

**Synthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungsmarkers  
lysosomaler Enzyme: Molekulare Analyse der humanen  
UDP-N-Acetylglucosamin:lysosomales Enzym-N-  
Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*

vorgelegt von  
**Stephan Tiede**  
aus Hamburg

beim Fachbereich Biologie  
der  
Universität Hamburg

Hamburg 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. T. BRAULKE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. L. RENWRANTZ  
Tag der Disputation: 20. Mai 2005

Hamburg, den 02. Mai 2005



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

**Gutachter:**

**Prof. Dr. T. Braulke**

**Prof. Dr. L. Renwrantz**

Meinem Sohn Felix  
und meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Lysosomen.....	1
1.2	Transport und Prozessierung lysosomaler Enzyme.....	3
1.2.1	<i>N</i> -Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Kompartiment.....	3
1.2.2	Bildung und biologische Bedeutung von M6P-Resten.....	4
1.2.2.1	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin:lysosomales Enzym <i>N</i> -Acetylglucosamin-1-phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase).....	5
1.2.2.2	<i>N</i> -Acetylglucosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (Phosphodiesterase oder „ <i>uncovering Enzym</i> “ ).....	6
1.2.2.3	Mukopolidose II und III.....	7
1.3	Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und intrazelluläre Sortierung von lysosomalen Enzymen.....	8
1.3.1	M6P-Rezeptor unabhängiger Transport.....	9
1.4	Proteolytische Modifikation von lysosomalen Enzymen am Beispiel von Cathepsin D.....	10
1.5	Therapiemöglichkeiten lysosomaler Speichererkrankungen.....	11
1.5.1	Knochenmarktransplantation.....	11
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1	Material.....	15
3.1.1	Verwendete Kits.....	15
3.1.2	Radioaktive Substanzen.....	15
3.1.3	Plasmide, DNA und DNA-Standards.....	15
3.1.4	Enzyme und Nukleotide.....	15
3.1.5	Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards.....	16
3.1.6	Bakterienstämme.....	16
3.1.7	Zell-Linien.....	16
3.1.8	Puffer, Medien und Lösungen.....	16
3.1.8.1	Medien zur Aufzucht von Bakterien.....	16
3.1.8.2	Zellkulturösungen.....	17
3.1.9	Antikörper.....	17
3.1.9.1	Primärantikörper.....	17
3.1.9.2	Sekundärantikörper.....	18
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	18
3.2.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	18
3.2.2	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	18
3.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA.....	18
3.2.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	18
3.2.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	19
3.2.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	19
3.2.4.1	Präparation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	20
3.2.4.2	Anlegen einer Glyzerolkultur.....	20
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	21
3.2.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	21
3.2.6.1	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	21
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
3.2.7.1	PCR an humaner genomischer DNA.....	22
3.2.7.1.1	Etablierung einer PCR zur ML III Diagnostik an humaner genomischer DNA.....	22
3.2.7.1.2	Etablierung einer PCR zur ML II Diagnostik an humaner genomischer DNA.....	23
3.2.7.2	Sequenzierung von DNA.....	24
3.2.8	PCR-Mutagenese der <i>GNPTAG</i> -cDNA.....	24
3.2.9	Klonierung und Aufreinigung eines GST- <i>GNPTAG</i> Fusionsprotein.....	25
3.2.10	Klonierung eines 6His- <i>GNPTAG</i> -Fusionsprotein.....	25
3.2.11	Isolierung von humaner genomischer DNA.....	26
3.2.12	RNA-Isolation.....	26
3.2.12.1	RNA-Isolation aus kultivierten Zellen.....	26
3.2.12.2	RNA-Isolation aus Gewebe nach Chirgwin (1979).....	26

