitte Exon 1a bis 7 aber Exon 4-7 Translation	NCBI

Tabelle 4.1.: phylogenetische Übersicht über 5' Bereich der vom MOCS2-kodierten mRNAs.

Mit Hilfe des Sci Ed Central-Programms wurde ein phylogenetischer Stammbaum des *MOCS2*-Gens erstellt. Dabei wurde die gesamte genomische Sequenz des Gens zu Grunde gelegt (Quelle <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) (siehe Abb. 4.6.).

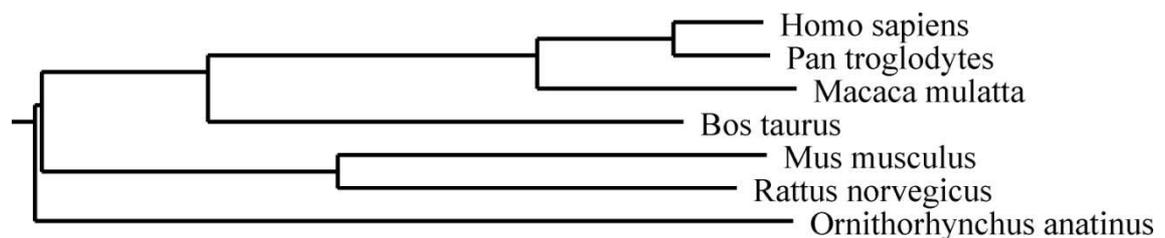


Abb. 4.6.: Phylogenetischer Stammbaum des *MOCS2*-Gens, basierend auf Sequenzvergleichen der genomischen Sequenzen von *Pan troglodytes* (NC\_006472.2), *Macaca mulatta* (NC\_007863.1), *Bos taurus* (NC\_007318.3), *Mus musculus* (NC\_000079.5), *Rattus norvegicus* (NC\_005101.2), *Orithorhynchus anatinus* (NC\_009094.1) mit dem humanen *MOCS2*-Gen (NC\_000005.9) als Referenz (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Zur Erstellung der phylogenetischen Baumstrukturen wurde der Sequenzvergleich des Sci Ed Central-Programms genutzt, welches den *Neighbor-Joining*-Algorithmus [175] zur Berechnung verwendet.

Der Stammbaum zeigt, dass die Übereinstimmungen im 5' Bereich des *MOCS2*-Gens die phylogenetische Nähe der untersuchten Organismen widerspiegelt.

Die ungewöhnliche Genstruktur, wie sie vor allem im Menschen und im Schimpansen gefunden wurde, könnte sich aus der Tatsache erklären, dass eine komplette Fusion der

Proteine das funktionelle Eingreifen des C-terminalen Endes der Proteine verhindern würde [32]. Das C-terminale Ende des MOCS2A-Proteins ist allen Organismen hochkonserviert [6]. Es beinhaltet ein terminales doppeltes Glycin-Motiv, welches für die Bindung von cPMP verantwortlich ist. Der C-Terminus von MOCS2B ist zwar nicht so hoch konserviert, wie der des MOCS2A-Proteins. Mutationsanalysen zeigten jedoch, dass er wichtig für die Proteinstabilität ist [32]. Der Vorteil der humanen *MOCS2*-Genstruktur liegt vielleicht in der garantierten Nähe der Interaktionspartner, da das Expressionslevel der MOCS2A- und MOCS2B-Proteine sehr gering ist [62]. Die Notwendigkeit der konzentrierten Expression der zwei Untereinheiten könnte in Hinblick auf die Behandlung der MoCo-Defizienz B Komplikationen hervorrufen. Aus diesem Grund wurde die *in vivo* Genreparatur als Behandlung für die Patienten dieser Gruppe in Betracht gezogen.

#### 4.5.2. *Mocs2*-Knockout-Modell

Zur Untersuchung des zweiten Schritts der MoCo-Biosynthese und zur Etablierung einer *in vivo* - Genreparatur mittels kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide sollte ein *Knockout*-Modell des murinen *Mocs2*-Gens etabliert werden. Dafür wird ein Tiermodell benötigt, bei dem, nicht wie im *Mocs1-Knockout*-Modell ein komplettes Exon durch homologe Rekombination mit einem Disruptionsvektor deletiert wurde, sondern bei dem die MoCo-Biosynthese durch eine Punktmutation unterbrochen ist.

Deshalb sollte eine *Knockout*-Maus mit einer Missense-Mutation in einer hochkonservierten Position im Exon 5 hergestellt werden. Jedoch erwies sich die Klonierungsstrategie für diesen Disruptionsvektor als nicht durchführbar, da der 3' flankierende Bereich sich in der korrekten Richtung nicht klonieren ließ bzw. instabil war. Deshalb wurde eine neue Klonierungsstrategie für einen Disruptionsvektor mit einer Punktmutation in der 5' Donor-*splice site* des Introns 6 im murinen *Mocs2*-Gen erstellt. Da die Auswirkungen von *splice site*-Mutationen nur bedingt vorhersagbar sind, wurden Disruptionsvektoren mit zwei unterschiedlichen Mutationen kloniert.

	pBlueKO4R3		pBlueKO4R4
WT:	5' AAAGg <sup>g</sup> tgagt 3'		WT: 5' AAAGg <sup>t</sup> tgagt 3'
<i>Knockout:</i>	5' AAAGa <sup>c</sup> cgagt 3'		<i>Knockout:</i> 5' AAAGa <sup>c</sup> cgagt 3'
	167+1 (G→A)		167+2 (T→C)

Beide Plasmide wurden für die Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone verwendet, bei denen eine homologe Rekombination zwischen dem Disruptionsvektor und dem *Mocs2*-Gen stattgefunden hatte. Beide rekombinanten ES-Zelllinien wurden für die Herstellung chimärer Mäuse verwendet. Nach dem ES-Zell-Transfer der Linie 167+1 (G→A) wurden zwei hochprozentige chimäre Mäuse geboren, die aber im Zuge einer Hepatitis-Infektion verstarben. Somit konnten nur *Founder*-Tiere mit der Mutation 167+2 (T→C) verpaart und Mäuse, die homozygot für das rekombinante Allel waren, erzeugt werden.

