Untersuchungen zu Funktion und Transport lysosomaler Enzyme am Mausmodell (*mus musculus*) der lysosomalen Speichererkrankung Mucolipidose Typ II

Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie,

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sandra Markmann

aus Marsberg

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. T. BRAULKE Weiterer Gutachter der Dissertation: Priv.-Doz. Dr. E. KRAMER Tag der Disputation: 13. Dezember 2013

Hamburg, den 28. November 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer nat. Thomas Braulke
- 2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Edgar Kramer

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzı	ngsverzeichnis	IV
1. Einlei	ung	1
1.1	Lysosomen	1
1.2	Autophagie-vermittelter Proteinabbau	2
13	Synthese und Transport löslicher lysosomaler Proteine	3
13	1 Biosynthese löslicher lysosomaler Proteine	
1.3	2 Generierung des Erkennungssignals löslicher lysosomaler Proteine	
1.3	3 M6P-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Proteine	
1.3	4 M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine	7
1.4	Funktion löslicher lysosomaler Proteine	9
1.4	.1 Degradation von Glycanen, Proteinen und Lipiden	9
1.4	2 Lysosomaler Cholesterin-Transport	11
15	Lysosomale Sneichererkrankungen	12
15	1 Mucolinidose Typ II und III	13
1.5	2 Tiermodelle der Mucolipidose Typ II	14
2 7:-1		16
2. Zielse	zung	16
3. Mater	ial und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1 3.1	Material 1 Chemikalien	17
3.1 3.1 3.1	Material .1 Chemikalien .2 Arbeitsgeräte	 17 17 19
3.1 3.1 3.1 3.1	Material 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien	 17 17 19 21
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	 17 17 19 21 22
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	 17 17 19 21 22 22
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	 17 17 19 21 22 22 22
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate	17 17 19 21 22 22 23
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	17 17 17 21 22 22 22 23 23
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer	17 17 21 22 22 22 23 23 24
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	17 17 19 21 22 22 22 23 23 24 24
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper	17 17 21 21 22 22 23 23 23 23 24 24 24
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine	17 17 19 21 22 22 23 23 24 24 24 24 24 26
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen	IT It <thit< th=""></thit<>
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material	IT It
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen 14 Software	17 17 21 22 22 23 23 24 26 26 26 27
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen 14 Software 1 Genotypisierung von Gnptab ^{ki} - und S ^{ko} -Mäusen	17 17 21 22 22 23 24 24 26 26 26 27
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen 14 Software 15 Genotypisierung von Gnptab ^{ki} - und S ^{ko} -Mäusen 2 Agarose-Gelelektrophorese	17 17 21 22 22 23 23 24 26 26 27 28
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material. 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen 14 Software 1 Genotypisierung von Gnptab ^{ki} - und S ^{ko} -Mäusen 2 Agarose-Gelelektrophorese 3 RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen	17 17 17 19 21 22 22 23 23 24 25 26 26 26 26 27 28 28
3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1 3.1	Material 1 Chemikalien 2 Arbeitsgeräte 3 Verbrauchsmaterialien 4 Kits und Assays 5 Säulen und Säulenmaterial 6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards 7 Enzymsubstrate 8 Maus- und Zelllinien 9 Häufig verwendete Puffer 10 Medium und Zusätze 11 Antikörper 12 Filipin und Lektine 13 Radioaktive Substanzen 14 Software 15 Genotypisierung von Gnptab ^{ki} - und S ^{ko} -Mäusen 16 Genotypisierung aus kultivierten Zellen 17 RNA-Isolierung aus Geweben	IT It <thit< th=""></thit<>

3.3	Zel	lbiologische Methoden	30
	3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	30
	3.3.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	30
	3.3.3	Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten	31
	3.3.4	Isolierung von Lungenfibroblasten aus der Maus	31
	3.3.5	Konditionieren von Medien	31
	3.3.6	Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]-Methionin	32
	3.3.7	Metabolische Markierung von Glycosaminoglycanen mit Na[³⁵ S]O ₄	32
	3.3.8	Endozytose von [¹²⁵ I]-markierten Proteinen	33
	3.3.9	Lentivirale Transduktion und Immortalisierung von Zellen	34
3.4	Bio	chemische Methoden	34
	3.4.1	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellen	34
	3.4.2	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Hirn	35
	3.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
	3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
	3.4.5	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Lösung	36
	3.4.6	Western-Blot-Analyse	37
	3.4.7	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	38
	3.4.8	Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine	39
	3.4.9	Fluorographie	41
	3.4.10	Szintillationsmessung von radioaktiven Proteinen	
		in Polyacrylamid-Gelen	41
	3.4.11	Messung von Enzymaktivitäten	41
	3.4.12	Aufreinigung metabolisch markierter Glycosaminoglycane	44
	3.4.13	Größenanalyse metabolisch markierter Glycosaminoglycane	46
	3.4.14	Massenanalytik von Oligosacchariden	46
	3.4.15	Massenanalytik von Lipiden	47
3.5	His	tochemische Methoden	48
	3.5.1	Indirekte Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen	48
	3.5.2	Histologische Untersuchungen an Gewebeschnitten	49
	3.5.3	Immunhistochemische Färbung von Glycanen an Gewebeschnitten	49
3.6	Sor	nstige Methoden	50
	3.6.1	Tierhaltung	50
4. Erg	gebnisse	2	51
4.1	Ex	pression und Transport lysosomaler Proteine in <i>Gnptab^{ki}</i> -MEFs	51
	4.1.1	M6P-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Proteine	51
	4.1.2	Transkriptionsrate lysosomaler Gene in Gnptab ^{ki} -MEFs	56
4.2	Ch	arakterisierung des Speichermaterials in <i>Gnptab^{ki}-</i> Mäusen	57
	4.2.1	Mikroskopische Untersuchung des Speichermaterials	57
	4.2.2	Charakterisierung von Oligosacchariden im Speichermaterial	59
	4.2.3	Charakterisierung von Lipiden im Speichermaterial	66

4.3	Neurodegeneration in <i>Gnptab</i> ^{ki} -Mäusen	71
4.3.	1 Progressiver Verlust neuronaler Zellen in Cerebellum	
4.2	von <i>Gnptab^{ki}</i> -Mäusen	
4.3.	 Astro- und Mikrogliose im Hirn von Gnptab-Mausen Akkumulation von Autonhagosomen im neuronalan Gawaha 	12
4.3.	yon <i>Gnntab^{ki}</i> -Mäusen	73
4.4	Transport lysosomaler Proteine in <i>Gnptab^{ki}</i> /S ^{ko} -Fibroblasten	75
4.5	Rezeptor-vermittelte Endozytose lysosomaler Proteine	79
4.5.	1 Expression von LDLR, LRP1, LIMP-2 und MPR300 in	
	Wildtyp-, <i>Gnptab^{ki}</i> -, S ^{ko} - und <i>Gnptab^{ki}</i> /S ^{ko} -MEFs	79
4.5.	2 Endozytose lysosomaler Enzyme	81
4.6	Einfluß der Zellimmortalisierung auf den Transport lysosomaler Proteine	
5. Diskus	sion	
5.1	Das Mausmodell für Mucolipidose Typ II	88
5 2	Transport und Lakalisation lysosomalor Protaina im $C^{nntah^{ki}}$	
5.4	Mausmodell	88
5.3	mRNA-Expression lysosomaler Proteine in <i>Gnptab</i> ^{ki} -MEFs	90
5.4	Charakterisierung des Speichermaterials im Gnptab ^{ki} -Mausmodell	92
5.5	Neurodegenerative Prozesse im <i>Gnptab^{ki}</i> -Mausmodell	97
5.6	M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine	102
6. Zusam	menfassung	108
7. Literat	turverzeichnis	110
8. Anhan	g	124
8.1	Primer	124
8.1.	1 Primer zur Genotypisierung	124
8.1.	2 Taqman-Primer für die Realtime-PCR	124
8.2	Relative Intensitäten der prominentesten anionischen	
~	Lipide im Hirn von Wildtyp- und <i>Gnptab^{ki}</i> -Mäusen	125
Publikati	ionen und Tagungsbeiträge	126
Danksag	ung	128
Erklärun	lg	129

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
А	Aktivität
AAL	Aleuria Aurantia Lektin
Abb.	Abbildung
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ASA	Arylsulfatase A
ASB	Arylsulfatase B
ASM	saure Sphingomyelinase
Atg	autophagy-related gene
Au	Autophagosomen
Bg	Blutgefäß
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
°C	Grad Celsius
CtsD	Cathepsin D
CtsZ	Cathepsin Z
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
COP	coat protein complex
cpm	counts per minute
C _T	cycle of threshold
DEAE	Diethylaminoethanol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dK	dichte Körperchen
DMAP	DNA methyltransferase-associated protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
3	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid

ER	endoplasmatisches Retikulum
ERT	Enzymersatztherapie
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
et al.	et alii (lat. und andere)
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
Fuc	Fucose
α-Fuc	α-Fucosidase
GAG	Glycosaminoglycan
Gal	Galactose
β-Gal	β-Galactosidase
β-Gal-6S	α -N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase
GGA	<i>Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ADP-</i> <i>ribosylation factor binding protein</i>
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
α-GlcNS	N-Sulfoglucosamin-Sulfohydrolase
β-Gluc	β-Glucuronidase
<i>Gnptab</i> ^{ki}	Gnptab ^{c.3082insC} Knock-in
h	hour, Stunde
β-Hex	β-Hexosaminidase
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSB	His-Sonication Buffer
IC	Inhibitor Cocktail
α-IdoA-2S	Iduronat-2-Sulfatase
α-Idu	α-L-Iduronidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
К	Körnerschicht
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LB	Luria-Bertani
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LIMP	Lysosomales integrales Membranprotein
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
LSD	Lysosomale Speichererkrankung

LTA	Lotus tetragonolobus Lektin
М	Molekularschicht
M6P	Mannose 6-phosphat
m	mature, reif
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Man	Mannose
α-Man	α-Mannosidase
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
min	Minute
ML	Mucolipidose
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MPR	Mannose 6-Phosphatrezeptor
MPS	Mucopolysaccharidose
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVB	multivesicular bodies
NP-40	Nonidet P-40
Npc	Niemann-Pick C
OD	Optische Dichte
р	precursor, Vorläufer
Р	Purkinje-Zellschicht
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pН	Säuregrad
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
РРО	2,5-Diphenyloxazole
RAP	receptor-associated protein
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S^{ko}	Sortilin knock-out
SD	standard deviation
SDS	Sodium Dodecylsulphate

SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
S1P	site-1 protease
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Apparat
TOF	<i>time of flight</i> (Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
U	Unit
UCE	uncovering enzyme
UDP	Uridinphosphat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ULK1	unc-51-like kinase
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{M}	Messvolumen
V_p	Probenvolumen
Vt	Bettvolumen
\mathbf{V}_0	Totvolumen
VPS	vacuolar sorting protein
v/v	Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
ZK	Zebra-Körperchen

1. Einleitung

1.1 Lysosomen

Eukaryotische Zellen bestehen aus einer Vielzahl von membranbegrenzten Organellen mit unterschiedlichen Funktionen. Zu diesen gehören auch die von Christian de Duve 1955 entdeckten Lysosomen (de Duve *et al.*, 1955). In Lysosomen werden zellfremde und zelleigene Makromoleküle durch ca. 50 lysosomale Hydrolasen degradiert. Nach dem Abbau von Lipiden, Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren werden die Katabolite aus dem Lumen der Lysosomen ins Cytosol transportiert und von der Zelle wiederverwendet (Sagne und Gasnier, 2008). Zusätzlich besitzen Lysosomen wichtige Funktionen bei weiteren zellulären Prozessen, wie der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption (Lacombe *et al.*, 2013), der Antigenpräsentation (Basha *et al.*, 2012) und der Pigmentbildung (Damek-Poprawa *et al.*, 2009).

Substratabhängig werden lysosomale Hydrolasen in Glycosidasen, Lipasen, Phosphatasen, Proteasen, Nukleasen, Sulfatasen und Thioesterasen eingeteilt. Zelltypspezifisch unterscheiden sich Lysosomen in ihrer Struktur, Größe und Anzahl, während in ihrem Lumen immer ein saurer pH herrscht (pH < 5) (Kornfeld und Mellman, 1989). Dieser ist für die Aktivierung lysosomaler Enzyme notwendig und wird durch die V-Typ H⁺-ATPase, die Protonen vom Cytosol ins Lumen transportiert, aufrechterhalten (Lafourcade et al., 2008). Neben der V-Typ H⁺-ATPase gibt es mehr als 140 weitere lysosomale Membranproteine, die für die Homöostase der Lysosomen notwendig sind (Schröder et al., 2007). Die prominentesten lysosomalen Membranproteine sind LAMP-1 (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1), LAMP-2 (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2) und LIMP-2 (Lysosomales-integrales Membranprotein 2). LAMP-2 ist wichtig für die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen und LIMP-2 transportiert das lysosomale Enzym β-Glucocerebrosidase zum Lysosom (Reczek et al., 2007; Saftig et al., 2008). Lysosomale Membranproteine sind meist hochglycosyliert, was sie vor dem Abbau durch lysosomale Enzyme schützt (Schieweck et al., 2009).

Während zelleigenes Material meist durch Autophagie in die Lysosomen gelangt (siehe 1.2), wird den Lysosomen zellfremdes Material durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder durch Autophagozytose zugeführt (de Duve, 1983; Kornfeld *et al.*, 1989).

1.2 Autophagie-vermittelter Proteinabbau

Autophagie ist ein lysosomaler Abbauweg, durch den cytoplasmatisches Material in Stresssituationen, wie zum Beispiel bei Nährstoffmangel oder während viraler Infektionen, degradiert wird (Talloczy *et al.*, 2002). Es werden drei Varianten der Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie. Als Mikroautophagie wird die Aufnahme cytosolischen Materials durch direkte Invagination der lysosomalen Membran bezeichnet. Bei der Chaperonvermittelten Autophagie durchqueren Proteine direkt die lysosomale Membran vom Cytoplasma ins Lumen des Lysosoms. Chaperone binden dabei an cytosolische Proteine, die eine KFERQ-Sequenz tragen und entfalten diese. Der Chaperon-Protein-Komplex kann anschließend durch die Interaktion mit dem Membranprotein LAMP-2 ins lysosomale Lumen translozieren (Kaushik und Cuervo, 2012).

Makroautophagie ist durch Autophagosomen gekennzeichnet, die Cytoplasma oder Organellen mit einer Doppelmembran umschließen. Insbesondere in Hefe konnte eine Vielzahl der am Makroautophagie-Prozess beteiligten Genen (autophagy-related genes (Atg)) identifiziert werden. Bei Nährstoffmangel der Zelle wird die Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibiert, was zur Derepression der ULK1 (unc-51like kinase 1)-Kinaseaktivität führt. Die aktive ULK1-Kinase phosphoryliert Beclin-1. Beclin-1 ist Teil eines Proteinkomplexes aus VPS34 (vacuolar sorting protein 34), einer Phosphatidylinositol-3-Kinase, und Atg14L. Durch die Phosphorylierung von Beclin-1 wird die VPS34-Kinase aktiviert, was zur Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P) führt und die Bildung des Phagophors initiiert (Kang et al., 2011; Russell et al., 2013). Es wird angenommen, dass aufgrund der zellulären Lokalisation von PtdIns(3)P am endoplasmatischen Retikulum (ER), Phagophoren aus ER-Membranen entstehen (Tooze und Yoshimori, 2010). Für die autophagosomale Elongation sind LC3-II (microtubule-associated protein light chain 3) und der Atg5-Atg12-Atg16L-Komplex essentiell. Für die Überführung der cytosolischen Form von LC3 (LC3-1) zur Autophagosomenmembran-gebundenen LC3-II-Form ist die Konjugation von Phosphatidylethanolamin notwendig, die für den Transport und die Reifung der Autophagosomen wichtig ist (Matsushita et al., 2007).

Mit Hilfe von SNARE-Proteinen (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor) fusionieren Autophagosomen und Lysosomen zu

Autophagolysosomen und die lysosomalen Enzyme beginnen mit dem Abbau des Autophagosoms und dessen Inhalt (Itakura *et al.*, 2012). Durch Makroautophagie kann einerseits unspezifisch cytosolisches Material umschlossen und abgebaut werden. Andererseits bindet das p62-Protein über eine C-terminale Domäne spezifisch an ubiquitinylierte Proteine, transportiert diese zu reifenden Autophagosomen und bindet an LC3-II an naszierenden Autophagosomen (Abb. 1-1) (Bjorkoy *et al.*, 2009).



Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Autophagolysosom-Bildung

Nährstoffmangel führt zur Inaktivierung von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und dadurch zur Derepression der ULK1 (*unc-51-like kinase1*)-Kinase. ULK1-Kinase phosphoryliert Beclin-1 im Atg14L-VPS34 (*vacuolar sorting protein* 34)-Beclin-1-Komplex und aktiviert die VPS34-Kinase, was zur Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P) an naszierenden Autophagosomen führt und die Bildung des Phagophores initiiert. Durch Konjugation von Phosphatidylethanolamin an die cytosolische LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*)-Form (LC3-I), wird diese in eine membrangebundene Form überführt (LC3-II) und trägt, neben dem Atg5-Atg12-Atg16L-Komplex, zur Reifung des Autophagosoms bei. Parallel bindet p62 an ubiquitinylierte Proteine und LC3-II auf der luminalen Seite des naszierenden Autophagosoms. Die Fusion mit dem Lysosom erfolgt nach vollständiger Bildung des Autophagosoms. Abbildung verändert nach Russell *et al.*, 2013 und Kang *et al.*, 2011.

1.3 Synthese und Transport löslicher lysosomaler Proteine

1.3.1 Biosynthese löslicher lysosomaler Proteine

Lysosomale Hydrolasen werden an Ribosomen des ER synthetisiert. Durch eine 20-25 lange Aminosäuresequenz am N-Terminus des naszierenden Proteins wird die Translokation ins Lumen des ER signalisiert und initiiert. Nach Entfernung des Signalpeptids werden vorgefertigte Oligosaccharide (Glc₃Man₉GlcNAc₂) auf selektive Asparaginreste innerhalb der Konsensussequenz NXT/S (X = alle Aminosäuren außer Prolin) der Hydrolasen überführt. Der terminale Glucoserest wird danach durch die Glucosidase I und die beiden inneren Glucosereste durch die Glucosidase II entfernt (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die neu synthetisierten Polypeptide binden über ihre monoglucosylierten Glycane an das Chaperon Calnexin bis sie vollständig gefaltet und nach Verpackung in COPII (*coat protein complex II*)-ummantelte Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert werden (Trombetta und Helenius, 1998). Durch Generierung des Mannose 6-Phosphat (M6P)-Erkennungssignals oder Übertragung komplexer Zucker (z.B. Fucose, Galactose und GlcNAc) erfolgen im Golgi-Apparat weitere Modifikationen der Mannose-reichen Oligosaccharide an Hydrolasen.

1.3.2 Generierung des Erkennungssignals löslicher lysosomaler Proteine

Die Bildung des M6P-Restes im cis-Golgi-Apparat ist essentiell für den effektiven, intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom. Diese posttranslationale Modifikation erfolgt in einer zweistufigen Reaktion, katalysiert durch die N -Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) und die N -Acetylglucosamin-1-phosphodiester- α -N-Acetylglucosaminidase (GlcNAc-1-Phosphodiesterase, UCE, uncovering enzyme) (Lazzarino und Gabel, 1988). Im ersten Schritt transferiert die GlcNAc-1-Phosphotransferase ein GlcNAc-1-Phosphatrest von UDP-GlcNAc an die C6-Hydroxylgruppe spezifischer Mannosereste lysosomaler Enzyme. Die erste Phosphorylierung erfolgt im α -1,6-Zweig des N-Glycans. Eine weitere Phosphorylierung kann im α -1,3-Zweig erfolgen (Pohl *et al.*, 2009). Die GlcNAc-1-Phosphotransferase ist ein heterohexamerer Komplex und besteht aus zwei α -, zwei β - und zwei γ -Untereinheiten (Bao *et al.*, 1996). Die α - und β -Untereinheiten enthalten das katalytische Zentrum. Zusätzlich soll eine Subdomäne der α-Untereinheit, die DMAP (DNA methyltransferase-associated protein)-Domäne, die Bindungsstelle für lysosomale Hydrolasen enthalten (Qian et al., 2013). Dabei ist die Spezifität der Erkennung abhängig von der Oberflächenkonformation lysosomaler Enzyme, die durch die Anordnung von Lysinresten und ihrem Abstand zu Mannose-reichen Oligosacchariden bestimmt wird (Steet et al., 2005). Die Funktion der y-Untereinheiten

ist noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass sie die Aktivität der α/β -Untereinheiten moduliert und möglicherweise zum Transfer eines zweiten GlcNAc-1-Phosphatrestes auf die Mannose-reichen Oligosaccharide lysosomaler Enzyme beiträgt (Qian et al., 2010). Die y-Untereinheiten werden durch das GNPTG-Gen (Raas-Rothschild *et al.*, 2000) bzw. die α - und β -Untereinheiten werden durch das GNPTAB-Gen kodiert (Tiede et al., 2005) und als katalytisch inaktives Vorstufen-Typ III-Membranprotein im ER synthetisiert. Sortierungssignale im C- und N-Terminus des α/β -Vorstufenproteins vermitteln den COPII-abhängigen, vesikulären Transport zum Golgi-Apparat, wo es durch die site-1 protease (S1P) zwischen den Aminosäuren K928 und D929 gespalten wird und eine aktive Form der GlcNAc-1-Phosphotransferase entsteht (Marschner et al., 2011; Franke et al., 2013). Im zweiten Schritt der Bildung des M6P-Erkennungssignals, wird der maskierte GlcNAc-Rest durch die GlcNAc-1phosphodiesterase (UCE) entfernt und der M6P-Rest freigelegt. Die GlcNAc-1-Phosphodiesterase ist ein 68 kDa Typ I-Membranprotein und zirkuliert zwischen dem trans-Golgi-Apparat und der Plasmamembran. Ob sie eine Rolle an der Plasmamembran spielt, ist nicht bekannt (Rohrer und Kornfeld, 2001).

1.3.3 M6P-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Proteine

Im trans-Golgi-Apparat binden neu synthetisierte lysosomale Enzyme an Mannose-6-Phosphatrezeptoren (MPRs). In eukaryotischen Zellen existieren zwei MPRs, der 46 kDa Kation-abhängige (CD-MPR, MPR46) und der 300 kDa Kation-unabhängige Rezeptor (CI-MPR, MPR300) (Ghosh et al., 2003). Beide MPRs sind Typ I-Membranproteine, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation, Quartärstruktur, Halbwertszeit und in der Fähigkeit Liganden zu binden unterscheiden. In der cytosolischen Domäne beider MPRs befinden sich, neben der GGA (Golgi-localized, ear-containing, ADP-ribosylation factor binding protein)gamma adaptin Bindungssequenz, Sequenzmotive für die Bindung der Adaptorprotein-Komplexe 1 und 2 (AP-1, AP-2). Mit Hilfe dieser Proteine werden die MPRs in Clathrin-umschlossene Vesikel verpackt und zu frühen Endosomen transportiert (Braulke und Bonifacino, 2009). Durch Einwirkung von den ESCRT (Endosomsal sorting Complex Required for Transport)-Proteinkomplexen 0, I-III reifen die frühen Endosomen zu späten bzw. multivesikulären Endosomen (multivesicular bodies, MVB), was mit der steigenden Aktivität der V-Typ H⁺-ATPase und einem Abfall des pH auf maximal 4,9 in späten Endosomen einhergeht. MVBs entstehen durch die Invagination endosomaler Membranen und der Abschnürung von Vesikeln ins Lumen. Während dieses Prozesses werden endosomale Transmembranproteine, die für die Degradation bestimmt sind, ins Lumen transportiert (Babst, 2005; Huotari und Helenius, 2011). Der niedrige pH in MVBs führt zur Dissoziation der lysosomalen Enzyme von MPRs, die anschließend mit Hilfe von Retromer-Komplexen zum *trans*-Golgi-Apparat zurücktransportiert werden. Die lysosomalen Enzyme erreichen ihren endgültigen Bestimmungsort durch Fusion der MVBs mit Lysosomen unter Beteiligung von ESCRT-Proteinkomplexen (Abb. 1-2) (Metcalf und Isaacs, 2010).



Abb. 1-2: Schematische Darstellung des M6P-abhängigen Transport löslicher lysosomaler Proteine

Nach Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die Modifikation lysosomaler Enzyme mit M6P-Resten durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase und Phosphodiesterase. Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) binden Mannose-6-Phosphatrezeptoren MPRs (MPR300 und MPR46) an die lysosomalen Enzyme. Die Enzym-Rezeptor-Komplexe werden über vesikulären Transport zum frühen Endosom befördert. In späten Endosomen dissoziieren die Rezeptoren von ihren Liganden. Die Rezeptoren werden zum TGN zurücktransportiert und die lysosomalen Enzyme erreichen die Lysosomen. MPR300 an der Plasmamembran können sezernierte lysosomale Enzyme binden und zu Endosomen transportieren.

Einige lysososmale Enzyme (5 - 10 % der Gesamtheit neu synthetisierter Hydrolasen) entgehen der Bindung an MPR im *trans*-Golgi-Apparat und werden sezerniert. Diese können jedoch durch MPR300, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, AP-2-abhängig internalisiert werden (Abb. 1-2) (Braulke und Bonifacino, 2009).

Ein Großteil lysosomaler Hydrolasen und Aktivatorproteine wird als inaktive Vorläuferproteine (Präproproteine) synthetisiert. Die Vorläuferproteine werden autokatalytisch oder durch andere saure, lysosomale Proteasen im endosomalen Lumen proteolytisch prozessiert. Dadurch entstehen aktive, reife Formen des Proteins und durch den sauren pH wird das reife Protein selbst proteolytisch aktiv (Sun und Wolfe, 2001a; Guha und Padh, 2008).

1.3.4 M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine

In Fibroblasten von Patienten mit Mucolipidose Typ II, einem erblichen GlcNAc-1-Phosphotransferase-Defekt, wird ein Großteil der lysosomalen Enzyme sezerniert. Allerdings konnten normale Aktivitäten einzelner Enzyme in verschiedenen Organen dieser Patienten gemessen werden (Waheed *et al.*, 1982). Die Befunde lassen vermuten, dass alternative, M6P-unabhängige, zelltyp-spezifische Transportwege für lysosomale Enzyme existieren. Ähnliche Schlußfolgerungen wurden aus den Analysen von MPR46/MPR300-defizienten Mäusen gezogen (Ludwig *et al.*, 1994; Dittmer *et al.*, 1999).

Auch die Aktivität der lysosomalen Hydrolase β -Glucocerebrosidase war in Fibroblasten von Patienten mit Mucolipidose Typ II unverändert (Aerts *et al.*, 1988). Später konnten Reczek *et al.* zeigen, dass die β -Glucocerebrosidase an das lysosomale Membranprotein LIMP-2 bindet, das den Transport zu Lysosomen vermittelt. Die Bindung der β -Glucocerebrosidase an eine *Coiled-Coil* Struktur von LIMP-2 erfolgt im ER (Reczek *et al.*, 2007; Blanz *et al.*, 2010; Zachos *et al.*, 2012). Lysosomale Membranproteine werden M6P-unabhängig, in Abhängigkeit von cytosolischen Tyrosin- oder Dileucin-basierten Sortierungssignalen im *trans*-Golgi-Apparat in Vesikel verpackt und direkt zum Lysosom transportiert (Saftig und Klumperman, 2009).

Als ein weiterer M6P-unabhängiger Rezeptor für einzelne lysosomale Enzyme ist Sortilin beschrieben, der hohe Homologien zu bekannten Sortierungsrezeptoren aufweist (Petersen *et al.*, 1997). Sortilin ist ein Typ-1 Transmembranprotein mit einer Vps10p (*vacuolar-protein-sorting 10 protein*)-Domäne im luminalen Teil und gehört zu der Vps10p-Superfamilie. In Hefe transportiert Vps10p Carboxypeptidase Y vom *trans*-Golgi-Apparat zur Vakuole, dem Äquivalent von Lysosomen in eukaryotischen Zellen (Cooper und Stevens, 1996). Im cytosolischen C-Terminus von Sortilin befinden sich, ähnlich wie in der cytosolischen Domäne des MPR300, eine Kasein-Kinase-2-Phosphorylierungsstelle und ein Dileucin-Sortierungssignal, die für die Bindung des cytosolischen Adaptorproteins GGA2 wichtig sind und den Transport vom *trans*-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen vermitteln (Petersen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, dass Sortilin die saure Sphingomyelinase, Cathepsin D, Cathepsin H und die Aktivatorprotein-Vorstufe Prosaposin M6P-unabhängig bindet, so dass Sortilin als alternativer Transportrezeptor für einzelne, nicht phosphorylierte Enzyme in Fibroblasten von Patienten mit Mucolipidose Typ II angesehen wird (Lefrancois *et al.*, 2003; Ni und Morales, 2006; Canuel *et al.*, 2008).

Neben intrazellulären Transportmechanismen können lysosomale Enzyme auch nach Sekretion in den extrazellulären Raum über Rezeptoren an der Oberfläche reinternalisiert und zu den Lysosomen transportiert werden (secretion-recapture Mechanismus (Hickman und Neufeld, 1972)). So wurde berichtet, dass Annexin VI bovine β-Glucuronidase an der Plasmamembran binden und internalisieren kann (Ramirez-Mata et al., 2011). Andere lysosomale Proteine, wie Cathepsin B, Cathepsin D und die Aktivatorprotein-Vorstufe Prosaposin, sollen durch Rezeptoren der LDL (low density lipoprotein)-Rezeptorfamilie endozytiert werden, zu der neben dem LDLR (LDL-Rezeptor) auch LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1) und LRP2 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, Megalin) gehören (Hiesberger et al., 1998; Nielsen et al., 2007; Derocq et al., 2012). Die Mitglieder dieser Familie sind an der Plasmamembran lokalisert und dienen der Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase durch Bindung und Endozytose zirkulierender Lipoprotein-Komplexe (Go und Mani, 2012). Eine wichtige Eigenschaft, die alle Rezeptoren dieser Familie gemeinsam haben, ist die Bindung von RAP (receptor-associated protein) im ER, das unter physiologischen Bedingungen als molekulares Chaperon fungiert und die frühzeitige Interaktion von Liganden mit den Rezeptoren verhindert und dadurch den sicheren Transport durch den sekretorischen Weg ermöglicht (Bu, 2001). Nielsen et al. konnten zeigen, dass LRP2 in proximalen Tubuluszellen der Niere die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B endozytieren kann (Nielsen *et al.*, 2007). Für die lysosomale Aspartylprotease Cathepsin D wird berichtet, dass sie in Fibroblasten an die extrazelluläre Domäne der β -Kette von LRP1 (AS 349-394) bindet und anschließend internalisiert wird (Beaujouin *et al.*, 2010; Derocq *et al.*, 2012). Die LRP-Liganden-Komplexe dissoziieren in frühen endosomalen Strukturen und die Rezeptoren rezirkulieren an die Plasmamembran.

1.4 Funktion löslicher lysosomaler Proteine

Die lysosomalen Hydrolasen degradieren in Lysosomen Makromoleküle wie Lipide, Zucker und Proteine. Lysosomale Proteine besitzen weitere Funktionen, wie die Aktivierung und Stabilisierung lysosomaler Hydrolasen oder den Transport von Metaboliten aus den Lysosomen. Defekte in lysosomalen Proteinen können zu lysosomalen Speichererkrankungen führen (Abschnitt 1.5).

1.4.1 Degradation von Glycanen, Proteinen und Lipiden

Proteoglycane sind in sekretorischen Granula, im Interstitium, an der Zelloberfläche und im extrazellulären Raum lokalisiert und bestehen aus einem Kernprotein, das eine oder bis über hundert Glycosaminoglycan-Ketten (GAGs) kovalent gebundenen hat. GAGs sind lineare Polysaccharide, die aus repetetiven Disacchariden bestehen und an unterschiedlichen Positionen Sulfatgruppen tragen. Die Disaccharide bestehen aus einem Aminozucker (N-Acetylglucosamin, Glucosamin, N-Acetylgalactosamin) und einer Uronsäure (Glucuronsäure, Iduronsäure) oder Galactose (Afratis *et al.*, 2012). Es gibt 5 unterschiedliche Gruppen von GAGs: Heparansulfate, Chondroitinsulfate, Keratansulfate, Dermatansulfate und Hyalurone. Der Abbau in Lysosomen erfolgt in aufeinanderfolgenden, enzymatischen Reaktionen vom nicht-reduzierenden Ende der GAG-Kette aus, wobei GAG-abhängig 3 bis 8 lysosomale Hydrolasen am Abbau einer Glycankette beteiligt sind (Freeze, 2009) (Abb. 1-3).

Einleitung



Abb. 1-3: Stufenweiser Abbau von Glycosaminoglycanen

Schematische Darstellung des Abbaus von Tetrasacchariden aus Hyaluron (A), Dermatan- und Chondroitinsulfat (B), Heparansulfat (C) und Keratansulfat (D). GAGs-Monosaccharide sind symbolisch dargestellt. Die Nummern an den GAG-Ketten stellen die Reihenfolge des sequentiellen Abbaus dar. Die zugehörigen Enzyme sind jeweils aufgelistet. 2-Sulfat (2S), 4-Sulfat (4S), 6-Sulfat (6S), N-Sulfat (NS). Abbildung verändert nach Freeze, 2009.

N-Glycane sind kovalent an Asparaginreste des Kernproteins (Glycoproteine) gebunden. Der Abbau von komplexen N-Glycanen erfolgt ähnlich wie für GAGs in Lysosomen in einem stufenweisen Prozess an dem neun lysosomale Hydrolasen beteiligt sind (Aronson und Kuranda, 1989) (Abb. 1-4).



Abb. 1-4: Stufenweiser Abbau von komplexen N-Glycanen

Schematische Darstellung des Abbaus von komplexen N-Glycanen. Monosaccharide wurden graphisch dargestellt. Die Nummern am N-Glycan stellen die Reihenfolge des sequentiellen Abbaus da. Die zugehörigen Enzyme sind aufgelistet. Abbildung verändert nach Freeze, 2009.

Glycolipide enthalten ein oder mehrere Oligosaccharide, welche glycosidisch an eine Lipidstruktur gebunden sind. Unterteilt werden Glycolipide in G_{M1} -Ganglioside, Sulfatide und Globotriaosylceramide. Der Abbau von beispielsweise G_{M1} -Gangliosiden erfolgt durch lysosomale Hydrolasen in aufeinanderfolgenden enzymatischen Reaktionen. Neben den lysosomalen Hydrolasen sind aber auch das G_{M2} -

Aktivatorprotein und Saponin C als Cofaktoren für den Abbau der Ganglioside essentiell (Xu *et al.*, 2010) (Abb. 1-5)



Abb. 1-5: Stufenweiser Abbau von G_{M1}-Gangliosiden

Die meisten lysosomalen Proteasen gehören zu den Familien der Aspartyl-, Cysteinoder Serinproteasen. Die Zuordnung dieser Proteasen erfolgt durch die Struktur und Präsenz von Aspartat-, Cystein- oder Serinresten im aktiven Zentrum. Einige lysosomale Proteasen werden ubiquitiär exprimiert, wie beispielsweise die Aspartylprotease Cathepsin D oder die Cysteinproteasen Cathepsin B, H und L. Andere Proteasen werden zelltyp- oder gewebe-spezifisch synthetisiert, wie z. B. Cathepsin S, das in Immunzellen exprimiert wird und bei der Prozessierung von Peptiden zur Antigenpräsentation beteiligt ist. Neben der Degradation von Proteinen in Lysosomen gehören die Prozessierung von Proproteinen, Antigenen und Prohormomen und die Initiierung apoptotischer Prozesse zu den wichtigsten Funktionen lysosomaler Proteasen (Müller *et al.*, 2012).

Sphingomyeline sind Lipide die hauptsächlich in Membranen vorkommen. Der Abbau erfolgt in den Lysosomen. Durch die saure Sphingomyelinase wird zunächst das Phosphodiester abgespalten, so dass Ceramid und Phosphocholin entsteht. Anschließend erfolgt die Deamidiation des Ceramids zu Sphingosin und freien Fettsäuren durch die saure Ceramidase (Kolter und Sandhoff, 2010).

1.4.2 Lysosomaler Cholesterin-Transport

LDLR an der Plasmamembran endozytieren cholesterin-haltiges LDL und transportieren es über endosomale Kompartimente zu Lysosomen, wo die

Schematische Darstellung des Abbaus von G_{M1} -Gangliosiden. Monosaccharide wurden graphisch dargestellt. Die Nummern an der Zuckerstruktur stellen die Reihenfolge des sequentiellen Abbaus dar. Die zugehörigen Enzyme sind aufgelistet.

Cholesterinester durch die saure Lipase gespalten werden und freies Cholesterin entsteht (Brown und Goldstein, 1986). Das lösliche lysosomale Protein Niemann-Pick C2 (NPC2) bindet Cholesterin und überführt es auf das lysosomale Membranprotein Niemann-Pick C1 (NPC1). NPC1 exportiert das freie Cholesterin über noch nicht bekannte Mechanismen aus den Lysosomen ins Cytoplasma. Anschließend wird das freie Cholesterin zum ER oder zur Plamamembran transportiert (Miller und Bose, 2011).