## Inhaltsverzeichnis

3.2.13	Quantitative PCR	27
3.3	Zellbiologische Methoden	27
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	27
3.3.2	Isolation von Monocyten	28
3.3.3	Trypsinieren von Zellen	28
3.3.4	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	28
3.3.5	Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen	28
3.3.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	29
3.3.7	Metabolische Markierung von Zellen mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin	29
3.3.8	Immunpräzipitation von Cathepsin D und $\beta$ -Hexosaminidase	30
3.4	Biochemische Methoden	30
3.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
3.4.2	Färbung von Proteinen	31
3.4.2.1	Coomassie-blue-Färbung	31
3.4.2.2	Silberfärbung	31
3.4.3	Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie	31
3.4.4	Messung von lysosomalen Enzymaktivitäten in MLII- und ML III-Fibroblasten	31
3.4.4.1	Messung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität	32
3.4.4.2	Messung der Arylsulfatase A-Aktivität	32
3.4.4.3	Messung der $\beta$ -Glucuronidase- und $\beta$ Galaktosidase-Aktivität	32
3.4.5	Deglykosylierung von <i>N</i> -glykosylierten Proteinen	33
3.4.6	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.4.7	Western blot Analyse	33
3.4.8	Overlay-Analyse mit biotinyliertem MPR 300	34
3.4.9	Gewinnung von Antikörpern	34
3.4.9.1	Affinitätsreinigung von Antikörpern	35
3.4.10	ConA-Sephrose-Säule	35
3.4.11	Präparation einer GNPTAG-Affinitätsmatrix zur Identifizierung GNPTAG-bindender Proteine aus Golgimembranen	36
3.4.11.1	Präparation von Golgimembran-Extrakten	36
3.4.12	GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivitätsbestimmung	36
3.4.13	Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektrometrie	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Analyse der Prozessierung und des Transportes von neu synthetisierten lysosomalen Enzymen sowie der Expression der GlcNAc-Phosphotransferase in humanen Makrophagen	39
4.1.1	Gesamtbetrag M6P-haltiger Proteine aus Makrophagen-Sekreten	39
4.1.2	M6P-unabhängiger lysosomaler Transport von CtsD in Makrophagen	40
4.1.3	M6P-unabhängige Assoziation von zellulären Cathepsin D-Formen mit Membranen	42
4.1.4	Expression von M6P-Rezeptoren in humanen Makrophagen und HeLa-Zellen	44
4.1.5	Expression der GlcNAc-Phosphotransferase $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) in humanen Makrophagen	44
4.1.6	GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität in Makrophagen	47
4.1.7	Bindungsstudien der GNPTAG mit der lysosomalen Hydrolase Arylsulfatase A	48
4.2	Analysen des Transports/Sortierung lysosomaler Enzyme und Expressionsanalysen der GlcNAc-Phosphotransferase bei ML III Patienten	49
4.2.1	Untersuchungen der Sortierung neu synthetisierter lysosomaler Enzyme bei zwei Geschwistern (Patient 1 und 2) mit ML III	49
4.2.2	Molekulare- und Expressions-Analyse der $\gamma$ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase bei den Patienten 1 und 2	52
4.2.3	Biochemische- und Expressions-Analysen der GNPTAG bei einem ML III Patienten (Patient 10) mit einem milden klinischen Phänotyp	54
4.3	Identifizierung des für die $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase kodierenden Gens	56
4.3.1	Sequenzanalysen von <i>MGC4170</i> bei ML II- und ML III-Patienten	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
5.1	GlcNAc-Phosphotransferase und M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Enzyme in humanen Makrophagen	60
5.1.1	Knochenmarktransplantation als therapeutischer Ansatz bei lysosomalen Speicherkrankheiten	62
5.2	GlcNAc-Phosphotransferase in Zellen von Mukopolidose II (ML II) und -III (ML III)	63
5.2.1	GlcNAc-Phosphotransferase in ML III-Patientenzellen	64

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.2	Untersuchungen mit rekombinanter GNPTAG aus Insektenzellen.....	65
5.3	Identifikation des kodierenden Gens der $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase .....	66
5.4	Ausblick .....	69
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>85</b>
9.1	Oligonucleotide (Primer) .....	85
9.2	Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der GNPTAG .....	87
9.3	Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der GNPTA (MGC4170).....	88
9.4	Chemikalien und Reagenzien.....	89
9.5	Geräte.....	89
9.6	Verbrauchsmaterialien .....	91