Die Einbringung der Punktmutationen in die 5' Donor-*splice site* des Introns 6 des *Mocs2*-Gens sollte zur Produktion einer mRNA führen, bei der die kodierenden Bereiche des Exons 6 fehlen. Jedoch wurde in den *Mocs2*<sup>-/-</sup> Mäusen, die homozygot für die Punktmutation 167+2 (T→C) waren, die mutierte 5' Donor-*splice site* des Exons 6 in einigen Fällen doch erkannt, was die Bildung des Wildtyptranskripts für die Spleißform II des *Mocs2*-Gens zur Folge hatte.

Die einbrachte Punktmutation veränderte die *splice site* des Introns 6 von Typ GT-AG zu Typ GC-AT. Die beiden Arten von Introns gehören zur Gruppe der U2 snRNPs-abhängigen Introns, die die Hauptgruppe aller Intronarten ausmachen und durch Spleißosomen erkannt werden, die aus U1, U2, U4, U5 und U6 snRNPs bestehen (genauere Erläuterung des Spleißmechanismus siehe Abb. 4.7.)

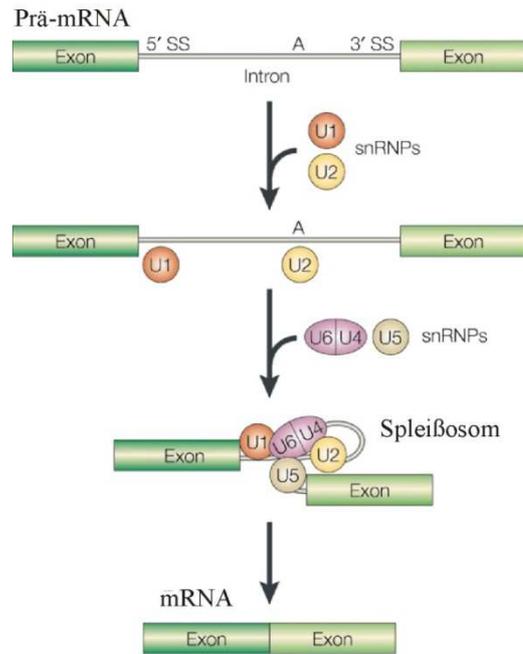


Abb. 4.7.: Spleißmechanismus: Die Spleißapparatur besteht aus *small nuclear RNAs* (snRNAs), die mit einer Mehrzahl an Proteinen die *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) bilden. Die snRNPs assoziieren mit der Prä-mRNA und initiieren so den Spleißmechanismus. Die Introns enthalten mehrere konservierte Motive an die die snRNPs binden können (5' Donor-*splice site*, Adenosin des *branch points*, 3' Akzeptor-*splice site*). Das U1-snRNP bindet an die 5' Donor-*splice site*. Das U2-snRNP bindet an das Adenosin des *branch points* innerhalb des Introns. Die Erkennung der Prä-mRNA führt zu der Rekrutierung weiterer Komplexe (U4/6- und U5-snRNPs), gefolgt von Rearrangements in den Basenpaarungen mit der mRNA und dem Entfernen des Introns [176]. SS = *splice site*, A = Adenosin des *branch points*

Die Verwendung einer GC-AG *splice site* anstatt einer GT-AG ist ein sehr seltenes Ereignis, obwohl sie in vielen Organismen beschrieben wurde. Sheth *et al.* (2006) untersuchten 21772 Gene der Maus und zeigten, dass in 0.817 % der Fälle dieser Subtyp der U2-snRNPs zum Einsatz in den Spleißosomen kommt [177]. Thanarai *et al.* (2001) beschrieben in einem früheren Artikel, dass für die Erkennung der GC-Donor-*splice site* die umgebenden Basenpaaren zu einem hohen Prozentsatz der Konsensus-Sequenz entsprechen müssen, um die fehlerhafte Basenpaarung mit der U1-snRNA auszugleichen. Sie ist ebenfalls Bestandteil der Spleißosomen und für die Interaktion mit der 5' *splice site* verantwortlich. Andererseits fanden sie, dass die zur GC-Donor-*splice site* korrespondierenden 3' Akzeptor-*splice sites* nur zu einem geringen Prozentsatz der Konsensus-Sequenz entsprechen [178].

Die 5' Donor-*splice site* des Introns 6 entspricht zu 100 % der Konsensus-Sequenz, aber auch die 3' Akzeptor-*splice site* hat einen hohen Wert mit 96 % (*Splice Site Prediction-*

Programm des Neural Network). Zwar wurde das GC-AT Intron nicht in jedem Fall erkannt, was die Detektion einer mRNA ohne Exon 6 beweist. Jedoch reichten die durch die GC-AT Intron-Erkennung gebildeten Transkripte aus, den Phänotyp der MoCo-Defizienz zu verhindern, was dieses Modell für weitere Untersuchungen unzweckmäßig machte. Deshalb soll in weiterführenden Arbeiten ein neues *Mocs2*-Knockout-Modell hergestellt werden, das eine andere Mutation im kodierenden Bereich des Gens trägt.