1.5 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomale Speichererkrankungen (*Lysosomal storage diseases*, LSDs) umfassen eine Gruppe von ca. 60 Krankheiten, die größtenteils autosomal-rezessiv vererbt werden (Vellodi, 2005). Meist resultieren die Erkrankungen aus Defekten einer lysosomalen Hydrolase, von Aktivatorproteinen oder werden durch Mutationen in lysosomalen Membranproteinen verursacht, die am Export von Metaboliten beteiligt sind. Diese Proteindefizienzen führen zur Akkumulation von spezifischen, nicht abbaubaren bzw. nicht transportierbaren Substraten dieser lysosomalen Proteine in Lysosomen. Die klinischen Erscheinungsbilder der lysosomalen Erkrankungen sind sehr heterogen, jedoch ist das zentrale Nervensystem häufig betroffen. Zusätzlich kann das Erkrankungsalter, der Schweregrad der Symptome und die Manifestation im zentralen Nervensystem bei den einzelnen Erkrankungen stark variieren (Platt *et al.*, 2012).

Die Klassifizierung der LSDs erfolgt insbesondere durch die Art des akkumulierenden Speichermaterials. So führt die Speicherung von GAGs (Mucopolysaccharide), aufgrund einzelner Enzymdefekte, die am Abbau dieser Glycane beteiligt sind, zur Untergruppe der Mucopolysaccharidosen (MPS I - IX). In einigen Fällen, in denen ein Enzym mehrere Substrate besitzt, kann der Enzymdefekt zur Speicherung unterschiedlicher Makromoleküle führen. Beispielsweise werden G_{M1}-Gangliosidose und MPS IV B (Morquio-B) durch einen Defekt in der β-Galactosidase hervorgerufen was zur Speicherung von G_{M1} Gangliosiden und Keratansulfat führt (Futerman und van Meer, 2004).

Bisher sind nur wenige LSDs behandelbar, bei denen Defizienzen einzelner löslicher lysosomaler Enzyme vorliegen. Bei der Enzymersatztherapie (ERT) wird das defekte

Protein substituiert. Das rekombinant hergestellte Enzym wird den Patienten injeziert und über M6P-Rezeptoren von Zellen peripherer Organe aufgenommen. Sechs LSDs sind bisher durch ERT behandelbar (Ohashi, 2012). Verschiedene klinische Studien (Phase I/Phase II) für intravenöse als auch intrathekale ERT weiterer lysosomaler Speichererkrankungen sind in der Erprobung. Die ERT ist insbesondere für lysosomale Speichererkrankungen geeignet, in denen das zentrale Nervensystem nicht betroffen ist, da intravenös injizierte, rekombinante Enzyme die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und somit nicht ins Hirn gelangen (Brady und Schiffmann, 2004). Zudem ist der Erfolg der ERT auf eine effiziente Endozytoserate der rekombinanten Enzyme in die betroffenen Organe angewiesen. Die Endozytose erfolgt in vielen Zelltypen über den MPR300. Eine geringe Expressionsrate von MPR300 und ein geringer Phosphorylierungsgrad des rekombinanten Proteins limitieren somit die Aufnahme des Enzyms in die Gewebe (Grubb et al., 2010). Durch verschiedene experimentelle Ansätze wird versucht, die Aufnahme des rekombinanten Proteins in die Gewebe sowie den Transport über die Blut-Hirn-Schranke zu verbessern. Dazu werden die Proteine unter anderem mit Proteindomänen fusioniert, die MPR300 oder alternative Bindungsdomäne des nicht-glycosylierten Wachstumsfaktors IGF-II ermöglicht die M6P-unabhängige Bindung des rekombinanten Enzyms an MPR300, der auch eine Bindungsstelle für IGF-II besitzt, und erhöht somit die Endozytose in Zellen des peripheren Muskelgewebes (Maga et al., 2013). Durch Verwendung eines ApoB-Sulfamidase-Fusionsproteins konnte sogar eine erhöhte Menge der rekombinanten Sulfamidase aus der Blutbahn in neuronales Gewebe übertragen werden. ApoB bindet an den LDL-Rezeptor, der in diesem Fall die Transzytose des Proteins über die Blut-Hirn Schranke zu vermitteln scheint (Sorrentino et al., 2013).

1.5.1 Mucolipidose Typ II und III

Eine besonders schwere Form der LSDs stellt die Mucolipidose Typ II (MLII alpha/beta, *I-cell disease*) dar (Leroy und Spranger, 1970), welche durch *nonsense* oder *frameshift*-Mutationen im *GNPTAB*-Gen hervorgerufen wird und zum vollständigen Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase führt (Tiede *et al.*, 2005) Mutationen im *GNPTG*-Gen (MLIII gamma) bzw. *missense*-Mutationen im *GNPTAB*-

Gen (MLIII alpha/beta) führen zur Mucolipidose Typ III, einer weniger progressiven Form der Erkrankung (Cathey et al., 2008). Aufgrund von Restaktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase können lysosomale Enzyme in MLIII-Patienten teilweise phosphoryliert und zu den Lysosomen transportiert werden. Bei beiden Erkrankungen synthetisierte lysosomale Enzyme aufgrund fehlender M6Pwerden neu Erkennungssignale sezerniert, was die intrazelluläre Defizienz dieser Enzyme in Lysosomen und die Akkumulation von Speichermaterial zur Folge hat. Die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme kann in Seren oder in kultivierten Fibroblasten von Patienten gemessen werden. Zusätzlich tragen geringe Enzymaktivitäten und lichtmikroskopisch sichtbare Einschlüsse (inclusions) in kultivierten Fibroblasten zur Diagnose der Patienten mit MLII bei. Die molekularbiologische Diagnose erfolgt durch Sequenzierung des GNPTAB-Gens. Das klinische Erscheinungsbild von MLII ist durch schwere psychomotorische und mentale Retardierung, Kleinwuchs, Skelettdeformitäten sowie kardiologische und respiratorische Komplikationen charakterisiert. Die Patienten versterben im Alter zwischen zwei und zehn Jahren (Braulke et al., 2013). Die Mechanismen, die für die gewebe-spezifischen pathologischen Veränderungen verantwortlich sind, und die Identität des akkumulierenden Speichermaterials bei MLII, sind unbekannt.

1.5.2 Tiermodelle der Mucolipidose Typ II

In einer Hauskatzenkolonie konnten Bosshard *et al.* eine spontane Mutation (c.2655C > T) im *Gnptab*-Gen identifizieren, was zur Ausprägung charakteristischer Merkmale von MLII, wie skelettale Fehlbildung, fazialer Dysmorphismus und psychomotorische Retardierung führte. Im Serum dieser Katzen wurden erhöhte lysosomale Enzymaktvitäten gemessen, die in kultivierten Fibroblasten reduziert waren (Bosshard *et al.*, 1996; Mazrier *et al.*, 2003). Das erste Mausmodell für Mucolipidose Typ II wurde durch die *gene trap*-Methode generiert. Die *Gnptab-knockout*-Mäuse (*Gnptab^{-/-}*) wiesen erhöhte Enzymaktivitäten im Serum auf, sind kleiner als Wildtyptiere und erblinden im Alter von 5 Monaten. Ihr Wachstum ist verlangsamt und ihre Lebenserwartung liegt bei maximal 15 Monaten. Zusätzlich zeigen kultivierte Fibroblasten die charakteristischen cytoplasmatischen Einschlüsse (Gelfman *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2009). Als weiteres Tiermodell für Mucolipidose Typ II wurde ein Morpholino-basiertes *Gnptab*-

Einleitung

knockdown Zebrafisch-Modell beschrieben. *Knockdown*-Embryonen zeigen skelettale Abnormalitäten, kraniofaziale Defekte und beeinträchtigte Beweglichkeit. Die veränderte Differenzierung der Chondrozyten konnte, aufgrund von Untersuchungen in frühen embryonalen Entwicklungsphasen dieses Tiermodells, auf abnormale Expressionen chondrogener Faktoren zurückgeführt werden (Flanagan-Steet *et al.*, 2009; Petrey *et al.*, 2012).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Braulke am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wurde durch Einführung einer Patientenmutation (*GNTPAB* c.3145insC, (Tiede *et al.*, 2005)) an orthologer Stelle im murinen *Gnptab*-Gen ein *knock-in* Mausmodell (*Gnptab*^{c.3082insC}, *Gnptab*^{ki}) für Mucolipidose Typ II generiert (Kollmann *et al.*, 2012). Distal der Spaltstelle des α/β -Vorstufenproteins führt die Insertion eines Cytosins an Position *Gnptab* c.3082 zu einem *frameshift* und dadurch zu einem vorzeitigen Translationsabbruch und Verlust der zweiten Transmembrandomäne des α/β -Vorstufenproteins (p.G1028R*fs*X16). Das α/β -Vorstufenprotein kann das ER nicht verlassen und wird deshalb nicht im Golgi-Apparat proteolytisch aktiviert. *Gnptab*^{ki}-Mäuse sind kleiner als Wildtyptiere und weisen eine geringere Gewichtszunahme auf. Die Sterblichkeit ist, mit einer maximalen Lebenserwartung von 14 Monaten, erhöht. Sie zeigen nahezu alle typischen klinischen und biochemischen Merkmale der humanen MLII-Erkrankung, wie Skelettdeformitäten, psychomotorische Defekte, schwere Neurodegeneration, Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und Akkumulation von verschiedenen Speichersubstanzen (Kollmann *et al.*, 2012).

2. Zielsetzung

Die N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) ist ein hexamerer, Golgi-residenter Enzymkomplex ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), der den ersten Schritt bei der Bildung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-Resten an Zuckerketten neu synthetisierter löslicher lysosomaler Enzyme katalysiert. M6P dient als Erkennungssignal für spezifische Rezeptoren und ist für den effektiven Transport der Enzyme zu den Lysosomen essentiell. Mutationen im *GNPTAB*-Gen, das die α - und β -Untereinheiten des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes kodiert, führen zu einer schweren lysosomalen Speichererkrankung, Mucolipidose Typ II (MLII), die biochemisch durch die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme und die Akkumulation von Speichermaterial in Lysosomen charakterisiert ist. Die Fehlsortierung betrifft aber nicht die Gesamtheit der 50 lysosomalen Hydrolasen und ist gewebe- und zelltyp-abhängig. Diese Befunde unterstützen die Hypothese zur Existenz von M6P-unabhängigen, alternativen Transportwegen lysosomaler Enzyme zu Lysosomen.

An einem Gnptab knock-in (Gnptab^{ki})-Mausmodell für MLII sollte in dieser Arbeit die Expression und die Abhängigkeit des Transportes einzelner lysosomaler Hydrolasen M6P-Rest untersucht werden. Vergleichende biochemische. vom massenspektrometrische und mikroskopische Analysen des Speichermaterials in neuronalem Gewebe der *Gnptab^{ki}*-Mäuse sollten zusätzlich zur Identifizierung von solchen Enzymen beitragen, die ausschließlich M6P-abhängig zu den Lysosomen transportiert werden und deshalb limitierend für den Abbau spezifischer Substrate in MLII-Zellen sind. Histologische Untersuchungen der *Gnptab^{ki}*-Mäuse sollten schließlich Aufschluss über den Verlauf neurodegenerativer Prozesse bei MLII geben, um Einblick in die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Neurodegeneration zu erhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten M6P-unabhängige Transportmechanismen für saure Hydrolasen zu Lysosomen näher untersucht werden. Da der neurotrophe, *multiligand type-1* Transmembranrezeptor Sortilin als alternativer Rezeptor für den intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme zu Lysosomen postuliert wurde, sollte durch Verpaarung von M6P-defizienten *Gnptab^{ki}*- mit Sortilin-defizienten (Sortilin^{ko})-Mäusen Zellen generiert werden, an denen die Bedeutung von Sortilin als alternativer M6P-unabhängiger Transportrezeptor analysiert werden sollte.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol 4°,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Acrylamid Agarose Ammoniumpersulfat Ampicillin Bromphenolblau BSA (bovine serum albumin) Calciumacetat Calciumchlorid Chloroform Coomassie blue Diethylpyrocarbonat (DEPC) Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat Diphenyloxazol (PPO) Dithiothreitol (DTT) DNA-Standard 1 kb-Ladder dNTP-Set Essigsäure Ethanol Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Formaldehyd Gelatine Glycerin Hefeextrakt

Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Bio-Rad, München Serva, Heidelberg Bio-Rad, München Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Roth, Karlruhe Invitrogen, Karlsruhe Amersham, Freiburg Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

Imidazol Merck, Darmstadt Isopropanol Roth, Karlsruhe Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) Roth, Karlsruhe Kaliumchlorid J.T. Baker, Griesheim Kaliumhydrogenphosphat Merck, Darmstadt Kanamycin Roth, Karlsruhe Ketamin Sigma-Aldrich, München Luminol Roth, Karlsruhe Magnesiumchlorid Sigma-Aldrich, München Magnesiumsulfat Merck, Darmstadt Methanol Merck, Darmstadt Milchpulver Roth, Karlsruhe Hoechst, Frankfurt a. M. Mowiol N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Roth, Karlsruhe Natriumacetat Merck, Darmstadt Natriumazid Sigma-Aldrich, München Natrimchlorid Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Natriumcitrat Natriumdeoxycholat Merck, Darmstadt Natriumdihydrogenphosphat Merck, Darmstadt Nartiumdodecylsulfat (SDS) Sigma-Aldrich, München Natriumhydrogencarbonat Merck, Darmstadt Natriumhydroxid Roth, Karlsruhe Nonidet 40 Roche, Mannheim Paraformaldehyd (PFA) Merck, Darmstadt p-Cumarinsäure Sigma-Aldrich, München Phenolrot Sigma-Aldrich, München Protaminsulfat Sigma-Aldrich, München Protein G-Sepharose GE Healthcare, München Salzsäure Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Saponin Streptavidin – Agarose Pierce, Rockford, USA

Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
<i>Tissue-Solubilizer</i> (Solvable TM)	Perkin-Elmer, USA
<i>TriReagent</i> [®]	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.1.2 Arbeitsgeräte

Gerät	Тур	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wettenberg
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
β -Szintillationscounter	β-Counter LS3801	Beckman Counter, Krefeld
Imager	Chemi Doc XRS	Bio-Rad, München
Douncer	5ml Volumen	Wheaton, USA
Drehrad	Rotator	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefer, Holliston, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Fluorometer	Infinite 200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
γ-Szintillationscounter	Wallac 1470	Perkin Elmer, Waltham, USA
Geldokumentationssystem	E-BOX VX2	peqlab, Erlangen
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
HPLC	Biologic DuoFlow	Bio-Rad, München
Inkubationsschrank	CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden
	Innova CO-170	New Brunswick Scientific

Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific
Kryo-Einfiergerät	Nalgene TM Cryo 1°C	Nalgene, Roskilde,
		Dänemark
Leuchtplatte	Gr6	Rex, Blaustein
Lyophilisator	Christ Alpha 1-2	Fisher Scientific, UK
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	Multiskan GO	Th. Scientific, St Leon-Rot
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Realtime-Cycler	Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
	Gelaire	Flow Laboratories, USA
Stickstoff-Einfriertank	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM	Biometra, Göttingen Stratagene, USA
Thermocycler	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Transferkammer	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg Hoefer, Holliston, USA
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg Hoefer, Holliston, USA Bandelin Electronic GmbH
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg Hoefer, Holliston, USA Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®]	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg Hoefer, Holliston, USA Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin BioSpec Products, USA
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg Hoefer, Holliston, USA Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin BioSpec Products, USA Scientific Industries
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, Giessen
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100 BP2100 S	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, GiessenSartorius, Göttingen
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen Wasserbad	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100 BP2100 S C 10	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, GiessenSartorius, GöttingenSchütt Labortechnik
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen Wasserbad Zentrifugen	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100 BP2100 S C 10 Centrifuge 5418	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, GiessenSartorius, GöttingenSchütt LabortechnikEppendorf, Hamburg
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen Wasserbad Zentrifugen	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100 BP2100 S C 10 Centrifuge 5418 Speed Vac [®]	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, GiessenSartorius, GöttingenSchütt LabortechnikEppendorf, HamburgSavant
Thermocycler Transferkammer Ultraschallgerät Ultra Turrax Vortex Waagen Wasserbad Zentrifugen	Tpersonal Real-Time, MX3000P TM Mastercycler, Gradient TE62 & TE22 Sonopuls Dremel [®] Genie 2 AC100 BP2100 S C 10 Centrifuge 5418 Speed Vac [®] Centrifuge 5415R	Biometra, GöttingenStratagene, USAEppendorf, HamburgHoefer, Holliston, USABandelin Electronic GmbH& Co KG, BerlinBioSpec Products, USAScientific IndustriesMettler Toledo, GiessenSartorius, GöttingenSchütt LabortechnikEppendorf, HamburgSavantEppendorf, Hamburg

Zentrifugen

Minifuge RF MC6 Centrifuge Sorvall Discovery M120 Heraeus, Hanau Sarstedt, Nümbrecht Kendro Laboratory Products

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Deckgläser	Glaswarenfabrik Heckt KG
Dialyseschlauch (Visking 8/32)	Roth, Karlsruhe
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Einwegmaterial für Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Fluoromount Medium	Polysciences, Inc., Eppelheim
Gewebekulturflaschen, -schalen	Sarstedt, Amersham
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen	Becton GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Parafilm	Bemis, Wisconsin, USA
Protran TM Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
	,
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Röntgenfilme	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen Spritzenvorsatzfilter, steril	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen VWR Int., USA
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen Spritzenvorsatzfilter, steril Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen VWR Int., USA VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen Spritzenvorsatzfilter, steril Sterilfilter <i>Stripes/</i> Deckel für Real-Time PCR	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen VWR Int., USA VWR, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen Spritzenvorsatzfilter, steril Sterilfilter <i>Stripes/</i> Deckel für Real-Time PCR Szintillationsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen VWR Int., USA VWR, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt Perkin-Elmer, Waltham, USA
Reaktionsgefäße Röntgenfilme Skalpelle Spritzen Spritzenvorsatzfilter, steril Sterilfilter <i>Stripes/</i> Deckel für Real-Time PCR Szintillationsröhrchen UV-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht Kodak, Stuttgart Braun, Melsungen Braun, Melsungen VWR Int., USA VWR, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt Perkin-Elmer, Waltham, USA Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Kits und Assays

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bradford Assay	Roti [®] Quant
Gene Jet TM RNA Purification Kit	Thermo Scientific, St Leon-Rot
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	peqlab, Erlangen
RNeasy [®] Mini Kit (250)	QIAGEN, Hilden
Taqman [®] Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.5 Säulen und Säulenmaterial

2,5 cm x 75 cm Säule	Bio-Rad, München
DEAE-Sepharose	Pharmacia Chemicals, Schweden
HisTrap TM HP	GE Healthcare, München
Polyprep-Säule	Bio-Rad, München
Sephadex PD-10	GE Healthcare, München
Sepharose Cl-6B	Sigma-Aldrich, München

3.1.6 Enzyme, Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Cathepsin B (aufgereinigt aus menschl. Leber)	Merck, Darmstadt
Cathepsin D (aufgereinigt aus Mausleber)	(Claussen et al., 1997)
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich, München
Dispase I	Sigma-Aldrich, München
DNase I	Sigma-Aldrich, München
β-Glucocerebrosidase	Genzyme, Neu-Isenburg
Heparinase I, II, III	(Lawrence et al., 2012)
Kollagenase I	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Lysozym	Merck, Darmstadt
PAGERuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion [®] -Polymerase	New England Biolabs GmbH,
	Frankfurt am Main
PMSF	Serva, Heidelberg

Proteinase K Protease-Inhibitor-Cocktail Arylsulfatase B (ASB)

3.1.7 Enzymsubstrate

p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-glucosamid	Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid	Sigma-Aldrich, München
Nitrocatecholsulfat	Sigma-Aldrich, München
4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid	Sigma-Aldrich, München
4-Methylumbelliferyl-α-L-fucopyranosid	Sigma-Aldrich, München
4-Methylumbelliferyl-α-L-iduronat	Glycosynth, Cheshire, England
4-Methylumbelliferyl- α -iduronat-2-sulfat	Moscerdam, Niederlande
4 -Methylumbelliferyl- β -D-galactosid- 6 -sulfat	Moscerdam, Niederlande
4-Methylumbelliferyl-α-N-sulfo-D-glucosamin	Moscerdam, Niederlande

3.1.8 Maus- und Zelllinien

Gnptab ^{c.3082insC} -Mauslinie (Gnptab ^{ki})	(Kollmann et al., 2012)
Sortilin 1-defiziente-Mauslinie (Sko)	(Jansen et al., 2007)
Gnptab ^{c.3082insC} / S ^{ko} -Mauslinie (Gnptab ^{ki} /S ^{ko})	Eigene Herstellung
LRP1-defiziente-	Prof. Jörg Heeren
Maus embryonale Fibroblasten (LRP1 ^{ko})	
LDLR-defiziente-	Prof. Jörg Heeren
Maus embryonale Fibroblasten (LDLR ^{ko})	
LRP1/LDLR-defiziente-	Prof. Jörg Heeren
Maus embryonale Fibroblasten (LRP1/LDLR ^{ko})	
LIMP-2-defiziente-	Prof. Paul Saftig
Maus embryonale Fibroblasten (LIMP-2 ^{ko})	

Roche, Mannheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München Firma Biomarin, USA

3.1.9 Häufig verwendete Puffer

10 x PBS:	1,37 M NaCl
	27 M KCl
	100 mM Na ₂ HPO ₄
	17,6 mM KH ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
10 x TBS:	100 mM Tris/HCl
	1,5 M NaCl (pH 7,4)

3.1.10 Medium und Zusätze

3.1.10.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt
	8 g/l NaCl
	рН 7,2

Die Zugabe von Antibiotikum erfolgte je nach Bedarf (100 μ g/ml Carbenicillin; 50 μ g/ml Kanamycin).

3.1.10.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
RPMI-1640	GIBCO/BRL, Eggenstein
DMEM/F12	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
DMEM ohne L-Glutamin und L-Methionin	MP Biomedicals, Ohio
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax TM	GIBCO/BRL, Eggenstein
D-Mannose 6-phosphat Natrium salz	Sigma-Aldrich, München
Optimem -1 + GlutMax TM	GIBCO/BRL, Eggenstein
Phosphate Buffered Saline (PBS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Receptor-Associated Protein (RAP)	Eigene Herstellung
0,02 % Trypsin/ EDTA	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.11 Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
Beclin-1	WB 1:200	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
BMP	IF 1:25	(Kobayashi et al., 1998)
Cathepsin D	WB 1:500	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Cathepsin D	IF 1:100	(Claussen et al., 1997)
	IP 2µl	
Cathepsin B	IF 1:200	Neuromics Antibodies, Northfield, USA
Cathepsin Z	WB 1:250	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
GAPDH	WB 1:500	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
LAMP-1 (1D4B)	WB 1:500	Hybridoma Bank, Iowa, USA
	IF 1:25	
LC3 (2G6)	WB 1:500	Nanotools, Teningen
LDLR	WB 1:5000	Abcam, Cambridge, UK
LRP1	WB 1:5000	Abcam, Cambridge, UK
c-Myc	WB 1:1000	Cell Signalling Techology Inc., Danvers
MnSOD	WB 1:1000	Upstate, USA
Neurotensin Rezeptor 3	WB 1:200	BD, San Jose, USA
NPC2	WB 1:500	(Ong et al., 2004)
α-Mannosidase	WB 1:5000	von Prof. Beccari zur
		Verfügung gestellt
p62	WB 1:500	MBL, Nakaku
Saure Sphingomyelinase	IF 1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
single chain fragment $lpha$	WB 1:1000	(Müller-Loennies et al., 2010)
M6P – scFv M6P-1		
β-Tubulin	WB 1:3000	Sigma-Aldrich, München

3.1.11.1 Primäre Antikörper
3.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
Ziege α Ratte Alexa Fluor 488	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege α Ratte Alexa Fluor 546	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor 546	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Esel α Ziege Alexa Fluor 555	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin Alexa Fluor 546	IF 1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege α Kaninchen IgG HRP	WB 1:3000	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus IgG HRP	WB 1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege α Ratte IgG HRP	WB 1:3000	Dianova, Hamburg
Kaninchen α Ziege IgG HRP	WB 1:3000	Dianova, Hamburg

3.1.12 Filipin und Lektine

Name	Verdünnung	Herkunft
Filipin Komplex	IF 1:100	Sigma Aldrich, München
Aleuria Aurantia Lektin	IF 1:50	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Lotus Tetragonolobus Lektin	IF 1:50	Vector Laboratories, Peterborough, UK

3.1.13 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin 10mCi/µl	Hartmann	Analytic	GmbH,
	Braunschwei	g	
[¹²⁵ I]-Natriumjodid	Hartmann	Analytic	GmbH,
	Braunschwei	g	
Na[³⁵ S]O ₄	Hartmann	Analytic	GmbH,
	Braunschwei	g	

3.1.14 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
CorelDraw [®] 11.6	Corel Coop., Unterschleißheim
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software Inc, USA
Leica Confocal Software 2.61	Leica, Wetzlar

Microsoft Office Standard Edition 2010 MxPro Realtime-PCR 4.6.1 Quantity One 2.61 Microsoft, Redmond, USA Stratagene Europe, Niederlande Bio-Rad, München

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Genotypisierung von Gnptab^{ki}- und S^{ko}-Mäusen

Die DNA-Extraktion aus Schwanzspitzen von *Gnptab^{ki}*- und S^{ko}-Mäusen und die anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte mit dem KAPA *Mouse Genotyping Hot Start* Kit. Zur Genotypisierung der *Gnptab^{ki}*- und der S^{ko}-Mauslinie wurde die Insertionsstelle der Neomycin-Kassette verwendet. Es wurden spezifische Primer ausgewählt die im *Gnptab^{ki}*-Mausmodell den ausgewählten Bereich flankieren und im S^{ko}-Mausmodell zusätzlich in der Neomycin-Kassette binden (Multiplex-PCR). Während der PCR wurde bei der *Gnptab^{ki}*-Mauslinie bei dem Wildtyp-Allel ein 550 bp großes Produkt und bei dem *knock-in* Allel ein 700 bp großes Produkt amplifiziert. Bei der S^{ko}-Mauslinie wurde ein 293 bp großes Produkt für das Wildtyp-Allel und ein 206 bp großes Produkt für das *knock-out* Allel amplifiziert. Die hier verwendeten Primer befinden sich im Anhang (Abschnitt 8.1.1). Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

$$Gnptab^{ki}-Programm: 95 °C 3 min
95 °C 15 sek
60 °C 15 sek
72 °C 15 sek
72 °C 4 min
95 °C 3 min
95 °C 3 min
95 °C 3 min
95 °C 3 min
95 °C 15 sek
57 °C 15 sek
72 °C 4 min
95 °C 15 sek
57 °C 15 sek
72 °C 4 min
95 °C 15 sek
57 °C 15 sek
72 °C 4 min
72 °C 4 min$$

Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 - 3 %-ige Agarosegele hergestellt (je nach Größe des Fragments). Zum Lösen der Agarose wurde diese in TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf 60 °C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 μ g/ml) dazugegeben. Die Lösung wurde anschließend in eine Gelkammer gegossen und zum Erhärten mindestens 30 min unter einem Abzug stehen gelassen. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer übergossen. Die Proben wurden in die Kammern pipettiert und bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Banden erfolgte anschließend unter UV-Bestrahlung im E-box Geldokumentationssystem.

TAE-Puffer:40 mM Tris/HCl (pH 8,5)20 mM Essigsäure2 mM EDTA

3.2.3 RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Eukaryontische Zellen wurden zwei Tage vor der RNA-Isolierung auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und die RNA mit Hilfe des *Gene JetTM RNA Purification Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl DEPC-Wasser. Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Die Quantität wurde photometrisch mit dem Multiskan GO Spektrophotometer bestimmt.

3.2.4 RNA-Isolierung aus Geweben

Zur Isolierung von RNA aus Gewebe wurden maximal 100 mg Mausgewebe mit 1 ml *TriReagent* mit einem Ultra Turrax homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und durch 15-sekündiges Vortexen vermischt. Daraufhin folgten 15 min Inkubation bei RT mit anschließender Zentrifugation für 15 min bei 12000 xg und 4 °C. Dabei bilden sich drei Phasen. Die oberste, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol hinzugegeben und kurz durch Vortexen vermischt. Daraufhin folgten 10 min Inkubation bei RT mit anschließender Zentrifugation bei 12000 xg und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 μ l 70 % (v/v) EtOH gewaschen, erneut bei 12000 xg und 4 °C zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Die RNA wurde in 100 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Die Qualität wurde durch Auftrennung im Agarosegel überprüft und die Quantität der RNA photometrisch gemessen.

3.2.5 cDNA-Synthese und quantitative Realtime-PCR

Mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* wurde nach Angaben des Herstellers die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente anschließend als Matrize für die quantitative *Realtime*-PCR. Die quantitative *Realtime*-PCR ist eine PCR-Methode zur Amplifikation und gleichzeitiger Quantifizierung von cDNA. Die Messung erfolgt dabei durch Verwendung des *TaqMan® Gene Expression Assay* über Fluoreszenzsignale von *TaqMan*-Sonden (Abschnitt 8.1.2). Diese Sonden sind am 3'-Ende an ein Reporterfluorophor und am 5'-Ende an einen Quencher gekoppelt. Die räumliche Nähe des Fluorophors zu dem Quencher verhindert die Detektion seiner Fluoreszenz. Erst nachdem die *Taq*-DNA-Polymerase durch ihre endonukleolytische Aktivität die Sonde hydrolysiert, wird das Fluorophor freigesetzt, räumlich vom Quencher getrennt und kann nach Anregung fluorometrisch gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Konzentration des Amplifikats. In den ersten PCR-Zyklen ist jedoch aufgrund der geringen Menge des Amplifikats und dementsprechend geringer Fluoreszenzintensität kein Anstieg detektierbar. Der erste exponentielle Anstieg bestimmt den sogenannten *cycle of threshold* (C_T-Wert).

Die Auswertung erfolgt nach der 2-^{$\Delta\Delta C_T$}-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wird zunächst die Differenz zwischen dem C_T-Wert des zu untersuchenden Gens und eines Kontrollgens (*β*-*Actin*) berechnet. Durch den Vergleich der einzelnen Gruppen erfolgt die Ermittlung der relativen Expression 2-^{$\Delta\Delta C_T$}. Dabei gilt folgende Gleichung:

 $\Delta C_{T} = C_{T Gen} C_{T \beta Actin} \text{ und } \Delta \Delta C_{T} = C_{T defiziente Zellen} C_{T Wildtyp-Zellen}$ PCR-Ansatz: 10 µl MaximaTM Probe qPCR Master Mix (2x) 7 µl ddH₂O

2 μl template cDNA
1 μl TaqMan[®] Gene Expression Assay

PCR-Programm:

95 °C 10 min 95 °C 30 sek 60 °C 1 min } 40 Zyklen

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz der Zellen von 90 % - 100 % wurden diese passagiert. Dazu wurde zunächst 1 x mit 5 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der adhärenten Zellen erfolgte mit 1,5 ml 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA. Die Zellkulturschale wurde geschwenkt, so dass das Trypsin/EDTA vollständig den Zellrasen benetzte. Nach Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von vorgewärmtem Medium (Maus embryonale Fibroblasten (MEF): DMEM, 10 % FKS, 1 x P/S, 1 x GlutaMaxTM; Lungenfibroblasten: RPMI-1640, 20 % FKS, 1 x P/S, 1 x GlutaMaxTM) gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt und je nach gewünschter Dichte ausgesät.

3.3.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden konfluente Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche mit 1,5 ml 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA von der Flasche gelöst, in 5 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Sedimentierung der Zellen bei 500 xg für 5 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 3 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 20 % FKS in DMEM) resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend in einem *NalgeneTM Cryo 1 °C Freezing Container* bei -80 °C eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurden diese in 5 ml kaltem Medium aufgetaut. Die Zellen wurden bei 200 xg für 5 min sedimentiert, das Pellet in 10 ml warmen Medium resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

3.3.3 Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten

Für die Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten wurden Tiere an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung präpariert. Das tragende Muttertier wurde durch Genickbruch getötet, der Bauch mit 70 % EtOH desinfiziert, die Embryonen entnommen und einzeln in eine Zellkulturschale mit PBS gelegt. Das Gewebe um die Embryonen wurde vollständig entfernt und ein kleiner Teil im Kopfbereich des Embryos für die Genotypisierung abgetrennt. Anschließend wurde der Embryo in ein Reaktionsgefäß mit 4 ml 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA überführt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren zerkleinert. Die Freisetzung einzelner Zellen aus dem Zellverbund erfolgte bei anschließender 10-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Durch Zugabe von 8 ml FKS-haltigem Medium wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in einer 75 cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert. Um das Trypsin/EDTA zu entfernen wurde nach Adherieren der Zellen das Medium gewechselt.

3.3.4 Isolierung von Lungenfibroblasten aus der Maus

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet, der Körper mit 70 % EtOH desinfiziert und anschließend die Lunge entnommen. Die Lunge wurde 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und in kleine Stückchen geschnitten. Die Stückchen wurden in ein Reaktionsgefäß mit 5 ml Lysispuffer überführt und 3 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 xg wurde das Pellet in Medium aufgenommen und die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert.

Lysispuffer:

PBS

12 U/ 5 ml Dispase I 850 U/ 5 ml Kollagenase III

3.3.5 Konditionieren von Medien

Für das Konditionieren von Medien wurden die Zellen auf eine \emptyset 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert. Nach 90 %-iger Konfluenz wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Optimem-1 + GlutaMaxTM bei 37 °C für 2 Tage kultiviert.

3.3.6 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin

Die Zellen wurden 2 Tage vor der Markierung auf Ø 3,5 cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Die konfluenten Zellen wurden zunächst 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 700 µl Hungermedium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Pulsemedium (Hungermedium, 150 µCi/ml [³⁵S]-Methionin) vorbereitet. Anschließend wurden 2 µl des Pulsemediums in 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktiviät des Pulsemediums im β-Szintillationscounter überprüft. Dabei gilt: 1 µCi = 2.200.000 cpm. Das Hungermedium wurde abgenommen und für 45 min durch das Pulsemedium ersetzt (*Pulse*). Die Zellen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen und entweder lysiert (siehe 3.4.8) oder nach dem *Pulse* mit 700 µl Chasemedium für weitere 5 h bei 37 °C (*Chase*) inkubiert. Durch Mesung der Radioaktivität im Pulsemedium vor und nach dem *Pulse*, in Zellhomogenaten und in Chasemedien wurde die Inkooperationsrate bestimmt. Das Chasemedium und die Zellen wurden nach Waschen mit PBS für die Immunpräzipitation vorbereitet (siehe 3.4.8).

Hungermedium:	DMEM ohne Methionin und Glutamin	
	1 x GlutaMax TM	
	1 x Penicillin/ Streptomycin	
	5 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS	
Chasemedium:	DMEM	
	1 x GlutaMax TM	
	1 x Penicillin/ Streptomycin	
	5 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS	
	10 mM Mannose 6-phosphat-Na-Salz	

3.3.7 Metabolische Markierung von Glycosaminoglycanen mit Na[³⁵S]O₄

Die Zellen wurden 2 Tage vor der Markierung auf 6-well-Zellkulturschalen (für die in 3.4.12 beschriebene Mengenanalyse von Chondroitinsulfat bzw. Heparansulfat) bzw. \emptyset 10 cm-Zellkulturschale (für die in 3.4.13 beschriebene Größenanalyse von Chondroitinsulfat bzw. Heparansulfat) ausplattiert. Nach Berechnung der aktuellen Radioaktivität mittels des Kalibrierungsdatums wurde die entsprechende Menge

33

Na[35 S]O₄ (100 µCi/ml) in frisches Medium überführt (Pulsemedium). Die konfluenten Zellen wurden zunächst 2 x mit PBS gewaschen. Die Markierung der Glycosaminoglycane (GAGs) erfolgte mit 2 ml bzw. 8 ml Pulsemedium für 2 Tage bei 37 °C (*Pulse*). Das Pulsemedium wurde abgenommen, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit 2 ml bzw. 8 ml Medium für 2 Tage bei 37 °C inkubiert (*Chase*). Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2 ml bzw. 4 ml 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA für 20 min trypsiniert, die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 xg zentrifugiert. Anschließend wurden die GAGs aus dem Pellet isoliert (siehe 3.4.12).