# 1 EINLEITUNG

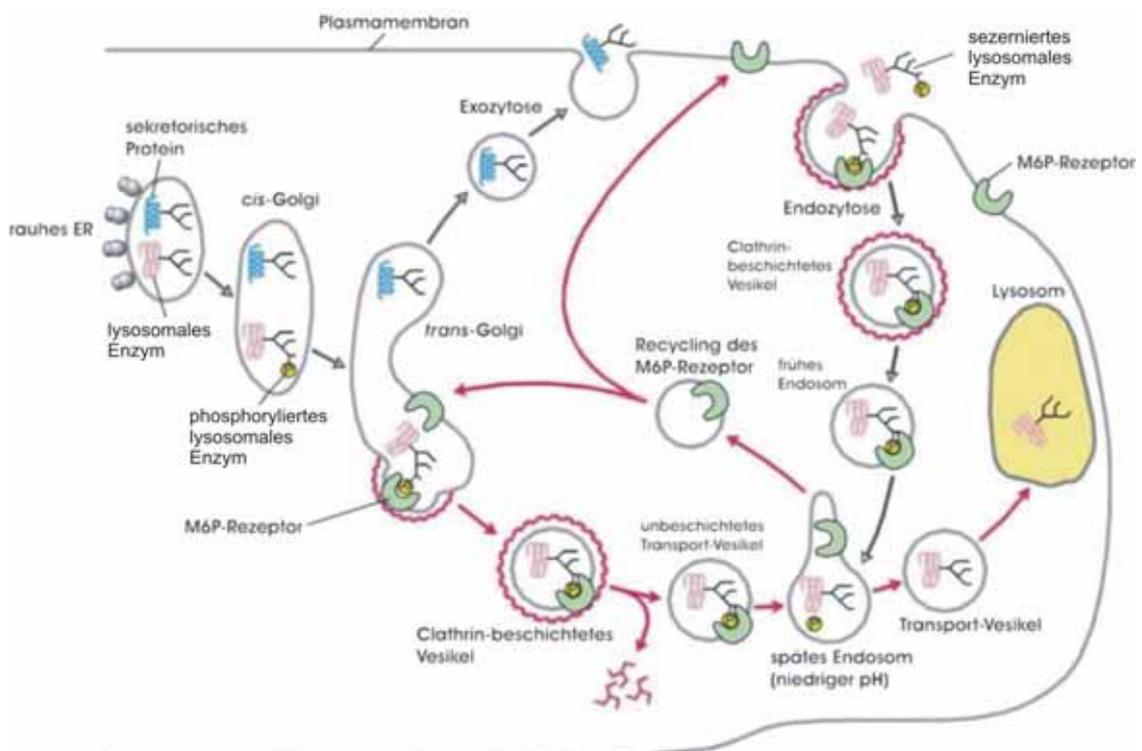
## 1.1 Lysosomen

Lysosomen sind Membran-umschlossene Zellorganellen, die mit zahlreichen sauren Hydrolasen angefüllt sind und dem Abbau zelleigener und zellfremder Makromoleküle, wie z.B. Proteine, komplexe Kohlenhydratverbindungen, Lipide und Nukleinsäuren, dienen. Diese Verbindungen werden entweder über Endozytose aus dem Extrazellulärraum, über den Biosyntheseweg oder durch Verschmelzung mit Autophagosomen zum Lysosom transportiert, dort in ihre Bausteine zerlegt und ins Zytosol transportiert. Innerhalb der Lysosomen herrscht ein saures Milieu, das durch ATP-getriebene, membranständige Protonenpumpen aufrechterhalten wird und dem pH-Optimum der lysosomalen Enzyme entspricht. Die Funktion der lysosomalen Membranen besteht folglich in der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten, dem selektiven Transport von Abbauprodukten ins Zytosol und dem Schutz der luminalen Membranproteindomänen vor Degradation. Neben der Biogenese neuer Lysosomen während der Zellteilung ist eine kontinuierliche Substitution lysosomaler Enzyme und Membranproteine zur Aufrechterhaltung der Integrität bereits bestehender Lysosomen erforderlich (Braulke, 1996; Kornfeld und Mellman, 1989; Eskelinen et al., 2003).

Die Transportwege und Sortierungsmechanismen löslicher lysosomaler Proteine sind am besten untersucht. Lösliche lysosomale Proteine werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die zur Steuerung der Translokation durch die ER-Membran erforderlich ist. Nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase, werden Dolicholphosphat-aktivierte Oligosaccharide kotranslational auf spezifische Asparaginreste der Sequenz Asn-X-Thr/Ser (X steht für eine beliebige Aminosäure) übertragen. Nach Prozessierung der Oligosaccharidketten werden die lysosomalen Proteine in Transportvesikel abgeschnürt, die mit dem *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates verschmelzen. Im Golgi erfolgt eine weitere Prozessierung der Oligosaccharidketten vom „high mannose type“ zum komplexen Typ (Kornfeld & Mellman, 1989; von Figura & Hasilik, 1986). Ein entscheidender Schritt bei der Prozessierung von Zuckerketten löslicher lysosomaler Enzyme ist die Bildung von Mannose-6-Phosphat-Resten (M6P) an Oligosaccharidketten vom „high mannose type“

durch die UDP-*N*-Acetylglucosamin:lysosomales Enzym-*N*-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase) (Kornfeld und Mellman 1989).