## 5. Zusammenfassung

Die Molybdän-Cofaktor (MoCo) -Defizienz ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit. An der MoCo-Biosynthese beim Menschen sind verschiedene Enzyme beteiligt, die von den Genen *MOCS1*, *MOCS2*, *MOCS3* und *GEPH* kodiert werden. Mutationen im MoCo-Biosyntheseweg führen zum Verlust der MoCo-abhängigen Enzyme Sulfitoxidase, Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase. Der Verlust dieser Enzymaktivitäten hat hauptsächlich schwere neuronale Schäden zur Folge und die meisten MoCo-defizienten Patienten sterben im frühen Kindesalter.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem *Mocs1-Knockout*-Modell für die MoCo-Defizienz Typ A mit Mutationen im *MOCS1*-Gen, um bisher bekannte Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern bzw. neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

In den vergangenen Jahren konnte eine Substitutionstherapie mit zyklischem Pyranopterinmonophosphat (cPMP), dem ersten Zwischenprodukt der MoCo-Biosynthese, etabliert werden. *Mocs1*-defiziente Mäuse sterben spätestens 12 d nach der Geburt mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 7.5 d. Die intrahepatische cPMP-Behandlung konnte den Phänotyp der MoCo-Defizienz erheblich verbessern, so dass die behandelten Mäuse ein durchschnittliches Alter von 91.8 d erreichten und fertil waren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten cPMP-Dosis-Bestimmungen führten zu einer weiteren Verlängerung der Lebensdauer der behandelten Mäuse auf durchschnittlich 160 d. Außerdem wurde die orale Gabe als eine neue Applikationsform des cPMPs untersucht. Eine Alternative zur cPMP-Substitutionstherapie eröffnete sich mit der Identifizierung und biochemischen Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidase (PSO) aus *Arabidopsis thaliana*, deren Fähigkeit die murine MoCo-Biosynthese zu restaurieren im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Zwar wurde eine Verlängerung der Lebensdauer erreicht, jedoch traten schwere Nebenwirkungen auf, die vermutlich auf die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ein Nebenprodukt der Detoxifizierung der PSO, zurückzuführen ist. Sie hatte den Tod der behandelten Mäuse zur Folge. Auch eine Injektion von embryonalen Hepatozyten in das Lebergewebe *Mocs1*-defizienter Mäuse konnte den Phänotyp der MoCo-Defizienz nicht verbessern.

Des Weiteren wurde die somatische Gentherapie für die Behandlung der MoCo-Defizienz Typ A in Betracht gezogen. Einerseits wurde untersucht, inwieweit die Verwendung von Atellocollagen als Trägermaterial von Plasmid-DNA sich auf die Transfektionsrate im Rahmen des nichtviralen Gentransfers auswirkt. Andererseits sollten virale Vektoren genutzt werden, um das intakte *MOCS1*-Gen in *Mocs1*-defiziente Mäuse einzubringen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Langzeitexpression verschiedener Expressionskassetten nachgewiesen werden, die mit Hilfe eines rekombinanten Adeno-assoziierten Vektor (rAAV) des chimären Serotyp 1/2 eingebracht wurden. Neben dem Vergleich verschiedener Applikationswege und Injektionszeitpunkte wurde auch die notwendige Dosis für die Aufhebung des Phänotyps der MoCo-Defizienz bestimmt. Außerdem wurde die Wirkung von zwei- und dreifachen Injektionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt von Mäusen untersucht. Dabei wurde ein kurzes neonatales Zeitfenster gezeigt, in dem das Immunsystem nicht auf den eingebrachten Vektor reagierte. Die Exposition mit dem rAAV-Capsid innerhalb dieses Fensters erlaubte die transgene Expression nach einer erneuten rAAV-Transduktion zu einem späteren Zeitpunkt. Dreifach-Injektionen des rAAV zeigten jedoch, dass außerhalb dieses Zeitfensters nicht mehr als eine Applikation des rAAVs möglich war, was gegen eine Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber dem viralen Capsid spricht.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Molybdän-Cofaktor-Defizienz Typ B. Im Falle des humanen *MOCS2*-Gens wurde eine neue Spleißform beschrieben, welches ein bis dahin unbeschriebenes Exon enthält. Der experimentelle Nachweis der Spleißform III im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass *MOCS2B* nicht durch *leaky scanning* translatiert wird, sondern dass durch das neue Transkript das *MOCS2A*-Startcodon umgangen und die Translation beim *MOCS2B*-Startcodon initiiert wird. Studien an Patientenfibroblasten mit Mutationen in diesem Abschnitt der MoCo-Biosynthese zeigten, dass *MOCS2B* nur zusammen mit *MOCS2A* stabil vorliegen kann. Weiterhin wurden die genomische Struktur des murinen *Mocs2*-Gens und dessen Transkripte untersucht. Diese Analysen gaben neue Hinweise auf die Bildung der Untereinheiten der Molybdopterynsynthase.

## 6. abstract

Molybdenum cofactor (MoCo) deficiency is an autosomal recessive inherited disease. The biosynthetic pathway leading to MoCo requires several enzymes encoded by the genes *MOCS1*, *MOCS2*, *MOCS3*, and *GEPH*. Mutations in any of these genes abolish formation of active MoCo, leading to the pleiotropic loss of all MoCo dependent enzymes such as sulfite oxidase, xanthine dehydrogenase as well as aldehyde oxidase. Affected patients display a progressive neuronal damage, which leads in most cases to death before adolescence.