Medium:

DMEM/F12

10 % hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS

3.3.8 Endozytose von [¹²⁵I]-markierten Proteinen

¹²⁵I]-markiertes rekombinantes Protein (spezifische Aktivität: 0,56 µCi/µg Cathepsin D, 28 µCi/µg Cathepsin B, 17µCi/µg Arylsulfatase B) wurde von Prof. Braulke zur Verfügung gestellt. Konfluente Zellen in \emptyset 3,5 cm-Zellkulturschalen wurden zunächst 2 x mit PBS gewaschen und für 30 min mit 800 µl DMEM/ 1 % BSA bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit (625.000 cpm/ml für Cathepsin B, Arylsulfatase B bzw. 375000 cpm/ml für Cathepsin D) [¹²⁵I]-markiertem Protein in 800 µl DMEM/1 % BSA unter An- bzw. Abwesenheit von spezifischen kompetetiven Inhibitoren, wie 10 µM receptor-associated Protein (RAP) oder 10 mM Mannose 6phosphat-Na-Salz (M6P). Die Inkubationszeit variierte je nach Fragestellung. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen 5 x mit eiskaltem PBS gewaschen bevor sie in 1 ml 250 mM Sucrose/10 mM Tris-Lösung (pH 7,4) abgeschabt wurden. Die Zellen wurden bei 800 xg und 4 °C für 4 min sedimentiert, der Überstand entfernt und die Radioaktivität des Pellet in einem y-Szintillationscounter gemessen. Das Pellet wurde in 100 µl Lysispuffer aufgenommen und für 1 h auf Eis lysiert. Für die der β-Hexosaminidase-Aktivität 3.4.11) Bestimmung (siehe und der Proteinkonzentration (siehe 3.4.3) wurden 10 µl Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Lysat bei 13000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand mit 30 µl 4 x Solubilisierungspuffer vermischt, 5 min bei

95 °C gekocht und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen 2 Cellophan-Folien im Geltrockner für 2 h getrocknet und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt.

Lysispuffer:

PBS 0,2 % Triton X-100 1 x IC

3.3.9 Lentivirale Transduktion und Immortalisierung von Zellen

Die Immortalisierung von embryonalen Mausfibroblasten und Lungenfibroblasten erfolgte durch Lentiviren. Die Produktion der Viren und die anschließende Transduktion der Zellen wurden von Dr. Kerstin Cornils, UKE durchgeführt. Der lentivirale pLego-Vektor enthält das Onkogen *LargeT* welches nach der Expression *in vitro* an den Tumorsupressor p53 bindet und inaktiviert, wodurch ein Proliferationsarrest der Zellen verhindert wird und diese teilungsfähig bleiben (Cheng *et al.*, 2009). Zur Überprüfung der Transduktionseffizienz enthält der pLego-Vektor zusätzlich den Fluoreszenzmarker Cerulean der in transduzierten Zellen cytosolisch exprimiert wird (Clayton *et al.*, 1982).

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellen

Konfluente Zellen einer \emptyset 10 cm-Zellkulturschale wurden 2 x mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lysispuffer mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Lyse erfolgte auf Eis für 1 h. Unlösliche Bestandteile wurden bei 16000 xg und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zu weiterem Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer: PBS

3.4.2 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Hirn

Das Gehirn wurde vor dem Homogenisieren in 3 Bereiche zerlegt (linker und rechter Cortex und Cerebellum) und bei -80 °C gelagert. Homogenisiert wurden immer gleiche Bereiche von unterschiedlichen Tieren. Zunächst wurde die fünffache Menge an Puffer I zu dem Gewebe hinzugegeben und mit einem Douncer (*tight*) mit 30 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 500 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit gleicher Menge Puffer II für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad vermischt (Fraktion I). Zur Auftrennung in Triton X-100-lösliche und -unlösliche Fraktion wurde das Homogenat anschließend bei 13000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde in neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet (unlösliche Fraktion) in 1 % SDS/PBS gelöst.

Puffer I:	0,25 M Sucrose	Puffer II:	Puffer I
	50 mM Tris/HCl (pH 7,4)		1 % Triton X-100
	1 mM EDTA		
	1 x IC		

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach den Herstellerangaben für den Bradford Assay von Roth (Roti[®]Quant). Zur Quantifizierung der Protein-konzentration wurde zu jeder Messung mit Hilfe eine Verdünnungsreihe mit Standard-BSA-Lösung (0-20µg) eine Eichgerade erstellt.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der Trenngele variierte zwischen 8 - 15 % und wurde abhängig von der Größe des zu analysierenden Proteins gewählt.

Sammelgel:

100 mM Tris/HCl (pH 6,8) 4 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS

	0,1% (v/v) TEMED
Trenngel:	375 mM Tris/HCl (pH 8,8)
	8 - 15 % (v/v) Acrylamid
	0,1% (w/v) SDS
	0,016 % (w/v) APS
	0,08 % (v/v) TEMED
Solubilisierungspuffer (4x):	500 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	4 % (w/v) SDS
	40 % (v/v) Glycerin
	Coomassie [®] Blue G
	(reduzierend: + 40 mM DTT)
Anodenpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 8,6)
	192 mM Glycin
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 8,6)
	192 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS

 $50 - 100 \ \mu$ g Protein wurden in Solubilisierungspuffer gelöst und bei 95 °C für 5 min gekocht. Nach Gießen des Gels und Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 55 mA/Gel. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet.

3.4.5 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Lösung

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Die Färbung erfolgte im sauren pH-Milieu, da Coomassie an positiv geladene Aminosäuren bindet. Das Trenngel wurde für mindestens 20 min in Färbelösung auf einer Wippe inkubiert und anschließend für 3 x 20 min in die Entfärbelösung gelegt. Nach einstündigem Wässern wurde das Gel in Folie eingeschweißt und getrocknet.

Färbelösung:	50 % Methanol
	10 % Essigäure
	0,05 % Coomassie [®] Blue R
Entfärbelösung:	50 % Methanol
	10 % Essigsäure

3.4.6 Western-Blot-Analyse

Zur Detektion spezifischer Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE, wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurden das Gel und die Membran luftblasenfrei zwischen 4 *Whatman*-Papieren und zwei Faser-*Pads* gelegt und in einer Transfer-Kassette in der Blotting-Kammer fixiert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 900 mA und 4 °C für 3 h oder über Nacht bei 150 mA.

Transferpuffer:	0,025 M Tris
	0,192 M Glycin
	20 % Methanol

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei kontinuierlicher Bewegung auf einer Wippe. Die Nitrozellulosemembran wurde aus der Transfer-Kassette entnommen und in Waschpuffer überführt. Zur Sättigung unspezifischer Antigenbindungsstellen wurde die Membran in Blockierpuffer überführt. Dabei hängt die Zusammensetzung des Blockierpuffers von den Bindungseigenschaften der primären Antikörper ab. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte in Blockierpuffer bei RT für 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h mit HRP-gekoppeltem sekundären Antikörper in Blockierpuffer inkubiert. Alle verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Abschnitt 3.1.11 nachzulesen.

Waschpuffer:	1 x TBS
	0,05 % Tween 20
Blockierpuffer 1:	1 x TBS
	0,05 % Tween 20
	5 % Milchpulver

Blockierpuffer 2:

1 x TBS 0,05 % Tween 20 1 % BSA

Beim Umsatz von Luminol durch HRP wird Chemilumineszenz erzeugt. Dies wird zur Visualisierung der Antikörper-markierten Proteinbanden mittels ECL (*Enhanced chemiluminescence*) genutzt. Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde mit der *ChemiDoc* aufgenommen.

ECL-Lösungen:

Lösung 1:	0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)
	2,7 mM Luminol
	0,44 mM p-Cumarinsäure
Lösung 2:	0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)
	0.02 % H ₂ O ₂

Zur Entfernung der gebundenen Antikörperkomplexe wurde die Membran zunächst "gestrippt". Dabei wird die Membran 5 min dH₂O gewaschen, 5 min mit 0,2 M NaOH inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion weiterer Proteine auf der Membran erfolgt beginnend mit der Blockierung.

3.4.7 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von His6-markierten Proteinen wurden diese in proteasedefizienten, *E.coli* BL21 Bakterien überexprimiert. Einzelne Kolonien wurden zunächst in 10 ml LB-Medium mit Ampicillin ü.N. bei 37 °C und 230 rpm kultiviert und anschließend in 500 ml Medium überführt. Zur Induktion der Expression der His6-markierten Proteine wurde bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 – 0,6 0,5 mM IPTG hinzugegeben und 5 h bei 24 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 4500 xg für 10 min und 4 °C pelletiert und in 40 ml HSB-Puffer/20 mM Imidazol resuspendiert. Durch Zugabe von 40 mg Lysozym und anschließender 3-minütiger Ultraschallbehandlung wurden die Bakterien aufgeschlossen. Das Homogenat wurde daraufhin bei 20000 xg für 20 min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter mit Porengröße 0,45 μ m von restlichen, unlöslichen Bestandteilen getrennt und das Filtrat im Verhältnis 1:3 mit HSB-Puffer/20 mM Imidazol verdünnt. Die Aufreinigung der His6-markierten Proteine erfolgte affinitätschromatographisch über eine 1 ml *HisTrapTM HP* (GE Healthcare) Säule im HPLC-System Bio-Flow (Biorad). Das folgende Programm wurde mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min durchgeführt:

Programmpunkt	Volumen	Puffer/ Probe
Äquilibrieren	10 ml	HSB + 20 mM Imidazol
Laden	30 ml	Probe
Waschen	30 ml	HSB + 20 mM Imidazol
Elution	5 ml	HSB + 450 mM Imidazol
Waschen	10 ml	HSB + 20 mM Imidazol

Tabelle 3-1: Programmeinstellung beim HPLC-Durchlauf

Wasch- und Elutionsfraktionen wurden im Fraktionssammler als 1 ml Fraktionen gesammelt und anschließend in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

HSB (His-Sonication Buffer):	50 mM NaH ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 8)
	300 mM NaCl
	0,1 mM PMSF
	0,1 mM Leupeptin

3.4.8 Immunpräzipitation metabolisch markierter Proteine

Nach metabolischer Markierung der Proteine (*Pulse*) und anschließender Prozessierungs- und Sortierungszeit (*Chase*) (siehe Abschnit 3.3.6) wurden die Zellen in 800 μ l Lysispuffer mit einem Einweg-Schaber von der Zellkulturschale geschabt und das Chasemedium gesammelt. Das Chasemedium wurde mit 78 μ l 10 % Triton X-100 und 15 μ l 50 x IC versetzt. Zur Tritonextraktion wurden die Proben 1 h auf Eis inkubiert. Zum Entfernen von DNA aus den Lysaten erfolgte eine DNA-Fällung mit 10 μ l 3 % Protaminsulfat, einer 10-minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 10.000 xg und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200 μ l PIMM hinzugefügt. Protein G-Sepharose wurde 2 x mit IMM gewaschen und eine 50 % (v/v) Lösung in IMM hergestellt. 50 μ l der Protein G-Sepharose-Lösung wurde mit den Proben für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein G-Sepharose und daran unspezifisch gebundene Proteine wurden anschließend bei 1000 xg bei 4 °C abzentrifugiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht auf dem Drehrad (Antikörperkonzentration siehe 3.1.11.1). Anschließend wurde 50 μ l Protein G-Sepharose hinzugefügt und für 1 h auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein G-Sepharose und daran gebundene Antikörper und Proteine wurden anschließend wie folgt gewaschen. Zwischen jedem Waschschritt wurde bei 1000 xg und 4 °C für 1 min zentrifugiert:

1 x 800 µl Neufeldpuffer

1 x 800 µl IMM

1 x 800 µl IMM + 2 M KCl

2 x 800 µl 0,1 x PBS

Die Protein G-Sepharose wurde anschließend in 50 μ l 2 x Solubilisierungspuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C gekocht, wodurch die präzipitierten Proteine denaturiert und von der Protein G-Sepharose getrennt wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie (Absatz 3.4.4, 3.4.9).

Lysispuffer:	1 x PBS	PIMM:	1 x PBS
	0,1 % BSA		1 % Triton X-100
	1 % Triton X-100		0,5 % Na-Desoxycholat
	1 x IC		0,2 % SDS
			10 % BSA
			1 x IC
Neufeldpuffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,5)	IMM:	1 x PBS
	0,6 M NaCl		1 % Triton X-100
	0,1 % SDS		0,5 % Na-Desoxycholat
	0,05 % NP-40		

3.4.9 Fluorographie

Zur Signalverstärkung von radioaktiv markierten Proteinen nach Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel wird das Gel zunächst 3 x für 20 min in DMSO geschwenkt und über Nacht in 20 % PPO/DMSO gelegt. Anschließend wird es für 1 h mit dH₂O gewässert bevor es zwischen zwei Cellophan-Folien im Geltrockner für 3 h getrocknet wird. Die Detektion der Banden erfolgt durch Auflegen eines Röntgenfilms.

3.4.10 Szintillationsmessung von radioaktiven Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Zur Quantifizierung von radioaktiv markierten Proteinen in Banden von Polyacrylamidgelen wurden die Banden mit Hilfe des entwickelten Röntgenfilms auf einer Leuchtplatte lokalisiert, ausgeschnitten und in Szintillationsröhrchen überführt. Anschließend wurde 300 µl dH₂O dazugegeben und die Gelstückchen wurden über Nacht quellen gelassen. Nach Zugabe von 1 ml *Tissue-Solubilizer* wurden die Szintillationsröhrchen für 5 h in ein 50 °C Wasserbad überführt. Anschließend wurde 10 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt und die Radioaktivität im *Counter* gemessen.

3.4.11 Messung von Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten lysosomaler Hydrolasen wurden in Zellhomogenaten, in konditionierten Medien und in Seren gemessen. Zur Messung der Enzymaktivitäten von Glycosidasen werden synthetische Substrate verwendet die als 4-Nitrophenyl- oder 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Monosaccharide vorliegen. Die in der Probe vorliegende spezifische Hydrolase spaltet unter sauren Bedingungen den Zuckerrest ab und 4-Nitrophenol bzw. 4-Methylumbelliferon wird frei, was nach Zugabe eines alkalischen Stopppuffers photometrisch bzw. fluorometrisch quantifiziert werden kann. Als Substrat für Sulfatasen dient 4-Nitrocatecholsulfat, wobei durch Abspaltung des Sulfats ein Nitrocatechol freigesetzt wird.

Nach Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellen (Absatz 3.4.1) wurden die in Tabelle 3-2 angegebene Proteinmenge auf 100 μ l Gesamtvolumen mit 0,2 % Triton X-100/ 1 x IC aufgefüllt. Zur Enzymaktivitätsbestimmung in konditionierten Medien wurde 100 μ l eingesetzt. Anschließend wurde 100 μ l Substrat in Reaktionspuffer hinzugegeben und für 1 h bzw. 16 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 800 μ l Stopppuffer beendet. Die Messung des freigesetzten 4-Nitrophenol erfolgte bei 405 nm (E_{405}) und des 4-Nitrocatechol bei 515 nm (E_{515}) .

Reaktionspuffer:	0,1 M Natriumcitrat (pH 4,6)
	0,2 % Triton-X100
	0,4 % BSA
Stopppuffer:	0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4)

Lysosomales Enzym	Substrat	Konzen- tration	μg Protein	Inkubations- zeit (h)
β-Hexosaminidase	p-Nitrophenyl-N-Acetyl-	10 mM	20	1
	β-D-glucosamid			
β-Galactosidase	p-Nitrophenyl-β-D-	10 mM	50	16
	galactopyranosid			
α -Mannosidase	p-Nitrophenyl-α-D-	5 mM	50	16
	mannopyranosid			
Arylsulfatase A	Nitrocatecholsulfat	10 mM	50	16

Tabelle 3-2: Verwendete Substratmengen, Proteinkonzentrationen und Inkubationszeiten für die Messung von Enzymaktivitäten mittels p-Nitrophenol.

Die Berechnung der Aktivität A erfolgte nach folgender Gleichung:

 $A = \frac{\Delta E/\min x V_M}{\epsilon x d x V_P}$

A = Enzymaktivität [U; $1 U = 1 \mu mol/min$]

 $\Delta E/min =$ Änderung der Extinktion (Absorption) pro Zeit

 ε = molarer Extinktionskoeffizient

[für p-Nitrophenol 18,45 /µmol*cm; für 4-Nitrocatechol 12,6 /µmol*cm]

 V_P = Probenvolumen während der Reaktion [40 µl]

 V_M = Meßvolumen in der Küvette [1000 µl]

d = Schichtdicke der Lösung [1 cm]

Enzymaktivitätsbestimmung 4-Methylumbelliferyl-konjugierten Für die mit Monosacchariden wurden zunächst folgende Molaritäten 4MU-Standard in DMSO gelöst: 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 mM. Anschließend wurde 20 µl jedes Standards mit 280 µl Verdünnungspuffer, 100 µl Lysispuffer und 3,6 ml Stopppuffer verdünnt. Jeweils 200 µl jedes Standards wurde zur Erstellung der Kurve eingesetzt (das entspricht: 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 nmol). Anschließend wurden Zellhomogenate hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt (Absatz 3.4.1 und 3.4.3). Die in Tabelle 3-3 angegebenen Proteinkonzentrationen bzw. Serumvolumina wurden für die Messung eingesetzt. Die Endkonzentration der Substrate während der Reaktion betrug: 5 mM für 4-Methylumbelliferyl- α -L-fucopyranosid, 1 mM für 4-Methylumbelliferyl-β-Dglucuronid und 0,5 mM für 4-Methylumbelliferyl-α-L-iduronat. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 900 µl Stopppuffer gestoppt. 200 µl des Standards und der Probe wurde in eine schwarze Mikrotiterplatte überführt und bei 340 nm Anregungs- und 485 nm Emissionswellenlänge gemessen. Die Enzymaktivitätsbestimmungen von Iduronat-2-Sulfatase, N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase und N-Sulfoglucosamin-Sulfohydrolase wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Lysosomales Enzym	Substrat	Konzen- tration	µg Protein	µl Serum	Inkubations- zeit (h)
α-L-Fucosidase	4MU-α-L-	10 mM	50		2
β-Glucuronidase	fucopyranosid 4MU-β-D- glucuronid	2 mM		30	4
α-L-Iduronidase	4MU-α-L-iduronat	5 mM		50	4
Iduronat-2- Sulfatase	4MU-α-iduronat-2- sulfat	*		3	*
Acetylgalactosamin 6-Sulfatase	4MU-β-D- galactosid-6-sulfat	*		20	*
N-Sulfoglucosamin Sulfohydrolase	4MU-α-N-sulfo-D- glucosamin	*		10	*

Tabelle3-3:VerwendeteSubstratmengen,Proteinkonzentrationen,SerumvoluminaundInkubationszeitenfürdieMessungvonEnzymaktivitätenmittels4-Methylumbelliferon.4-Methylumbelliferyl (4-MU), nach Herstellerangaben durchgeführt (*).

Verdünnungspuffer:	0,1 M Natriumcitrat (pH 4,5)	
	0,15 M NaCl	
Lysispuffer:	0,1 M Natriumcitrat (pH 4,5)	
	0,15 M NaCl	
	0,1 % Triton X-100	
Stopppuffer:	0,4 M Glycin/NaOH (pH 10,4)	

Die Enzymaktivitäsbestimmungen von Cathepsin D und Cathepsin B wurden von Dr. Markus Damme durchgeführt.

3.4.12 Aufreinigung metabolisch markierter Glycosaminoglycane

Nach metabolischer Markierung der GAGs (Absatz 3.3.7) wurde das Pellet in 500 μ l 0,1 M NaOH lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurde das Homogenat im Verhältnis 1:5 mit DEAE (Diethylaminoethylcellulose)-Waschpuffer verdünnt, 100 μ g/ml Pronase hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Das Zelllysat wurde durch einen Filter mit Porengröße 0,20 μ m von restlichen, unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Zur Aufreinigung metabolisch markierter GAGs wurde zunächst die DEAE-Polyprep-Säule vorbereitet. Dazu wurde 400 µl DEAE-Sepharose in die Säule pipettiert und anschließend mit 10 ml Prä-Waschpuffer gewaschen. Das Zelllysat wurde mit DEAE-Waschpuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt und auf die Säule gegeben. Nach Bindung der stark negativ geladenen GAGs an die positiv geladene DEAE-Sepharose wurde mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,5 ml Elutionspuffer und die GAG-Konzentration wurde mit 100 µl des Eluats im Szintillationscounter gemessen.

Um die Menge an Chondroitinsulfat bzw. Heparansulfat zu bestimmen, mussten die aufgereinigten GAGs zunächst zur Entsalzung auf eine Sephadex PD-10 Säule gegeben werden. Dafür wurde die Säule mit 25 ml 10 % EtOH equilibriert und anschließend die Probe aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig eingelaufen war, wurden die GAGs mit 3,5 ml 10 % EtOH eluiert und anschließend im Lyophilisator lyophilisiert.

Die getrockneten GAGs wurden in 400 μ l dH₂O resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Der eine Teil wurde für den Verdau mit

Heparinase I, II und II und der andere für den Verdau mit Chondroitinase ABC verwendet.

1. Reaktionsansatz für Verdau mit Chondoitinase ABC:

200 µl aufgereinigte und entsalzte GAGs

20 µl 10 x Chondroitinasepuffer

20 IU/ 100 μ l Chondroitinase ABC

2. Reaktionsansatz für Verdau mit Heparinase I, II, III:

200 µl aufgereinigte und entsalzte GAGs

20 µl 10 x Heparinasepuffer

Jeweils 2 mIU/100 µl Heparinase I, II und III

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Anschließend wurden die verdauten Proben im Verhältnis 1:10 mit DEAE-Waschpuffer verdünnt und erneut wie oben beschrieben auf eine DEAE Polyprep-Säule gegeben. Nach der Elution mit 2,5 ml Elutionspuffer wurde die Menge an Chondroitinsulfat bzw. Heparansulfat im Szintillationscounter gemessen.

DEAE-Prä-Waschpuffer:	50 mM Natriumacetat (pH 6,0)
	0,2 M NaCl
	0,5 % (w/v) Triton X-100
DEAE-Waschpuffer:	50 mM Natriumacetat (pH 6,0)
	0,2 M NaCl
DEAE-Elutionspuffer:	50 mM Natriumacetat (pH 6,0)
	1 M NaCl
10 x Chondroitinasepuffer:	500 mM Tris (pH 7,9)
	500 mM NaCl
10 x Heparinasepuffer:	500 mM Natriumacetat (pH 7,0)
	5 mM Calciumacetat

Um die Größe von GAGs auf der Zelloberfläche zu untersuchen wurden die Zellen nach dem in Absatz 3.3.7 beschriebenen *Pulse* 20 min mit 4 ml 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA trypsiniert und bei 1000 xg für 5 min pelletiert. Die Oberflächen-GAGs befinden sich anschließend im Überstand. Intrazelluläre GAGs wurden nach dem *Chase* aus dem Pellet isoliert. Die Aufreinigung von Chrondroitinsulfat und Heparansulfat erfolgte wie in Absatz 3.4.12 beschrieben. Um die Größe der GAG chromatographisch analysieren zu können, wurden an die GAGs gebundene Peptide zwischen der Chromatographie mit DEAE-Sepharose und der Entsalzung der GAGs durch Zugabe von 500 µl 0,4 M NaOH und anschließender Neutralisation mit 500 µl 0,4 M HCl entfernt. Nach der Elution von Chondroitinsulfat und Heparansulfat von der DEAE-Polyprep-Säule wurden 10000 cpm in 200 µl DEAE-Waschpuffer aufgenommen und mit 50 µl Phenolrot-Lösung vermischt. Eine 2,5 cm x 75 cm Säule wurde mit CL-6B Granulat befüllt und die Probe vorsichtig auf die Säule gegeben. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/15 min und die Proben wurden in einem Fraktionskollektor aufgefangen.

Das Molekulargewicht der GAGs kann bei der Chromatographie durch Bestimmung des K_{av} -Werts berechnet werden. Der K_{av} entspricht dem Verteilungkoeffizient von Molekülen in der löslichen Phase, und berechnet sich aus dem Elutionsverhalten und den Eigenschaften der verwendeten Säule. Dem K_{av} -Wert von GAGs kann nach Wasteson *et al.* ein entsprechendes Molekulargewicht zugeordnet werden (Wasteson, 1971). Zur Auswertung wurde zunächst der V_t-Wert (Bettvolumen) der Säule bestimmt. Dieser entspricht der Fraktionsnummer mit der dunkelsten Phenolrotfärbung. Der V₀-Wert (Totvolumen der Säule) ist ein 1/3 des V_t-Werts. Anschließend wurden die Proben im Szintillationscounter gemessen. Der K_{av}-Wert kann durch die Fraktionsnummer, dem Bettvolumen und dem Totvolumen der Säule nach folgender Gleichung berechnet werden:

 $K_{av} = (Fraktionsnummer - V_0) / (V_t - V_0)$

3.4.14 Massenanalytik von Oligosacchariden

50 - 60 mg Gewebe vom Hirn wurde zunächst in kleine Stücke geschnitten und anschließend mit Hilfe eines Ultra Turrax in 600 µl dH₂O bei 4 °C homogenisiert. Nach

3 x 10 sek Ultraschallbehandlung erfolgte die Fällung von Proteinen durch die Zugabe von 2,6 ml 100 % Methanol. Die Proteine wurden durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 3 min und 4 °C sedimentiert und die im Überstand gelösten Oligosaccharide in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 1,3 ml 80 % Ethanol aufgenommen, 10 sek im Ultraschall behandelt, für 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert und die Überstande vereint.

Zur Präzipitation von Lipiden wurde 900 μ l Chloroform zu den Überständen hinzugegeben und durch Vortexen vermischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 3300 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 2,73 ml dH₂O hinzugefügt und durch abermaliges Vortexen vermischt. Anschließend wurden die Proben bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde 0,25 g des Anionen-/Kationen-Austauscher-Gemisches (*exchange resin*, AG 501-X8, 20-50 *mesh*) zum Überstand hinzugefügt und für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Das ungebundene Material wurde lyophilisiert und in dH₂O resuspendiert (Endkonzentration: 1 mg Gewebe/ μ]).

Die Oligosaccharide wurden anschließend mittels MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator) und gekoppelter Gaschromatographie/ Massenspektrometrie identifiziert (Morelle *et al.*, 2005a; Morelle *et al.*, 2005b) und durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie quantifiziert (Blanz *et al.*, 2008). Durchgeführt wurden die massenspektrometrischen Analysen von Dr. W. Morelle aus der Arbeitsgruppe von Dr. J.-C. Michalski, Universität Lille, Frankreich.

3.4.15 Massenanalytik von Lipiden

Das Gewebe (linke Cortexhälfte bzw. das Cerebellum) wurde gewogen, in 500 μ l dH₂O überführt und mit einem Douncer homogenisiert. Anschließend wurde 2 ml 100 % Methanol und 1 ml Chloroform hinzugefügt und vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben bei 1000 xg für 15 min zentrifugiert und der Überstand in konischen Glasröhrchen gesammelt. Das Pellet wurde erneut in 500 μ l dH₂O aufgenommen, das oben beschriebene Verfahren wiederholt und die Überstände vereint. Anschließend wurden die Lipidextrakte mit Chloroform/Methanol (1:2) auf die gleiche Endkonzentration eingestellt (Cerebellum: 7,5 mg Gewebe/ml; Cortex: 19 mg/ml).

Die aufgereinigten Lipide wurden mit Hilfe des Vakuum-Elutionssystems von Camag in eine neutrale und eine anionische Fraktion aufgetrennt. Dafür wurden C18-Säulen (300 mg, Varian) mit 3 x 2 ml Chloroform/Methanol (1:2) und 1 x 2 ml Methanol equilibriert. Anschließend wurde 6 ml des Lipidextrakts (Cerebellum: 45 mg Gewebe; Cortex: 114 mg Gewebe) mit 8 ml Methanol/Wasser (1:1) vermischt und auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluss wurde in Glasröhrchen gesammelt, mit 8 ml Methanol/0,9 % NaCl (1/1) versetzt und erneut auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt bevor die Säule mit 4 x 500 µl Wasser entsalzt wurde. Die Elution der anionischen Lipidfraktion erfolgte mit 4 x 2 ml Methanol/Wasser (12:1) und der neutralen Lipidfraktion mit 4 x 2 ml Chloroform/Methanol (1:2). Beide Eluate wurden mit Stickstoff getrocknet. Die Fraktionen wurden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie und dem lipidspezifischen Detektionsmodus im Labor von Dr. R. Käkelä, Universität Helsinki, Finnland analysiert (Käkelä *et al.*, 2003; Jabs *et al.*, 2008).

3.5 Histochemische Methoden

3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen

Zunächst wurden sterile Deckgläschen in eine 12-well-Zellkulturplatte überführt und mit 1 ml 1 %-iger steriler Gelatine/PBS-Lösung bedeckt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Deckgläschen bei offenem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Die Zellen wurden daraufhin in 70 %-iger Konfluenz auf den Gelatine-beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die adhärenten Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 μ l 4 % PFA für 30 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 500 μ l 0,1 % Saponin in PBS für 10 min permeabilisiert. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren erfolgte die Inkubation mit 500 μ l Blockierlösung für 1 h. Die primären Antikörper wurden in Blockierlösung verdünnt (Absatz 3.1.11.1) und 50 μ l auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der zellbewachsenen Seite auf den Tropfen gelegt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, auf einen 50 µl Tropfen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (Absatz 3.1.11.2) überführt und erneut für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS und 2 x mit dH₂O gewaschen. Die Einbettung erfolgte mit Fluoromount-Medium auf Objektträgern und am darauffolgenden Tag wurde mit Nagellack versiegelt. Die Aufnahme der Zellen erfolgte mit dem Leica-Konfokalmikroskop SP2 mit einem 63x Ölobjektiv). Die Überlagerung von Fluoreszenzaufnahmen aus unterschiedlichen Kanälen wurde mit dem Programm Adobe Photoshop durchgeführt.

Blockierlösung:

PBS

5 % BSA

0,1 % Saponin

3.5.2 Histologische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Die untersuchten Organe der Maus wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert. Einige Färbungen wurden durch Kooperationspartner durchgeführt. Dr. Markus Damme, Universität Bielefeld färbte Filipin, Luxolblau, GFAP, CD68, p62 und Calbindin an Schwimmschnitten (Damme *et al.*, 2011). Dr. Melanie Neumann, *Core Facility* Mauspathologie UKE fertigte PAS-Färbungen mit Hilfe von Paraffin-Schnitten an. Dr. Michaela Schweizer, ZMNH, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf hat Mäuse zur elektronenmikroskopischen Untersuchung erhalten (Weinert *et al.*, 2010; Schweizer *et al.*, 2013) und Dr. Micsenyi, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva Universität, New York färbte G_{M2} und G_{M3} Ganglioside an Vibratomschnitten (Micsenyi *et al.*, 2009).

3.5.3 Immunhistochemische Färbung von Glycanen an Gewebeschnitten

Von einem mit 4 % PFA fixierten Maushirn wurde am Vibratom 50 µm sagitale Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in eine 6-well-Zellkulturschale mit PBS überführt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4 °C in 0,2 % Natriumazid in PBS. Die Färbung wurde in einer 24-well-Zellkulturschale durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst 3 x mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung und Blockierung erfolgte mit 300 µl Blockierlösung. Das Lektin *Lotus Tetragonolobus* wurde 1:50 in Blockierlösung verdünnt und 3 Tage mit den Schnitten bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper für 1,5 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte feucht auf Objektträger aufgezogen und mit Fluoromount-Medium eingedeckelt.

Blockierlösung:

PBS

0,3 % BSA 10 % Pferdeserum 0,3 % Triton X-100

3.6 Sonstige Methoden

3.6.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter standardisierten Bedingungen in einem 12 h Hell-/ Dunkelrythmus gehalten. Alle Experimente an Gnptab^{ki}-Mäusen erfolgten an homozygoten *Gnptab^{ki}*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren. Heterozygote Tiere mit einem C57Bl/6 Hintergrund wurden mit heterozygoten 129/SvJ Mäusen gekreuzt um homozygote Mäuse mit einem stabilen, gemischten C57Bl/6-129/SvJ Hintergrund zu erzeugen. Zur Generierung von Sortilin- und Gnptabdoppeltdefizienten Mäusen wurden homozygote Sortilin knockout Mäuse (S^{ko}) (Jansen et al., 2007) mit Gnptab^{ki}-Mäusen verpaart und anschließend untereinander verkreuzt. Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung biopsiert und entsprechend Abschnitt 3.2.1 genotypisiert. Zur Blutentnahme bei lebenden Mäusen wurde die Mandibularvene punktiert. Zur Gewinnung von Serum wurde das Vollblut für 10 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde für 6 min bei 6000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Tiertötungen erfolgten durch CO₂-Inhalation oder zervikale Dislokation.

4. Ergebnisse

4.1 Expression und Transport lysosomaler Proteine in *Gnptab^{ki}*-MEFs

4.1.1 M6P-abhängiger Transport löslicher lysosomaler Proteine

Lysosomale Matrixproteine werden im Golgi durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase und die GlcNAc-1-Phosphodiesterase mit M6P-Resten modifiziert. Anschließend werden die M6P-haltigen Proteine durch MPR erkannt, die den Transport zu Lysosomen vermitteln. Bei Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität ist die Sortierung der lysosomalen Proteine gestört und sie werden sezerniert.

Im Folgenden wurde die Expression und der Transport verschiedener lysosomaler Enzyme in Zellen des *Gnptab*^{c.3082insC} *knock-in* (*Gnptab*^{ki})-Mausmodells für Mucolipidose Typ II (MLII) analysiert. Zunächst wurden primäre embryonale Mausfibroblasten (MEFs) aus Wildtyp- und *Gnptab*^{ki}-Embryonen an Tag 12,5 der Embryonalentwicklung isoliert und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde die Expression lysosomaler Proteine in Zellen und konditionierten Medien mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Zur Detektion von M6P-haltigen Proteinen wurde die Blot-Membran zunächst mit einem anti-M6P-*single chain* Antikörperfragment analysiert. Dabei handelt es sich um einen rekombinanten Antikörper, der die M6P-Modifikation an N-Glycanen lysosomaler Proteine spezifisch detektiert (Müller-Loennies *et al.*, 2010). In Homogenaten und im Medium von Wildtyp-MEFs ist eine Vielzahl von Proteinen mit M6P-Resten mit molaren Massen zwischen 25 und 70 kDa detektierbar. Einige M6Pabhängig transportierte Proteine entgehen der Bindung an M6P-Rezeptoren im *trans*-Golgi-Apparat, werden sezerniert und sind in den Medien der Wildtyp-MEFs nachweisbar. In *Gnptab^{ki}*-MEFs sowie in konditionierten Medien dieser Zellen sind keine M6P-haltigen Proteine zu detektieren (Abb. 4-1 A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die *Gnptab^{ki}*-Mutation zu einem Funktionsverlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase im untersuchten Mausmodell führt und keine M6P-Reste mehr generiert werden.

Anschließend wurden die Expression und Lokalisation der lysosomalen Proteine Cathepsin Z (CtsZ), α -Mannosidase (α -Man), Npc2 (Abb. 4-1 B) und Cathepsin D

(CtsD, Abb. 4-1 C) im Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs und in konditionierten Medien dieser Zellen mittels Western-Blot untersucht. Cathepsin Z wird als 40 kDa Vorläuferprotein exprimiert und anschließend im endosomalen Kompartiment proteolytisch zu einer reifen Form mit molarer Masse von 37 kDa prozessiert. In Homogenaten von Wildtyp-MEFs erkennt man die prozessierte, reife Form (m) von Cathepsin Z. In Homogenaten von *Gnptab^{ki}*-MEFs ist diese hingegen nicht zu detektieren. Jedoch erkennt man in den Medien der *Gnptab^{ki}*-MEFs eine Anreicherung des Cathepsin Z-Vorläuferproteins. Aufgrund der fehlenden M6P-Reste an Mannosereichen Oligosacchariden werden diese weiter zu komplexen Zuckerstrukturen prozessiert, was sich in der geringeren elektrophoretischen Mobilität sezernierter lysosomaler Proteine in Medien von *Gnptab^{ki}*-MEFs widerspiegelt.



Abb. 4-1: Expression von lysosomalen Proteinen in Wildtyp- und *Gnptab*^{ki}-Fibroblasten

Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von lysosomalen Proteinen wurden Western-Blot-Analysen an Wildtyp (wt)- und *Gnptab*^{ki} (ki)-embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) durchgeführt. Jeweils 100 µg Zellhomogenat und 100 µl FKS-freies Medium, mit dem die Zellen zuvor für 48 h kultiviert waren, wurden unter nicht-reduzierenden (**A**) und reduzierenden Bedingungen (**B**, **C**) im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit einem anti-M6P-*single chain* Antikörper (**A**) und Antiseren gegen Cathepsin Z (CtsZ), α -Mannosidase (α -Man), Niemann Pick C2 (Npc2) (**B**) und Cathepsin D (CtsD) (**C**) analysiert. β -Tubulin und Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (MnSOD) dienten als Ladekontrolle. *precursor*, Vorläuferprotein (p); *mature*, reife Form (m); intermediäre Form (i), * unspezifische Bande.