Die M6P-Reste ermöglichen die Segregation der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme von der sekretorische Route durch Bindung an einen von zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Die Ligand-Rezeptorkomplexe werden in Clathrin-beschichtete Vesikel verpackt, die nach Verlust der Clathrinhülle mit dem endosomalen Kompartiment fusionieren, wo es aufgrund des sauren pH zur Dissoziation der Ligand-Rezeptor-Komplexe kommt. Die MPR rezirkulieren zum TGN und stehen für neue Transportrunden zur Verfügung (Le Borgne und Hoflack, 1998b), und die M6P-haltigen Enzyme gelangen auf noch unbekannte Weise in die Lysosomen. Ein variabler Teil, ca. 5-20 %, der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme binden nicht im TGN an MPRs und werden sezerniert. Diese inaktiven Enzymvorstufen können über MPRs an der Plasmamembran der gleichen oder benachbarter Zellen gebunden, internalisiert und über den Endozytoseweg den Lysosomen zugeführt werden (Abb. 1). In Hepatozyten, Leukozyten und einigen anderen Zelltypen können lysosomale Enzyme auch M6P-unabhängig segregiert werden (Owada und Neufeld, 1982; Kornfeld und Sly, 2001).



**Abb. 1: Transport von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen.**

(Quelle: Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> Edition, Lodish et al., 2000)

## 1.2 Transport und Prozessierung lysosomaler Enzyme

### 1.2.1 *N*-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Kompartiment

Nach der Translokation lysosomaler Enzymvorstufen ins ER können Asparaginreste (Asn) in einer Konsensus-Sequenz (Asn-X-Ser/Thr) selektiv *N*-glykosyliert werden. Dabei überträgt eine spezifische Oligosaccharyltransferase einen Oligosaccharidrest (Glc)3-(Man)9-(GlcNAc)2, der an den Carrier Dolicholpyrophosphat gebunden ist, auf den Asparaginrest. Anschließend wird der Oligosaccharidrest im ER und Golgi-Apparat modifiziert (*trimming*). Zunächst werden von der Oligosaccharidseitenketten im ER die Glucosereste durch die  $\alpha$ -1,2-spezifische Glucosidase I und die  $\alpha$ -1,3-spezifische Glucosidase II abgespalten. Danach spaltet eine  $\alpha$ -Mannosidase einen Mannose-Rest ab, woraufhin die Proteine durch das tubulovesikuläre Membran-System des „ER-Golgi intermediäres Kompartiment“ (ERGIC) das ER verlassen und den Golgi erreichen. Die Oligosaccharide der meisten Glykoproteine werden im weiteren Verlauf durch Anfügung anderer Zuckerreste (Galaktose, *N*-Acetylglucosamin, Sialinsäure und Fucose) zu komplexen Zuckerketten modifiziert (Abb. 2 A). Im Gegensatz dazu unterliegen lysosomale Enzyme einer enzymatisch vermittelten Modifikation ihrer Oligosaccharidseitenketten, die deren weiteres *Trimming* zur komplexen Form verhindert (Hasilik und von Figura, 1981) und die es ihnen ermöglicht, den Transportweg sekretorischer Proteine zu verlassen (Abb. 2 B).

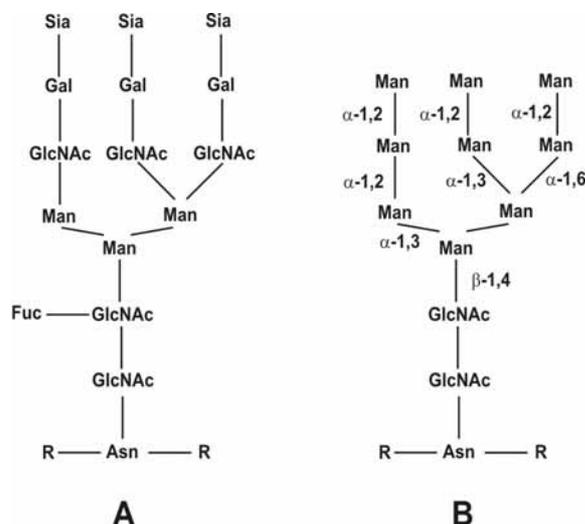


Abb. 2: A) Oligosaccharidkette vom komplexen und B) mannosereichen Typ.