The first part of this thesis was engaged with a murine model for MoCo deficiency type A with mutations in the *MOCS1* gene to improve established treatment regimen or to find new therapies. In the past years a substitution therapy with cyclic pyranopterin monophosphat (cPMP), the first intermediate of MoCo biosynthesis, was established. *Mocs1*-deficient mice die within the first 12 days after birth, with an average life span of 7.5 d. Intrahepatic cPMP injections ameliorated the phenotype of MoCo-deficiency. The mice reached adulthood und were fertile. In this work the cPMP application rate was increased to improve the longevity of treated mice. Additionally, a new application in form of oral administration was investigated.

An alternative substitution became possible with the identification and biochemical characterization of the plant sulfite oxidase (PSO) from *Arabidopsis thaliana*. Its ability to rescue the phenotype of MoCo deficiency was investigated in this work. An elongation of life span was achieved. But serious side effects of this treatment resulting from the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is a byproduct of the PSO mediated detoxification, led eventually to the death of the treated mice. The delivery of embryonic hepatocytes in the liver of *Mocs1*-deficient mice could also not improve the phenotype of the MoCo deficiency.

Furthermore, the possibilities of somatic gene therapy for MoCo deficiency were explored. First, nonviral gene transfer of plasmid DNA coated with a polymer were used. Second, viral vectors were utilized to deliver the *MOCS1* gene into *Mocs1*-deficient mice. In this work the dosage of recombinant AAV necessary to rescue the lethal deficiency phenotype was determined. Also the long-term expression of different

expression cassettes delivered in a chimeric AAV capsid of serotype 1/2 was demonstrated and different routes of application were compared. In addition the effect of double and triple injections at different time points after birth was studied and a short neonatal window for non-response of the immune system was found. Exposition with rAAV capsids within this window allowed transgene expression after a second rAAV transduction at a later time point. However, exposition within this window does not trigger immunotolerance to the viral capsid, which hampers the repeated rAAV-mediated gene transfer outside this tolerant window.

The second part of this thesis was engaged with the molybdenum cofactor deficiency type B. In case of the human *MOCS2* gene a new splice form containing an alternate first exon was confirmed, which was undescribed until now. The experimental verification of this splice form disproved leaky scanning as the mode of MOCS2B translation. This novel transcript circumvents the MOCS2A start codon and renders the MOCS2B start codon as target for the scanning mechanism of translation initiation.

In addition, studies with fibroblasts from a patient with a mutation in this step of MoCo biosynthesis showed that MOCS2B only stable exists in the presence of MOCS2A. Furthermore, the genomic structure of the murine *Mocs2* gene and its corresponding transcripts were examined. These analyses gave new insights in the formation of the molybdopterin synthase subunits.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Rajagopalan, K.V. and J.L. Johnson, *The pterin molybdenum cofactors*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10199-202.
2. Allen, R.M., et al., *Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase*. Crit Rev Biotechnol, 1994. **14**(3): p. 225-49.
3. Reiss, J., *Genetics of molybdenum cofactor deficiency*. Hum Genet, 2000. **106**(2): p. 157-63.
4. Reiss, J., et al., *A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(1): p. 208-13.
5. Kirsch, J., et al., *Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 745-8.
6. Schwarz, G., *Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(23): p. 2792-810.
7. Schwarz, G. and R.R. Mendel, *Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes*. Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 623-47.
8. Duran, M., et al., *Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport?* J Inherit Metab Dis, 1978. **1**(4): p. 175-8.
9. Johnson, J.L., et al., *Inborn errors of molybdenum metabolism: combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(6): p. 3715-9.
10. Johnson, J.L., et al., *Molybdopterin synthase mutations in a mild case of molybdenum cofactor deficiency*. Am J Med Genet, 2001. **104**(2): p. 169-73.
11. Johnson, J.L. and K.V. Rajagopalan, *Human sulfite oxidase deficiency. Characterization of the molecular defect in a multicomponent system*. J Clin Invest, 1976. **58**(3): p. 551-6.
12. Shih, V.E., et al., *Sulfite oxidase deficiency. Biochemical and clinical investigations of a hereditary metabolic disorder in sulfur metabolism*. N Engl J Med, 1977. **297**(19): p. 1022-8.
13. Johnson, J.L., Duran, M. , *Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency*. McGraw-Hill, New York, 2001.
14. Salman, M.S., et al., *New insights into the neuropathogenesis of molybdenum cofactor deficiency*. Can J Neurol Sci, 2002. **29**(1): p. 91-6.
15. Gadelha, F.R., et al., *Ca<sup>2+</sup>-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 1997. **345**(2): p. 243-50.
16. Choi, D.W., *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron, 1988. **1**(8): p. 623-34.
17. Meldrum, B. and J. Garthwaite, *Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(9): p. 379-87.
18. Beal, M.F., *Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases*. Faseb J, 1992. **6**(15): p. 3338-44.