 α -Mannosidase wird in MEFs als 85 kDa Vorläuferprotein synthetisiert. Durch die proteolytische Spaltung in Endosomen entsteht eine 60 kDa intermediäre Form (i) und eine 40 kDa reife Form (m). In Homogenaten von Wildtyp-MEFs erkennt man beide

prozessierte Formen der α -Mannosidase. In Zellhomogenaten von *Gnptab^{ki}*-MEFs hingegen ist nur das Vorläuferprotein nachweisbar, das intrazellulär akkumuliert, während in den konditionierten Medien der Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs die Vorläuferform der α -Mannosidase in vergleichbaren Mengen detektiert wird (Abb. 4-1 B). Npc2 wird als 19 kDa Vorläuferprotein synthetisiert und nach Erreichen des endosomalen Kompartimentes zu einer 17 kDa reifen Form proteolytisch prozessiert. In Homogenaten von Wildtyp-MEFs erkennt man die reife Form, die in Homogenaten von *Gnptab^{ki}*-MEFs fehlt. Jedoch akkumuliert das komplex-glycosylierte Npc2-Vorläuferprotein in den Medien der *Gnptab^{ki}*-MEFs (Abb. 4-1 B)

Cathepsin D wird als 50 kDa Vorläuferprotein zu den Endosomen transportiert und dort proteolytisch in eine 45 kDa intermediäre und anschließend in eine 30/33 kDa reife Form gespalten. In Homogenaten von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs kann die intermediäre Form (i) und die 30 kDa reife Form (m) von Cathepsin D detektiert werden, wobei die Intensitäten dieser Banden in den *Gnptab^{ki}*-MEFs signifikant schwächer sind. Ähnlich der gestörten proteolytischen Prozessierung von Cathepsin D in Fibroblasten von Patienten mit MLII (Hasilik und Neufeld, 1980), ist in den Homogenaten von *Gnptab^{ki}*-MEFs noch eine zweite 33 kDa reife Form zu finden. Im Vergleich zu Wildtyp-MEFs wird in *Gnptab^{ki}*-MEFs ein Großteil des Vorläuferproteins von Cathepsin D sezerniert (Abb. 4-1 C). Wie bei Cathepsin Z und Npc2, weist die höhere molare Masse des Vorläuferproteins von Cathepsin D im Medium der *Gnptab^{ki}*-MEFs auf die veränderte Prozessierung der N-Glycane zum komplexen Typ hin (Hasilik und von Figura, 1981).

Die Western-Blot-Analysen zeigen, dass Cathepsin Z, α -Mannosidase und Npc2 M6Pabhängig zu den Lysosomen transportiert werden. Der Transport von Cathepsin D erfolgt hingegen nur teilweise M6P-abhängig. Obwohl ein größerer Teil des Cathepsin D-Vorläuferproteins in *Gnptab^{ki}*-MEFs sezerniert wird als in Wildtyp-MEFs, werden in *Gnptab^{ki}*-MEFs auch Anteile von Cathepsin D zu Endosomen/ Lysosomen transportiert und proteolytisch prozessiert.

Zur detailierten Untersuchung der Synthese, Prozessierung und Sortierung von Cathepsin D und Cathepsin Z wurden Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs im folgenden Experiment mit [³⁵S]-Methionin für 45 min metabolisch markiert (*Pulse*). Durch

anschließende Inkubation der Zellen mit nicht-radioaktivem Medium (*Chase*) kann das [³⁵S]-markierte Protein über einen kurzen Zeitraum sensitiv verfolgt werden. Nach dem sogenannten *Pulse-Chase* wurden die Zellen geerntet, lysiert und Cathepsin D bzw. Cathepsin Z aus den Zellextrakten und Medien immunpräzipitiert.



Abb. 4-2: Synthese, Transport und Prozessierung von Cathepsin D und Cathepsin Z in Wildtypund *Gnptab*^{ki}-MEFs

Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-MEFs wurden für 45 min mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und anschließend geerntet (Spur 1 und 3) oder für 5 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*) und danach geerntet (Spur 2 und 4). Cathepsin D (CtsD) und Z (CtsZ) wurden von Zellhomogenaten und Chasemedien immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend fluorographisch detektiert. Anschließend wurden Proteinbanden ausgeschnitten und die Menge des radioaktiv-markierten Proteins durch Szintillationsmessung bestimmt. *precursor*, Vorläuferpotein (p); *mature*, reife Form (m); intermediäre Form (i)

Cathepsin D kann nach der metabolischen Markierung als 50 kDa Vorläuferprotein in den Fibroblasten detektiert werden. Die Syntheserate ist in Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs vergleichbar (Abb. 4-2, Spur 1 und 3). Nach einem 5-stündigen Chase ist in Wildtyp- als auch in *Gnptab^{ki}*-MEFs eine 45 kDa intermediäre Form des Cathepsin D detektierbar, was einen Transport des Proteins zum endosomalen Kompartiment nachweist (Abb. 4-2, Spur 2 und 4). Jedoch ist in *Gnptab^{ki}*-MEFs, aufgrund der Sekretion des Vorläuferproteins (Abb. 4-2, Spur 6), die intrazelluläre Menge an prozessierten Cathepsin D geringer. Ca. 80 % des nach 5 h nachweisbaren Gesamtproteins werden von den *Gnptab^{ki}*-MEFs als Vorläuferprotein sezerniert, wohingegen sich bei Wildtyp-MEFs 62 % im Extrazellulärraum befinden (Abb. 4-2, Spur 5). Wie bei Cathepsin D gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Syntheserate des 40 kDa Vorläuferproteins von Cathepsin Z in Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs (Abb. 4-2, Spur 1 und 3). Die 37 kDa prozessierte, reife Form von Cathepsin Z und 4).

Entsprechend wurden 89 % des nach 5 h nachweisbaren Gesamtproteins als Vorläuferprotein sezerniert (Abb. 4-2, Spur 6). Auch bei Cathepsin Z ist bei der sezernierten Form zu erkennen, dass Cathepsin Z aufgrund der Prozessierung der N-Glycane zum komplexen Typ im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein höheres Molekulargewicht aufweist.

Um die intrazelluläre Konzentration an lysosomalen Enzymen in *Gnptab^{ki}*-MEFs und die Sekretion lysosomaler Enzyme in den Extrazellularraum zu untersuchen, wurden zusätzlich Enzymaktivitäten lysosomaler Hydrolasen photometrisch bestimmt.



Abb. 4-3: Enzymaktivitäten in MEFs und in Seren von Wildtyp- und Gnptabki-Mäusen

Enzymaktivitäten lysosomaler Hydrolasen in Zellhomogenaten Wildtyp (wt)- und *Gnptab*^{ki} (ki)-MEFs (**A**) und Seren von 7 Monate alten Wildtyp (wt)- und *Gnptab*^{ki} (ki)-Mäusen (**B**) wurden mittels photometrischer und fluorometrischer Messungen bestimmt. Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten, wobei Wildtyp-Werte gleich 1 gesetzt wurden (Mittelwert ± Standardabweichung, **P* < 0.05, n = 3). β -Hexosaminidase (β -Hex), β -Galactosidase (β -Gal), α -Mannosidase (α -Man), Arylsulfatase A (ASA), α -Fucosidase (α -Fuc), Cathepsin B (CtsB), Cathepsin D (CtsD), N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase (β -Gal-6S), β -Glucuronidase (α -Gluc), α -L-Iduronidase (α -Idu), Iduronat-2-Sulfatase (α -IdoA-2S), Heparan N-Sulfatase (α -GlcNS).

In den *Gnptab^{ki}*-MEFs wurden intrazellulär signifikant geringere Enzymaktvitäten von β -Hexosaminidase, β -Galactosidase, α -Mannosidase, Arylsulfatase A und α -Fucosidase

gemessen. In den *Gnptab*^{ki}-MEFs ist im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs maximal 30 % (z. B. für Arylsulfatase A) des Wildtyp-Proteinanteils vorhanden. Teilweise fällt dieser Wert unter 5 % (z. B. für α -Mannosidase). Die intrazellulären Enzymaktivitäten von Cathepsin B und D waren in den *Gnptab*^{ki}-MEFs hingegen nicht verändert (Abb. 4-3 A).

Im Serum der *Gnptab^{ki}*-Mäuse wurden mit Hilfe der Enzymaktivitätsmessungen die Konzentrationen weiterer lysosomaler Enzyme bestimmt. Acetylgalactosamin-6-Sulfatase, β -Glucuronidase und α -L-Iduronidase waren im Serum von *Gnptab^{ki}*-Mäusen 3- bis 5-fach erhöht, die Iduronat-2-Sulfatase und Heparan N-Sulfatase 12- bis 14-fach (Abb. 4-3 B).

4.1.2 Transkriptionsrate lysosomaler Gene in *Gnptab^{ki}*-MEFs

Im Western-Blot wurden in *Gnptab^{ki}*-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs starke Unterschiede in der intrazellulären Konzentration lysosomaler Proteine detektiert. Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede durch Änderungen der Transkriptionsmenge der entsprechenden Gene verursacht sind, wurden die relativen mRNA-Spiegel lysosomaler Proteine in MEFs durch *realtime*-PCR bestimmt.

Die mRNA-Spiegel lysosomaler Gene sind in *Gnptab^{ki}*-MEFs für alle untersuchten Gene leicht erhöht. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Steigerungen der mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 4-4).



Abb. 4-4: mRNA-Expression lysosomaler Gene in MEFs von Wildtyp- und Gnptabki-Mäusen

Aus primären MEFs von Wildtyp (wt)- und $Gnptab^{ki}$ (ki)-Mäusen wurde RNA isoliert, um durch *realtime*-PCR die relativen mRNA-Expressionen lysosomaler Gene im Verlgeich zu Wildtyp zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei eine Normalisierung auf die mRNA-Expression von β -Aktin erfolgte und die Expression in Wildtyp-MEFs gleich 1 gesetzt wurde. (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3). β -Hexosaminidase (*Hexa*), β -Galactosidase (*Glb1*), α -Mannosidase (*Man2b1*), α -Fucosidase (*Fuca1*), Arylsulfatase A (*Arsa*), Cathepsin D (*Ctsd*).

4.2 Charakterisierung des Speichermaterials in *Gnptab^{ki}*-Mäusen

Bei Mucolipidose Typ II (MLII) führt die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme zur Defizienz dieser Enzyme in Lysosomen und dadurch zur Speicherung von nicht abgebauten Makromolekülen. Die molekulare Charakterisierung des Speichermaterials ermöglicht es daher lysosomale Enzyme zu identifizieren, die ausschließlich M6Pabhängig zu Lysosomen transportiert werden. Im Folgenden wurde deshalb das Speichermaterial im Hirngewebe und in embryonalen Fibroblasten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen ultrastrukturell, massenspektrometrisch und histochemisch untersucht.

4.2.1 Mikroskopische Untersuchung des Speichermaterials

Um zu untersuchen ob in Hirngewebe von *Gnptab^{ki}*-Mäusen Speichermaterial vorhanden ist, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von 11 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen von Dr. Michaela Schweizer (*Scientific Service Group Morphology*, ZMNH, Hamburg) angefertigt.



Abb. 4-5: Ultrastrukturelle Analyse des Speichermaterials im neuronalen Gewebe von 11 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen

Nach Perfusion wurde das Hirn von $Gnptab^{ki}$ -Mäusen entnommen und Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt. Längsschnitt eines myelinierten Axons von cerebellaren Neuronen und mit größerer Auflösung. multivesikuläre Strukturen (Pfeile); elektronendichte Strukturen (ed) (A und B). Speichermaterial in Körnerzellen des Cerebellums. *fingerprint*-Strukturen (fp), Zebra-Strukturen (ZS), elektronendichte Strukturen (ed), geflocktes Speichermaterial (*), Autophagosom (Au) (C, D und E). Maßstäbe A - E: 1 µm.

Speichermaterial war in kortikalen, hippocampalen und cerebellaren Neuronen nachweisbar. Neurone wiesen angeschwollene Axone (Spheroide) auf, die mit verschiedenartigen Speichervakuolen gefüllt waren. Dabei konnte elektronendichtes bis elektronentransparentes, membranumschlossenes Speichermaterial in cerebellaren Neuronen detektiert werden (Abb. 4-5 A und B). Das Speichermaterial in Körnerzellen des Cerebellums bestand aus dichten und multilamellären, elektrontransparenten geflockten, Zebra- und sogenannten *fingerprint*-Strukturen (Abb. 4-5 C bis E). Außerdem wurden Autophagosomen detektiert (Abb. 4-5 E).

Im Folgenden wurde das Speichermaterial in *Gnptab^{ki}*-MEFs mittels Differenzial-Interferenzkontrast-Mikroskopie untersucht. Mikroskopisch ist in *Gnptab^{ki}*-MEFs die Akkumulation von Speichermaterial nachweisbar. Dabei ist das Cytoplasma mit einer hohen Anzahl kugelförmiger Einschlüsse gefüllt, die in Wildtyp-MEFs nicht zu sehen waren (Abb. 4-6).



Abb. 4-6: Differenzial-Interferenzkontrast-Mikroskopie von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}***-MEFs** Differenzial-Interferenzkontrast-Mikroskopie von Wildtyp (Wildtyp)- und *Gnptab^{ki}*(*ki*)- MEFs nach zwei Tagen Kultivierungszeit. Maßstab: 15 μm.

Immunfluoreszenzmikroskopische und Western-Blot-Analysen zeigten zudem, dass es sich bei den zellulären Einschlüssen um LAMP-1-positive lysosomale Strukturen handelt (Abb. 4-7 A). LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) ist ein 140 kDa lysosomales, integrales Membranprotein, dessen Konzentration in *Gnptab^{ki}*-MEFs aufgrund der Anzahl und Größe lysosomaler Strukturen im Vergleich zu Wildtyp-MEFs um das 2-fache erhöht ist (Abb. 4-7 B).



Abb. 4-7: Immunfluoreszenzmikroskopische und Western-Blot-Analysen von LAMP-1 in Wildtypund *Gnptab^{ki}*-MEFs

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen von LAMP-1 in Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki} (ki)*- MEFs. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisert und mit einem monoklonalen LAMP-1-Antikörper (grün) dargestellt. Maßstab: 15 µm (**A**). LAMP-1-Western-Blot-Analyse in Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki} (ki)*-MEFs. 100 µg Zellhomogenat wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit einem LAMP-1-Antikörper analysiert. β-Tubulin diente als Ladekontrolle (**B**).

4.2.2 Charakterisierung von Oligosacchariden im Speichermaterial

Ein Großteil der bekannten lysosomalen Hydrolasen sind Glycosidasen, die am Abbau von Oligosaccharidstrukturen an Glycoproteinen, Glycolipiden und Proteoglycanen beteiligt sind. Um zu untersuchen, ob Zuckerstrukturen in den Lysosomen der *Gnptab^{ki}*-Mäuse gespeichert sind, wurde Hirngewebe zunächst histochemisch untersucht. Durch PAS-Färbung (*Periodic Acid Schiff reaction*) können Oligosaccharidstrukturen histochemisch dargestellt werden. Die Färbung wurde von Dr. Melanie Neumann (HEXT *Core Facility Mousepathology*, UKE) durchgeführt.



Abb. 4-8: Akkumulation von PAS-positivem Speichermaterial im Cerebellum von Gnptab^{ki}-Mäusen

Hirne von 10 Monate alten Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki} (ki)*-Mäusen wurden mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. An sagitalen Hirnschnitten (50 μ m) wurden Zuckerstrukturen mit PAS-Reagenz angefärbt. Zelluläre Strukturen wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Dargestellt ist die Molekularschicht des Cerebellums. PAS-positive Strukturen (Pfeile). Maßstab: 50 μ m. PAS-positive Strukturen konnten in allen Teilen des Cerebellums der *Gnptab^{ki}*-Maus detektiert werden. Insbesondere in der weißen Substanz und in der Molekularschicht wurde eine starke Färbung nachgewiesen (Abb. 4-8). Im Cerebellum von Wildtyp-Mäusen hingegen konnten keine PAS-positiven Strukturen detektiert werden.

4.2.2.1 Identifizierung von N-Glycanstrukturen im Speichermaterial

Zur Identifizierung akkumulierender Zuckerstrukturen wurden freie Oligosaccharide aus dem Hirn von 6 Monate alten Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen isoliert und anschließend mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert. Eine Quantifizierung der Oligosaccharide erfolgte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Zugabe von 520 pmol GlcNAc₁Man₁ als Standard. Durchgeführt wurden die massenspektrometrischen Analysen von Dr. W. Morelle aus der Arbeitsgruppe von Dr. J.-C. Michalski, Universität Lille, Frankreich.

Im Hirn von Wildtyp-Mäusen stellt Glycogen in diesem Alter die quantitativ häufigste Zuckerstruktur dar und ist als Tetra- bis Oktomere (Hex4 bis Hex8) detektierbar. Im Hirn der *Gnptab^{ki}*-Mäuse stellen hingegen freie N-Glycanstrukturen vom Mannosereichen (GlcNAcMan₂ - GlcNAcMan₄, Abb. 4-9 A) und vom komplexen Typ die quantitativ häufigsten Zuckerstrukturen dar. Die komplexen N-Glycane weisen alle terminale Fucosereste auf. Die quantitativ häufigste Zuckerstruktur ist vom komplexen Typ (Fuc₁Gal₁Man₂GlcNAc₂; m/z 1345). Die quantitative Analyse ergab, dass diese Oligosaccharide im Hirngewebe der 6 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäuse mit einer Konzentration von 500 pmol Fuc₁Gal₁Man₂GlcNAc₂/mg Hirngewebe angereichert sind (Abb. 4-9 B). Hingegen liegt die Speicherung anderer fucosylierter N-Glycane zwischen 33 pmol/mg für Fuc₃Gal₃Man₃GlcNAc₄ (m/z 1345) und 120 pmol/mg Hirngewebe für Fuc₂Gal₁Man₃GlcNAc₃ (m/z 1969). Mannose-reiche N-Glycane werden in ähnlichen Mengen gespeichert. So akkumulieren 99 pmol Man₂GlcNAc/mg Hirngewebe (m/z 722) und 50 pmol Man₂GlcNAc₄/mg Hirngewebe 6 Monate alter *Gnptab^{ki}*-Mäusen (m/z 1130).



Abb. 4-9: Massenspektrometrische Analyse der freien Oligosaccharide im Hirn von $Gnptab^{ki}$ -Mäusen

Massenspektrometrische Identifizierung von Zuckerstrukturen im Hirn 6 Monate alter Wildtyp (wt)- und *Gnptab*^{ki} (ki)-Mäuse. Freie Oligosaccharide wurden permethyliert und im Reflektionsmodus für positive Ionen mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert. Die Massen und Strukturen der häufigsten Oligosaccharide sind eingezeichnet; Kontamination von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (*) (A). Quantifizierung der 2-Aminobenzamid-gekoppelten Oligosaccharide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (**B**). Die Monosaccharide wurden wie folgt dargestellt: Fucose (Δ), Mannose (\bullet), Galactose (\circ), N-Acetylglucosamin (\blacksquare).

Zur Verifizierung dieser Daten wurden Hirnschnitte und MEFs mit Hilfe von Fucosespezifischen Lektinen untersucht. Lektine sind Proteine meist pflanzlichen Ursprungs, die eine hohe Konformations- und Zuckerspezifität aufweisen. So binden die Lektine
Lotus tetragonolobus (LTA), Ulex europaeus (UEA) und Aleuria Aurantia (AAL) Fucose-haltige Oligosaccharide. LTA bindet bevorzugt an α 1,3-verknüpfte Fucose, UEA an α 1,2-verknüpfte Fucose und AAL an α 1,6-verknüpfte Fucose (Kratz *et al.*, 2010).



Abb. 4-10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse fucosylierter Glykane an Hirnschnitten und MEFs von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen

Färbung fucosylierter N-Glycane mit dem *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA, rot) im Cerebellum 10 Monate alter Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäuse. Sagitalschnitte (50 μ m) vom Hirn transkardial perfundierter Mäuse wurden permeabilisiert und mit biotinyliertem Lektin (rot) inkubiert. Maßstab: 50 μ m. Molekularschicht (M), Purkinje-Zellschicht (P), Körnerschicht (Ks) (A). Detektion fucosylierter N-Glycane mit *Aleuria Aurantia* agglutinin (AAL) in Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-MEFs. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisert, mit dem biotinyliertem Lektin AAL (rot) inkubiert. Maßstab: 15 μ m (B). Lysosomale Membranen wurden parallel zur Lektinfärbung mit einem Antikörper gegen LAMP-1 (grün) markiert. *Merge* stellt die Überlagerung der Abbildungen LAMP-1 und LTA bzw. AAL da. *Inset* ist die Detailaufnahme von dem in der *merge*-Abbildung begrenzten Bereich. Gelb zeigt die Kolokalisation.

Hirnschnitte (50 μ m) von 10 Monate alten Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen wurden permeabilisert und mit biotinyliertem LTA für 3 Tage inkubiert. Nach Inkubation mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorophor erfolgte die mikroskopische Auswertung. Die Färbung mit LTA zeigte die Akkumulation von N-Glycanen mit α 1,3-gekoppelten terminalen Fucoseresten insbesondere in der Molekularschicht (M) des Cerebellums von *Gnptab^{ki}*-Mäusen. Die LTA-positiven Zellen in der Molekularschicht weisen zudem eine starke überlagernde LAMP-1-Färbung auf, was auf eine Anreicherung der Zuckerstrukturen in Lysosomen hinweist. In Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen konnten keine LTA-positiven Strukturen detektiert werden (Abb. 4-10 A). In Wildtypund *Gnptab^{ki}*-MEFs hingegen waren nur AAL-positive N-Glycane mit terminal α 1,6verknüpften Fucoseresten darstellbar. Die Lokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1 zeigte, dass die fucosylierten N-Glycane lysosomal lokalisiert sind. In den *Gnptab^{ki}*-MEFs ist die starke Anreicherung von Lektin-positivem Material in vergrößerten lysosomalen Strukturen deutlich zu erkennen (Abb. 4-10 B).

Um zu bestimmen, welche Zellpopulationen fucosylierte N-Glycanstrukturen speichern, wurden von Dr. Michaela Schweizer (*Scientific Service Group Morphology*, ZMNH, Hamburg) Semidünnschnitte (0,5 μ m) und Ultradünnschnitte (60 nm) von Hirnen angefertigt und diese mit Toluidin und *Aleuria Aurantia* agglutinin (AAL) angefärbt. Dargestellt durch die dichten und dunklen Strukturen in den Toluidin-gefärbten Semidünnschnitten von Hirngewebe 9 Monate alter Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäuse, zeigt sich der Verlust von Zellen in der Körnerzellschicht und die Degeneration der Purkinje-Zellen im Hirn von *Gnptab^{ki}*-Mäusen (Abb. 4-11 A und B). AAL-positive Strukturen konnte insbesondere in der Purkinje-Zellschicht vom Cerebellum der *Gnptab^{ki}*-Mäuse detektiert werden. Keine AAL-positiven Strukturen wurden hingegen im Cerebellum von Wildtyp-Mäusen beobachtet (Abb. 4-11 C und D). Elektronenmikroskopische Analysen zeigen die Akkumulation von α 1,6-fucosylierten N-Glycanstrukturen in Purkinje-Zellen, Neuronen der Körnerschicht, Astrozyten, Mikroglia, Perizyten und Endothelzellen von Blutgefäßen in *Gnptab^{ki}*-Mäusen (Abb. 4-11 E-K).



Abb. 4-11: Elektronenmikroskopische Analyse von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen 9 Monate alter Wildtyp und *Gnptab^{ki}*- Mäuse nach Lektinfärbung

Toluidin- und Lektinfärbung in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen 9 Monate alter Mäuse. Toluidinangefärbte Semidünnschnitte (0,5 μ m) vom Cerebellum von Wildtyp- (**A**) und *Gnptab^{ki}*-Mäusen (**B**). Die dunklen Strukturen (Pfeile in B) deuten auf Speichermaterial hin. Semidünnschnitte vom Cerebellum von Wildtyp- (**C**) und *Gnptab^{ki}*-Mäusen (**D**) und Ultradünnschnitte vom Cerebellum von *Gnptab^{ki}*-Mäusen (60nm, **E-F**) wurden mit biotinyliertem *Aleuria Aurantia* agglutinin (AAL) angefärbt. AAL-DAB (Diaminobenzidin) positives Speichermaterial (Pfeile in **D** und Pfeilköpfe in **E-K**) wurde in Purkinje-Zellen (**E**), Neuronen der Körnerschicht (**F**), Astrozyten (**G**), Mikroglia (**H**), Perizyten (**J**) und Endothelzellen von Blutgefäßen detektiert (**K**). Purkinje-Zellschicht (P), Körnerzellschicht (K), Blutgefäße (Bg), Nucleus (N). Maßstab: A-D = 20 µm, E-K = 1 µm.

4.2.2.2 Identifizierung von Glycosaminoglycanen im Speichermaterial

Neben freien Zuckern stellen die Oligosaccharidketten der Glycosaminoglycane (GAGs) Substrate der lysosomalen Glycosidasen dar. Deshalb wurde im Folgenden die Degradation von GAGs in Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs untersucht. Dazu wurden neu synthetisierte GAGs in MEFs mit Na[³⁵SO₄] metabolisch markiert und anschließend über DEAE (Diethylaminoethylcellulose)-Säulen aufgereinigt. Die stark negativ geladenen GAGs binden an die positiv geladene DEAE-Sepharose. Anschließend

wurden Heparansulfate mittels Heparinase I, II und III fragmentiert und die dadurch verbleibenden Chondroitinsulfatketten über DEAE-Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung der Heparansulfate erfolgte durch enzymatischen Verdau von Chondroitinsulfaten mittels Chondroitinase ABC. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Radioaktivität der beiden Fraktionen. In *Gnptab^{ki}*-MEFs wurde 1000-fach mehr [³⁵SO₄]-Radioaktivität an intrazellulärem Heparansulfat, und 1700-fach mehr [³⁵SO₄]-Radioaktivität an intrazellulärem Chondroitinsulfat pro µg Protein detektiert als in Wildtyp-MEFs (Abb. 4-12 A).



Abb. 4-12: Metabolische Markierung von Glycosaminoglycanen in MEF von Wildtyp- und Gnptab^{ki}-Mäusen

GAGs wurden in Wildtyp (wt)- und Gnptab^{ki} (ki)-MEFs mit Na[³⁵SO₄] für 48 h metabolisch markiert. Anschließend wurden die Zellen weitere 48 h in nicht-radioaktivem Medium inkubiert und die GAGs über DEAE-Sepharose Säulen aus Zellhomogenaten aufgereinigt. Heparansulfate wurden mittels Heparinase I, II und III fragmentiert und die dadurch verbleibenden Chondroitinsulfatketten über DEAE-Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung der Heparansulfate erfolgte durch enzymatischen Verdau von Chondroitinsulfaten mittels Chondroitinase ABC. Angezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung. Die Wildtyp-Werte wurden gleich 1 gesetzt (*P < 0.05, n = 3) (A). Die Bestimmung des Molekulargewichts von an der Zelloberfläche und intrazellulär-lokalisierten Heparan- und Chondroitinsulfate erfolgte über eine CL-6B Säule. Zur Bestimmung von GAGs an der Zelloberfläche wurden die Zellen mit Na[³⁵SO₄] für 48 h metabolisch markiert und anschließend für 20 min trypsiniert. Dadurch werden die Proteoglykane proteolytisch verdaut und die GAGs in die Trypsinlösung freigesetzt. Zelloberflächen-GAGs wurden anschließend mittels DEAE-Sepharose-Säulen aus der Trypsin-Lösung aufgereinigt. Intrazelluläre GAGs wurden nach 48 h metabolischer Markierung und anschließender Inkubation der Zellen mit nicht-radioaktivem Medium für weitere 48 h aus Zellhomogenaten aufgereinigt. Nach enzymatischer Trennung in Chondroitin- und Heparansulfat wurden diese auf eine CL-6B Säule aufgetragen. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/15 min und die Fraktionen wurden im Farktionssammler aufgefangen. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des Bettvolumens und des Totvolumens der Säule und anschließender Berechnung des Kav-Wertes (siehe 3.4.13). Dieser Wert enstpricht einem festgelegten Molekulargewicht (B).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Molekulargewichte von GAGs an der Zelloberfläche und von intrazellulären GAG-Fraktionen gelchromatographisch (*size exclusion chromatography*) bestimmt. Die durchschnittliche molare Masse von

Heparansulfat-GAGs, die an Zelloberflächen-Proteoglycanen von Wildtyp-MEFs zu finden sind, beträgt 49 kDa, während die in *Gnptab^{ki}*-MEFs 58 kDa beträgt. Die Masse der Chondroitinsulfate wurde an Zellen beider Genotypen auf 30 kDa bestimmt (Abb. 4-12 B). In *Gnptab^{ki}*-MEFs akkumuliert Heparansulfat intrazellulär mit einer Masse von 10 kDa und Chondroitinsulfat mit 30 kDa. In Wildtyp-MEFs konnten keine intrazellulären Massen bestimmt werden, da Heparansulfat- und Chondroitinsulfat vollständig abgebaut wird.. Die Experimente zeigen, dass die Degradation von GAGs in *Gnptab^{ki}*-MEFs stark eingeschränkt ist, was zur Speicherung von GAGs führt.

4.2.3 Charakterisierung von Lipiden im Speichermaterial

Neben Oligosacchariden und Protetoglycanen werden Lipide in Lysosomen abgebaut. Um zu untersuchen, ob die lysosomale Degradation von Lipiden bei MLII eingeschränkt ist, wurden Hirngewebe und Fibroblasten der *Gnptab^{ki}*-Mäuse auf die Akkumulation von Lipiden massenspektrometrisch und histochemisch untersucht.

4.2.3.1 Identifizierung von G_{M2}- und G_{M3}-Gangliosiden und Bis(monoacylglycero)phosphat im Speichermaterial

Nach Methanol/Chlorofom-Extraktion aus Hirngewebe von 5 und 10 Monate alten Wildtyp und *Gnptab^{ki}*-Mäusen wurden die isolierten Lipide durch *Reversed-Phase*-Chromatographie in neutrale und anionische Fraktionen aufgetrennt. Die anionischen und neutralen Lipide wurden mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie im Labor von Dr. R. Käkelä, Universität Helsinki, Finnland quantitativ untersucht (Käkelä *et al.*, 2003; Jabs *et al.*, 2008).

Ganglioside wurden durch die Vorläufer-Ionen Analyse bei 290 m/z detektiert. In Hirnextrakten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen waren die Monosialogangliosidkonzentrationen von G_{M2}- und G_{M3}-Gangliosiden um das 1,8-fache erhöht gegenüber dem Wildtyp-Hirngewebe. Zusätzlich konnte die Speicherung von Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) nachgewiesen werden (Abb. 4-13 A und B). In Hirnextrakten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen war BMP im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen 1,3 - 1,9-fach erhöht. Im Alter von 10 Monaten steigerte sich die Akkumulation von BMP, G_{M2} und G_{M3} in Hirnextrakten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen auf 2,3-fach höhere Werte im Vergleich zum Wildtyp-Gewebe

(siehe 8.2). Die Analyse der neutralen Lipide zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und *Gnptab*^{ki}-Mäusen.



Abb. 4-13: Massenspektrometrische Analyse der Lipidkomposition im Hirn von Wildtyp- und Gnptab^{ki}-Mäusen

Die anionischen Lipidfraktionen, isoliert aus Hirngewebe von 5 Monate alten Wiltdtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäuse, wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Ganglioside wurden entweder als einfach geladene (1-) oder zweifach geladene (2-) Ionen detektiert. Die Intensitäten wurden auf das Signal des GD1-Gangliosides normalisiert (**A**). Relative Intensitäten der aus dem Hirngewebe von 10 Monate alten Mäusen isolierten anionischen Lipide. Die Gesamtintensität aller detektierbaren Lipide in der anionischen Fraktion wurden auf 100 % gesetzt. (* P < 0,05) (**B**). Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Sulfatid (Sulf), α -Hydroxysulfatid (Sulf-OH), Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP), Phosphatidylglycerol (PG)

Zur Verifizierung der Gangliosid-Speicherung wurden Hirnschnitte aus 8 Monate alten Wiltyp- und *Gnptab*^{ki}-Mäusen mit Antikörpern gegen G_{M2}- und G_{M3}-Ganglioside histochemisch analysiert.

Immunhistochemische Färbungen von G_{M2} - und G_{M3} -Gangliosiden am retrosplenialen Cortex 8 Monate alter Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäuse bestätigten die Akkumulation in vesikulären Strukturen von Neuronen der Großhirnrinde von *Gnptab^{ki}*-Mäusen. Insbesondere konnte eine starke G_{M2} -Immunreaktivität in Hirnschnitten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen Mäusen festgestellt werden. In Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen konnten keine Akkumulationen von G_{M2} - und G_{M3} -Gangliosiden festgestellt werden (Abb. 4-14).



Abb. 4-14: Histochemische Detektion von G_{M2} - und G_{M3} -Gangliosiden an Hirnschnitten von $Gnptab^{ki}$ -Mäusen

Sagitalschnitte (35 μ m) vom Hirn 8 Monate alter transkardial perfundierter Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäuse wurden permeabilisiert und mit HRP-gekoppelten G_{M2}- und G_{M3}-Antikörpern inkubiert. Die Färbung wurde mittels DAB (Diaminobenzidin)-Reaktion visualisiert und mit Nissl gegengefärbt. Dargestellt ist der retrospleniale Cortex. Maßstab: 20 μ m.

Neben G_{M2} - und G_{M3} -Gangliosiden wurde die Speicherung von BMP im Hirn der *Gnptab*^{ki}-Mäuse massenspektrometrisch festgestellt. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BMP wurde anschließend untersucht, ob BMP auch in *Gnptab*^{ki}-MEFs gespeichert wird. Die Färbung von BMP in Wildtyp- und *Gnptab*^{ki}- MEFs zeigt, dass BMP in LAMP-1-positiven lysosomalen Vesikeln lokalisiert ist und dass die Anzahl und Größe BMP-positiver Vesikel in *Gnptab*^{ki}- MEFs stark erhöht ist.



Abb. 4-15: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von BMP in Wildtyp- und Gnptab^{ki}-MEFs

Detektion von BMP (grün) und LAMP-1 (rot) in Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-MEFs. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisert und mit Antikörpern gegen LAMP-1 und BMP inkubiert. Maßstab: 15 μ m. *Merge* stellt die Überlagerung der Abbildungen LAMP-1 und BMP da. *Inset* ist die Detailaufnahme von dem in der *merge*-Abbildung begrenzten Bereich. Gelb zeigt die Kolokalisation.

4.2.3.2 Identifizierung von Cholesterin im Speichermaterial

Bei der lysosomalen Degradation von zelleigenen Membranstrukturen als auch von extrazellulären, endozytiertem LDL wird unter anderem Cholesterin luminal freigesetzt, das normalerweise durch die lysosomalen Proteine Npc1 und Npc2 wieder in das Cytosol überführt wird (Goldstein und Brown, 1976). Um zu untersuchen, ob Cholesterin in neuronalem Gewebe und in Fibroblasten von *Gnptab^{ki}*-Mäusen akkumuliert, wurde Cholesterin mit dem fluoreszierenden Antibiotikum Filipin angefärbt und mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analyse detektiert.

Im Hirn von 8 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen konnte akkumulierendes Cholesterin in großen Teilen des zentralen Nervensystems detektiert werden, während keine Filipinreaktivität im Wildtyp-Gewebe nachweisbar war. Eine starke Färbung mit Filipin war in der Purkinje- und Körnerschicht des Cerebellums der *Gnptab^{ki}*-Mäusen zu sehen (Abb. 4-16 A). In kultivierten *Gnptab^{ki}*-MEFs erkennt man zudem eine deutliche Anreicherung von Cholesterin in LAMP-1-positiven lysosomalen Vesikeln (Abb. 4-16 B).



Abb. 4-16: Fluoreszenzmikroskopische-Analyse der Cholesterinverteilung im Cerebellum und in MEFs von Wildtyp und *Gnptab^{ki}*-Mäusen

Anfärbung von freiem Cholesterin mittels Filipin im Cerebellum 8 Monate alter Wildtyp (wt)- und $Gnptab^{ki}$ (ki)-Mäuse. Sagitalschnitte (35 µm) vom Hirn transkardial perfundierter Mäuse wurden permeabilisiert und mit Filipin (weiß) inkubiert. Maßstab: 20 µm. Körnerschicht (Ks), Purkinje-Zellschicht (P) (**A**). Detektion von freiem Cholesterin mit Filipin (blau) in Wildtyp (wt)- und $Gnptab^{ki}$ (ki)-MEFs. Die Zellen wurden fixiert und durch Inkubation mit Filipin (blau) permeabilisert. Lysosomale Membranen wurden parallel zur Filipinfärbung mit einem Antikörper gegen LAMP-1 (rot) markiert. *Merge* stellt die Überlagerung der Abbildungen Filipin und LAMP-1 dar. *Inset* ist die Detailaufnahme von dem in der *merge*-Abbildung begrenzten Bereich. Rosa zeigt die Kolokalisation. Maßstab: 15 µm (**B**).

Im Hirn von *Gnptab*^{ki}-Mäusen konnte die Akkumulation von fucosylierten und Mannose-reichen N-Glycanen, BMP, G_{M1}- und G_{M2}-Gangliosiden und Cholesterin detektiert werden. Mittels Lektin- bzw. Filipinfärbung wurde die Speicherung von fucosylierten Oligosacchariden bzw. Cholesterin im Hirn und MEFs von *Gnptab*^{ki}-Mäusen verifiziert. Die Speicherung von BMP wurde in *Gnptab*^{ki}-MEFs verifiziert. Zudem wurde in *Gnptab*^{ki}-MEFs die Akkumulation von Heparan- und Chondroitinsulfat detekiert. Dieses Speichermaterial deutet auf die Fehlsortierung von α -L-Fucosidase, α -Mannosidase (MAN2b1, die $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ and $\alpha(1-6)$ verbundene Mannosereste hydolysiert), β -Galactosidase und β -Hexosaminidase hin. Die Fehlsortierung von Npc2 führt zur Speicherung von Cholesterin.