## 1.2.2 Bildung und biologische Bedeutung von M6P-Resten

Die spezifische Modifikation lysosomaler Enzyme, die Bildung des M6P-Markers, wird durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert. Der erste Schritt ist der Angriff der 6-OH-Gruppe eines  $\alpha$ -1,2-Mannoserestes auf die Phosphatbindung eines Uridinphosphat-*N*-acetylglucosamin-Moleküls, der durch das Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin:lysosomales Enzym *N*-Acetylglucosamin-1-phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase, EC 2.7.8.17) katalysiert wird. Der zuerst phosphorylierte Mannoserest ist der endständige Rest des  $\alpha$ -1,6 Astes des Oligosaccharids. Weitere fünf Positionen sowohl auf dem  $\alpha$ -1,6- als auch auf dem  $\alpha$ -1,3-verknüpften Ast stehen im weiteren Verlauf zur Phosphorylierung zur Verfügung. Es werden jedoch tatsächlich nur maximal zwei Mannosereste pro Oligosaccharidseitenkette phosphoryliert (Abb. 3), (Kornfeld und Mellman 1989). Im zweiten Schritt wird der entstandene Phosphodiester durch die *N*-Acetylglucosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ -*N*-Acetylglucosaminidase (Phosphodiesterase oder „*uncovering Enzym*“, EC 3.1.4.45) unter Austritt eines Moleküls *N*-Acetylglucosamin gespalten (Abb. 3). Der nun freigelegte M6P-Marker ermöglicht im *trans*-Golgi die Bindung der lysosomalen Enzyme an zwei Typen von M6P-Rezeptoren und ihren vesikulären Transport über das endosomale Kompartiment zum Lysosom.

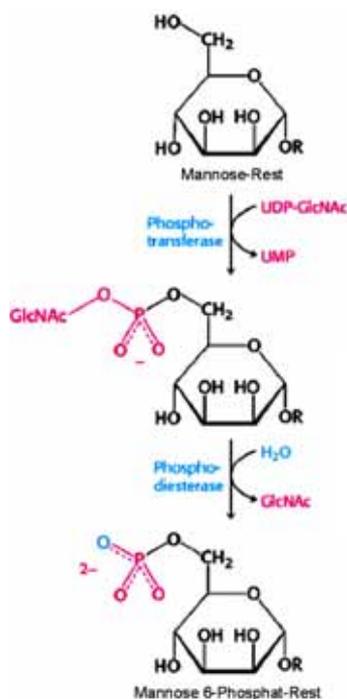


Abb. 3: Darstellung der M6P-Erkennungsmarker-Biosynthese neusynthetisierter lysosomaler Enzyme.

(Quelle: Biochemistry, 5th Edition, Stryer et al., 2002)

### 1.2.2.1 UDP-*N*-Acetylglucosamin:lysosomales Enzym *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase)

Die bovine GlcNAc-Phosphotransferase wurde als 540 kDa Komplex gereinigt und ist aus 6 Untereinheiten ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) mit den Massen von 166, 51 bzw. 56 kDa zusammengesetzt. Die  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Untereinheiten sollen über Disulfidbrücken verbundene Homodimere bilden. Die  $\beta$ -Untereinheiten sollen kovalent an jeweils eine  $\alpha$ -Untereinheiten gebunden sein (Bao et al., 1996a) (Abb. 4). Die humane  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) der GlcNAc-Phosphotransferase wurde kloniert und kodiert ein lösliches Protein von 305 Aminosäuren mit 2 potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen und einer Signal-Peptid-Sequenz (siehe Anhang 9.2). Die GNPTAG wird von einem Gen mit der chromosomalen Lokalisation 16p13.3 kodiert (Raas-Rothschild et al., 2000). Die Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht worden. Es wurde ohne Beleg mitgeteilt, daß das Gen, das die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten kodiert, 22 Exons enthält, 80 kb umfaßt und auf Chromosom 12p lokalisiert ist. Die individuellen Untereinheiten sollen durch proteolytische Prozessierung gebildet werden und das katalytische Zentrum der GlcNAc-Phosphotransferase darstellen (Kornfeld und Sly, 2001).

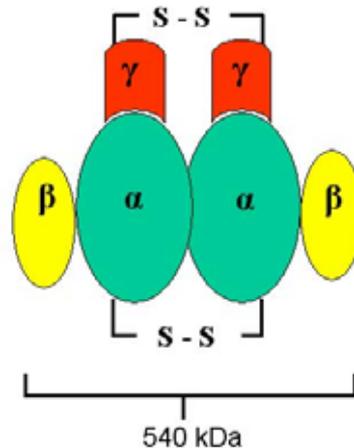


Abb. 4: Model der humanen GlcNAc-Phosphotransferase

Zusätzlich zum ersten Schritt der Biosynthese des M6P-Markers, soll die GNPTAG die Erkennungsdomäne für lysosomale Enzyme beinhalten und somit für die Spezifität der Reaktion verantwortlich sein. Die GlcNAc-Phosphotransferase selektioniert spezifisch lysosomale Enzyme von anderen Glykoproteinen im Golgi zur Phosphorylierung (Reitman und Kornfeld, 1981). Die Affinität der GlcNAc-Phosphotransferase zu lysosomalen