19. Zhang, X., et al., *A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43035-45.
20. Reiss, J., et al., *The pathogenesis of molybdenum cofactor deficiency, its delay by maternal clearance, and its expression pattern in microarray analysis*. Mol Genet Metab, 2005. **85**(1): p. 12-20.
21. Harrison, R., *Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(6): p. 774-97.
22. Garattini, E., et al., *Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 1): p. 15-32.
23. Hille, R. and T. Nishino, *Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase*. Faseb J, 1995. **9**(11): p. 995-1003.
24. Simmonds, H.A., S. Reiter, and T. Nishino, *Hereditary xanthinuria*. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 1995. **7**: p. 1781-97.
25. Della Corte, E., et al., *Properties of the xanthine oxidase from human liver*. Biochim Biophys Acta, 1969. **191**(1): p. 164-6.
26. Reiter, S., et al., *Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol*. Clin Chim Acta, 1990. **187**(3): p. 221-34.
27. Johnson, J.L., et al., *Molybdenum cofactor biosynthesis in humans. Identification of two complementation groups of cofactor-deficient patients and preliminary characterization of a diffusible molybdopterin precursor*. J Clin Invest, 1989. **83**(3): p. 897-903.
28. Reiss, J. and J.L. Johnson, *Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH*. Hum Mutat, 2003. **21**(6): p. 569-76.
29. Reiss, J., et al., *Human molybdopterin synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum cofactor deficiency type B*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(3): p. 706-11.
30. Hahnwald, R., et al., *A novel MOCS2 mutation reveals coordinated expression of the small and large subunit of molybdopterin synthase*. Mol Genet Metab, 2006. **89**(3): p. 210-3.
31. Arenas, M., et al., *An unusual genetic variant in the MOCS1 gene leads to complete missplicing of an alternatively spliced exon in a patient with molybdenum cofactor deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2009.
32. Leimkuhler, S., et al., *Ten novel mutations in the molybdenum cofactor genes MOCS1 and MOCS2 and in vitro characterization of a MOCS2 mutation that abolishes the binding ability of molybdopterin synthase*. Hum Genet, 2005. **117**(6): p. 565-70.
33. Lee, H.J., et al., *Molybdenum cofactor-deficient mice resemble the phenotype of human patients*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(26): p. 3309-17.
34. Kramer, S., R.V. Hageman, and K.V. Rajagopalan, *In vitro reconstitution of nitrate reductase activity of the Neurospora crassa mutant nit-1: specific incorporation of molybdopterin*. Arch Biochem Biophys, 1984. **233**(2): p. 821-9.
35. Johnson, J.L., M.M. Wuebbens, and K.V. Rajagopalan, *The structure of a molybdopterin precursor. Characterization of a stable, oxidized derivative*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13440-7.

36. Johnson, J.L. and K.V. Rajagopalan, *Molybdopterin biosynthesis in man. Properties of the converting factor in liver tissue from a molybdenum cofactor deficient patient*. Adv Exp Med Biol, 1993. **338**: p. 379-82.
37. Hanzelmann, P., G. Schwarz, and R.R. Mendel, *Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18303-12.
38. Hoff, T., et al., *Isolation of two Arabidopsis cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor biosynthesis by functional complementation of Escherichia coli mutants*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6100-7.
39. Gray, T.A. and R.D. Nicholls, *Diverse splicing mechanisms fuse the evolutionarily conserved bicistronic MOCS1A and MOCS1B open reading frames*. Rna, 2000. **6**(7): p. 928-36.
40. Schwarz, G., et al., *Rescue of lethal molybdenum cofactor deficiency by a biosynthetic precursor from Escherichia coli*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(12): p. 1249-55.
41. Marshall, K.A., et al., *The neuronal toxicity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 515-20.
42. Vincent, A.S., et al., *Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 393-402.
43. Johnson, J.L., H.P. Jones, and K.V. Rajagopalan, *In vitro reconstitution of demolybdosulfite oxidase by a molybdenum cofactor from rat liver and other sources*. J Biol Chem, 1977. **252**(14): p. 4994-5003.
44. Nowak, K., et al., *Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation*. Plant Cell Physiol, 2004. **45**(12): p. 1889-94.
45. Eilers, T., et al., *Identification and biochemical characterization of Arabidopsis thaliana sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46989-94.
46. Hansch, R., et al., *Plant sulfite oxidase as novel producer of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6884-8.
47. Wuebbens, M.M. and K.V. Rajagopalan, *Structural characterization of a molybdopterin precursor*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13493-8.
48. Santamaria-Araujo, J.A., et al., *The tetrahydropyranopterine structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 15994-9.
49. Blaese, R.M., et al., *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
50. Glover, D.J., H.J. Lipps, and D.A. Jans, *Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(4): p. 299-310.
51. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay, *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(5): p. 346-58.
52. Hahneward, R., *Somatische Gentherapie am Modell der Molybdän-Cofaktor-Defizienz*, in *Institut für Humangenetik*. 2005, Universität Göttingen.
53. Kootstra, N.A. and I.M. Verma, *Gene therapy with viral vectors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 413-39.