4.3 Neurodegeneration in *Gnptab*^{ki}-Mäusen

4.3.1 Progressiver Verlust neuronaler Zellen in Cerebellum von *Gnptab*^{ki}-Mäusen

Mucolipidose Typ II ist eine neurometabolische Erkrankung, die klinisch unter anderem durch mentale und motorische Retardierung charakterisiert ist. *Gnptab^{ki}*-Mäuse zeigen zudem motorische Auffälligkeiten wie *clasping* (Anklammern der Hinter- und Vorderläufe an den Körper beim Herausnehmen aus dem Käfig) und unkoordinierte Bewegungen, die auf einen neurodegenerativen Phänotyp hinweisen. Zur genaueren Analyse der neurodegenerativen Prozesse wurden Hirne von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen histochemisch untersucht.

Die immunhistochemische Färbung der Purkinje-Zellschicht durch das Calciumbindende Protein Calbindin zeigte einen umfangreichen Verlust von Purkinje-Zellen in 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen. Ein charakteristisches Merkmal von lysosomalen Speichererkrankungen ist die Ausbildung axonaler Spheroide der Purkinje-Zellen (Walkley *et al.*, 2010), welche auch im Hirn der *Gnptab^{ki}*-Mäuse detektiert werden konnten (Abb. 4-17 A).

Um den Verlauf der Neurodegeneration im *Gnptab^{ki}*-Mausmodell zu untersuchen wurden 4, 9 und 12 Monate alte *Gnptab^{ki}*-Mäuse histologisch untersucht. Der Verlust der neuronalen Zellen und die Hirnatrophie verlaufen in *Gnptab^{ki}*-Mäusen progressiv, wobei ein signifikanter Größenunterschieden des Cerebellums bereits in 4 Monate alten Mäusen erkennbar ist (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4-17 A ist deutlich der Größenunterschied des Cerebellums von 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erkennen.

Luxolblau besitzt eine hohe Affinität zu dem im Myelin enthaltenen Neurokeratin und wird daher zur Färbung von Myelin verwendet. Im Hirn von 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen zeigte sich eine starke Demyelinisierung (Abb. 4-17 B).



Abb. 4-17: Immunhistochemische Färbung des Cerebellum mit Calbindin und Luxolblau

Immunhistochemische Analysen des Cerebellums von 9 Monate alten Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (ki)-Mäusen. Sagitalschnitte (50 μ m) vom Hirn transkardial perfundierter Mäuse wurden permeabilisiert und mit HRP-gekoppeltem Calbindin-Antikörper inkubiert. Die Färbung wurde mittels DAB (Diaminobenzidin)-Reaktion visualisiert. Detektion von Purkinje-Zellen und axonalen Spheroiden (Pfeile) nach höherer Auflösung. Molekularschicht (M), Purkinje-Zellschicht (P), Körnerschicht (Ks), weiße Substanz (S). Maßstab: obere Reihe: 500 μ m; untere Reihe: 50 μ m (A). Die Färbung des Myelins erfolgte an Hirnschnitten (50 μ m) durch Luxolblau. Maßstab: obere Reihe: 500 μ m; untere Reihe: 50 μ m (B).

4.3.2 Astro- und Mikrogliose im Hirn von Gnptab^{ki}-Mäusen

Als Gliose bezeichnet man die Aktivierung von Gliazellen, wie Astroglia und Mikroglia, die eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen begleitet. Um zu untersuchen, ob Astroglia und Mikroglia in *Gnptab^{ki}*-Mäusen aktiviert werden, wurden an Hirnschnitten von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen die Expression des Astrozytenspezifischen Intermediärfilaments *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und des Makrophagen/Mikroglia-Markerprotein CD68 untersucht.

Starke GFAP- und CD68-Immunreaktivität konnte in allen Teilen des Hirns der 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäuse nachgewiesen werden. Die hypertrophen Astrozyten im Cerebellum und der Großhirnrinde zeigten eine prominente reaktive Astrogliose. Im Cerebellum wurde die Astrogliose besonders in der weißen Substanz, der Körner- und Purkinjezellschicht deutlich (Abb. 4-18 A). CD68-positive Gliazellen wurden insbesondere im Cerebellum, Hippocampus und dem Thalamus mit prominenter Mikrogliose in der weißen Substanz und der Molekularschicht des Cerebellums detektiert (Abb. 4-18 B). Außerdem konnte starke CD68-Immunreaktivität in der Großhirnrinde der *Gnptab^{ki}*-Mäuse festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine Astrogliose bzw. Mikrogliose im Hirn der Wildtyp-Mäuse detektiert werden.



Abb. 4-18: Reaktive Gliosen im Cerebellum, Cortex und Hippocampus von Gnptab^{ki}-Mäusen

Immunhistochemische Analysen des Cerebellum, Cortex und Hippocampus von 9 Monate alten Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäusen. Sagitalschnitte (50 μ m) vom Hirn transkardial perfundierter Mäuse wurden permeabilisiert und mit HRP-gekoppeltem (**A**) *glial fibrillary acid protein* (GFAP)-Antikörper (Astroglia) bzw. (**B**) CD68-Antikörper (Mirkoglia) inkubiert und mittels Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion visualisiert. Molekularschicht (M), Purkinje-Zellschicht (P), Körnerschicht (Ks), weiße Substanz (S). Maßstäbe: Cerebellum: 500 μ m, Cortex: 250 μ m, Hippocampus: 500 μ m, *Inset*: 50 μ m

4.3.3 Akkumulation von Autophagosomen im neuronalen Gewebe von *Gnptab^{ki}*-Mäusen

Durch den Prozess der Autophagie werden zelleigene, cytosolische Proteine und Zellorganellen von Membranen umschlossen (Autophagosomen), um anschließend der lysosomalen Degradation (Autophagolysosomen) zugeführt zu werden. Um zu untersuchen, ob es durch die Fehlsortierung lysosomaler Proteine bzw. Dysfunktion der Lysosomen zu einer Beeinträchtigung des Autophagieprozesses kommt, wurde die Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen im Hirn von *Gnptab^{ki}*-Mäusen analysiert. Zunächst wurde die Expression von LC3 (*Microtubule-associated proteins IA/IB light chain 3A*) untersucht. Während die LC3-I-Form im Cytosol lokalisiert ist, bindet die prozessierte, Phosphatidylethanolamin-konjugierte LC3-II-Form an die autophagosomale Membran. Die Menge von LC3-II korreliert dabei mit der relativen

Anzahl der Autophagosomen (Kabeya *et al.*, 2000). In Cerebellumhomogenaten von 10 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen ist im Vergleich zum Wildtyp ein signifikanter Anstieg der Isoform LC3-II nachweisbar. Die Expression von LC3-I hingegen ist in Wildtyp-und *Gnptab^{ki}*-Mäusen vergleichbar (Abb. 4-19 A und B).

Um zu überprüfen, ob die Bildungsrate von Autophagosomen im Cerebellum von *Gnptab^{ki}*-Mäusen erhöht ist, wurde zudem die Expression von Beclin1 analysiert. Beclin1 ist Teil des Beclin1-Vps34-Atg14L Komplexes, der die Ausbildung von autophagosomalen Membranen initiiert (Abb. 1-1) (Kang *et al.*, 2011). In Cerebellumhomogenaten von 10 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen konnten jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieses Proteins festgestellt werden (Abb. 4-19 A und B).



Abb. 4-19: Akkumulation von Autophagosomen im Cerebellum von Gnptabki-Mäusen

Western-Blot-Analyse von LC3 und Beclin1 in Homogenaten und p62 in TritonTM X-100-unlöslichen Fraktionen vom Cerebellum 10 Monate alter Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäuse. 100 µg Proteinhomogent bzw. gleiche Mengen TritonTM X-100-unlösliche Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit LC3-, Beclin1- und p62-Antikörpern analysiert. Gapdh und β-Tubulin dienten als Ladekontrolle (**A**). Die Quantifizierung der Proteinexpression von LC3-II, Beclin1 und p62 erfolgte densitometrisch und wurde auf β-Tubulin normalisiert. Angezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung. Die Wildtyp-Werte wurden gleich 1 gesetzt (*P < 0.05, n = 3) (**B**).

Ein weiteres Markerprotein für Autophagie ist p62 (*sequestosome 1*), das mit cytosolischen, ubiquitinierten Proteinen heteropolymere detergenz-resistente Strukturen ausbildet und an LC3-II bindet (Bjorkoy *et al.*, 2005; Wooten *et al.*, 2006) und den Abbau dieser ubiquitinierten Proteine mittels Autophagie vermittelt. In detergenzunlöslichen Fraktionen von Cerebellumhomogenaten von 10 Monate alten *Gnptab*^{ki}-Mäusen ist eine 1,8-fach erhöhte Konzentration von p62 detektierbar. Die Anreicherung p62-positiver Proteinaggregate im Cerebellum der *Gnptab^{ki}*-Mäuse deutet darauf hin, dass der Abbau ubiquitinierter Proteine durch Autophagie inhibiert ist (Abb. 4-19 A, B).

Die anschließende immunhistochemische Analyse von Hirnschnitten 11 Monate alter Mäuse zeigte die Akkumulation p62-positiver Strukturen im Soma von Neuronen der Hirnbrücke (*Pons*) von *Gnptab^{ki}*-Mäusen (Abb. 4-20 A). Zudem konnten p62-positive Proteinaggregate im Hippocampus, Cortex und der Körnerschicht des Cerebellums detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Neuronen von Wildtyp-Mäusen wurden diese Strukturen nicht detektiert. Doppelimmunfluorszenz-Färbungen für Markerproteine in Neuronen (NeuN), Astroglia (GFAP), Mikroglia (CD68) und Oligodendroglia (MBP) und p62 zeigte die neuronale Lokalisation dieser p62-positiven Strukturen (Abb. 4-20 B).



Abb. 4-20: Akkumulation von p62-positiven Aggregaten

Histologische Analysen von p62 im Hirn 11 Monate alter Mäuse. Immunhistochemie Analyse der Hirnbrücke (*Pons*) von Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Mäusen. Sagitalschnitte (50 µm) vom Hirn transkardial perfundierter Mäuse wurden permeabilisiert und mit HRP-gekoppeltem p62 Antikörper inkubiert und mittels Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion visualisiert. Maßstab: 5 µm (**A**). Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen von p62 (rot) mit Markern für Neurone (NeuN), Astroglia (GFAP), Mikroglia (CD68) und Oligodendroglia (MBP) (grün) (**B**).

In Neuronen von *Gnptab^{ki}*-Mäusen ist die basale Autophagie aufgrund dysfunktioneller Lysosomen gestört, was zur Akkumulation von LC-II und p62 führt.

4.4 Transport lysosomaler Proteine in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Fibroblasten

Untersuchungen an *Gnptab^{ki}*–MEFs zeigen, dass einige lysosomale Proteine unabhängig von M6P zu den Lysosomen transportiert werden können. In Kapitel 4.1.1

wurde dies durch *Pulse-Chase-*Experimente und Western-Blot-Analysen für die lysosomale Protease Cathepsin D gezeigt. Zudem konnte in vorherigen Studien am *Gnptab*^{ki}-Mausmodell gezeigt werden, dass Cathepsin B in neuronalem Gewebe als reifes, lysosomales Protein vorliegt (Kollmann *et al.*, 2012). In Studien an MLII-Patientenzellen wurde zudem die vermehrte Sekretion und Reduktion der intrazellulären Spiegel an saurer Sphingomyelinase (ASM) festgestellt (Hurwitz *et al.*, 1994). Über welche Transportmechanismen z. B. Cathepsin D, Cathepsin B und saure Sphingomylelinase zu Lysosomen gelangen, ist noch unklar, aber ein Kandidat stellt der *multi-ligand type-1* Transmembranrezeptor Sortilin da.

Um zu analysieren, ob Sortilin am M6P-unabhängigen Transport lysosomaler Proteine beteiligt ist, wurden *Gnptab^{ki}*-Mäuse mit Sortilin-defizienten Mäusen (S^{ko}) (Jansen *et al.*, 2007) gekreuzt (*Gnptab^{ki}*/S^{ko}). Anschließend wurde die Expression, Lokalisation und der Transport der lysosomalen Proteine Cathepsin D, Cathepsin B und saure Sphingomyelinase untersucht.



Abb. 4-21: Relative mRNA-Expression von *Ctsb*, *Ctsd* und *Smpd1* in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs

Aus primären MEFs von Wildtyp (wt)-, *Gnptab^{ki}* (ki)-, S^{ko}-, und *Gnptab^{ki}*/S^{ko} (ki/ S^{ko})-Mäusen wurde RNA isoliert um durch *realtime*-PCR die relative mRNA-Expression von *Ctsb*, *Ctsd* und *Smpd1* im Vergleich zum Wildtyp zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_1$ -Methode, wobei eine Normalisierung auf die mRNA-Expression von β-Aktin erfolgte und die Expression im Wildtyp gleich 1 gesetzt wurde. (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3). Die mRNA-Expression von folgenden lysosomalen Proteinen wurde gemessen: Cathepsin B (*Ctsb*), Cathepsin D (*Ctsd*), saure Sphingomyelinase (*Smpd1*) (**P* < 0.05)

Zunächst wurde mittels *realtime*-PCR die mRNA-Expression von Cathepsin B, Cathepsin D und saurer Sphingomyelinase in *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs bestimmt. In *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs ist die Expression von Cathepsin B um das 2,8- bzw. 2,2-fache erhöht, wohingegen in S^{ko}-MEFs der Unterschied nur bei 1,3 liegt. Cathepsin D ist in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}- MEFs 1,6-fach und 2,0-fach signifikant erhöht. Die mRNA-Expression der sauren Sphingomyelinase ist in allen Genotpyen gleich.

Um zu untersuchen, ob Cathepsin B, Cathepsin D und saure Sphingomyelinase in Fibroblasten von $Gnptab^{ki}/S^{ko}$ -Mäusen überhaupt noch zu den Lysosomen gelangen, wurde ihre intrazelluläre Lokalisation mittels Doppelimmunfluoszenzmikroskopie an Fibroblasten analysiert, die aus der Lunge der adulten Mäuse isoliert wurden.

Cathepsin D (Abb. 4-22 A), Cathepsin B (Abb. 4-22 B) und saure Sphingomyelinase (Abb. 4-22 C) kolokalisieren in *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Lungenfibroblasten mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP-1. Somit könne Cathepsin D, Cathepsin B und saure Sphingomyelinase sowohl M6P- als auch Sortilin-unabhängig zu den Lysosomen transportiert werden.



Abb. 4-22: Fluoreszenzmikroskopische-Analyse von Cathepsin D, Cathepsin B und saurer Sphingomyelinase in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Lungenfibroblasten

Detektion von Cathepsin D (A, rot), Cathepsin B (B, rot) und saure Sphingomyelinase (C, rot) in Wildtyp (wt)-, *Gnptab^{ki}* (*ki*)-, S^{ko}-, und *Gnptab^{ki}*/S^{ko} (*ki*/ S^{ko})-Lungenfibroblasten. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisert und mit Antikörpern gegen Cathepsin D, Cathepsin B und saure Sphnigomyelinase (rot) und LAMP-1 (grün) inkubiert. *Inset* ist die Detailaufnahme von dem in der *merge*-Abbildung begrenzten Bereich. Gelb zeigt die Kolokalisation. Maßstab: 15 µm.

Zur genaueren Untersuchung der Syntheserate, Prozessierung und Sortierung von Cathepsin D in S^{ko}- und *Gnptab*^{ki}/S^{ko}-Lungenfibroblasten wurden zusätzlich *Pulse-Chase*-Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und anschließend geerntet (*Pulse*) oder für weitere 5 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*). Anschließend wurden aus den Zellen und den Medien Extrakte hergestellt aus denen Cathepsin D immunpräzipitiert wurde.



Abb. 4-23: Synthese, Transport und Prozessierung von Cathepsin D in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Lungenfibroblasten

Wildtyp (wt)-, *Gnptab^{ki}* (*ki*)-, S^{ko}-, und *Gnptab^{ki}*/S^{ko} (*ki*/ S^{ko})-Lungenfibroblasten wurden für 45 min mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und anschließend geerntet (Spur 1, 3, 5 und 7) oder für 5 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*) und danach geerntet (Spur 2, 4, 6 und 8). Cathepsin D wurde von Zellhomogenaten und Chasemedien immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend fluorographisch detektiert. Anschließend wurden Proteinbanden ausgeschnitten und die Menge des radioaktiv markierten Proteins durch Szintillationsmessung bestimmt. *precursor*, Vorläuferpotein (p); intermediäre Form (i).

Cathepsin D wird als 53 kDa Vorläuferprotein synthetisiert, das im endosomalen Kompartiment zu einer 39 kDa intermediären Form prozessiert wird. Im *Pulse-Chase*-Experiment an *Gnptab^{ki}*-MEFs wurde bereits gezeigt, dass die Konzentration an reifem lysosomalen Cathepsin D reduziert ist und die Vorläuferform von diesen Zellen vermehrt sezerniert wird (siehe 4.1.1). Dies wurde in hier durchgeführten *Pulse-Chase*-Experimenten bestätigt (Abb. 4-23, Spur 1- 4, 8, 9). In *Gnptab^{ki}*-Lungenfibroblasten wurde jedoch nur 74 % und in Wildtyp-Lungenfibroblasten 42 % sezerniert (Abb. 4-23, Spur 8, 9), im Vergleich zu 80 % und 62 % in *Gnptab^{ki}* – und Wildtyp-MEFs (siehe 4.1.1). Vergleicht man S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}- mit Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Lungenfibroblasten sieht man, dass die Sortilin Defizienz keinen zusätzlichen Effekt auf den Transport und Prozessierung von Cathepsin D hat (Abb. 4-23, Spur 2, 4, 6, 8). Während der 5-stündigen Chasephase sezernieren die S^{ko}-Lungenfibroblasten wie Wildtyp-Lungenfibroblasten ca. 40 % des synthetisierten Cathepsin D (Abb. 4-23, Spur 11). Der Transport und die Prozessierung von Cathepsin D in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Lungenfibroblasten (Abb. 4-23, Spur 8) und die Sekretion in das Medium (Abb. 4-23, Spur 12) ist hingegen mit der von *Gnptab^{ki}*-Lungenfibroblasten (Abb. 4-23, Spur 4, 10) vergleichbar. Beide Genotypen sezernieren ca. 75 % des Vorläuferproteins von Cathepsin D.

4.5 Rezeptor-vermittelte Endozytose lysosomaler Proteine

Neben vesikulären, intrazellulären Transportmechanismen können lysosomale Enzyme Lysosomen auch durch Sekretion und Wiederaufnahme (*secretion-recapture, (Hickman et al., 1972*)) erreichen. Es konnte bereits für die lysosomalen Proteine Prosaposin und Cathepsin D gezeigt werden, dass der zur LDL (*low-density lipoprotein*)-Rezeptorfamilie gehörende Rezeptor LRP1 (LDL-*related protein 1*) sezerniertes Prosaposin und Cathepsin D glycosylierungs-unabhängig binden, internalisieren und zu Lysosomen transportieren kann (Hiesberger *et al.*, 1998; Derocq *et al.*, 2012).

Das lysosomale Enzym β -Glucocerebrosidase wird intrazellulär durch Bindung an LIMP-2 M6P-unabhängig zu den Lysosomen transportiert (Reczek *et al.*, 2007). Ob sezernierte β -Glucocerebrosidase auch über LIMP-2 endozytiert werden kann und ob weitere lysosomale Enzyme über Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie endozytiert werden, ist nicht bekannt.

4.5.1 Expression von LDLR, LRP1, LIMP-2 und MPR300 in Wildtyp-,*Gnptab^{ki}-*, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs

Zunächst wurde die mRNA-Expression von LRP1, dem LDLR, MPR300 und LIMP-2 in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs untersucht.

Die mRNA-Expression von LRP1 ist in *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs im Vergleich zum Wildtyp 1,5 - 3,5-fach erhöht. Signifikante Unterschiede waren in S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs detektierbar (Abb. 4-24). Die mRNA-Expression vom LDLR ist in allen Genotypen signifikant erhöht, während die Expression von LIMP-2 (*Scarb2*) in *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs unverändert ist. Signifkante Unterschiede in der Expression von MPR300 (*Igf2r*) konnten nur in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs detektiert werden. Es ist auffällig, dass sich die mRNA-

Expressionen der Endozytoserezeptoren LRP1, LDLR und MPR300 in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs sogar im Vergleich zu *Gnptab^{ki}*- und S^{ko}-MEFs signifikant unterscheiden (Abb. 4-24).



Abb. 4-24: Relative mRNA-Expression von *Lrp1*, *Ldlr*, *Scarb2* und *Igf2r* in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs

Aus primären MEFs von Wildtyp (wt)-, *Gnptab*^{ki} (ki)-, S^{ko}-, und *Gnptab*^{ki}/S^{ko} (ki/S^{ko})-Mäusen wurde RNA isoliert um durch *realtime*-PCR die relative mRNA-Expression von *Lrp1*, *Ldlr*, *Scarb2* und *Igf2r* im Vergleich zum Wildtyp zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei eine Normalisierung auf die mRNA-Expression von β-Aktin erfolgte und die Expression im Wildtyp gleich 1 gesetzt wurde. (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3, *P < 0.05).

Zur Untersuchung der Proteinexpression dieser Rezeptoren wurden Homogenate von Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs im Western-Blot analysiert.

Im Zelllysat von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs ist Sortilin als 105 kDa Protein detektierbar. In S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs ist Sortilin aufgrund des *knockouts* nicht exprimiert (Abb. 4-25). Die Expression von Sortilin ist in *Gnptab^{ki}*-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs um das 2,7-fache erhöht (Abb. 4-25 A und B). LRP1 besteht aus einer 85 kDa membranüberspannenden Domäne und einem 515 kDa extrazellulärem Fragment. Die 85 kDa Bande konnte in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs detektiert werden. Zusätzlich erscheint in den Zelllysaten der *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*- und aufgrund der lysosomalen Dysfunktion in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*-MEFs akkumuliert. LRP1 wird in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs geringer exprimiert als in Wildtyp-MEFs und S^{ko}-MEFs. Die Expression von LDLR ist in *Gnptab^{ki}*-MEFs 5-fach höher als in Wildtyp-MEFs. In S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs ist im Vergleich zum Wildtyp kein bzw. nur ein geringer Anstieg der Expression zu erkennen (Abb. 4-25 A und B).



Abb. 4-25: Proteinexpression von LRP1, LDLR und Sortilin in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}-*, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}/*S^{ko}-MEFs

Western-Blot-Analyse von LRP1, LDLR, und Sortlin in Wildtyp-, $Gnptab^{ki}$ (ki)-, S^{ko}- und $Gnptab^{ki}/S^{ko}$ (ki/S^{ko})-MEFs. 20 µg Proteinhomogenat wurden unter reduzierenden Bediungen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit LRP1, LDLR und Sortlin Antikörpern analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle (A). Densitometrische Quantifizierung der relativen Proteinexpression von Sortilin, LRP1 und LDLR auf GAPDH normalisiert. Der Wildtyp-Wert wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.2 Endozytose lysosomaler Enzyme

Extrazelluläre Proteine können durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von der Zelle aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Rezeptoren an der Endozytose lysosomaler Enzyme beteiligt sind.

Zunächst wurde die Endozytose von Mannose-6-phosporylierter, rekombinanter humaner Arylsulfatase B (ASB) untersucht. Dazu wurde [¹²⁵I]-markierte ASB in Anund Abwesenheit von RAP (receptor-associated protein) bzw. M6P im Medium mit Wildtyp-, Gnptab^{ki}- und Gnptab^{ki}/S^{ko}-MEFs für 20 min bei 37 °C inkubiert (Pulse). RAP und M6P sind kompetitive Inhibitoren, die spezifisch an Rezeptoren binden und dadurch die Bindung anderer Liganden inhibieren. So bindet RAP an Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie und M6P an MPRs. Nach dem Pulse folgte eine 8-stündige Inkubation der MEFs mit nicht-radioaktivem Medium (*Chase*), um den Degradationsprozess der ASB in den Lysosomen von Wildtyp-, Gnptab^{ki}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs zu untersuchen.

[¹²⁵I]-markierte, phosphorylierte ASB wurde in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs ca. 7fach mehr aufgenommen als von Wildtyp-MEFs. Die Zugabe von M6P inhibierte die Aufnahme um ca. 80 % in Wildtyp-MEFs, während RAP nur einen geringfügigen Effekt auf die Endozytose hatte. Nach 8-stündiger Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium erkennt man die 47 kDa reife Form von ASB insbesondere in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs. In Wildtyp-MEFs wird das Enzym in 8 h fast vollständig abgebaut, hingegen zeigt sich in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs eine beeinträchtige Degradation (Abb. 4-26).



Abb. 4-26: Endozytose [¹²⁵I]-markierter, phospohorylierter Arylsulfatase B in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}/S^{ko}*-MEFs

 $[^{125}I]$ -markierte, phosphorylierte Arylsulfatase B (ASB, 625000 cpm/ml) wurde in An- bzw. Abwesenheit von 320 µg/0,8 ml RAP bzw. 10 mM M6P im Medium von Wildtyp (wt)-, *Gnptab^{ki}* (*ki*)- und *Gnptab^{ki}/S^{ko}* (*ki/S^{ko}*)-MEFs für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (*Chase* = 0) oder für 8 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die $[^{125}I]$ -Banden durch Autoradiographie visualisiert. Durch Ausschneiden und Szintillationsmessung der Banden konnten die absoluten Mengen (cpm/mg Protein) berechnet werden. precursor, Vorläuferprotein (p), *mature*, reife Form (m).

Anschließend wurde die Endozytose der lysosomalen Proteine Cathepsin B (CtsB) und Cathepsin D (CtsD) untersucht. Cathepsin D wurde aus Mausleber (Claussen *et al.*, 1997) und das kommerziell erhältliche Cathepsin B aus menschlicher Leber aufgereinigt. Die lysosomale saure Phosphatase (LAP) und die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) in den Lysosomen der Leber führen zu einer rapiden Dephosphorylierung lysosomaler Enzyme (Suter *et al.*, 2001). Aufgereinigtes Cathepsin D und Cathepsin B aus Leber besitzt somit keine M6P-Reste mehr. Dadurch kann die Endozytose dieser lysosomalen Enzyme über MPRs ausgeschlossen werden.

[¹²⁵I]-markiertes Cathepsin B bzw. Cathepsin D wurde für 1 h in An- bzw. Abwesenheit von RAP mit Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs inkubiert. Um zu überprüfen, ob die Endozytose dieser lysosomalen Enzyme über Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie erfolgt, wurden zusätzlich LRP1^{ko}-, LDLR^{ko}- und LRP1^{ko}/LDLR^{ko}-

MEFs mit [¹²⁵I]-markiertem Cathepsin B bzw. Cathepsin D für 1 h in An- bzw. Abwesenheit von RAP inkubiert.

Bei dem reifen dephosphorylierten, [¹²⁵I]-markierten Cathepsin B handelt es sich um ein 24 kDa Protein. Es wird in Wildtyp-MEFs zu einem geringeren Teil (466 cpm/mg Protein) endozytiert als in *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs (627 und 631 cpm/mg Protein). Die Aufnahme kann in allen drei Genotypen durch RAP bis zu 80 % inhibiert werden. LRP1^{ko}- und LDLR^{ko}-MEFs endozytieren Cathepsin B in geringerem Maße (12 % bzw. 21,5 % der Wildtyp-MEFs) als Wildtyp-MEFs. Durch Zugabe von RAP konnte die Aufnahme von Cathepsin B in LRP1^{ko}-MEFs zu 52 % und in LDLR^{ko}-MEFs zu 41 % inhibiert werden (Abb. 4-27 A).

Dephosphoryliertes, [¹²⁵I]-markiertes Cathepsin D der Maus besitzt eine molare Masse von 40 kDa. Es wird in Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs in gleicher Menge aufgenommen (52 und 50 cpm/ mg Protein). Hingegen verdoppelt sich die Aufnahme von [¹²⁵I]markierten Cathepsin D in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs (105 cpm/mg Protein). Durch die Zugabe von RAP wurde die Endozytose in allen Genotypen bis zu 80 % inhibiert. In LRP1^{ko}und LRP1^{ko}/LDLR^{ko}-MEFs wurden sehr geringe Mengen an Cathepsin D aufgenommen (3-8 cpm/mg Protein). Jedoch zeigt sich in LDLR^{ko}-MEFs eine starke Signalbande (32 cpm/mg Protein), die durch Zugabe von RAP zu 62 % inhibiert wurde (Abb. 4-27 B).

In einem Kontrollexperiment wurde die Aufnahme des lysosomalen Enzyms β -Glucocerebrosidase untersucht, die keine M6P-Reste besitzt und für die gezeigt wurde, dass sie an das lysosomale Membranprotein LIMP-2 im ER bindet und über diese Protein-Protein-Interaktion zu den Lysosomen gelangt (Reczek *et al.*, 2007). Gleichzeitig sollte in diesem Experiment untersucht werden, ob LIMP-2 auch die Endozytose der β -Glucocerebrosidase vermittelt.

In *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs wurde dephosphorylierte, [¹²⁵I]-markierte β -Glucocerebrosidase in höheren Maße aufgenommen (429 cpm/mg Protein) als in Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-MEFs (124 und 244 cpm/mg Protein). Zudem konnte auch die Aufnahme in LIMP-2^{ko}-MEFs und LDLR^{ko}-MEFs festgestellt werden (252 und 108 cpm/mg Protein). Die Zugabe des Inhibitors RAP führte in LIMP-2^{ko}-MEFs zu 42 % und in LDLR^{ko}-MEFs zu 39 % verringerter Aufnahme von β -Glucocerebrosidase. In Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*- und



Gnptab^{ki}/S^{ko}-MEFs hatte die Zugabe von RAP nur einen geringfügigen Effekt (Abb. 4-27 C).

Abb. 4-27: Endozytose [¹²⁵I]-markierter, dephosphorylierter lysosomaler Enzyme

Die Aufnahme von phosphorylierten lysosomalen Enzymen, wie ASB, erfolgt hauptsächlich über MPR an der Zelloberfläche (Abb. 4-26). Liegen lysosomale Enzyme dephosphoryliert vor, können sie über alternative Rezeptoren endozytiert werden. So wird nicht-phosphoryliertes Cathepsin D über LRP1 und nicht-phosphoryliertes Cathepsin B über LDLR und LRP1 internalisiert. Der Endozytoserezeptor für β -Glucocerebrosidase ist noch nicht bekannt. Die Experimente zeigen, dass es sich dabei nicht um LIMP-2 oder Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie handelt (Abb. 4-27).

^{[&}lt;sup>125</sup>I]-markierte, dephosphorylierte lysosomale Enzyme wurden in An- bzw. Abwesenheit von 320 μg/0,8 ml RAP im Medium von Wildtyp (wt)-, *Gnptab^{ki}* (*ki*)-, *Gnptab^{ki/S^{ko}}* (*ki/S^{ko}*)-, LRP1^{ko}-, LDLR^{ko}-, LRP1^{ko}/LDLR^{ko}- und LIMP-2^{ko}-MEFs für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die [¹²⁵I]-Banden durch Autoradiographie visualisiert. Durch Ausschneiden und Szintillationsmessung der Banden konnten die absoluten Mengen (cpm/mg Protein) berechnet werden. Endozytose von Cathespin B (CtsB, 625000 cpm/ml) (**A**) und Cathepsin D (CtsD, 375000 cpm/ml) (**B**) und β-Glucocerebrosidase (β-GC, 625000 cpm/ml) (**C**).

4.6 Einfluß der Zellimmortalisierung auf den Transport lysosomaler Proteine

Die Isolierung von primären Zellen ist zeitaufwendig und die Teilungsrate ist begrenzt. Die Immortalisierung von primären Zellen wird genutzt um aus Tiermodellen isolierte Zellen teilungsfähig zu halten und somit ein stabiles Zellmodell der Erkrankung zu generieren.

Die Immortalisierung der MEFs und Lungenfibroblasten erfolgte durch lentivirale Transduktion des Onkogens *LargeT*. Dieses Onkogen stammt aus dem Simian Virus (SV40) und bindet und inaktiviert den Tumorsupressor p53 (Cheng *et al.*, 2009). Dies verhindert einen Proliferationsarrest der Zelle, so dass sich *Large T*-transduzierte Zellen unbegrenzt teilen. Lungenfibroblasten isoliert aus Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*-, S^{ko}- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Mäusen wurden mit *LargeT* immortalisiert und anschließend auf die Expression und den Transport von M6P-haltigen Proteinen untersucht.

Während in primären Wildtyp-Lungenfibroblasten eine Vielzahl von Proteinen mit M6P-Resten in Western-Blot zu detektieren sind, sinkt nach der Immortalisierung der Zellen die Anzahl und die Intensität der M6P-haltigen Proteine in Wildtyp-Lungenfibroblasten drastisch. Die schwache anti-M6P Immunreaktivität in immortalisierten Wildtyp-Lungenfibroblasten ist vergleichbar mit der Intensität der primären und immortalisierten *Gnptab^{ki}*-MEFs, die aufgrund der defekten GlcNAc-1-Phosphotransferase keine M6P-Reste generieren (Abb. 4-28 A).

Wie bereits in Abb. 4-23 dargestellt, wird Cathepsin D in primären MEFs als 50 kDa Vorläuferprotein exprimiert und ist nach einem 5-stündigen *Chase* in Wildtyp- als auch in *Gnptab*^{ki}/S^{ko}-Lungenfibroblasten in einer intermediären 45 kDa Form des Cathepsin D detektierbar, was einen Transport des Proteins zum endosomalen Kompartiment nachweist. Im Medium primärer *Gnptab*^{ki}-Lungenfibroblasten befindet sich nach dem *Chase* 75 % des Gesamtproteins, wohingegen beim Wildtyp 40 % in den Extrazellulärraum sezerniert wurde.

In Abb. 4-28 B ist ein vergleichbares Experiment mit immortalen Wildtyp- und *Gnptab*^{ki}/S^{ko}-Lungenfibroblasten dargestellt. Nach 3-stündigem *Chase* ist in immortalen Wildtyp-Zellen die intermediäre, prozessierte Form des Cathepsin D nur schwach zu detektieren (Abb. 4-28, Spur 2), da ein Großteil (90 %) der Vorläuferform von Cathepsin D ins Medium sezerniert wird (Abb. 4-28, Spur 5). In immortalen $Gnptab^{ki}/S^{ko}$ -Lungenfibroblasten ist, im Gegensatz zu primären $Gnptab^{ki}/S^{ko}$ -Lungenfibroblasten, nach dem *Chase* keine prozessierte Form des Cathepsins zu detektieren (Abb. 4-28, Spur 4). Es befindet sich ausschließlich als Vorläuferform im Medium (Abb. 4-28, Spur 6).



Abb. 4-28: Expression und Transport M6P-haltiger Proteine in primären und immortalen Lungenfibroblasten von Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Mäusen

Western-Blot-Analyse von Zellhomogenaten primärer und immortalisierter Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}* (*ki*)-Lungenfibroblasten. 100 µg Proteinhomogenat wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit anti-M6P-*single chain* Antikörper analysiert (**A**). Immortalisierte Wildtyp (wt)- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko} (*ki*/S^{ko})-Lungenfibroblasten wurde für 20 min mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und anschließend geerntet (Spur 1 und 3) oder für 3 h mit nichtradioaktivem Medium (*Chase*) inkubiert und danach geerntet (Spur 2 und 4). Cathepsin D (CtsD) wurde von Zelllysat und Chasemedien (Spur 5 und 6) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Fluorographie analysiert. Anschließend wurden Proteinbanden ausgeschnitten und die Menge des radioaktiv markierten Proteins durch Szintillationsmessung bestimmt. p = *precursor*, Vorläuferpotein; i = intermediäre Form (**B**).

Im Gegensatz zu primären Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Fibroblasten sezernieren immortalisierte Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Fibroblasten eine erhöhte Menge des neu synthetisierten Cathepsin D. Zudem sind Proteine in Homogenaten immortalisierter Wildtyp-Fibroblasten in geringerem Maße mit M6P modifiziert, was bei Untersuchungen des lysosomalen Proteintransports an immortalisierten Zellen berücksichtigt werden muß. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit nur primäre MEFs und Lungenfibroblasten verwendet.

5. Diskussion

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase katalysiert den ersten Schritt bei der Generierung von M6P-Resten an löslichen lysosomalen Enzymen und ist essentiell für den effektiven Transport dieser Enzyme zu Lysosomen. Mutationen im *GNPTAB*-Gen, das für die α/β -Untereinheiten des Phosphotransferase-Komplexes kodiert, führen zur lysosomalen Speichererkrankung Mucolipidose Typ II (MLII). Durch Fehlen des M6P-Restes werden neu synthetisierte lysosomale Proteine nicht von MPR erkannt und deshalb sezerniert. Die Defizienz der Hydrolasen in Lysosomen führt zur Akkumulation von Substraten dieser Enzyme, was als lysosomales Speichermaterial detektierbar ist.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde das Gnptabki-Mausmodell für MLII biochemisch und histologisch charakterisiert. Zunächst wurden die Expression, der Transport und die zelluläre Lokalisation von lysosomalen Hydrolasen bestimmt. Dabei dass der lysosomale Transport der untersuchten zeigte sich, Proteine in unterschiedlichem Maße vom M6P-vermittelten Transportmechanismus abhängig ist, sodass die lysosomale Konzentration einiger Hydrolasen stark reduziert ist, andere hingegen in normalen bis erhöhten Konzentrationen in Lysosomen vorliegen. Durch Untersuchung des Speichermaterials in neuronalem Gewebe der Gnptabki-Mäuse konnte weiterhin bestätigt werden, dass die lysosomale Defizienz spezifischer Hydrolasen den Abbau der untersuchten Substrate limitieren. Die histologischen Untersuchungen der Neurodegeneration an *Gnptab^{ki}*-Mäusen zeigten zudem eine progressive Atrophie des Hirns und des Cerebellums und identifizierte Mikro- und Astrogliose, sowie die Blockierung des basalen Autophagieprozesses als Pathomechanismen der Erkrankung.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde an *Gnptab^{ki}*-Fibroblasten die Rolle alternativer Rezeptoren beim Transport lysosomaler Proteine zu den Lysosomen untersucht. Die Untersuchungen fokussierten sich hierbei auf Sortilin, der als alternativer Rezeptor für den Transport verschiedener lysosomaler Enzyme zu Lysosomen beschrieben wurde, und auf Rezeptoren der LDLR-Familie, die die Endozytose von LDL und sezernierter lysosomaler Proteine vermitteln.