Enzymen ist 100-150-fach höher als zu nicht-lysosomalen Glykoproteinen (Bao et al., 1996b). Die Spezifität der Erkennung soll weniger von der Art der verknüpften Oligosaccharide an lysosomalen Enzymen vermittelt werden, als vielmehr von der Konformation bestimmter Domänen der lysosomalen Enzyme abhängig sein (Kornfeld und Sly, 2001). Unterstützt wurde diese Vermutung durch Experimente mit chimären Proteinen aus der Aspartylprotease Cathepsin D und dem sekretorischen Pepsinogen. Die Einfügung der C-terminalen Regionen des Cathepsin D in Pepsinogen war ausreichend, um eine GlcNAc-Phosphotransferase-Erkennungsdomäne zu bilden, obwohl diese Bereiche nur eine Identität von 45 % in der Aminosäuresequenz aufweisen. Mittels Kristallstruktur-Analysen zeigte sich, daß die ausgetauschte Region eine Erkennungsdomäne an der Oberfläche von Pepsinogen repräsentierte, die ebenfalls einer Oberflächenstruktur von Cathepsin D ähnelte. Diese Oberflächen-Region enthält zwei Lysine, die in einem Abstand von 34 Å zueinander liegen. Dieses Motiv wurde auch bei anderen lysosomalen Enzymen gefunden und soll das Phosphorylierungssignal für die GlcNAc-Phosphotransferase darstellen (Cuozzo et al., 1995; Warner et al., 2002).

### **1.2.2.2 *N*-Acetylglucosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ -*N*-Acetylglucosaminidase (Phosphodiesterase oder „*uncovering Enzyme*“)**

Die Phosphodiesterase katalysiert den zweiten Schritt in der Biosynthese des M6P-Markers lysosomaler Enzyme. Sie entfernt den GlcNAc-Rest um das M6P-Signal freizulegen. Dieser Schritt ist essentiell für den Transport lysosomaler Enzyme, da die beiden MPRs nicht in der Lage sind GlcNAc-M6P zu binden. Die Phosphodiesterase wurde aus boviner Leber isoliert und stellt ein Typ I Membran-assoziiertes Enzym mit dem N-Terminus im Lumen des Golgis dar. Sie ist hauptsächlich im TGN lokalisiert, zirkuliert aber auch zwischen TGN und Plasmamembran (Rohrer und Kornfeld, 2001). Die Phosphodiesterase ist als Tetramer (272 kDa) aus zwei Disulfid-gebundenen Homodimeren, aus jeweils zwei Untereinheiten von 68 kDa, aufgebaut (Mullis und Kornfeld, 1994). Ursprünglich wurde das Enzym als Phosphodiesterase angesehen, aber neuere Studien zeigen, daß es als  $\alpha$ -*N*-acetylglucosidase funktioniert (Kornfeld und Sly, 2001).

### 1.2.2.3 Mukolipidose II und III

Es sind zwei angeborene Krankheiten beim Menschen bekannt, bei denen die Bildung der M6P-Reste beeinträchtigt oder komplett verhindert sind: Mukolipidose II und III. Bei der Mukolipidose II (I-Cell-Disease, ML II, MIM# 252500) und der Mukolipidose III (pseudo-Hurler-Polydystrophie, ML III, MIM# 252600) ist die Zielsteuerung aller M6P-haltigen lysosomalen Enzyme gestört. Aufgrund eines Defektes der GlcNAc-Phosphotransferase wird das spezifische Sortierungssignal, der M6P-Rest, nicht synthetisiert, so daß lysosomale Enzyme im Golgi nicht an die M6P-Rezeptoren binden können und verstärkt sezerniert werden (Hasilik et al., 1981; Reitman et al., 1981). In kultivierten Hautfibroblasten von Mukolipidose II-Patienten finden sich zytoplasmatische Einschlüsse (*inclusions*), daher der Name „I-Cell-Disease“ (Leroy et al., 1972). Biochemische Analysen identifizierten sie als Anreicherungen von Mukopolysacchariden, Lipiden und Oligosacchariden (Thomas et al., 1976). Sie manifestiert sich meist kurz nach der Geburt und geht mit schwerer körperlicher (Dysostosis multiplex) und geistiger Retardierung einher. Selten überleben die Betroffenen die erste Lebensdekade (Kornfeld und Sly, 2001). Einen wesentlich milderen Verlauf hat die ML III. Sie wurde zum ersten Mal 1966 beschrieben (Maroteaux und Lamy, 1966). Das klinische Bild kann sehr variabel sein, jedoch ist es milder als bei der ML II (Kelly et al, 1975). Drei verschiedene Komplementationsgruppen (A, B und C) sind bekannt. Bei Patienten der Gruppen A und B ist die katalytische Funktion der GlcNAc-Phosphotransferase gestört, bei Patienten der Gruppe C die Erkennung lysosomaler Enzyme (Varki et al., 1981; Honey et al., 1982). Allerdings besteht keine Korrelation zwischen Komplementationsgruppe und klinischem Verlauf (Honey et al., 1982). Die Symptome der ML III treten zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr auf. Die geistige Entwicklung wird bei ML III-Patienten als normal angegeben und sie können bis ins Erwachsenenalter überleben (Kelly et al, 1975, Kornfeld und Sly, 2001).