54. Fisher, K.J., et al., *Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis*. Virology, 1996. **217**(1): p. 11-22.
55. Flotte, T.R., et al., *Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3781-90.
56. Ponnazhagan, S., et al., *Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(3): p. 275-84.
57. ; Available from: <http://www.rzbd.fhhamburg.de/~fhhbamh/fertilisation/pid.htm>.
58. Weber, A., M.T. Groyer-Picard, and I. Dagher, *Hepatocyte transplantation techniques: large animal models*. Methods Mol Biol, 2009. **481**: p. 83-96.
59. Fox, I.J., et al., *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1422-6.
60. Grompe, M., *Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases*. J Inherit Metab Dis, 2001. **24**(2): p. 231-44.
61. Gupta, S. and J.R. Chowdhury, *Therapeutic potential of hepatocyte transplantation*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(6): p. 439-46.
62. Stallmeyer, B., et al., *Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(3): p. 698-705.
63. Pitterle, D.M., J.L. Johnson, and K.V. Rajagopalan, *In vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. Role of protein-bound sulfur in formation of the dithiolene*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13506-9.
64. Stallmeyer, B., et al., *Molybdenum co-factor biosynthesis: the Arabidopsis thaliana cDNA cnx1 encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three Escherichia coli proteins*. Plant J, 1995. **8**(5): p. 751-62.
65. Reiss, J., et al., *Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency*. Nat Genet, 1998b. **20**(1): p. 51-3.
66. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
67. Igoucheva, O., V. Alexeev, and K. Yoon, *Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells*. Gene Ther, 2001. **8**(5): p. 391-9.
68. Nakamura, M., et al., *Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo*. Gene Ther, 2004. **11**(10): p. 838-46.
69. Lu, I.L., et al., *Correction/mutation of acid alpha-D-glucosidase gene by modified single-stranded oligonucleotides: in vitro and in vivo studies*. Gene Ther, 2003. **10**(22): p. 1910-6.
70. Fan, W. and K. Yoon, *In vivo alteration of the keratin 17 gene in hair follicles by oligonucleotide-directed gene targeting*. Exp Dermatol, 2003. **12**(6): p. 832-42.
71. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
72. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.

73. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
74. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
75. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
76. Chien, A., D.B. Edgar, and J.M. Trela, *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. J Bacteriol, 1976. **127**(3): p. 1550-7.
77. Breslauer, K.J., et al., *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3746-50.
78. Kogan, S.C., M. Doherty, and J. Gitschier, *An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A*. N Engl J Med, 1987. **317**(16): p. 985-90.
79. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *"A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity"*. Addendum. Anal Biochem, 1984. **137**(1): p. 266-7.
80. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
81. Sorger, G.J., *Nitrate reductase electron transport systems in mutant and in wild-type strains of Neurospora*. Biochim Biophys Acta, 1966. **118**(3): p. 484-94.
82. Sorger, G.J. and N.H. Giles, *Genetic control of nitrate reductase in Neurospora crassa*. Genetics, 1965. **52**(4): p. 777-88.
83. Nason, A., et al., *Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **65**(1): p. 137-44.
84. Nason, A., et al., *In vitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a Neurospora mutant and a component of molybdenum-enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(12): p. 3242-6.
85. Hogan, B., et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Vol. 2. 1994, Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
86. Hauck, B., L. Chen, and W. Xiao, *Generation and Characterisation of Chimeric Recombinant AAV Vectors*. Mol Ther, 2003. **7**(3): p. 419-425.
87. Shevtsova, Z., et al., *Promoters and serotypes: targeting of AAV vectors for CNS gene transfer in vitro and in vivo*. Exp Physiol, 2004.
88. Hauck, B., L. Chen, and W. Xiao, *Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors*. Mol Ther, 2003. **7**(3): p. 419-25.
89. Zolotukhin, S., et al., *Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield*. Gene Ther, 1999. **6**(6): p. 973-85.
90. Laconi, E., et al., *Long-term, near total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine*. Am J Pathol 1998. **153**: p. 319-329.
91. Yasuchika, K., et al., *Establishment of a highly efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells*. Hepatology, 2002. **36**(6): p. 1488-97.

92. Stenzel, K.H., T. Miyata, and A.L. Rubin, *Collagen as a biomaterial*. Annu Rev Biophys Bioeng, 1974. **3**(0): p. 231-53.
93. Gross-Hardt, S. and J. Reiss, *The bicistronic MOCSI gene has alternative start codons on two mutually exclusive exons*. Mol Genet Metab, 2002. **76**(4): p. 340-3.
94. Hirasawa, T., et al., *Biodegradability of 'Minipellet,' a New Drug Formulation Using Atelocollagen as a Drug Carrier Material, in the Rhesus Monkey*. . Biomedical research, 1997. **18**(2): p. 149-159.
95. Rajagopalan, K.V., *Novel aspects of the biochemistry of the molybdenum cofactor*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1991. **64**: p. 215-90.
96. Bessis, N., F.J. GarciaCozar, and M.C. Boissier, *Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms*. Gene Ther, 2004. **11 Suppl 1**: p. S10-7.
97. McCarty, D.M., S.J. Young, and J. Samulski, *Integration of Adeno-Associated-Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 819-45.
98. Strachan, T. and A.P. Read, *Human molecular genetics 3*. 3rd ed. 2004, New York ; London: Garland Science. xxv, 674 p.
99. Grompe, M., E. Laconi, and D.A. Shafritz, *Principles of therapeutic liver repopulation*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(1): p. 7-14.
100. Laconi, E., et al., *Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine*. Am J Pathol, 1998. **153**(1): p. 319-29.
101. Jago, M.V., *The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning*. Am J Pathol, 1969. **56**(3): p. 405-21.
102. Ono, H. and A. Ito, *Transport of the precursor for sulfite oxidase into intermembrane space of liver mitochondria: binding of the precursor to outer mitochondrial membrane*. J Biochem (Tokyo), 1984. **95**(2): p. 353-8.
103. Falciani, F., et al., *Interferons induce xanthine dehydrogenase gene expression in L929 cells*. Biochem J, 1992. **285 ( Pt 3)**: p. 1001-8.
104. Santamaria-Araujo, J., *Isolation and Spectroscopic Characterization of the Molybdenum Cofactor Precursor Z and its Application to Resue MOCSI-deficient Mice*. 2005, Technische Universität Braunschweig.
105. Lovenberg, W. and R.A. Levine, *Pfleiderer, W. in: Unconjugated pterins in neurobiology : basic and clinical aspects*. 1987, London ; New York: Taylor & Francis. x, 218 p.
106. Pfleiderer, W., *Pteridines. Properties, reactivities and biological significance*. Journal of heterocyclic chemistry, 1992. **29**(3): p. 583-605.
107. Bihun, C. and L. Bauck, *Basic anatomy, physiology, husbandry, and clinical techniques, in Ferrets, Rabbits and Rodents*, K. Quesenberry and J. Carpenter, Editors. 2004, WB Saunders: St. Louis. p. 286-298.
108. Shimo, T., et al., *Simultaneous treatment with citrate prevents nephropathy induced by FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor, in rats*. Toxicol Sci, 2005. **87**(1): p. 267-76.
109. Johnson, J.L., K.V. Rajagopalan, and S.K. Wadman, *Human molybdenum cofactor deficiency*. Adv Exp Med Biol, 1993. **338**: p. 373-8.
110. Rugar, C.A., et al., *Isolated sulfite oxidase deficiency*. Neuropediatrics, 1996. **27**(6): p. 299-304.