5.1 Das Mausmodell für Mucolipidose Typ II

Im *Gnptab^{ki}*-Mausmodell für MLII führt die Insertion der MLII-Patientenmutation *GNPTAB* c.3145insC an orthologer Stelle des murinen *Gnptab*-Gens zum Translationsabbruch und Verlust der distalen Transmembrandomäne des α/β -Vorstufenproteins der Phosphotransferase (Kollmann *et al.*, 2012). Untersuchungen zum Transport des α/β -Vorstufenproteins zeigten, dass Sortierungssignale, die im C-und N-terminalen cytosolischen Bereich dieses Typ III-Transmembranproteins lokalisiert sind, für den Transport vom ER zum *cis*-Golgi notwendig sind (Franke *et al.*, 2013). Im Golgi-Apparat wird das Vorläuferprotein durch die *site-1-protease* (S1P) proteolytisch gespalten und somit aktiviert (Marschner *et al.*, 2011). Durch den Verlust der distalen Transmembrandomäne des α/β -Vorstufenproteins kann das mutierte Protein nicht zum Golgi-Apparat transportiert und aktiviert werden (Kollmann *et al.*, 2012). Somit führt die *frameshift*-Mutation zu einem vollständigen Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferaseaktivität, was durch verschiedene biochemische Analysen bestätigt wurde.

Die Aktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase kann indirekt unter Verwendung eines *single-chain*-Antikörperfragments nachgewiesen werden, das spezifisch M6P-Reste an N-glycosylierten Proteinen detektiert (Müller-Loennies *et al.*, 2010). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte in Wildtyp-MEFs intrazellulär eine Vielzahl M6P-haltiger Proteine detektiert werden. Zudem waren M6P-haltige Proteine auch im Medium dieser Zellen nachweisbar, da etwa 5-20 % der neu synthetisierten lysosomalen Enzyme im *trans*-Golgi der Bindung an M6P-Rezeptoren entgehen und sezerniert werden (Braulke und Bonifacino, 2009). In Zellen und Medien von *Gnptab^{ki}*-MEFs konnten dagegen keine M6P-haltigen Proteine detektiert werden, was den vollständigen Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität in diesen Mäusen bestätigte (Abb. 4-1 A).

5.2 Transport und Lokalisation lysosomaler Proteine im *Gnptab*^{ki}-Mausmodell

Die Diagnose der Patienten mit MLII erfolgt primär durch Messung von lysosomalen Enzymaktivitäten. Aufgrund der Fehlsortierung lysosomaler Enzyme sind bei MLII (i) erhöhte lysosomale Enzymaktivitäten im Serum und (ii) verringerte lysosomale Enzymaktivitäten in kultivierten Fibroblasten messbar (Leroy *et al.*, 1972; Thomas *et* al., 1973). Diese biochemischen Parameter konnten ebenfalls im Serum von Gnptab^{ki}-Mäusen und in Gnptabki-MEFs nachgewiesen werden. Die Aktivität mehrerer lysosomaler Hydrolasen ist im Serum der Gnptab^{ki}-Mäuse auf das 2- bis 14-fache erhöht (Abb. 4-3, Kollmann et al. 2012). In Gnptabki-MEFs entspricht die Aktivität der lysosomalen Hydrolasen β -Hexosaminidase, β -Galactosidase, α -Mannosidase, Arylsulfatase A und α -Fucosidase nur 4-30 % der Aktivität in Wildtyp-MEFs. Die Restaktivitäten der lysosomalen Enzyme in *Gnptab^{ki}*-MEFs können zwei Gründe haben: 1) Die intrazelluläre Aktivität resultiert aus neu synthetisierten lysosomalen Proteinen, die im ER, Golgi und/oder sekretorischen Vesikeln vorliegen und bei der Enzymaktivitätsbestimmung in vitro unter optimalen Bedingungen aktiv sind. 2) Die lysosomalen Enzyme gelangen zum Teil unabhängig von M6P-Resten zu den Lysosomen. Die intrazellulären Aktivitäten der lysosomalen Proteasen, wie Cathepsin D und Cathespin B waren sogar unverändert (Abb. 4-3). Deshalb wurden die Expression und Lokalisation der lysosomalen Proteine in Fibroblasten durch Western-Blot-Analysen und Pulse-Chase-Experimente weiter untersucht.

Ein Großteil lysosomaler Hydrolasen werden als inaktive Vorläuferproteine (Präproproteine) synthetisiert, anschließend M6P-abhängig zum endosomalen/ lysosomalen Kompartiment transportiert und dort proteolytisch aktiviert. In Western-Blot-Analysen kann somit durch Detektion der proteolytisch prozessierten, reifen Form der Transport zum endosomalen Kompartiment nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden durch Pulse-Chase-Experimente die Prozessierung und Sortierung lysosomaler Enzyme direkt nach der Synthese verfolgt. Diese Experimente zeigten, dass Cathepsin Z in *Gnptab^{ki}*-MEFs nicht prozessiert, sondern vollständig in den extrazellulären Raum sezerniert wird (Abb. 4-1 B und Abb. 4-2). Zudem weist Cathepsin Z im Medium von Gnptab^{ki}-MEFs ein höheres Molekulargewicht auf, was auf eine veränderte N-Glycosylierung des Proteins zurückzuführen ist. Aufgrund fehlender M6P-Reste werden die Oligosaccharidstrukturen an lysosomalen Proteinen durch die α-Mannosidase "getrimmt". Anschließend übertragen Glycosyltransferasen komplexe Zucker auf die N-Glycane, was zu der veränderten elektrophoretischen Mobilität der sezernierten lysosomalen Enzyme führt (Hasilik et al., 1981). Diese Veränderung konnte auch in Fibroblasten von Patienten mit MLII festgestellt werden (Tiede et al., 2005). Western-Blot-Analysen zeigten zudem keine prozessierten, lysosomalen Formen

des Niemann-Pick Proteins C2 (Npc2) und der α -Mannosidase (Man2b1) in *Gnptab*^{ki}-MEFs (Abb. 4-1 B). Npc2 bindet unverestertes Cholesterin in Lysosomen und überführt es auf Npc1, das den Export des Cholesterins aus Lysosomen vermittelt (Peake und Vance, 2010). Die lysosomale α -Mannosidase (Man2b1) hydrolysiert Mannosereste von N-Glycanen und ist somit für den Abbau von Oligosacchariden in Lysosomen notwendig (Damme *et al.*, 2010). Neben vollständig fehlsortierten und somit M6Pabhängig transportierten lysosomalen Proteinen, konnten in Western-Blot-Analysen und *Pulse-Chase*-Experimenten spezifische lysosomale Enzyme, wie beispielsweise Cathepsin D, detektiert werden, die die Lysosomen unabhängig von M6P erreichen (Abb. 4-1 C, Abb. 4-2), und zum Teil proteolytisch prozessiert werden.

Die Pulse-Chase-Experimente zeigten zudem, dass sich der Anteil des sezernierten Vorläuferproteins z. B. von Cathepsin D in verschiedenen Zelltypen voneinander unterscheidet. In humanen Kontrollfibroblasten werden nur 5-20 % des neu synthestisierten Cathepsin D sezerniert (Braulke, 1996). In den hier durchgeführten Pulse-Chase-Experimenten war in Wildtyp-MEFs 60 % (Abb. 4-2) und in Wildtyp-Lungenfibroblasten 42 % (Abb. 4-23) des nach 5 h vorliegenden Cathepsin D im Medium nachweisbar. Möglicherweise bindet der verwendete Antikörper besser an die sezernierte Vorläuferform des murinen Cathepsin D, sodass diese mehr immunpräzipitiert wird. Eine verstärkte basale Sekretion in embryonalen Mausfibroblasten ist jedoch wahrscheinlicher. Zudem führte die lentivirale Immortalisierung von primären Wildtyp- und Gnptabki-MEFs zusätzlich zu einer Steigerung der Sekretionsrate lysosomaler Proteine (Abb. 4-28 B) und zu einer verminderten Generierung von M6P-Resten an lysosomalen Proteinen in Wildtyp-MEFs (Abb. 4-28 A), was bei der Untersuchung von Transportmechanismen an immortalen Zellen berücksichtigt werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur primäre Zellen analysiert.

5.3 mRNA-Expression lysosomaler Proteine in *Gnptab*^{ki}-MEFs

Die reduzierte intrazelluläre Konzentration lysosomaler Enzyme in $Gnptab^{ki}$ -MEFs könnte, neben der Fehlsortierung, auch auf eine verringerte Genexpression zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, wurden mRNA-Expressionsspiegel lysosomaler Proteine, wie β -Hexosaminidase, β -Galactosidase, α -Mannosidase,

α-Fucosidase, Arylsulfatase A, Npc2 und Cathepsin D durch *Realtime*-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass alle untersuchten lysosomalen Hydrolasen in Gnptabki-MEFs tendenziell stärker, aber nicht signifikant höher, als in Wildtyp-MEFs exprimiert wurden (Abb. 4-4). Dies läßt darauf schließen, dass möglicherweise der Verlust der Hydrolasen in *Gnptab*^{ki}-Lysosomen zu einer Steigerung ihrer Neusynthese führt. Der kürzlich identifizierte Transkriptionsfaktor TFEB (transcription factor EB) spielt vermutlich bei der Ausbildung dieses Phänotyps eine essentielle Rolle. TFEB bindet an eine palindromische Erkennungssequenz (auch bekannt als CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation-Element)), welche in der Promotorsequenz vieler Gene, die für lysosomale Enzyme und Membranproteine kodieren, zu finden ist (Sardiello et al., 2009). Die Überexpression von TFEB führt zu einer Steigerung der Größe und Anzahl lysosomaler Kompartimente pro Zelle sowie zur erhöhten mRNA-Expression vieler lysosomaler Gene und daraus resultierend zur Erhöhung lysosomaler Enzymaktivitäten (Sardiello et al., 2009). Die Regulation von intrazellulärem TFEB erfolgt über Serin-Phosphorylierung unterschiedlicher Reste (mehr als 10 sind bekannt), die unter anderem durch den Kinase-Komplex mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) phosphoryliert werden (Settembre et al., 2013). Liegen ausreichend Aminosäuren im lysosomalen Lumen vor, bindet mTORC1 über Rag-Guanosin-Triphosphatasen (Rag-GTPasen) an die lysosomale Membran und wird durch den mTORC1-Aktivator Rheb-Guanosin-Triphosphatase (Rheb-GTPase) aktiviert. Dabei interagieren Aminosäuren mit der V-Typ H⁺-ATPase in der lysosomalen Membran und regulieren den sogenannten Ragulator-Komplex, der die Bindung der Rag-GTPasen an Lysosomen und somit die Bindung und Aktivierung von mTORC1 vermittelt (Zoncu et al., 2011). TFEB interagiert mit dem lysosome nutrient sensing-Komplex (LYNUS), bestehend aus mTORC1, Rab-GTPasen, Rheb und weiteren Proteinkomplexen, und wird durch aktives mTORC1 phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Bei Nährstoffmangel dissoziiert mTORC1 vom LYNUS-Komplex und wird inaktiv. Folglich kann TFEB nicht phosphoryliert werden, was die Aktivierung und Translokation von TFEB in den Nucleus auslöst und die erhöhte Expression lysosomaler Gene bedingt (Settembre et al., 2012; Settembre et al., 2013). Die Aktivierung und Translokation von TFEB kann auch durch lysosomale Speicherung induziert werden. Dies konnte bereits in Fibroblasten aus Mausmodellen lysosomaler

Speichererkrankungen, wie Mucopolysaccharidose Typ III (MPSIII) und Multipler Sulfatasedefizienz (MSD), gezeigt werden (Sardiello *et al.*, 2009)

Die erhöhten mRNA-Expressionsspiegel der lysosomalen Proteine β -Hexosaminidase, β -Galactosidase, α -Mannosidase, α -Fucosidase, Arylsulfatase A, Npc2 und Cathepsin D in *Gnptab^{ki}*-MEFs könnte deshalb durch die kompensatorische Aktivierung von TFEB erklärt werden.

5.4 Charakterisierung des Speichermaterials im *Gnptab^{ki}*-Mausmodell

Die Untersuchungen zum Transport und zur zellulären Lokalisation lysosomaler Hydrolasen am $Gnptab^{ki}$ -Mausmodell für Mucolipidose Typ II haben gezeigt, dass der lysosomale Transport der untersuchten Proteine in unterschiedlichem Maße vom M6Pvermittelten Transportmechanismus abhängig ist, sodass die lysosomale Konzentration einiger Hydrolasen stark reduziert ist (z. B. Cathesin Z und Npc2), andere hingegen in normalen bis erhöhten Konzentrationen in Lysosomen vorliegen (z. B. Cathepsin B und Cathepsin D). Durch Analyse des Speichermaterials in neuronalem Gewebe der $Gnptab^{ki}$ -Mäuse wurde weiterhin untersucht, ob zusätzliche Aussagen über lysosomale Hydrolasen gewonnen werden können, die ausschließlich M6P-abhängig zu den Lysosomen transportiert werden und deshalb limitierend für den Abbau spezifischer Substrate in MLII-Geweben sind.

Die Defizienz lysosomaler Enzyme in Lysosomen führt in *Gnptab^{ki}*-MEFs zu lichtmikroskopisch sichtbaren Einschlußkörperchen (Abb. 4-6). Dieses typische Merkmal der Erkrankung konnte bereits 1967 in Fibroblasten von Patienten mit MLII festgestellt werden (Leroy und Demars, 1967). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Immunfärbung gezeigt werden, dass die Einschlußkörperchen in *Gnptab^{ki}*-MEFs positiv für den lysosomalen Marker LAMP-1 sind und somit lysosomale Strukturen darstellen (Abb. 4-7 A). Zudem war der LAMP-1-Gehalt in *Gnptab^{ki}*-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs verdoppelt (Abb. 4-7 B), was auf eine erhöhte Anzahl und Größe lysosomaler Kompartimente in *Gnptab^{ki}*-MEFs zurückgeführt wurde und vermutlich durch eine erhöhte Expression lysosomaler Gene und deren Translation bei lysosomale Degradationskapazität verursacht wird.

Ultrastrukturelle Analysen im Hirn von $Gnptab^{ki}$ -Mäusen zeigten verschiedenartiges Speichermaterial, von elektronentransparenten bis elektronendichten, multilamellären, geflockten, Zebra- und *fingerprint*-Strukturen in Körnerzellen 11 Monate alter $Gnptab^{ki}$ -Mäuse (Abb. 4-5). Bereits in 4 Monate alten $Gnptab^{ki}$ -Mäusen zeigten sich elektronendichte Einschlüsse in hippocampalen Neuronen und angeschwollene Axone (Spheroide) in cerebellaren Neuronen, die mit verschiedenartigen Speichervakuolen gefüllt waren (Kollmann *et al.*, 2012). Neben neuronalen Zellen konnte auch in nichtneuronalen Zellen, wie Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen der Blutgefäße, Speichermaterial detektiert werden (Abb. 4-11 G bis K). Weiterführende Untersuchungen zeigten zudem Speichermaterial in verschiedenen Zelltypen der Retina in 4 Monate alten $Gnptab^{ki}$ -Mäusen (Schweizer *et al.*, 2013).

Heterogenes Speichermaterial ist ein typisches Merkmal von MLII und konnte auch in erkrankten Patienten und Katzen beobachtet werden (Martin et al., 1984; Bosshard et verschiedenartige al.. 1996). Die ultrastrukturelle Zusammensetzung des Speichermaterials gibt erste Hinweise auf die Art des akkummulierenden Speichermaterials. So sind elektronendichte Strukturen auf die Speicherung von Glycogen zurückzuführen, wie sie in Morbus Pompe-Patienten und Mäusen vorkommen, die durch einen genetischen Defekt in der α -1,4-Glucosidase hervorgerufen wird (Pokorny et al., 1982; Lynch et al., 2005). Zebra- und fingerprint-Strukturen weisen auf die Speicherung von Gangliosiden und anderen Glycolipiden hin. Diese ultrastrukturellen Eigenschaften des Speichermaterials können vor allem in Patienten mit Morbus Fabry (*a*-Galactosidase-Defizienz), Fucosidose (*a*-Fucosidase-Defizienz), G_{M1}- und G_{M2}-Gangliosidose (β-Galactosidase- bzw. β-Hexosaminidase-Defizienz), Galactosialidose (Neuraminidase-B-Galactosidase-Defizienz), Mucolipidose Typ IV (Mucolipin1-Defekt) und Sialidose (Neuraminidase1-Defizienz) detektiert werden (Alroy und Ucci, 2006). Für Patienten mit Mucolipidose Typ II und für Tiermodelle dieser Erkrankung gab es aber bisher weder detaillierte, analytische Untersuchungen noch Hinweise auf die Natur des Speichermaterials im Gehirn.

Durch PAS-Färbungen, wodurch Oligosaccharidstrukturen histochemisch angefärbt werden, konnte die Akkumulation von Oligosaccharidstrukturen im gesamten Cerebellum 10 Monate alter *Gnptab^{ki}*-Mäuse festgestellt werden (Abb. 4-8). Für die genauere Charakterisierung der Zusammensetzung von Zuckerstrukturen im

Speichermaterial wurden freie Oligosaccharide aus dem Gesamthirn-Gewebe 6 Monate alter Wildtyp und Gnptabki-Mäuse isoliert, massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Die Analysen zeigten, dass in Hirngewebe der Gnptabki-Mäuse Mannosereiche und fucosylierte N-Glycane vom komplexen Typ akkumulieren (Abb. 4-9). Durch Lektinfärbungen konnte die Akkumulation von fucosylierten N-Glycanen in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen des Cerebellums und in embryonalen Mausfibroblasten verifiziert werden (Abb. 4-10, Abb. 4-11). Die Menge an akkumulierenden Mannose-reichen Strukturen im Hirn von Gnptabki-Mäusen war vergleichbar mit der Menge, die im Hirn von einem Knockout-Mausmodell für α-Mannosidose gefunden worden ist, bei dem ein Defekt der a-Mannosidase vorliegt (Roces et al., 2004). Da der Abbau von komplexen und Mannose-reichen Glycanen in Lysosomen sequentiell vom nicht-reduzierenden Ende her erfolgt (Aronson et al., 1989; Freeze, 2009), lässt die Speicherung dieser Metabolite darauf schließen, dass α-Fucosidase und α-Mannosidase ausschließlich bzw. stärker auf den Transport über M6P-spezifische Rezeptoren angewiesen sind als andere lysosomale Glycosidasen (Abb. 1-4) und dadurch den vollständigen Abbau der N-Glycane verhindern.

Die Struktur der akkumulierenden fucosylierten und Mannose-reichen Glycane zeigt weiterhin, dass in neuronalem Gewebe von *Gnptab^{ki}*-Mäusen Man(α 1-6) verzweigte Glycanäste vollständig abgebaut werden, wenn sie keine Fucosereste tragen. Neben der in *Gnptab^{ki}*-Mäusen fehlsortierten α -Mannosidase (Man2b1), die α (1–2), α (1–3) und α (1–6) verbundene Mannosereste hydolysiert, existiert eine weitere α -Mannosidase (Man2b2), die ausschließlich α (1-6) glykosidisch verknüpfte Mannose-Reste des *Core*-Glykans hydrolysiert (Park *et al.*, 2005). Daher lassen die Ergebnisse vermuten, dass aktive Man2b2 im Hirn von *Gnptab^{ki}*-Mäusen nicht vollständig fehlsortiert wird, sondern in Lysosomen in ausreichender Menge vorliegt. Ähnliche Untersuchungen am Urin von Patienten mit α -Mannosidose (MAN2B1-Defizienz) zeigten, dass hauptsächlich Man(α 1–3)Man(β 1–4)GlcNAc Trisaccharide gespeichert werden. Akumulierende Man(α 1-6)-verzweigte Glycanstrukturen konnten nicht detektiert werden (Michalski und Klein, 1999).

Während überraschenderweise im Hirn von *Gnptab^{ki}*-Mäusen keine Speicherung von Glycosaminoglycanen (GAGs) nachweisbar war (unveröffentlichte Daten), weisen

Gnptab^{ki}-MEFs erhöhte Konzentrationen von Heparan- und Chondroitinsulfat auf (Abb. 4-12 A). GAGs sind polymere Zuckerstrukturen, die kovalent an Core-Proteine gebundenen sind. Diese sogenannten Proteoglycane sind hauptsächlich an der Zelloberfläche und in löslicher Form im extrazellulären Raum lokalisiert und können u. a. Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren binden, fungieren als Rezeptoren für die Endozytose von Lipoproteinen oder spielen bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eine wesentliche Rolle (Sarrazin et al., 2011). Die für den Abbau vorgesehene Zelloberflächen-Proteoglycane werden endozytiert und das Core-Protein durch Proteasen gespalten. Die Heparansulfatketten werden anschließend durch eine Heparanase in kleine Fragmente gespalten, die dann in den Lysosomen durch acht Exoglycosidasen und Sulfatasen vollständig degradiert werden. Für den Abbau von Chondroitinsulfatketten existiert keine Endoglycosidase, die die Polysaccharidkette vor Erreichen der Lysosomen fragmentiert. Der Abbau dieser GAGs, an dem 6 lysosomale Hydrolasen beteiligt sind, erfolgt vollständig in Lysosomen (Abb. 1-3) (Varki, 2009). Liegt eine Mutation in einem lysosomalen Enzym vor, das für den Abbau von GAGs essentiell ist, führt dies zu Mucopolysaccharidosen (MPS), die die größte Gruppe lysosomaler Speichererkrankungen darstellen und durch die Speicherung von GAGs charakterisiert sind (Zafeiriou und Batzios, 2013).

Die molare Masse von Heparansulfat-GAGs, die an Zelloberflächen-Proteoglycanen von Gnptab^{ki}-MEFs zu finden waren, betrug ca. 58 kDa, während intrazellulär 10 kDa Fragmente akkumulierten. Heparanase kann M6P-unabhängig zu Endosomen transportiert werden (Ben-Zaken et al., 2008), weshalb die Fragmentierung von Heparansulfat in *Gnptab*^{ki}-MEFs nicht eingeschränkt ist. Da der vollständige Abbau der Heparansulfatfragmente jedoch auf lysosomale Hydrolasen angewiesen ist, die M6Pabhängig zu den Lysosomen transportiert werden, werden die Fragmente in Gnptab^{ki}-MEFs nicht weiter abgebaut. Chondroitinsulfat weist in Gnptab^{ki}-MEFs an der Zelloberfläche dieselbe Masse auf wie intrazelluläres Chondroitinsulfat und wird offensichtlich nicht abgebaut (Abb. 4-12 B). Die lysosomalen Hydrolasen α -L-Iduronidase, Acetylgalactosamin-6-Sulfatase, β-Glucuronidase, Iduronat-2-Sulfatase und Heparan N-Sulfatase, die am Abbau von GAGs beteiligt sind, werden M6P-abhängig zu Lysosomen transportiert, was durch ihre erhöhte Konzentration im Serum von *Gnptab^{ki}*-Mäusen gezeigt werden konnte (Abb. 4-3). Welche der beteiligten Hydrolasen jedoch ausschließlich über M6P-abhängige Transportwege zu den Lysosomen gelangen und somit den Abbau der GAGs in *Gnptab^{ki}*-Mefs limitieren, kann durch die verwendete Methode nicht identifiziert werden.

Die ultrastrukturellen Analysen gaben zusätzlich Hinweise auf die Akkumulation von Lipiden in neuronalem Gewebe der *Gnptab^{ki}*-Mäuse. Nach Extraktion von Lipiden aus Hirngewebe, Trennung in neutrale und saure Lipidfraktionen und anschließende massenspektrometrische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass in 5 und 10 Monate alten Gnptab^{ki}-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen nur G_{M2}- und G_{M3}-Ganglioside 2-fach erhöht waren (Abb. 4-13). Die Akkumulation dieser Ganglioiside konnte histochemisch verifiziert werden (Abb. 4-14). Die Speicherung dieser Metabolite lässt darauf schließen, dass ß-Hexosaminidase und Sialidase ausschließlich bzw. stärker auf den Transport mittels M6P-Rezeptoren angewiesen sind, da diese lysosomalen Glycosidasen für den Abbau der G_{M2}- und G_{M3}-Ganglioside essentiell sind. Alternativ könnte auch die Fehlsortierung des M6P-haltigen löslichen G_{M2}-Aktivatorproteins oder von Saposin B für die Gangliosid-Speicherung verantwortlich sein (Abb. 1-5, (Schulze et al., 2009)). Die Akkumulation von G_{M2}- und G_{M3}-Gangliosiden im Hirn von Gnptab^{ki}-Mäusen könnte allerdings auch sekundäres Speichermaterial darstellen. Eine Vielzahl lysosomaler Speichererkrankungen, wie Mucopolysaccharidosen (MPS I, VI, VII), Neuronale Ceroid Lipofuszinosen und Niemann-Pick C-Erkrankung, speichern G_{M2}- und G_{M3}-Ganglioside, obwohl der primäre Defekt nicht in einem Enzym vorliegt, das für den Abbau von Gangliosiden notwendig ist (Vogler et al., 2005; Walkley et al., 2005; Jabs et al., 2008; Walkley und Vanier, 2009; Kreutz et al., 2013). Bei der Niemann-Pick C- Erkrankung (NPC), die durch Defekte in den lysosomalen Proteinen NPC1 oder NPC2 verursacht wird, stellt unesterifiziertes Cholesterin das primäre lysosomale Speichermaterial da. NPC2 bindet freies Cholesterin, das aus dem LDL-Abbau durch die Saure Lipase freigesetzt wird, und überführt es auf das NPC1-Membranprotein, das den Transport von Cholesterin aus Lysosomen in das Cytosol vermittelt (Brown et al., 1986). Anschließend erfolgt der Transport durch Cholesterin-Bindungsproteine zum ER oder zur Plasmamembran (Miller et al., 2011). Die Akkumulation von Cholesterin in den Lysosomen führt zur Defizienz in anderen Kompartimenten der Zelle, was die Hochregulierung der Cholesterinneusynthese zur Folge hat (Beltroy et al., 2005). In Patienten mit NPC

kommt es zur Speicherung weiterer Membranbestandteile, wie Ganglioside, Sphingomyelin und Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) im Hirn und in verschiedenen anderen Organen (Sun *et al.*, 2001b). Auch im Hirn von 8 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen und in *Gnptab^{ki}*-MEFs konnte die Akkumulation von Cholesterin und BMP in Lysosomen detektiert werden (Abb. 4-16), was durch die Fehlsortierung und lysosomale Defizienz von Npc2 bestätigt wird (Abb. 4-1 B).

Erhöhte BMP-Spiegel, allerdings 20-fach höher als in Wildtyp-Mäusen, und eine veränderte intrazelluläre Verteilung von Cholesterin konnte auch in Hirnen von Cathepsin D-defizienten Mäusen detektiert werden (Jabs *et al.*, 2008). Veränderungen in der Lipidkomposition von vesikulären Membranen beeinträchtigen zusätzlich den effizienten Transport lysosomaler Hydrolasen (Kobayashi *et al.*, 1999), die Interaktionen und Funktionen lysosomaler Proteine und die Degradation spezifischer Lipide (Gallala und Sandhoff, 2011) und können somit auch zum Phänotyp der Mucolipidose Typ II beitragen.

5.5 Neurodegenerative Prozesse im *Gnptab^{ki}*-Mausmodell

Mucolipidose Typ II ist eine neurometabolische Erkrankung, die klinisch unter anderem durch mentale und motorische Retardierung charakterisiert ist. Auch *Gnptab^{ki}*-Mäuse zeigen progressive motorische Auffälligkeiten wie *clasping* (Anklammern der Hinterund Vorderläufe an den Körper beim Herausnehmen aus dem Käfig) und eine schwankende Gangart bereits im Alter von 4 - 6 Monaten (Kollmann *et al.*, 2012). *Clasping* geht bei Mäusen häufig mit neurodegenerativen Prozessen im Cerebellum einher (Lalonde und Strazielle, 2011). So konnte in *Gnptab^{ki}*-Mäusen ein progressiver Verlauf der Hirnatrophie und der Verlust neuronaler Zellen detektiert werden. In 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen zeigt sich ein umfangreicher Verlust der Purkinje-Zellschicht und die Ausbildung axonaler Spheroide (Abb. 4-17 A), die für lysosomale Speichererkrankungen charakteristisch sind und den axonalen Transport beeinträchtigen (Walkley *et al.*, 2010). Der progressive Verlust der Purkinje-Zellschicht wurde auch für andere lysosomale Speichererkrankungen, wie die Niemann-Pick C-Erkrankung, beschrieben (Ko *et al.*, 2005).
In 9 Monate alten *Gnptab^{ki}*-Mäusen konnte außerdem eine starke Demyelinisierung beobachtet werden (Abb. 4-17 B). Die Demyelinisierung ist ein charakteristisches der lysosomalen metachromatischen Leukodystrophie (MLD) und Merkmal Globoidzell-Leukodystrophie (Morbus Krabbe) (McGowan et al., 2000; Clas et al., 2012). MLD wird durch Mutationen der lysosomalen Arylsulfatase A (ASA) oder des ASA-Aktivatorproteins Saponin D verursacht (Ballabio und Gieselmann, 2009). Bei M. Krabbe ist dagegen die lysosomale Galactocerebrosidase defekt (Belleri et al., 2013). Diese lysosomalen Hydrolasen sind am Glycolipidmetabolismus beteiligt und spielen bei der Bildung von Myelin eine besondere Rolle, da Myelin aus Membranstrukturen mit einem 70 %-igen Glycolipidanteil besteht. Bei M. Krabbe führt der Defekt der Galactocerebrosidase zudem zur Akkumulation von Psychosin, das toxisch auf die am Aufbau des Myelin beteiligten Oligodendrozyten wirkt (Hawkins-Salsbury et al., 2013). Bisher wurden bei Patienten mit MLII keine Demyelinisierungsprozesse beschrieben, was entweder auf ungenügende Untersuchungen zurückzuführen ist, oder die schnelle Neurodegeneration im Mausmodell der MLII bedingt die sekundäre Demyelinisierung, die beim langsamen Verlauf der Neurodegeneration in Patienten nicht detektierbar ist.

Proteomanalysen an MPR46- und MPR300-defizienten Fibroblasten zeigten die Fehlsortierung von Arylsulfatase A und Galactocerebrosidase, was auf den M6Pabhängigen Transport dieser Enzyme hindeutet (Kollmann *et al.*, 2005). Die Demyelinisierung in Hirnen von *Gnptab^{ki}*-Mäusen könnte durch die lysosomale Defizienz von Arylsulfatase A und Galactocerebrosidase erklärt werden, obwohl keine Akkumulationen der Substrate dieser Enzyme (Sulfatide, 3-Sulfolactosylceramid, Galactosylceramid) im Hirn von *Gnptab^{ki}*-Mäusen detektiert werden konnten. Da die massenspektrometrischen Analysen am Gesamthirn der *Gnptab^{ki}*-Mäuse durchgeführt worden sind, könnten regionale Akkumulationen vergleichsweise so gering sein, dass sie nicht als Speicherung detektiert werden.

Die Neurodegeneration in *Gnptab^{ki}*-Mäusen wird durch Astrogliose und Mikrogliose in allen untersuchten Hirnregionen begleitet (Abb. 4-18). Reaktive Gliosen sind sensitive Indikatoren für neurodegenerative Prozesse, die durch aktivierte gliale Zellen im Hirn aufgrund von inflammatorischen Signalen beschädigter Neuronen charakterisiert werden (Streit *et al.*, 1999). Dabei wird je nach aktiviertem Zelltyp zwischen Astrogliose (aktivierte Astrozyten) und Mikrogliose (aktivierte Mikroglia)

unterschieden. Astrozyten haben diverse Funktionen bei der neuronalen Homöostase, wie die Zuführung von Nährstoffen, Aufrechterhaltung des Kalium-Haushalts und Aufnahme und Modifikation von Neurotransmittern (Di Malta *et al.*, 2012). Astrogliose zeigte sich im Cerebellum 9 Monate alter *Gnptab^{ki}*-Mäuse besonders deutlich in der weißen Substanz, der Körner- und Purkinje-Zellschicht (Abb. 4-18 A). Mikroglia stellen die Abwehrzellen des Gehirns dar. Bei Schädigungen von neuronalen Zellen migrieren Mikroglia zum Ort der Läsion, proliferieren und transformieren zu Phagozyten. Durch mikrogliäre Phagozytose werden apoptotische, neuronale Zellen entfernt (Kettenmann *et al.*, 2013). Da aber sowohl Mikroglia als auch Astroglia der *Gnptab^{ki}*-Mäuse durch dysfunktionelle Lysosomen/Phagolysosomen gekennzeichnet sind, potenzieren sich die Prozesse mit Fortschreiten der Neurodegeneration. Genauso wie für Astrogliosen, konnten Mikrogliosen in allen Teilen des Gehirns 9 Monate alter *Gnptab^{ki}*-Mäuse detektiert werden. Insbesondere konnten aktivierte Mikroglia im Cerebellum, der Großhirnrinde, Hippocampus und dem Thalamus mit prominenter Mikrogliose in der weißen Materie und der Molekularschicht des Cerebellums beobachtet werden (Abb.

4-18 B).

Neben ihren wichtigen Funktionen als Abwehrzellen im Gehirn bzw. als Nährzellen neuronaler Zellen, können Mikroglia und Astrozyten auch zu neurodegenerativen Prozessen beitragen. In lysosomalen Speichererkrankungen kann die Funktion der Gliazellen, aufgrund defizienter lysosomaler Enzyme und daraus resultierender lysosomaler Dysfunktion, stark beeinträchtigt sein. So können Mikroglia zwar sterbende Neuronen phagozytieren, sie jedoch nicht abbauen, was zur Migration und Aktivierung weiterer Mikroglia und zur Freisetzung von Tumornekrosefaktor (TNF)-a, IL-6 und Stickoxid führen kann, was auf Neuronen toxisch wirkt (Kettenmann et al., 2013). In einem Mausmodell der Sandhoff-Erkrankung (β-Hexosaminidase-Defizienz) konnte durch Knochenmarktransplantation aus gesunden Mäusen die Aktivierung der defekten Mikroglia und der neuronale Zelltod, durch die Migration gesunder Mikroglia ins Hirn, verhindert werden. Zusätzlich differenzierten eingewanderte, transplantierte Monozyten im Hirn zu Mikroglia, die zur Phagozytose und Abbau degenerierter Neuronen fähig waren (Wada et al., 2000). Di Malta et al. konnten mit Hilfe eines astrozytenspezifischen konditionellen knockouts von SUMF1, was ein Mausmodell der multiplen Sulfatasedefizienz (MSD) darstellt, zeigen, dass dysfunktionelle Astrozyten zur

Neurodegeneration von kortikalen Neuronen beitragen, was auf den Verlust ihrer Funktion bei der Versorgung von neuronalen Zellen zurückzuführen ist. Die Degeneration von Purkinje-Zellen war in diesem Mausmodell jedoch unabhängig von der Funktionalität der Astrozyten (Di Malta *et al.*, 2012). In einem anderen Mausmodell für die lysosomale Speichererkrankung Niemann-Pick Typ C (NPC), das ebenfalls durch den Verlust der Purkinje-Zellschicht gekennzeichnet ist, konnte gezeigt werden, dass dysfunktionelle Astrozyten allein keinen Einfluss auf das Absterben von Purkinjezellen haben, so dass vermutlich zellautonome Mechanismen diesen Phänotyp hervorrufen (Elrick *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011).