Die Diagnose der ML II und III wird biochemisch durch Messung erhöhter Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum gestellt. Auch das Verhältnis von intra- und extrazellulärer Aktivität lysosomaler Enzyme, sowie die Aktivität der GlcNAc-Phosphotransferase in kultivierten Fibroblasten kann bestimmt werden. Die Unterscheidung zwischen ML II und ML III wird aufgrund klinischer Kriterien gestellt, da die Bestimmung der GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität kein zuverlässiges Parameter ist. Obwohl die GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität in ML II-Fibroblasten nicht nachweisbar ist und in ML III-Fibroblasten Restaktivitäten von 2-20 % gemessen werden (Hasilik et al., 1981,

1982; Robey und Neufeld, 1982), sind Beispiele bekannt, bei denen keine Korrelation zwischen gemessener Restaktivität der GlcNAc-Phosphotransferase und klinischem Typ besteht (Okada et al., 1985).

Im Rahmen der Symptome besteht eine erhebliche inter- und intrafamiliäre Variabilität. Die molekulare Basis dieses breiten phänotypischen Spektrums ist jedoch noch nicht geklärt. Insbesondere kann im Einzelfall die geistige Beeinträchtigung sehr gering ausfallen (Okada et al., 1985; Whelan et al., 1983; Beck et al., 1995). Die Beteiligung des ZNS bei ML II ist unklar und wird kontrovers diskutiert. Vermutlich sind aktivierte Gliazellen des ZNS an der Pathogenese bei der Mukopolidose, wie bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen, maßgeblich beteiligt (Martin et al., 1984; Wada et al., 2000; Ohmi et al., 2002).

Es gibt weder ein definiertes Tiermodell der Mukopolidosen, z. B. durch Ausschaltung von Phosphotransferase-Genen, noch natürliche Mutationen im *GNPTAG*-Gen. Es existieren jedoch 2 Tiermodelle mit „I-Cell disease-like phenotype“. Das ist zum einen eine triple-k.o.-Maus für MPR46, MPR300 und den Wachstumsfaktor IGF-II (Ludwig et al., 1996; Dittmer et al., 1998). Bei dem 2. Tiermodell handelt es sich um einen natürlichen vererbaren Defekt bei Katzen, dessen genetische Ursache unklar ist (Boshard et al., 1996). Beide Tiermodelle sind durch erhöhte Serumspiegel an lysosomalen Enzymen und durch Speichermaterial in vergrößerten Lysosomen gekennzeichnet, die im Mausmodell durch die Abwesenheit der M6P-Rezeptoren erklärbar ist. Abhängig von der Kreuzungsstrategie der triple-k.o.-Mäuse und der transkriptionellen Reaktivierung des paternalen MPR300 Allels in einigen Organen, variiert der Anteil von überlebenden Tieren zwischen <20 % innerhalb der ersten 4 Lebenswochen und 9 Monaten. Die triple-defizienten Mäuse sind steril und zeigen faziale Dysmorphien, einen charakteristischen Gang (versteifte Gelenke), Dysostosis multiplex und Kardiomyopathien. Lysosomale Einschlusskörper sind auch in parenchymalen Zellen (Hepatocyten, Neuronen, Glia) der triple-k.o.-Maus und Katze nachweisbar. Von den I-Cell-Disease-ähnlichen Katzen erreicht keine ein reproduktives Alter (1-216 Tage). Im Unterschied zu menschlichen Patienten sind ältere Katzen nach ca. 3,5 Monaten blind.