111. Abuchowski, A., et al., *Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3578-81.
112. Glue, P., et al., *Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data*. Hepatitis C Intervention Therapy Group. Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(5): p. 556-67.
113. Gabizon, A.A., Y. Barenholz, and M. Bialer, *Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs*. Pharm Res, 1993. **10**(5): p. 703-8.
114. Working, P., *Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives*. Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications ed. J.M. Harris and S. Zalipsky. 1997, Washington D.C.: American Chemical Society. 45.
115. Lundstrom, K. and T. Boulikas, *Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials*. Technol Cancer Res Treat, 2003. **2**(5): p. 471-86.
116. Hanzelmann, P., et al., *Characterization of MOCSIA, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34721-32.
117. Grillo, M.A. and S. Colombatto, *S-adenosylmethionine and protein methylation*. Amino Acids, 2005. **28**(4): p. 357-62.
118. Haenzelmann, P., G. Schwarz, and R.R. Mendel, *Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18303-12.
119. Zhang, G., et al., *Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery*. Gene Ther, 2004. **11**(8): p. 675-82.
120. Xu, Z.L., et al., *Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors*. Gene, 2001. **272**(1-2): p. 149-56.
121. Ochiya, T., et al., *Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines*. Curr Gene Ther, 2001. **1**(1): p. 31-52.
122. Davidson, B.L., et al., *Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3428-32.
123. Petry, H., et al., *Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice* Gene Ther, 2008. **15**: p. 54-60.
124. Rabinowitz, J.E., et al., *Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 791-801.
125. Nakai, H., et al., *Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 6969-76.
126. Schultz, B.R. and J.S. Chamberlain, *Recombinant adeno-associated virus transduction and integration*. Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1189-99.

127. Harding, T.C., et al., *Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B*. Gene Ther, 2004. **11**(2): p. 204-13.
128. Sun, J.Y., et al., *Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors*. Gene Ther, 2003. **10**(11): p. 964-76.
129. Manno, C.S., et al., *Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response*. nature medicine, 2006. **12**(3): p. 342-347.
130. Acland, G.M., et al., *Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 92-5.
131. Kaplitt, M.G., et al., *Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial*. Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2097-105.
132. commission-enterprise-pharmaceuticals, e., *Good manufacturing practice (GMP) Guidelines*. EudraLex. **4**.
133. Snyder, R.O., et al., *Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 64-70.
134. Niemeyer, G.P., et al., *Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy*. blood, 2009. **113**: p. 797-806.
135. Mount, J.D., et al., *Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2670-6.
136. Nathwani, A.C., et al., *Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1662-9.
137. Wang, L., et al., *Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3079-86.
138. Mingozzi, F., et al., *CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans*. nature medicine, 2007. **13**(4): p. 419-422.
139. Calcedo, R., et al., *Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses*. J Infect Dis, 2009. **199**(3): p. 381-90.
140. Halbert, C.L., et al., *Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(4): p. 440-7.
141. Warrington, K.H., Jr. and R.W. Herzog, *Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer*. Hum Genet, 2006. **119**(6): p. 571-603.
142. Jian, H., et al., *Evidence of multilayer factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B*. Mol Ther, 2006. **14**: p. 452-455.
143. Manno, C.S., et al., *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2963-72
144. Sabatino, D.E., et al., *Persistent Expression of hF.IX After Tolerance Induction by In Utero or Neonatal Administration of AAV-1-F.IX in Hemophilia B Mice*. Molecular Therapy, 2007. **15**(9): p. 1677-1685.

145. Duan, D., et al., *Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8568-77.
146. Duan, D., et al., *Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates*. Virology, 1999. **261**(1): p. 8-14.
147. Miao, C.H., et al., *Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3793-803.
148. Vincent-Lacaze, N., et al., *Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 1949-55.
149. Nakai, H., T.A. Storm, and M.A. Kay, *Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9451-63.
150. Russell, D.W., A.D. Miller, and I.E. Alexander, *Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8915-9.
151. Rutledge, E.A. and D.W. Russell, *Adeno-associated virus vector integration junctions*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8429-36.
152. McCarty, D.M., S.M. Young, Jr., and R.J. Samulski, *Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 819-45.
153. Nakai, H., et al., *AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 297-302.
154. Nakai, H., et al., *Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3606-14.
155. Miller, D.G., E.A. Rutledge, and D.W. Russell, *Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration*. Nat Genet, 2002. **30**(2): p. 147-8.
156. Donsante, A., et al., *AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma*. Science, 2007. **317**(5837): p. 477.
157. Russell, D.W., *AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer*. Mol Ther, 2007. **15**(10): p. 1740-3.
158. Wang, X., et al., *Ex vivo gene transfer into hepatocytes*. Methods Mol Biol, 2009. **481**: p. 117-40.
159. Ponder, K.P., et al., *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1217-21.
160. Uyama, S., et al., *Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts*. Transplantation, 2001. **71**(9): p. 1226-31.
161. Weber, A., et al., *Hepatocyte transplantation in animal models*. Liver Transpl, 2009. **15**(1): p. 7-14.
162. Strom, S.C., J.R. Chowdhury, and I.J. Fox, *Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(1): p. 39-48.
163. Kobayashi, N., et al., *Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 851-7.
164. Lainas, P., et al., *Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization*. J Hepatol, 2008. **49**(3): p. 354-62.