Der Abbau von zelleigenen, cytosolischen Proteinen und fehlerhaften, gealterten Organellen erfolgt durch Autophagie. Der knockout essentieller Gene der Autophagie führt zu cytoplasmatischen Einschlüssen (Autophagosomen) in Neuronen und anschließender Neurodegeneration, insbesondere von Purkinje-Zellen. In Mäusen mit konditionellen, neuronen-spezifischen knockouts von Atg5 und Atg7, Proteinen, die für den Autophagieprozess essentiell sind, wurden ähnliche Verhaltensauffälligkeiten wie in dem hier beschriebenen Gnptabki-Mäusen beobachtet (Clasping der Hinter- und Vorderläufe und unkoordinierte Bewegungen) (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Beeinträchtigungen des Autophagieprozesses konnten bereits in anderen lysosomalen Speichererkrankungen, wie Multipler Sulfatasedefizienz (MSD), Mucopolysaccharidose Typ IIIA (MPSIIIA), Danon-Krankheit und Mucolipidose Typ IV (MLIV), gezeigt werden (Tanaka et al., 2000; Jennings et al., 2006; Settembre et al., 2008). Zur Bestimmung der relativen Menge von Autophagosomen im Hirn der Gnptab^{ki}-Mäuse wurden LC3 Western-Blot-Analysen durchgeführt. Während der Reifung der Autophagosomen wird die cytosolische Form von LC3 (LC3-I) in die Autophagosomenmembran-gebundene LC3-II-Form überführt (Matsushita et al., 2007). Die Menge von LC3-II korreliert dabei mit der relativen Anzahl der Autophagosomen (Kabeya et al., 2000). Im Hirn von 10 Monate alten Gnptab^{ki}-Mäusen ist die Menge an LC3-II im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifkant um das 2,5-fache erhöht (Abb. 4-19). Der Anstieg der Autophagosomenzahl kann auf eine erhöhte Bildungsrate der Autophagosomen oder eine reduzierte Fusion mit Lysosomen zurückgeführt werden. Um dies zu klären, wurde die Menge von Beclin-1 bestimmt. Beclin-1 ist Teil eines Proteinkomplexes, der essentiell für die induzierte Bildung des Phagophores ist (Kang et al., 2011; Russell et al., 2013). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Beclin-1-Mengen zwischen Hirnen aus Wildtyp- und Gnptabki- Mäusen festgestellt werden (Abb. 4-19). Erhöhte LC3-II- und unveränderte Beclin-1-Konzentrationen wurden auch für Mausmodelle der lysosomalen Erkrankungen MSD und MPSIIIA beschrieben. MSDund MPSIIIA-Mausmodellen ist die In Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen beeinträchtigt (Settembre et al., 2008), was schließlich zur Akkumulation von toxischen Proteinen und dysfunktionellen Mitochondrien und zur Apoptose führt (Boya et al., 2005). Ob die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen in Gnptab^{ki}-Mäusen beeinträchtigt ist, oder ob aufgrund defizienter lysosomaler Enzyme der Abbau der Autophagosomen vermindert ist, ist bisher unbekannt.

Zusätzlich sind in Hirnen von *Gnptab^{ki}*-Mäusen signifikant erhöhte Konzentrationen von p62 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen detektierbar (Abb. 4-19, Abb. 4-20), wie sie auch bei MSD- und MPSIIIA-Mäusen beschrieben wurden (Settembre *et al.*, 2008). Das cytosolische Protein p62 bindet ubiquitinylierte Proteine, vermittelt ihre Aufnahme in Autophagosomen und ihren lysosomalen Abbau. Durch die Oligomerisierung von p62 und die Bindung ubiquitinylierter Proteine werden p62-haltige Aggregate gebildet, die durch Bindung an LC3-II in Autophagosomen eingeschlossen werden (Bjorkoy *et al.*, 2005). Micsenyi *et al.* postulieren zudem, dass lysosomales Speichermaterial durch lysosomale Membranpermeabilität ins Cytosol gelangt, an das p62 bindet und dadurch p62-positive cytosolische Einschlüsse entstehen (Micsenyi *et al.*, 2013). Ob die Aggregation von p62 toxisch ist und primär zur Degeneration der neuronalen Zellen beiträgt, ist nicht klar. Das Protein p62 ist ein multifunktionelles Protein, dessen direkte Interaktion mit Caspase-8 zum Zelltod führen kann, während p62-vermittelte Aktivierung des TRAF-NFκB Signalweges das Zellüberleben fördern kann (Ichimura und Komatsu, 2010).

Am *Gnptab^{ki}*-Mausmodell der Mucolipidose Typ II konnten Pathomechanismen der Neurodegeneration bei dieser Erkrankung erstmalig untersucht werden. Die neurodegenerativen Prozesse sind vermutlich zurückzuführen auf: 1) beeinträchtige basale Autophagieprozesse, 2) dysfunktionelle Astrozyten, die die nutrielle Versorgung der Neuronen und ihre Homöostase beeinflussen, 3) dysfunktionelle Mikroglia, die die

Anreicherung von neurotoxischem Tumornekrosefaktoren (TNF)- α , IL-6 und NO bewirken, und 4) auf die Aktivierung p62-vermittelter Apoptosemechanismen.

5.6 M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine

Untersuchungen an *Gnptab^{ki}*-MEFs zeigten, dass einige lysosomale Proteine unabhängig von M6P zu Lysosomen transportiert werden können (Abb. 4-1 C, Abb. 4-2). In *Pulse-Chase*-Experimenten und Western-Blot-Analysen konnte dies für die lysosomale Protease Cathepsin D gezeigt werden. Zudem liegt Cathepsin B im neuronalen Gewebe von *Gnptab^{ki}*- Mäusen als reife, prozessierte Form vor (Kollmann *et al.*, 2012). Auch in Organen von Patienten mit Mucolipidose Typ II konnten normale Aktivitäten für die lysosomale Hydrolase β -Hexosaminidase gemessen werden (Waheed *et al.*, 1982), was darauf hinweist, dass einige lösliche lysosomale Proteine über alternative Transportmechanismen zum Lysosomen gelangen können.

Sortilin, ein Typ-1 Transmembranprotein, der verschiedene Liganden binden kann (Quistgaard et al., 2009), wurde als ein alternativer Rezeptor für den Transport lysosomaler Enzyme postuliert. Er besitzt Homologien zum Vps10-Rezeptor, der in der Hefe für den Transport saurer Hydrolasen zur Vakuole verantwortlich ist (Petersen et al., 1997). Sortilin enthält in seiner cytosolischen Domäne ein Dileucin- und Tyrosin-Sortierungssignal mit starker Homologie zu Sortierungsmotiven des MPR300 (Nielsen et al., 2001). Er ist primär im Golgi-Apprat und an der Plasmamembran in clathrinbeschichteten Membranbereichen lokalisiert, wo er die Internalisierung von extrazellulärem Progranulin, LDL oder der Lipoprotein Lipase zu Lysosomen vermittelt (Nielsen et al., 1999; Hu et al., 2010; Strong et al., 2012). Zudem wurde beschrieben, dass Sortilin die saure Sphingomyelinase (ASM), Cathepsin D (CtsD), Cathepsin H (CtsH) und Prosaposin binden und zu den Lysosomen transportieren kann (Lefrancois et al., 2003; Ni et al., 2006; Canuel et al., 2008). Um lysosomale Proteine zu identifizieren, die Sortilin-abhängig zu Lysosomen transportiert werden können, wurden Gnptab^{ki}-Mäuse mit Sortilin-defizienten (S^{ko})-Mäusen (Jansen *et al.*, 2007) gekreuzt (Gnptab^{ki}/S^{ko}). Anschließend wurde der Transport von lysosomalen Proteinen vergleichend in S^{ko}-, Gnptab^{ki}- und Gnptab^{ki}/S^{ko}-MEFs bzw. Lungenfibroblasten untersucht, um eventuelle kompensatorische Effekte durch den jeweils anderen Rezeptor auszuschließen. Sowohl durch immunfluoszenzmikroskopische Analysen als

auch durch [³⁵S]-Methionin *Pulse-Chase*-Experimente konnten keine Veränderung in der lysosomalen Lokalisation verschiedener lysosomaler Enzyme (wie CtsD, CtsB oder ASM) bzw. keine additiven Effekte in der Fehlsortierung oder proteolytischen Prozessierung von Cathepsin D in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}- gegenüber *Gnptab^{ki}*-Fibroblasten festgestellen (Abb. 4-22, Abb. 4-23). In der vorliegenden Arbeit konnten in S^{ko}-Mäusen weder Transportdefekte von Cathepsin D noch typisches Speichermaterial lysosomaler Erkrankungen nachgewiesen werden, was gegen eine signifikante Rolle von Sortilin im Transport löslicher Proteine zu Lysosomen spricht.

Zur Identifizierung von Sortilin als Transportrezeptor wurde in der Arbeitsgruppe von Morales ein verkürztes, dominant-negatives Sortilin-Protein exprimiert, das aufgrund der fehlenden cytosolischen Domäne weder zu frühen noch zu späten Endosomen transportiert werden kann und im Golgi-Apparat verbleibt (Lefrancois *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2006; Canuel *et al.*, 2008). Nach Überexpression in unterschiedlichen Zelltypen konnte die Kolokalisation der lysosomalen Proteine saure Sphingomyelinase, Cathepsin D, Cathepsin H und Prosaposin mit dem dominant-negativen Sortilin im Golgi-Apparat detektiert werden. Außerdem wurde aus Koimmunopräzipitationsexperimenten eine direkte Interaktion von Sortilin mit den untersuchten lysosomalen Proteinen abgeleitet. Die Ergebnisse der Morales Arbeitsgruppe stehen zum Teil im Widerspruch mit den hier durchgeführten Experimenten. Morales hat jedoch nicht direkt gezeigt, dass Sortilin den lysosomalen Transport der untersuchten Proteine vermittelt. Zudem sind die durch Morales *et al.* durchgeführten siRNA-vermittelten Sortilin*-knockdown*-Experimente nicht mit den hier durchgeführten Experimenten an *Gnptab*^{ki}/S^{ko}-MEFs vergleichbar, da sie an Zellen mit intaktem M6P-vermittelten Transport durchgeführt wurden.

Die Expression von Sortilin ist in *Gnptab^{ki}*-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs erhöht (Abb. 4 25) und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs zeigten, ähnlich wie *Gnptab^{ki}*-MEFs, signifikant erhöhte mRNA-Spiegel der lysosomalen Proteasen Cathepsin D und Cathepsin B. Da jedoch in S^{ko}-MEFs die mRNA-Expression dieser lysosomalen Enzyme nicht verändert ist (Abb. 4-21), ist eine kompensatorische Aktivierung des lysosomalen Sensors TFEB durch die lysosomale Speicherung in *Gnptab^{ki}*-Zellen wahrscheinlich, während die Defizienz von Sortilin zu keiner transkriptionellen Expressionskontrolle lysosomaler Zielgene durch TFEB führt.

Neben dem direkten intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zu Endosomen können lysosomale Enzyme das Lysosom auch durch Sekretion und Wiederaufnahme über Rezeptor-vermittelte Endozytose (*secretion-recapture*) erreichen (Hickman *et al.*, 1972). So konnten Sando und Neufeld bereits 1977 zeigen, dass sezernierte phosphorylierte α -L-Iduronidase über Rezeptoren an der Oberfläche von Fibroblasten aufgenommen werden kann (Sando und Neufeld, 1977). Die Endozytose von phosphorylierten lysosomalen Enzymen erfolgt hauptsächlich über den MPR300 (Stein *et al.*, 1987). So ist die Endozytose M6P-haltiger Arylsulfatase B (ASB) sowohl in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}*- als auch in *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs komplett durch den molaren Überschuß an M6P inhibierbar. Zudem nehmen *Gnptab^{ki}*- als auch *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-MEFs 7-fach mehr ASB auf als Wildtyp-MEFs, was auf eine erhöhte Anzahl von M6P-Rezeptoren an der Plasmamembran zurückzuführen ist (Braulke *et al.*, 1992) und durch die TFEB-regulierte Expression des *Igf2r*-Gens, das den murinen MPR300 kodiert, in

 $Gnptab^{ki}$ - als auch in $Gnptab^{ki}/S^{ko}$ -MEFs erklärbar ist (Palmieri *et al.*, 2011).

Neben dem MPR300 können auch andere Zelloberflächenrezeptoren die Aufnahme und den lysosomalen Transport von Proteinen vermitteln. Durch Endozytoseexperimente mit nicht-phosphoryliertem, [¹²⁵I]-markiertem Cathepsin D und Cathepsin B konnte gezeigt werden, dass diese Liganden sowohl in Wildtyp- als auch in Gnptab^{ki} und Gnptab^{ki}/S^{ko}-MEFs internalisiert werden (Abb. 4-27 A und B). Derocq et al. konnten zeigen, dass Cathepsin D an die extrazelluläre Domäne der β-Kette von LRP1 bindet (Derocq et al., 2012). In proximalen Tubuluszellen der Niere wird Cathepsin B über LRP2 endozytiert, ein weiterer Rezeptor der LDL-Rezeptorfamilie (Nielsen et al., 2007). Um zu untersuchen, ob Rezeptoren der LDLR-Familie an der Endozytose der nicht-phosphorylierten Proteine Cathepsine D und B beteiligt sind, wurden die Internalisierungsexperimente zusätzlich an LRP1^{ko}-, LDLR^{ko}- und LDLR/LRP1^{ko}-MEFs durchgeführt und der Einfluß des Rezeptor-assoziierten Proteins RAP, einem Inhibitor für LRP1 und LDLR, auf die Endozytoserate der [¹²⁵I]-markierten Cathepsine untersucht. Die Bindung von RAP an LRP1 führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, sodass kein Ligand mehr binden kann. Mit geringerer Affinität bindet RAP auch an LDLR, was die Bindung anderer Liganden inhibiert (Jensen et al., 2006). Die Experimente zeigen, dass Cathepsin D an LRP1 und Cathepsin B sowohl an LRP1 als auch an LDLR binden kann und diese Rezeptoren die M6P-unabhängige Endozytose in

MEFs vermitteln. LRP2 wird in MEFs nicht exprimiert (nicht veröffentlichte Resultate), und trägt deshalb nicht zum M6P-unabhängigen Transport in MEFs bei. Hingegen belegen Realtime- und Western-Blot-Analysen, dass die Expression von LRP1 und LDLR in Gnptab^{ki}- und Gnptab^{ki}/S^{ko}-MEFs gegenüber Wildtyp-MEFs bis zu 5-fach erhöht ist (Abb. 4-24). Sortilin ist ein wichtiger Rezeptor im Lipoprotein-Metabolimus und kann sowohl LDL binden und endozytieren als auch die Produktion von Apoliprotein B regulieren (Strong et al., 2012). Durch die Akkumulation von nichtverestertem Cholesterin in Lysosomen und die daraus resultierende Defizienz in *Gnptab*^{*ki*}-MEFs von werden anderen Membranen Cholesterin-sensitive Transkriptionsfaktoren, SREBPs (sterol regulatory element-binding protein), aktiviert die u. a. die Expression der LDLR an der Oberfläche erhöhen und die Cholesterin-Defizienz über gesteigerte LDL-Endozytose kompensieren (Goldstein und Brown, 2009). LRP1 und LDLR werden, neben Hepatozyten und Kupfferzellen, auch in Neuronen und Astrozyten exprimiert und stellen daher bedeutende, alternative Transportrezeptoren für Cathepsin D und B und möglicherweise andere lysosomale Enzyme in verschiedenen Zelltypen dar (Zheng et al., 1994; Beffert et al., 2004; Basak et al., 2012)

Neben Cathepsin B und D wurde auch die Endozytose von nicht-phosphorylierter β -Glucocerebrosidase analysiert. β -Glucocerebrosidase ist das Enzym, das seit 1992 zur weltweit ersten Enzymersatztherapie der lysosomalen Speichererkrankung M. Gaucher eingesetzt wurde (Mistry *et al.*, 1992). Um vor allem die peripheren Organe bei diesen Patienten zu erreichen, wird auf eine M6P-abhängige Endozytose zugunsten der Aufnahme über Mannoserezeptoren verzichtet. Während die β -Glucocerebrosidase intrazellulär über das lysosomale Membranprotein Limp-2 zu Lysosomen transportiert wird (Reczek *et al.*, 2007), ist es unklar wie das Enzym in andere Zellen aufgenommen wird, die keine Mannoserezeptoren besitzen, wie z. B. MEFs.

Durch Endozytoseexperimente sollte deshalb untersucht werden, ob β -Glucocerebrosidase auch über LDLR und/oder Limp-2 aufgenommen werden kann oder ob andere Rezeptoren die Internalisierung in Wildtyp-, *Gnptab^{ki}-*, *Gnptab^{ki}/S^{ko}-*MEFs vermitteln. Sowohl in LDLR^{ko}- als auch in LIMP-2^{ko}-MEFs wurde β -Glucocerebrosidase in RAP-unabhängiger Weise endozytiert (Abb. 4-27 C), so dass neben den Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie und LIMP-2 ein weiterer, nichtidentifizierter Rezeptor für die β -Glucocerebrosidase-Aufnahme postuliert werden muss. In *Gnptab^{ki}*- und *Gnptab^{ki}*/S^{ko}- MEFs war die endozytierte β -Glucocerebrosidase-Menge im Vergleich zu Wildtyp-MEFs erhöht, sodass vermutlich auch dieser noch unbekannte Rezeptor für β -Glucocerebrosidase, wie andere endozytierende Rezeptoren (MPR300, LDLR), in diesen Genotypen hochreguliert ist. Es wurden mehrere Zelltypspezifische Endozytoserezeptoren für lysosomale Enzyme beschrieben. So bindet Cathepsin X an Heparansulfat von Proteoglycanen in CHO-Zellen und wird internalisiert (Nascimento *et al.*, 2005) und Mannoserezeptoren in Makrophagen können exogenes Cathepsin D endozytieren (Young *et al.*, 1991). Zudem ist die Zelltypspezifische Endozytose von lysosomalen Enzymen abhängig von ihrer N-Glycosylierung (Du *et al.*, 2005). Aufgund fehlender M6P-Reste in MLII-Zellen werden die Oligosaccharidstrukturen an lysosomalen Proteinen zu komplexen Zuckern prozessiert, die möglicherweise andere Bindungsaffinitäten für Rezeptoren besitzen als M6P-modifizierte lysosomale Enzyme.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cathepsin B, Cathepsin D und saure Sphingomyelinase in Fibroblasten M6P- und Sortilin-unabhängig zu Lysosomen gelangen. Die Endozytose von Cathepsin D erfolgt über LRP1 und Cathepsin B über LRP1 und LDLR, wohingegen der Rezeptor, der die Internalisierung von β-Glucocerebrosidase in Fibroblasten vermittelt, noch nicht bekannt ist.

Die Identifizierung alternativer Rezeptoren für den Transport lysosomaler Enzyme zu Lysosomen ist maßgeblich für die weitere Entwicklung von Enzymersatztherapien (ERT). Die meisten ERTs sind von M6P-vermittelten Transportmechanismen abhängig, wodurch die effiziente Endozytose durch den Phosphorylierungsgrad der rekombinaten Proteine und die Expression von MPR300 limitiert ist (Grubb *et al.*, 2010). Nicht phosphorylierte Proteine können jedoch durch die Bindung an alternative Rezeptoren endozytiert werden. So wird ein hoher Prozentsatz des rekombinaten Proteins durch Mannoserezeptoren in die Leber aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit und durch andere Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie die Endozytose von lysosomalen Enzymen in Fibroblasten und Zellen des proximalen Tubulus der Niere vermitteln. In experimentellen Ansätzen wird zudem

versucht, durch Fusion von lysosomalen Proteinen mit ApoB-Domänen, die an LDLR binden, die Endozytoserate dieser Proteine sowie die Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke zu verbessern (Sorrentino *et al.*, 2013). Dies zeigt, dass die Identifizierung von Rezeptoren, die den Transport zu Lysosomen vermitteln können, maßgeblich ist für die Weiterentwicklung Enzymersatz basierter-Therapien lysosomaler Erkrankungen.

6. Zusammenfassung

Die GlcNAc-1-Phosphotransferase katalysiert den ersten Schritt bei der Synthese von Mannose-6-Phosphat (M6P)-Resten an löslichen lysosomalen Enzymen. Diese posttranslationale Modifikation ist essentiell für den effektiven, intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme zu Lysosomen. Mutationen im GNPTAB-Gen, das die α - und β -Untereinheiten der GlcNAc-1-Phosphotransferase kodiert, führen zur lysosomalen Speichererkrankung Mucolipidose Typ II (MLII). In MLII-Zellen werden neu synthetisierte lysosomale Enzyme aufgrund fehlender M6P-Erkennungssignale fehlsortiert und sezerniert, was die intrazelluläre Defizienz dieser Enzyme in und die nachfolgende Akkumulation Lysosomen von nicht-abbaubaren Speichersubstanzen zur Folge hat. MLII ist klinisch durch schwere psychomotorische mentale Retardierung. Skelettdeformitäten und kardio/respiratorische und Komplikationen charakterisiert, was zum frühzeitigen Tod führt.

Durch die Einführung einer Patientenmutation an orthologer Stelle im murinen *Gnptab*-Gen wurde ein Mausmodell für MLII (*Gnptab*^{ki}) generiert. In der vorliegenden Arbeit konnten durch massenspektrometrische und immunhistologische Analysen von neuronalem Gewebe der *Gnptab*^{ki}-Mäuse die Akkumulation von fucosylierten und Mannose-reichen N-Glycanen, von Bis(monoacylglycero)phosphat, Cholesterin und G_{M1}- und G_{M2}-Gangliosiden identifiziert werden. In embryonalen Mausfibroblasten von *Gnptab*^{ki}-Mäusen war zusätzlich die Speicherung von Glycosaminoglycanen nachweisbar.

Die Identifizierung des Speichermaterials und biochemische Analysen zu Transport und Lokalisation lysosomaler Enzyme zeigten, dass die α -L-Fucosidase, α -Mannosidase, β -Galactosidase, β -Hexosaminidase, Cathepsin Z und das Cholesterin-bindende Protein Npc2 ausschließlich M6P-abhängig zu den Lysosomen transportiert werden und somit den lysosomalen Abbau von Substraten spezifisch limitieren.

Andere lysosomale Enzyme, wie Cathepsin D, Cathepsin B und saure Sphingomyelinase, werden in *Gnptab*^{ki}-MEFs partiell über M6P-unabhängige Transportwege zu Lysosomen transportiert.

Um zu untersuchen, ob Sortilin als alternativer Transportrezeptor für den M6Punabhängigen Transport lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen verantwortlich ist, wurden zunächst *Gnptab^{ki}*-Mäuse mit Sortilin-defizienten (S^{ko})-Mäusen gekreuzt. In Fibroblasten aus *Gnptab^{ki}*/S^{ko}-Mäusen war kein additiver Effekt auf die Fehlsortierung von Cathepsin D, B und saurer Sphingomyelinase zu Lysosomen feststellbar.

Endozytoseexperimente mit nicht-phosphoryliertem Cathepsin D und Cathepsin B zeigten hingegen, dass diese lysosomalen Proteasen über Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie, bevorzugt LRP1, an der Plasmamembran internalisiert werden. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass neu synthetisierte lysosomale Enzyme in *Gnptab^{ki}*-Fibroblasten im Golgi-Apparat nicht an M6P-Rezeptoren binden und sezerniert werden, um anschließend über Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie an der Zelloberfläche wieder in die Zellen aufgenommen und zu Lysosomen transportiert zu werden (*secretion-recapture* Mechanismus).

Schließlich wurden in dieser Arbeit pathologische Veränderungen im Hirn und Pathomechanismen der Neurodegeneration in *Gnptab^{ki}*-Mäusen analysiert. Neben dem progressiven Verlust der Purkinje-Zellschicht und Demyelinisierungsprozessen im Cerebellum waren Astrogliosen und Mikrogliosen im gesamten Hirn der *Gnptab^{ki}*-Mäuse feststellbar. Die Störung der basalen Autophagie kann für den neuronalen Zelltod verantwortlich gemacht werden.

Die *Gnptab^{ki}*-Maus kann als hervorragendes, experimentelles Modell für die Untersuchungen von Pathomechanismen der Neurodegeneration angesehen werden, die nicht nur die Etablierung neuer therapeutischer Konzepte für diese Erkrankung erlauben, sondern die auch auf andere lysosomale Speichererkrankungen mit ähnlichen Symptomen übertragbar sind. Außerdem bieten isolierte Zellen dieser Mäuse die Möglichkeit, neue Transportwege lysosomaler Proteine zu Lysosomen und ihre Regulation zu untersuchen, die für verbesserte und gezielte Enzymersatztherapien bei lysosomalen Erkrankungen von Bedeutung sind.

7. Literaturverzeichnis

- Aerts, J. M., Schram, A. W., Strijland, A., van Weely, S., Jonsson, L. M., Tager, J. M., Sorrell, S. H., Ginns, E. I., Barranger, J. A. and Murray, G. J. (1988).
 "Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation." <u>Biochim Biophys Acta</u> 964(3): 303-308.
- Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A. D., Pavao, M. S., Tzanakakis, G. N. and Karamanos, N. K. (2012).
 "Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment." <u>FEBS</u> <u>J</u> 279(7): 1177-1197.
- Alroy, J. and Ucci, A. A. (2006). "Skin biopsy: a useful tool in the diagnosis of lysosomal storage diseases." <u>Ultrastruct Pathol</u> 30(6): 489-503.
- Aronson, N. N., Jr. and Kuranda, M. J. (1989). "Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins." <u>FASEB J</u> 3(14): 2615-2622.
- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." Traffic 6(1): 2-9.
- Ballabio, A. and Gieselmann, V. (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1793(4): 684-696.
- Bao, M., Booth, J. L., Elmendorf, B. J. and Canfield, W. M. (1996). "Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure." J Biol Chem 271(49): 31437-31445.
- Basak, J. M., Verghese, P. B., Yoon, H., Kim, J. and Holtzman, D. M. (2012). "Lowdensity lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of Abeta uptake and degradation by astrocytes." <u>J Biol Chem</u> 287(17): 13959-13971.
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A. T., Lack, N., Choi, K. B. and Jefferies, W. A. (2012). "A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway." <u>Nat Immunol</u> 13(3): 237-245.
- Beaujouin, M., Prebois, C., Derocq, D., Laurent-Matha, V., Masson, O., Pattingre, S., Coopman, P., Bettache, N., Grossfield, J., Hollingsworth, R. E., Zhang, H., Yao, Z., Hyman, B. T., van der Geer, P., Smith, G. K. and Liaudet-Coopman, E. (2010). "Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth." J Cell Sci 123(Pt 19): 3336-3346.
- Beffert, U., Stolt, P. C. and Herz, J. (2004). "Functions of lipoprotein receptors in neurons." <u>J Lipid Res</u> 45(3): 403-409.
- Belleri, M., Ronca, R., Coltrini, D., Nico, B., Ribatti, D., Poliani, P. L., Giacomini, A., Alessi, P., Marchesini, S., Santos, M. B., Bongarzone, E. R. and Presta, M. (2013). "Inhibition of angiogenesis by beta-galactosylceramidase deficiency in globoid cell leukodystrophy." <u>Brain</u> 136(Pt 9): 2859-2875.
- Beltroy, E. P., Richardson, J. A., Horton, J. D., Turley, S. D. and Dietschy, J. M. (2005).
 "Cholesterol accumulation and liver cell death in mice with Niemann-Pick type C disease." <u>Hepatology</u> 42(4): 886-893.
- Ben-Zaken, O., Shafat, I., Gingis-Velitski, S., Bangio, H., Kelson, I. K., Alergand, T., Amor, Y., Maya, R. B., Vlodavsky, I. and Ilan, N. (2008). "Low and high

affinity receptors mediate cellular uptake of heparanase." <u>Int J Biochem Cell</u> <u>Biol</u> **40**(3): 530-542.

- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T. (2005). "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." J <u>Cell Biol</u> 171(4): 603-614.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A. and Johansen, T. (2009). "Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1." <u>Methods Enzymol</u> 452: 181-197.
- Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P. and Schwake, M. (2010).
 "Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase." <u>Hum Mol Genet</u> 19(4): 563-572.
- Blanz, J., Stroobants, S., Lüllmann-Rauch, R., Morelle, W., Lüdemann, M., D'Hooge, R., Reuterwall, H., Michalski, J. C., Fogh, J., Andersson, C. and Saftig, P. (2008). "Reversal of peripheral and central neural storage and ataxia after recombinant enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice." <u>Hum Mol Genet</u> 17(22): 3437-3445.
- Bosshard, N. U., Hubler, M., Arnold, S., Briner, J., Spycher, M. A., Sommerlade, H. J., von Figura, K. and Gitzelmann, R. (1996). "Spontaneous mucolipidosis in a cat: an animal model of human I-cell disease." <u>Vet Pathol</u> **33**(1): 1-13.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. and Kroemer, G. (2005). "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u> 25(3): 1025-1040.
- Brady, R. O. and Schiffmann, R. (2004). "Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders." Lancet Neurol **3**(12): 752-756.
- Braulke, T. (1996). Soluble Lysosomal Proteins. <u>Subcellular Biochemistry</u>. J. B. Lloyd and W., M. R., Plenum Press, New York. **27:** 15 49.
- Braulke, T. and Bonifacino, J. (2009). "Sorting of lysosomal proteins." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1793**(4): 605-614.
- Braulke, T., Raas-Rothschild, A. and Kornfeld, S. (2013). I-Cell Disease and Pseudo-Hurler Polydystrophy: Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization. <u>In The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited</u> <u>Disease</u>. M. Valle, Beaudet, A., Vogelstein, B., Kinzler, K., Antonarakis, S., Ballabio, A., Sciver, C., Sly, W. S., Childs, B., Bunz, F., Gibson, K. M. and Mitchell, G.
- Braulke, T., Tippmer, S., Matzner, U., Gartung, C. and von Figura, K. (1992). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor in I-cell disease fibroblasts: increased synthesis and defective regulation of cell surface expression." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1138(4): 334-342.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." <u>Science</u> 232(4746): 34-47.
- Bu, G. (2001). "The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family." Int Rev Cytol **209**: 79-116.

- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K. and Morales, C. R. (2008). "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **373**(2): 292-297.
- Cathey, S. S., Kudo, M., Tiede, S., Raas-Rothschild, A., Braulke, T., Beck, M., Taylor, H. A., Canfield, W. M., Leroy, J. G., Neufeld, E. F. and McKusick, V. A. (2008). "Molecular order in mucolipidosis II and III nomenclature." <u>Am J Med Genet A</u> 146A(4): 512-513.
- Cheng, J., DeCaprio, J. A., Fluck, M. M. and Schaffhausen, B. S. (2009). "Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens." <u>Semin Cancer Biol</u> **19**(4): 218-228.
- Clas, P., Groeschel, S. and Wilke, M. (2012). "A semi-automatic algorithm for determining the demyelination load in metachromatic leukodystrophy." <u>Acad</u> <u>Radiol</u> **19**(1): 26-34.
- Claussen, M., Kübler, B., Wendland, M., Neifer, K., Schmidt, B., Zapf, J. and Braulke, T. (1997). "Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D." <u>Endocrinology</u> 138(9): 3797-3803.
- Clayton, C. E., Lovett, M. and Rigby, P. W. (1982). "Functional analysis of a simian virus 40 super T-antigen." J Virol 44(3): 974-982.
- Cooper, A. A. and Stevens, T. H. (1996). "Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases." J Cell Biol **133**(3): 529-541.
- Damek-Poprawa, M., Diemer, T., Lopes, V. S., Lillo, C., Harper, D. C., Marks, M. S., Wu, Y., Sparrow, J. R., Rachel, R. A., Williams, D. S. and Boesze-Battaglia, K. (2009). "Melanoregulin (MREG) modulates lysosome function in pigment epithelial cells." J Biol Chem 284(16): 10877-10889.
- Damme, M., Morelle, W., Schmidt, B., Andersson, C., Fogh, J., Michalski, J. C. and Lübke, T. (2010). "Impaired lysosomal trimming of N-linked oligosaccharides leads to hyperglycosylation of native lysosomal proteins in mice with alphamannosidosis." <u>Mol Cell Biol</u> **30**(1): 273-283.
- Damme, M., Stroobants, S., Walkley, S. U., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Fogh, J., Saftig, P., Lubke, T. and Blanz, J. (2011). "Cerebellar alterations and gait defects as therapeutic outcome measures for enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis." J Neuropathol Exp Neurol 70(1): 83-94.
- de Duve, C. (1983). "Lysosomes revisited." Eur J Biochem 137(3): 391-397.
- de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955).
 "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." <u>Biochem J</u> 60(4): 604-617.
- Derocq, D., Prebois, C., Beaujouin, M., Laurent-Matha, V., Pattingre, S., Smith, G. K. and Liaudet-Coopman, E. (2012). "Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis." <u>Oncogene</u> **31**(26): 3202-3212.
- Di Malta, C., Fryer, J. D., Settembre, C. and Ballabio, A. (2012). "Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **109**(35): E2334-2342.

- Dittmer, F., Ulbrich, E. J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1999). "Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific." J Cell Sci 112 (Pt 10): 1591-1597.
- Du, H., Levine, M., Ganesa, C., Witte, D. P., Cole, E. S. and Grabowski, G. A. (2005).
 "The role of mannosylated enzyme and the mannose receptor in enzyme replacement therapy." <u>Am J Hum Genet</u> 77(6): 1061-1074.
- Elrick, M. J., Pacheco, C. D., Yu, T., Dadgar, N., Shakkottai, V. G., Ware, C., Paulson, H. L. and Lieberman, A. P. (2010). "Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration." <u>Hum Mol Genet</u> 19(5): 837-847.
- Flanagan-Steet, H., Sias, C. and Steet, R. (2009). "Altered chondrocyte differentiation and extracellular matrix homeostasis in a zebrafish model for mucolipidosis II." <u>Am J Pathol</u> 175(5): 2063-2075.
- Franke, M., Braulke, T. and Storch, S. (2013). "Transport of the GlcNAc-1phosphotransferase alpha/beta-subunit precursor protein to the Golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif." J Biol Chem 288(2): 1238-1249.
- Freeze, H. (2009). Genetic Disorders of Glycan Degradation. <u>Essentials of Glycobiology, 2nd edition</u>. A. Varki, Cummings, R. and Esko, J. D. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Futerman, A. H. and van Meer, G. (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> 5(7): 554-565.
- Gallala, H. D. and Sandhoff, K. (2011). "Biological function of the cellular lipid BMP-BMP as a key activator for cholesterol sorting and membrane digestion." <u>Neurochem Res</u> **36**(9): 1594-1600.
- Gelfman, C. M., Vogel, P., Issa, T. M., Turner, C. A., Lee, W. S., Kornfeld, S. and Rice, D. S. (2007). "Mice lacking alpha/beta subunits of GlcNAc-1phosphotransferase exhibit growth retardation, retinal degeneration, and secretory cell lesions." <u>Invest Ophthalmol Vis Sci</u> 48(11): 5221-5228.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (2003). "Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **4**(3): 202-212.
- Go, G. W. and Mani, A. (2012). "Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis." <u>Yale J Biol Med</u> **85**(1): 19-28.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1976). "The LDL pathway in human fibroblasts: a receptor-mediated mechanism for the regulation of cholesterol metabolism." <u>Curr Top Cell Regul</u> 11: 147-181.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2009). "History of Discovery: The LDL Receptor." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</u> **29**(4): 431–438. .
- Grubb, J. H., Vogler, C. and Sly, W. S. (2010). "New strategies for enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." <u>Rejuvenation Res</u> **13**(2-3): 229-236.
- Guha, S. and Padh, H. (2008). "Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis." Indian J Biochem Biophys **45**(2): 75-90.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. and Mizushima, N. (2006).

"Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." <u>Nature</u> **441**(7095): 885-889.

- Hasilik, A. and Neufeld, E. F. (1980). "Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues." <u>J Biol Chem</u> 255(10): 4946-4950.
- Hasilik, A. and von Figura, K. (1981). "Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and beta-hexosaminidase." <u>Eur J Biochem</u> 121(1): 125-129.
- Hawkins-Salsbury, J. A., Parameswar, A. R., Jiang, X., Schelsinger, P. H., Bongarzone, E. R., Ory, D. S., Demchenko, A. V. and Sands, M. S. (2013). "Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in Globoid Cell Leukodystrophy, alters membrane architecture." J Lipid Res.
- Hickman, S. and Neufeld, E. F. (1972). "A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 49(4): 992-999.
- Hiesberger, T., Huttler, S., Rohlmann, A., Schneider, W., Sandhoff, K. and Herz, J. (1998). "Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." <u>EMBO J</u> 17(16): 4617-4625.
- Hu, F., Padukkavidana, T., Vaegter, C. B., Brady, O. A., Zheng, Y., Mackenzie, I. R., Feldman, H. H., Nykjaer, A. and Strittmatter, S. M. (2010). "Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin." <u>Neuron</u> 68(4): 654-667.
- Huotari, J. and Helenius, A. (2011). "Endosome maturation." <u>EMBO J</u> **30**(17): 3481-3500.
- Hurwitz, R., Ferlinz, K., Vielhaber, G., Moczall, H. and Sandhoff, K. (1994). "Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts." J <u>Biol Chem</u> 269(7): 5440-5445.
- Ichimura, Y. and Komatsu, M. (2010). "Selective degradation of p62 by autophagy." <u>Semin Immunopathol</u> **32**(4): 431-436.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C. and Mizushima, N. (2012). "The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes." Cell **151**(6): 1256-1269.
- Jabs, S., Quitsch, A., Käkelä, R., Koch, B., Tyynela, J., Brade, H., Glatzel, M., Walkley, S., Saftig, P., Vanier, M. T. and Braulke, T. (2008). "Accumulation of bis(monoacylglycero)phosphate and gangliosides in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis." J Neurochem 106(3): 1415-1425.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S. S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., Petersen, C. M., Lewin, G. R., Hempstead, B. L., Willnow, T. E. and Nykjaer, A. (2007). "Roles for the proneurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury." <u>Nat Neurosci</u> 10(11): 1449-1457.
- Jennings, J. J., Jr., Zhu, J. H., Rbaibi, Y., Luo, X., Chu, C. T. and Kiselyov, K. (2006). "Mitochondrial aberrations in mucolipidosis Type IV." J Biol Chem 281(51): 39041-39050.

- Jensen, G. A., Andersen, O. M., Bonvin, A. M., Bjerrum-Bohr, I., Etzerodt, M., Thogersen, H. C., O'Shea, C., Poulsen, F. M. and Kragelund, B. B. (2006). "Binding site structure of one LRP-RAP complex: implications for a common ligand-receptor binding motif." J Mol Biol 362(4): 700-716.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." <u>EMBO J</u> 19(21): 5720-5728.
- Käkelä, R., Somerharju, P. and Tyynela, J. (2003). "Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry." J Neurochem 84(5): 1051-1065.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. and Tang, D. (2011). "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> 18(4): 571-580.
- Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2012). "Chaperones in autophagy." <u>Pharmacol Res</u> **66**(6): 484-493.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F. and Verkhratsky, A. (2013). "Microglia: new roles for the synaptic stripper." <u>Neuron</u> 77(1): 10-18.
- Ko, D. C., Milenkovic, L., Beier, S. M., Manuel, H., Buchanan, J. and Scott, M. P. (2005). "Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease." <u>PLoS Genet</u> 1(1): 81-95.
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (1999). "Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport." <u>Nat Cell Biol</u> 1(2): 113-118.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (1998). "A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function." <u>Nature</u> **392**(6672): 193-197.
- Kollmann, K., Damme, M., Markmann, S., Morelle, W., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Rochert, A. K., Pohl, S., Lübke, T., Michalski, J. C., Käkelä, R., Walkley, S. U. and Braulke, T. (2012). "Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucolipidosis II 'knock-in' mice." <u>Brain</u> 135(Pt 9): 2661-2675.
- Kollmann, K., Mutenda, K. E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. and Lübke, T. (2005). "Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis." <u>Proteomics</u> 5(15): 3966-3978.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. (2010). "Lysosomal degradation of membrane lipids." <u>FEBS Lett</u> **584**(9): 1700-1712.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." <u>Nature</u> 441(7095): 880-884.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." <u>Annu Rev Biochem</u> **54**: 631-664.

- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989). "The biogenesis of lysosomes." <u>Annu Rev Cell</u> <u>Biol 5</u>: 483-525.
- Kratz, E. M., Borysewicz, K. and Katnik-Prastowska, I. (2010). "Terminal monosaccharide screening of synovial immunoglobulins G and A for the early detection of rheumatoid arthritis." <u>Rheumatol Int</u> **30**(10): 1285-1292.
- Kreutz, F., dos Santos Petry, F., Camassola, M., Schein, V., Guma, F. C., Nardi, N. B. and Trindade, V. M. (2013). "Alterations of membrane lipids and in gene expression of ganglioside metabolism in different brain structures in a mouse model of mucopolysaccharidosis type I (MPS I)." <u>Gene</u> 527(1): 109-114.
- Lacombe, J., Karsenty, G. and Ferron, M. (2013). "Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts." <u>Cell Cycle</u> **12**(17).
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-685.
- Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. and van der Goot, F. G. (2008). "Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization." <u>PLoS One</u> **3**(7): e2758.
- Lalonde, R. and Strazielle, C. (2011). "Brain regions and genes affecting limb-clasping responses." <u>Brain Res Rev</u> 67(1-2): 252-259.
- Lawrence, R., Brown, J. R., Al-Mafraji, K., Lamanna, W. C., Beitel, J. R., Boons, G. J., Esko, J. D. and Crawford, B. E. (2012). "Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses." <u>Nat Chem Biol</u> 8(2): 197-204.
- Lazzarino, D. A. and Gabel, C. A. (1988). "Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation." J Biol Chem 263(21): 10118-10126.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M. and Morales, C. R. (2003). "The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin." <u>EMBO J</u> 22(24): 6430-6437.
- Leroy, J. G. and Demars, R. I. (1967). "Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts." <u>Science</u> **157**(3790): 804-806.
- Leroy, J. G., Ho, M. W., MacBrinn, M. C., Zielke, K., Jacob, J. and O'Brien, J. S. (1972). "I-cell disease: biochemical studies." Pediatr Res 6(10): 752-757.
- Leroy, J. G. and Spranger, J. W. (1970). "I-cell disease." <u>N Engl J Med</u> 283(11): 598-599.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." <u>Methods</u> **25**(4): 402-408.
- Ludwig, T., Munier-Lehmann, H., Bauer, U., Hollinshead, M., Ovitt, C., Lobel, P. and Hoflack, B. (1994). "Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6phosphate receptor-deficient fibroblasts." <u>EMBO J</u> **13**(15): 3430-3437.
- Lynch, C. M., Johnson, J., Vaccaro, C. and Thurberg, B. L. (2005). "High-resolution light microscopy (HRLM) and digital analysis of Pompe disease pathology." J <u>Histochem Cytochem</u> 53(1): 63-73.

- Maga, J. A., Zhou, J., Kambampati, R., Peng, S., Wang, X., Bohnsack, R. N., Thomm, A., Golata, S., Tom, P., Dahms, N. M., Byrne, B. J. and LeBowitz, J. H. (2013).
 "Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in pompe mice." J Biol Chem 288(3): 1428-1438.
- Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Braulke, T. and Pohl, S. (2011). "A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism." <u>Science</u> **333**(6038): 87-90.
- Martin, J. J., Leroy, J. G., van Eygen, M. and Ceuterick, C. (1984). "I-cell disease. A further report on its pathology." <u>Acta Neuropathol</u> **64**(3): 234-242.
- Matsushita, M., Suzuki, N. N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y. and Inagaki, F. (2007). "Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy." J Biol Chem 282(9): 6763-6772.
- Mazrier, H., Van Hoeven, M., Wang, P., Knox, V. W., Aguirre, G. D., Holt, E., Wiemelt, S. P., Sleeper, M. M., Hubler, M., Haskins, M. E. and Giger, U. (2003). "Inheritance, biochemical abnormalities, and clinical features of feline mucolipidosis II: the first animal model of human I-cell disease." J Hered 94(5): 363-373.
- McGowan, J. C., Haskins, M., Wenger, D. A. and Vite, C. (2000). "Investigating demyelination in the brain in a canine model of globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) using magnetization transfer contrast: preliminary results." J <u>Comput Assist Tomogr</u> 24(2): 316-321.
- Metcalf, D. and Isaacs, A. M. (2010). "The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes." <u>Biochem Soc Trans</u> 38(6): 1469-1473.
- Michalski, J. C. and Klein, A. (1999). "Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1455(2-3): 69-84.
- Micsenyi, M. C., Dobrenis, K., Stephney, G., Pickel, J., Vanier, M. T., Slaugenhaupt, S. A. and Walkley, S. U. (2009). "Neuropathology of the Mcoln1(-/-) knockout mouse model of mucolipidosis type IV." J Neuropathol Exp Neurol 68(2): 125-135.
- Micsenyi, M. C., Sikora, J., Stephney, G., Dobrenis, K. and Walkley, S. U. (2013). "Lysosomal membrane permeability stimulates protein aggregate formation in neurons of a lysosomal disease." <u>J Neurosci</u> 33(26): 10815-10827.
- Miller, W. L. and Bose, H. S. (2011). "Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking." J Lipid Res 52(12): 2111-2135.
- Mistry, P. K., Davies, S., Corfield, A., Dixon, A. K. and Cox, T. M. (1992). "Successful treatment of bone marrow failure in Gaucher's disease with low-dose modified glucocerebrosidase." <u>Q J Med</u> 83(303): 541-546.
- Morelle, W., Jimenez, J. C., Cieniewski-Bernard, C., Dei-Cas, E. and Michalski, J. C. (2005a). "Characterization of the N-linked glycans of Giardia intestinalis." <u>Glycobiology</u> **15**(5): 549-559.

- Morelle, W., Page, A. and Michalski, J. C. (2005b). "Electrospray ionization ion trap mass spectrometry for structural characterization of oligosaccharides derivatized with 2-aminobenzamide." <u>Rapid Commun Mass Spectrom</u> **19**(9): 1145-1158.
- Müller-Loennies, S., Galliciotti, G., Kollmann, K., Glatzel, M. and Braulke, T. (2010).
 "A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphatecontaining proteins: application in mucolipidosis type II patients and mice." <u>Am</u> <u>J Pathol</u> 177(1): 240-247.
- Müller, S., Dennemarker, J. and Reinheckel, T. (2012). "Specific functions of lysosomal proteases in endocytic and autophagic pathways." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1824**(1): 34-43.
- Nascimento, F. D., Rizzi, C. C., Nantes, I. L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A. K., Nader, H. B., Juliano, L. and Tersariol, I. L. (2005). "Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans." <u>Arch Biochem Biophys</u> 436(2): 323-332.
- Ni, X. and Morales, C. R. (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." <u>Traffic</u> **7**(7): 889-902.
- Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J. and Petersen, C. M. (1999). "Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase." <u>J Biol Chem</u> 274(13): 8832-8836.
- Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. and Petersen, C. M. (2001). "The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein." <u>EMBO J</u> 20(9): 2180-2190.
- Nielsen, R., Courtoy, P. J., Jacobsen, C., Dom, G., Lima, W. R., Jadot, M., Willnow, T. E., Devuyst, O. and Christensen, E. I. (2007). "Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 104(13): 5407-5412.
- Ohashi, T. (2012). "Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." <u>Pediatr Endocrinol Rev</u> 10 Suppl 1: 26-34.
- Ong, W. Y., Sundaram, R. K., Huang, E., Ghoshal, S., Kumar, U., Pentchev, P. G. and Patel, S. C. (2004). "Neuronal localization and association of Niemann Pick C2 protein (HE1/NPC2) with the postsynaptic density." <u>Neuroscience</u> 128(3): 561-570.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M. and Ballabio, A. (2011). "Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways." <u>Hum Mol Genet</u> 20(19): 3852-3866.
- Park, C., Meng, L., Stanton, L. H., Collins, R. E., Mast, S. W., Yi, X., Strachan, H. and Moremen, K. W. (2005). "Characterization of a human core-specific lysosomal {alpha}1,6-mannosidase involved in N-glycan catabolism." J Biol Chem 280(44): 37204-37216.
- Peake, K. B. and Vance, J. E. (2010). "Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells." <u>FEBS Lett</u> **584**(13): 2731-2739.
- Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H. H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P. and Moestrup, S. K. (1997).

"Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography." J Biol Chem 272(6): 3599-3605.

- Petrey, A. C., Flanagan-Steet, H., Johnson, S., Fan, X., De la Rosa, M., Haskins, M. E., Nairn, A. V., Moremen, K. W. and Steet, R. (2012). "Excessive activity of cathepsin K is associated with cartilage defects in a zebrafish model of mucolipidosis II." <u>Dis Model Mech</u> 5(2): 177-190.
- Platt, F. M., Boland, B. and van der Spoel, A. C. (2012). "The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction." J <u>Cell Biol</u> 199(5): 723-734.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S. and Braulke, T. (2009). "Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases." <u>Biol</u> <u>Chem</u> **390**(7): 521-527.
- Pokorny, K. S., Ritch, R., Friedman, A. H. and Desnick, R. J. (1982). "Ultrastructure of the eye in fetal type II glycogenosis (Pompe's disease)." <u>Invest Ophthalmol Vis</u> <u>Sci</u> 22(1): 25-31.
- Qian, Y., Flanagan-Steet, H., van Meel, E., Steet, R. and Kornfeld, S. A. (2013). "The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme Nacetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 110(25): 10246-10251.
- Qian, Y., Lee, I., Lee, W. S., Qian, M., Kudo, M., Canfield, W. M., Lobel, P. and Kornfeld, S. (2010). "Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase." J Biol <u>Chem</u> 285(5): 3360-3370.
- Quistgaard, E. M., Madsen, P., Groftehauge, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M. and Thirup, S. S. (2009). "Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed betapropeller domain." <u>Nat Struct Mol Biol</u> 16(1): 96-98.
- Raas-Rothschild, A., Cormier-Daire, V., Bao, M., Genin, E., Salomon, R., Brewer, K., Zeigler, M., Mandel, H., Toth, S., Roe, B., Munnich, A. and Canfield, W. M. (2000). "Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucolipidosis IIIC)." J Clin Invest 105(5): 673-681.
- Ramirez-Mata, A., Michalak, C., Mendoza-Hernandez, G., Leon-Del-Rio, A. and Gonzalez-Noriega, A. (2011). "Annexin VI is a mannose-6-phosphateindependent endocytic receptor for bovine beta-glucuronidase." <u>Exp Cell Res</u> 317(16): 2364-2373.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T. and Saftig, P. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of betaglucocerebrosidase." <u>Cell</u> 131(4): 770-783.
- Roces, D. P., Lüllmann-Rauch, R., Peng, J., Balducci, C., Andersson, C., Tollersrud, O., Fogh, J., Orlacchio, A., Beccari, T., Saftig, P. and von Figura, K. (2004).
 "Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study." <u>Hum Mol Genet</u> 13(18): 1979-1988.
- Rohrer, J. and Kornfeld, R. (2001). "Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network." Mol Biol Cell **12**(6): 1623-1631.

- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A. and Guan, K. L. (2013). "ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase." <u>Nat Cell Biol</u> 15(7): 741-750.
- Saftig, P., Beertsen, W. and Eskelinen, E. L. (2008). "LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation." <u>Autophagy</u> 4(4): 510-512.
- Saftig, P. and Klumperman, J. (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **10**(9): 623-635.
- Sagne, C. and Gasnier, B. (2008). "Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters." J Inherit Metab Dis **31**(2): 258-266.
- Sando, G. N. and Neufeld, E. F. (1977). "Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme, alpha-l-iduronidase, by cultured human fibroblasts." <u>Cell</u> **12**(3): 619-627.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E. and Ballabio, A. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." <u>Science</u> 325(5939): 473-477.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C. and Esko, J. D. (2011). "Heparan sulfate proteoglycans." <u>Cold Spring Harb Perspect Biol</u> **3**(7).
- Schieweck, O., Damme, M., Schroder, B., Hasilik, A., Schmidt, B. and Lübke, T. (2009). "NCU-G1 is a highly glycosylated integral membrane protein of the lysosome." <u>Biochem J</u> 422(1): 83-90.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schafer, H., Elsässer, H. P., Mann, M. and Hasilik, A. (2007). "Integral and associated lysosomal membrane proteins." <u>Traffic</u> 8(12): 1676-1686.
- Schulze, H., Kolter, T. and Sandhoff, K. (2009). "Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1793(4): 674-683.
- Schweizer, M., Markmann, S., Braulke, T. and Kollmann, K. (2013). "Ultrastructural Analysis of Neuronal and Non-neuronal Lysosomal Storage in Mucolipidosis Type II Knock-in Mice." <u>Ultrastruct Pathol</u> **37**(5): 366-372.
- Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampanato, C., Venturi, C., Medina, D., de Pablo, R., Tacchetti, C., Rubinsztein, D. C. and Ballabio, A. (2008). "A block of autophagy in lysosomal storage disorders." <u>Hum Mol Genet</u> 17(1): 119-129.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. and Ballabio, A. (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **14**(5): 283-296.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M. and Ballabio, A. (2012). "A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB." <u>EMBO J</u> 31(5): 1095-1108.
- Sorrentino, N. C., D'Orsi, L., Sambri, I., Nusco, E., Monaco, C., Spampanato, C., Polishchuk, E., Saccone, P., De Leonibus, E., Ballabio, A. and Fraldi, A. (2013). "A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier

corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA." <u>EMBO</u> <u>Mol Med 5(5)</u>: 675-690.

- Steet, R., Lee, W. S. and Kornfeld, S. (2005). "Identification of the minimal lysosomal enzyme recognition domain in cathepsin D." J Biol Chem 280(39): 33318-33323.
- Stein, M., Zijderhand-Bleekemolen, J. E., Geuze, H., Hasilik, A. and von Figura, K. (1987). "Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes." <u>EMBO J</u> 6(9): 2677-2681.
- Streit, W. J., Walter, S. A. and Pennell, N. A. (1999). "Reactive microgliosis." Prog Neurobiol 57(6): 563-581.
- Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A. C., Millar, J. S., Sachs, K. V., Li, X., Kumaravel, A., Wang, M. Y., Ai, D., Guo, L., Alexander, E. T., Nguyen, D., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Morales, C. R., Tall, A. R., Kathiresan, S., Fisher, E. A., Musunuru, K. and Rader, D. J. (2012). "Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism." J Clin Invest 122(8): 2807-2816.
- Sun, H. and Wolfe, J. H. (2001a). "Recent progress in lysosomal alpha-mannosidase and its deficiency." <u>Exp Mol Med</u> 33(1): 1-7.
- Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., O'Brien, J. F., Kraft, D. L., Lundquist, P. A., Patterson, M. C., Pagano, R. E. and Snow, K. (2001b). "Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1." <u>Am J Hum Genet</u> 68(6): 1361-1372.
- Suter, A., Everts, V., Boyde, A., Jones, S. J., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Hayman, A. R., Cox, T. M., Evans, M. J., Meister, T., von Figura, K. and Saftig, P. (2001). "Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice." <u>Development</u> 128(23): 4899-4910.
- Talloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W. t., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E. L. and Levine, B. (2002). "Regulation of starvation- and virusinduced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> 99(1): 190-195.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." <u>Nature</u> 406(6798): 902-906.
- Thomas, G. H., Taylor, H. A., Reynolds, L. W. and Miller, C. S. (1973). "Mucolipidosis 3 (Pseudo-Hurler polydystrophy): multiple lysosomal enzyme abnormalities in serum and cultured fibroblast cells." <u>Pediatr Res</u> 7(9): 751-756.
- Tiede, S., Storch, S., Lübke, T., Henrissat, B., Bargal, R., Raas-Rothschild, A. and Braulke, T. (2005). "Mucolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase." <u>Nat Med</u> 11(10): 1109-1112.
- Tooze, S. A. and Yoshimori, T. (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." <u>Nat Cell Biol</u> **12**(9): 831-835.

- Trombetta, E. S. and Helenius, A. (1998). "Lectins as chaperones in glycoprotein folding." <u>Curr Opin Struct Biol</u> **8**(5): 587-592.
- Varki, A. (2009). "Essentials of Glycobiology. 2nd edition." <u>Cold Spring Harbor (NY):</u> <u>Cold Spring Harbor Laboratory Press</u>.
- Vellodi, A. (2005). "Lysosomal storage disorders." <u>Br J Haematol</u> 128(4): 413-431.
- Vogel, P., Payne, B. J., Read, R., Lee, W. S., Gelfman, C. M. and Kornfeld, S. (2009). "Comparative pathology of murine mucolipidosis types II and IIIC." <u>Vet Pathol</u> 46(2): 313-324.
- Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Lessard, M., Soper, B. and Barker, J. (2005). "Early onset of lysosomal storage disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII: undegraded substrate accumulates in many tissues in the fetus and very young MPS VII mouse." <u>Pediatr Dev Pathol</u> **8**(4): 453-462.
- Wada, R., Tifft, C. J. and Proia, R. L. (2000). "Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10954-10959.
- Waheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A., von Figura, K., van Elsen, A. and Leroy, J. G. (1982). "Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme Nacetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> 105(3): 1052-1058.
- Walkley, S. U., Sikora, J., Micsenyi, M., Davidson, C. and Dobrenis, K. (2010). "Lysosomal compromise and brain dysfunction: examining the role of neuroaxonal dystrophy." <u>Biochem Soc Trans</u> 38(6): 1436-1441.
- Walkley, S. U., Thrall, M. A., Haskins, M. E., Mitchell, T. W., Wenger, D. A., Brown, D. E., Dial, S. and Seim, H. (2005). "Abnormal neuronal metabolism and storage in mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy) disease." <u>Neuropathol Appl Neurobiol</u> 31(5): 536-544.
- Walkley, S. U. and Vanier, M. T. (2009). "Secondary lipid accumulation in lysosomal disease." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1793(4): 726-736.
- Wasteson, A. (1971). "A method for the determination of the molecular weight and molecular-weight distribution of chondroitin sulphate." J Chromatogr **59**(1): 87-97.
- Weinert, S., Jabs, S., Supanchart, C., Schweizer, M., Gimber, N., Richter, M., Rademann, J., Stauber, T., Kornak, U. and Jentsch, T. J. (2010). "Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H+-driven lysosomal Claccumulation." <u>Science</u> 328(5984): 1401-1403.
- Wooten, M. W., Hu, X., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Geetha, T., Paine, M. G. and Wooten, M. C. (2006). "Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease." J Biomed <u>Biotechnol</u> 2006(3): 62079.
- Xu, Y. H., Barnes, S., Sun, Y. and Grabowski, G. A. (2010). "Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism." J Lipid Res **51**(7): 1643-1675.
- Young, P. R., Karanutilake, C. and Zygas, A. P. (1991). "Binding of cathepsin D to the mannose receptor on rat peritoneal macrophages." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1095**(1): 1-4.

- Yu, T., Shakkottai, V. G., Chung, C. and Lieberman, A. P. (2011). "Temporal and cellspecific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration." Hum Mol Genet 20(22): 4440-4451.
- Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P. and Schwake, M. (2012). "A critical histidine residue within LIMP-2 mediates pH sensitive binding to its ligand beta-glucocerebrosidase." <u>Traffic</u> **13**(8): 1113-1123.
- Zafeiriou, D. I. and Batzios, S. P. (2013). "Brain and spinal MR imaging findings in mucopolysaccharidoses: a review." <u>AJNR Am J Neuroradiol</u> **34**(1): 5-13.
- Zheng, G., Bachinsky, D. R., Stamenkovic, I., Strickland, D. K., Brown, D., Andres, G. and McCluskey, R. T. (1994). "Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP)." J Histochem Cytochem 42(4): 531-542.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y. and Sabatini, D. M. (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." <u>Science</u> **334**(6056): 678-683.

8. Anhang

8.1 Primer

8.1.1 Primer zur Genotypisierung

Name	Sequenz 5'-3'
Gnptab ^{ki} _for	CATCCCACCGACTCAGGAAG
Gnptab ^{ki} _rev	GCAGCAGTGCCCATCTGATA
Sort_for	GGGACCAAAGGGCTAGATTGC
Sort_rev	TCCGAAGGAGACACTCACAATTC
Sort_BGH_PolyA_for	ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG

8.1.2 Taqman-Primer für die Realtime-PCR

Name	Sequenz 5'-3'
Arsa	Mm00802173_g1
Ctsb	Mm01310506_m1
Ctsd	Mm00515587_m1
Fucal	Mm00502778_m1
Glb1	Mm00515342_m1
Hexa	Mm00599880_m1
Igf2r	Mm00439576_m1
Lamp-1	Mm00495262_m1
Ldlr	Mm00440169_m1
Lrp1	Mm00464608_m1
Man2b1	Mm00487585_m1
Npc2	Mm00499230_m1
Scarb2	Mm00446978_m1
Smpd1	Mm00488318_m1

8.2 Relative Intensitäten der prominentesten anionischen Lipide im Hirn von Wildtyp- und *Gnptab^{ki}*-Mäusen

		Relative Intensitäten							
		5 Monate 10 Monate							
Lipidspezies	Ketten	Wildtyp	Gnptab ^{ki}	Verhältnis	Wildtyp	Gnptab ^{ki}	Verhältnis		
BMP 40:08	20:4/20:4	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.03	1.3	0.11 ± 0.04	$\textbf{0.18} \pm \textbf{0.03}$	1.6		
BMP 42:10	20:4/22:6	0.42 ± 0.21	0.71 ± 0.23	1.7	0.22 ± 0.10	$\textbf{0.58} \pm \textbf{0.13}$	2.6		
BMP 44:12	22:6/22:6	1.03 ± 0.34	$\textbf{2.00} \pm \textbf{0.12}$	1.9	1.01 ± 0.10	$\textbf{2.59} \pm \textbf{0.80}$	2.6		
PA 34:01	16:0/18:1	1.43 ± 0.64	$\textbf{0.92} \pm \textbf{0.14}$	0.6	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.02	1.0		
PA 34:02	16:0/18:2	$\textbf{2.00} \pm \textbf{2.41}$	$\textbf{0.85} \pm \textbf{0.36}$	0.4	$\textbf{0.03} \pm \textbf{0.01}$	0.04 ± 0.01	1.6		
PA 36:01	18:0/18:1	1.35 ± 0.00	1.02 ± 0.18	0.8	1.61 ± 0.25	1.34 ± 0.16	0.8		
PA 38:04	18:0/20:4	0.62 ± 0.05	0.56 ± 0.07	0.9	0.27 ± 0.05	0.34 ± 0.04	1.3		
PA 38:05	18:1/20:4	$\textbf{0.28} \pm \textbf{0.00}$	$\textbf{0.24} \pm \textbf{0.02}$	0.9	$\textbf{0.10} \pm \textbf{0.01}$	$\textbf{0.09} \pm \textbf{0.01}$	0.9		
PA 40:06	18:0/22:6	1.96 ± 0.37	1.60 ± 0.49	0.8	1.94 ± 0.61	$\textbf{2.47} \pm \textbf{0.12}$	1.3		
PG 36:04	16:0/20:4	0.32 ± 0.06	$\textbf{0.32}\pm\textbf{0.14}$	1.0	$\textbf{0.23} \pm \textbf{0.04}$	$\textbf{0.25} \pm \textbf{0.07}$	1.1		
PG 38:04	18:0/20:4	0.32 ± 0.09	$\textbf{0.35} \pm \textbf{0.11}$	1.1	$\textbf{0.32} \pm \textbf{0.10}$	0.50 ± 0.07	1.5		
PG 38:05	18:1/20:4	0.39 ± 0.00	$\textbf{0.38} \pm \textbf{0.08}$	1.0	0.54 ± 0.09	0.76 ± 0.06	1.4		
PG 40:06	18:0/22:6	0.54 ± 0.12	0.50 ± 0.12	0.9	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.07	1.0		
PI 36:04	16:0/20:4	$\textbf{2.79} \pm \textbf{0.48}$	$\textbf{3.30} \pm \textbf{0.05}$	1.2	1.73 ± 0.49	$\textbf{2.29} \pm \textbf{0.03}$	1.3		
PI 38:04	18:0/20:4	10.27 ± 1.74	12.78 ± 0.01	1.2	9.72 ± 2.57	13.28 ± 0.90	1.4		
PI 38:05	18:1/20:4	1.57 ± 0.35	$\textbf{2.04} \pm \textbf{0.11}$	1.3	1.32 ± 0.59	1.82 ± 0.12	1.4		
PI 40:06	18:0/22:6	0.41 ± 0.03	0.60 ± 0.03	1.5	0.91 ± 0.11	0.94 ± 0.06	1.0		
PS 34:01	16:0/18:1	0.96 ± 0.24	$\textbf{0.80} \pm \textbf{0.19}$	0.8	0.51 ± 0.27	0.59 ± 0.07	1.2		
PS 36:01	18:0/18:1	$\textbf{6.40} \pm \textbf{0.79}$	4.53 ± 0.61	0.7	8.44 ± 1.05	6.90 ± 0.69	0.8		
PS 36:02	18:1/18:1	1.61 ± 0.33	$\textbf{1.28} \pm \textbf{0.19}$	0.8	1.84 ± 0.25	1.78 ± 0.12	1.0		
PS 36:04	16:0/20:4	0.26 ± 0.02	$\textbf{0.26} \pm \textbf{0.04}$	1.0	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.06	1.6		
PS 38:01	18:0/20:1	0.56 ± 0.07	0.39 ± 0.02	0.7	1.36 ± 0.21	0.91 ± 0.09	0.7		
PS 38:04	18:0/20:4	$\textbf{2.28} \pm \textbf{0.03}$	1.98 ± 0.03	0.9	$\textbf{2.08} \pm \textbf{0.43}$	$\textbf{2.22} \pm \textbf{0.27}$	1.1		
PS 38:05	18:1/20:4	0.53 ± 0.01	$\textbf{0.47} \pm \textbf{0.06}$	0.9	0.68 ± 0.11	0.52 ± 0.07	0.8		
PS 40:04	18:0/22:4	1.88 ± 0.39	1.47 ± 0.03	0.8	$\textbf{2.00} \pm \textbf{0.45}$	$\textbf{2.08} \pm \textbf{0.18}$	1.0		
PS 40:06	18:0/22:6	18.41 ± 6.33	17.38 ± 2.18	0.9	14.24 ± 4.16	16.93 ± 0.30	1.2		
PS 40:07	18:1/22:6	0.61 ± 0.10	$\textbf{0.68} \pm \textbf{0.06}$	1.1	0.56 ± 0.10	0.60 ± 0.10	1.1		
Sulf 18:0	18:0	2.51 ± 0.10	1.79 ± 0.18	0.7	$\textbf{0.70} \pm \textbf{0.10}$	$\textbf{0.63} \pm \textbf{0.05}$	0.9		
Sulf 22:0	22:0	$\textbf{2.75} \pm \textbf{0.36}$	$\textbf{2.30} \pm \textbf{0.44}$	0.8	1.99 ± 0.39	1.49 ± 0.09	0.7		
Sulf 22:1	22:1	1.15 ± 0.17	1.10 ± 0.01	1.0	$\textbf{0.74} \pm \textbf{0.10}$	0.59 ± 0.05	0.8		
Sulf 24:0	24:0	4.91 ± 1.35	$\textbf{4.84} \pm \textbf{1.14}$	1.0	5.51 ± 0.81	$\textbf{4.12} \pm \textbf{0.21}$	0.7		
Sulf 24:1	24:1	12.57 ± 3.04	14.37 ± 1.58	1.1	16.88 ± 3.02	12.59 ± 1.25	0.7		
Sulf 26:0	26:0	0.75 ± 0.04	0.60 ± 0.00	0.8	0.61 ± 0.18	0.47 ± 0.05	0.8		
Sulf 26:1	26:1	1.07 ± 0.27	1.01 ± 0.18	0.9	$\textbf{0.82} \pm \textbf{0.09}$	0.59 ± 0.10	0.7		
Sulf-OH 18:0	18:0	0.94 ± 0.03	$\textbf{0.77} \pm \textbf{0.05}$	0.8	$\textbf{0.35} \pm \textbf{0.03}$	$\textbf{0.32} \pm \textbf{0.02}$	0.9		
Sulf-OH 22:0	22:0	$\textbf{3.75} \pm \textbf{0.79}$	$\textbf{3.80} \pm \textbf{0.49}$	1.0	$\textbf{3.82} \pm \textbf{0.85}$	$\textbf{3.03} \pm \textbf{0.32}$	0.8		
Sulf-OH 24:0	24:0	$\textbf{2.68} \pm \textbf{0.87}$	$\textbf{3.37} \pm \textbf{0.75}$	1.3	$\textbf{4.24} \pm \textbf{0.81}$	$\textbf{3.17} \pm \textbf{0.28}$	0.7		
Sulf-OH 24:1	24:1	$\textbf{2.08} \pm \textbf{0.75}$	$\textbf{2.89} \pm \textbf{0.32}$	1.4	$\textbf{3.57} \pm \textbf{0.93}$	$\textbf{2.71} \pm \textbf{0.32}$	0.8		
GM3 C18,18	18:0/d18:1	0.47 ± 1.17	0.86 ± 0.04	1.8	0.52 ± 0.07	1.09 ± 0.24	2.1		
GM3 C20,18	18:0/d20:1	0.10 ± 0.05	$\textbf{0.17} \pm \textbf{0.00}$	1.7	$\textbf{0.12} \pm \textbf{0.02}$	$\textbf{0.32} \pm \textbf{0.08}$	2.6		
GM2 C18,18	18:0/d18:1	$\textbf{0.38} \pm \textbf{0.14}$	$\textbf{0.69} \pm \textbf{0.02}$	1.8	$\textbf{0.40} \pm \textbf{0.04}$	0.96 ± 0.14	2.4		
GM1 C18,18	18:0/d18:1	1.27 ± 0.26	$\textbf{0.83} \pm \textbf{0.04}$	0.7	$\textbf{2.23} \pm \textbf{0.15}$	1.58 ± 0.27	0.7		
GM1 C20,18	18:0/d20:1	0.17 ± 0.08	$\textbf{0.17} \pm \textbf{0.03}$	1.0	0.52 ± 0.03	$\textbf{0.48} \pm \textbf{0.08}$	0.9		
GD1 C18,18	18:0/d18:1	1.37 ± 0.01	1.08 ± 0.06	0.8	1.58 ± 0.18	1.64 ± 0.21	1.0		
GD1 C20,18	18:0/d20:1	0.20 ± 0.07	$\textbf{0.19} \pm \textbf{0.02}$	0.9	1.18 ± 0.35	0.90 ± 0.07	0.8		
GT1 C18,18	18:0/d18:1	1.09 ± 0.34	1.13 ± 0.14	1.0	1.05 ± 0.18	1.61 ± 0.42	1.5		
GT1 C20,18	18:0/d20:1	0.45 ± 0.15	$\textbf{0.48} \pm \textbf{0.06}$	1.1	$\textbf{0.48} \pm \textbf{0.09}$	0.67 ± 0.23	1.4		

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

- Schweizer, M., Markmann, S., Braulke, T. and Kollmann, K. (2013). "Ultrastructural Analysis of Neuronal and Non-neuronal Lysosomal Storage in Mucolipidosis Type II Knock-in Mice." <u>Ultrastruct Pathol</u> 37(5): 366-372.
- Kollmann, K., Damme, M., Markmann, S., Morelle, W., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Röchert, A. K., Pohl, S., Lübke, T., Michalski, J. C., Käkelä, R., Walkley, S. U. and Braulke, T. (2012). "Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucolipidosis II 'knock-in' mice." <u>Brain</u> 135(Pt 9): 2661-2675.
- Markmann, S., Braulke, T. and Kollmann, K. "Analysis of mannose 6-phosphate independent transport mechanisms of lysosomal enzymes in *Gnptab*^{c.3082insC} fibroblasts." Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge

"Mannose 6-phosphate-independent transport mechanisms to lysosomes", Meeting des Graduiertenkollegs 1459 in Wismar (2013)

"Mannose 6-phosphate-independent transport mechanisms to lysosomes", 19. Meeting der *European Study Group on Lysosomal Diseases* (ESGLD), Graz, Österreich (2013, prämiert als bester Vortrag)

"Missorting of lysosomal enzymes, accumulation of storage material and impaired autophagy lead to neurodegeneration in a mucolipidosis II mouse", 35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Dresden (2012)

"Missorting of lysosomal enzymes leads to neurodegeneration in a mouse model for mucolipidosis type II", Meeting des Graduiertenkollegs 1459 in Wedel (2012)

"Altered transport of lysosomal enzymes and neurodegeneration in GlcNAc-1phosphotransferade-deficient mice", Meeting des Graduiertenkollegs 1459 in Sylt (2011)

Posterpräsentationen

S. Markmann, K. Kollmann, M. Damme, M. Schweizer, R. Käkelä, J. C. Michalski, S. Walkley und T. Braulke (2011): "Severe lysosomal dysfunctions lead to neurodegeneration in the *Gnptab*^{c.3082insC} mouse model of mucolipidosis type II", 18. Meeting der *European Study Group on Lysosomal Diseases* (ESGLD), Helsinki, Finnland

S. Markmann, K. Kollmann, T. E. Willnow und T. Braulke (2013): "Analysis of Mannose 6-phosphate independent transport mechanisms", *Gordon Research Conference on Lysosomal Diseases*, Lucca, Italien

S. Markmann, K. Kollmann, M. Damme, M. Schweizer und T. Braulke (2012): "Missorting of lysosomal enzymes leads to neurodegeneration in a mouse model for mucolipidosis type II", Symposium *Protein Trafficking in Health and Disease*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich direkt oder indirekt bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Thomas Braulke und Dr. Katrin Kollmann für die Bereitstellung des spannenden Themas, für die stetige Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Katrin, ohne deine Geduld, Kompetenz und moralische Unterstützung wäre ich wohl nicht so weit gekommen. Vielen Dank!

Ich danke PD. Dr. Kramer für die Begutachtung der Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg 1459 danke ich für die finanzielle Unterstützung und den 3-monatigen Auslandsaufenthalt in Prof. Jeffrey Esko's Labor in San Diego, Kalifornien. Ein großes Dankeschön geht auch an Jeff für die anregenden Diskussionen und Unterstützung während meines Aufenthalts.

Ich danke Dr. Markus Damme, Dr. Matthew Micsenyi, Dr. Michaela Schweizer, Dr. Jean-Claude Michalski und Dr. Reijo Käkelä für die histochemischen, elektronenmikroskopischen und massenspektrometrischen Analysen.

Prof. Jörg Heeren, Prof. Paul Saftig und Prof. Thomas Willnow danke ich für die Bereitstellung von LRP1-, LDLR-, LRP1/LDLR-, LIMP-2-defizienten Zellen und die Sortilin-defizienten-Mäuse.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle meine (ehemaligen) Arbeitskollegen: Jessica, Carolin, Sarah, Johannes, Laura, Georgia, Mine, Raffa, Benny, Sandra, Katrin, Taka, Pieter, Kathrin, Bastian. Ich danke euch für die aufmunternden Worte, den lustigen Laboralltag und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte all meinen Freunden danken, insbesondere Melle, Stoffel, Doreen und Conny. Danke für eure Unterstützung und euer stets offenes Ohr bei Kummer und Sorgen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern für euer Vertrauen und die stetige Unterstützung auf all meinen Lebenswegen. Meinen Brüdern, sowie allen anderen Familienmitgliedern, dass ihr immer für mich da seid.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet–Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.