165. Traggiai, E., et al., *Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice*. Science, 2004. **304**(5667): p. 104-7.
166. Bissig, K.D., et al., *Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20507-11.
167. Mattocks, A.R., *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. 1986, London ; Orlando Fla.: Academic Press. x, 393 p.
168. Koenig, S., et al., *Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(4): p. 285-98.
169. Sigal, S.H., et al., *Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. G1260-72.
170. Wilson, R., et al., *2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of C. elegans*. Nature, 1994. **368**(6466): p. 32-8.
171. Mendel, R.R., *Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology*. Planta, 1997. **203**(4): p. 399-405.
172. Kozak, M., *The scanning model for translation: an update*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 229-41.
173. Geballe, A.P. and D.R. Morris, *Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(4): p. 159-64.
174. Kozak, M., *Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation*. Gene, 2002. **299**(1-2): p. 1-34.
175. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(4): p. 406-25.
176. Dredge, B.K., A.D. Polydorides, and R.B. Darnell, *The splice of life: alternative splicing and neurological disease*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(1): p. 43-50.
177. Sheth, N., et al., *Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(14): p. 3955-67.
178. Thanaraj, T.A. and F. Clark, *Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(12): p. 2581-93.

## 8. Danksagung

Prof. Dr. J. Reiss danke ich für die großartige Betreuung, die wertvollen Anregungen für meine Doktorarbeit und die vielfältige Unterstützung im Laboralltag.

Prof. Dr. G. Schwarz bedanke ich mich sehr herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für die vielen hilfreichen Anregungen. Außerdem bedanke ich für die biochemischen Untersuchungen und die Aufreinigung der pflanzlichen Sulfitoxidase.

Prof. Dr. C. Kubisch danke ich für die Übernahme des Korrefertas.

Prof. Dr. S. Korsching danke ich für die Leitung der Prüfungskommission und Dr. K. Fischer für die Übernahme des Prüfungsbeisitzes.

Prof. Dr. S. Leimkühler danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Untersuchung des *MOCS2*-Gens.

Frau Prof. Dr. K. Guan und Dr. K. Streckfuss danke ich für die Isolierung und Aufreinigung der embryonalen Hepatozyten.

Dr. S. Kügler danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Herstellung der Adeno-assoziierten Viren.

Für die unermüdliche Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre danke ich ganz herzlich U. Lenz und W. Wegner.

Danke an alle weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Göttingen und des Instituts für Biochemie der Universität zu Köln für die freundliche Atmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag.

Bei meiner Familie und Christian Gerls möchte ich dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir in schwierigen Situationen beigestanden haben.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Günter Schwarz und Prof. Dr. J. Reiss betreut worden.

### **Publikationen**

R. Hahnewald, W. Wegner, and J. Reiss, AAV-mediated gene therapy for metabolic diseases: dosage and reapplication studies in the molybdenum cofactor deficiency model. *Genet Vaccines Ther*, 2009. **7**: p. 9.

S. Kügler, R. Hahnewald, M. Garrido and J. Reiss, Long-term rescue of a lethal inherited disease by adeno-associated virus-mediated gene transfer in a mouse model of molybdenum-cofactor deficiency. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(2): p. 291-7.

R. Hahnewald, S. Leimkühler, A. Vilaseca, C. Acquaviva-Bourdain, U. Lenz and J. Reiss, A novel MOCS2 mutation reveals coordinated expression of the small and large subunit of molybdopterin synthase. *Mol Genet Metab*, 2006. **89**(3): p. 210-3.

### **Tagungsbeitrag**

R. Hahnewald, and J. Reiss, Pathogenese des Molybdän-Kofaktor-Mangels – Development of a gene-directed orphan drug, in *Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin*, Schriftenreihe der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V., J. Köhrle and C. Schmutzler (Hrsg.). 2007, Herbert Utz Verlag: München.

Unterschrift

## 9. Lebenslauf

Name: Hahnewald                      Vorname: Rita  
Geboren: 26.05.1980                  Geburtsort: Freital  
Familienstand: ledig                  Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulischer Werdegang:

1986-1987                      Schiller-Oberschule Freital  
1987-1992                      Karl-Liebknecht-Oberschule Freital  
1992-1998                      Kreisgymnasium Freital-Deuben  
1998                              Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Studienverlauf:

1998-1999                      Studium der Elektrotechnik an der Technischen Universität  
Dresden  
1999-2005                      Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen  
2005                              Abschluss als Diplom-Biologe, Thema der Diplomarbeit:  
„Somatische Gentherapie am Modell der Molybdän-Cofaktor-  
Defizienz“  
2005-2007                      wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik der  
Georg-August-Universität Göttingen  
Seit 2007                      Doktorand an der Universität zu Köln, externe praktische Arbeit  
an der Universität Göttingen

Datum

Unterschrift