### **1.3 Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und intrazelluläre Sortierung von lysosomalen Enzymen**

Nach der Ausstattung lysosomaler Enzyme mit dem M6P-Marker können diese von zwei spezifischen M6P-Rezeptoren im TGN erkannt werden. Der Rezeptor-Ligand-Komplex

verläßt dann das TGN in clathrin-beschichteten Vesikeln und fusioniert schließlich mit späten Endosomen (Kornfeld, 1992; Hille-Rehfeld, 1995). Beide M6P-Rezeptoren (MPR) sind Typ I Membran-integrale Glykoproteine mit einer Masse von 300 und 46 kDa. Beide MPRs besitzen im Wesentlichen drei Strukturdomänen: eine N-terminale extrazytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne des 300 kDa MPR (MPR300) besteht aus 15 Wiederholungen einer Einheit aus 140 Aminosäuren, die homolog zu der Extrazellulärdomäne des 46 kDa MPR (MPR46) ist (Lobel et al., 1988; Pohlmann et al., 1987). Der MPR300 enthält 2 M6P-Bindungsdomänen in den luminalen Domänen und bindet somit 2 Mol M6P. Der MPR46 enthält eine M6P-Bindungsdomäne und bindet somit 1 Mol M6P oder 0,5 Mol diphosphoryliertes Oligosaccharid pro Mol MPR46. Die Bindungskapazität von Liganden an die beiden MPRs ist pH-Wert-abhängig. Der MPR46 bindet lysosomale Enzyme im Golgi optimal bei pH 6,5 und setzt die Liganden in dem sauren Milieu des endosomalen Kompartiments bei pH <6,0 frei. Der MPR46 ist im Gegensatz zum MPR300 nicht in der Lage bei pH 7,4 an der Plasmamembran mit lysosomalen Enzymen zu interagieren (Storch und Braulke, 2005). Die MPRs sind im TGN, frühen und späten Endosomen sowie an der Plasmamembran, aber nicht in Lysosomen lokalisiert. Beide Rezeptoren zirkulieren konstitutiv zwischen diesen Kompartimenten, gesteuert durch Signalstrukturen im zytoplasmatischen Teil der MPRs. Die Mechanismen und Signale, die lysosomale Membranproteine zu ihrem Bestimmungsort bringen, sind weniger gut charakterisiert. Die Untersuchungen werden hauptsächlich an 5 Proteinen durchgeführt, die den Hauptanteil der lysosomalen Membranproteine ausmachen: die lysosomalen assoziierten Membranproteine 1 und 2 (Lamp-1 und -2), die lysosomalen integralen Membranproteine 1 und 2 (Limp-1 und -2) und die lysosomale saure Phosphatase (LAP). Ein gemeinsames Charakteristikum ist der hohe Glykosylierungsgrad. Die lysosomalen Membranproteine enthalten in ihren zytoplasmatischen Domänen Sortierungssignale mit Tyrosin- und Dilucin-Motiven, die mit zytosolischen Adaptorproteinen interagieren können, die den Transport z. T. über die Plasmamembran M6P-unabhängig dirigieren (Eskelinen et al., 2003).

### **1.3.1 M6P-Rezeptor-unabhängiger Transport**

Es gibt Hinweise für die Existenz eines M6P-unabhängigen Segregationsweges. In Fibroblasten von Mukopolidose-Patienten werden lysosomale Enzyme aufgrund eines Defektes der GlcNAc-Phosphotransferase nicht mit dem Erkennungssignal versehen und

deshalb verstärkt sezerniert (1.2.2.3). In anderen Zellen dieser Patienten, wie z.B. Hepatozyten, Nierenzellen und Leukozyten sind jedoch normale intrazelluläre Aktivitäten lysosomaler Enzyme meßbar (Kornfeld und Sly, 2001). Zusätzlich werden einige lysosomale Enzyme, wie z.B. die  $\alpha$ -Glukocerebrosidase, auch in gesunden Fibroblasten M6P-unabhängig segregiert (Aerts et al., 1988). Membran-assoziiertes, M6P-unabhängiger Transport der Vorstufe der sauren Hydrolase Cathepsin D ist bei verschiedenen Zelltypen, wie z.B. humanen Hepatoma HepG2-Zellen (Rijnboutt et al., 1991 a,b), Maus-Makrophagen (Diment et al., 1988) oder humanen Mamma-Karzinomzellen MCF7 (Capony et al., 1994) beschrieben worden. In HepG2-Zellen kann Procathepsin D mit zwei co-synthetisierten 68 und 72 kDa schweren Glykoproteinen quer vernetzt werden, die als verschieden glykosylierte Formen des Prosaposins identifiziert wurden, und wahrscheinlich als Komplex mit Cathepsin D M6P-Rezeptor-unabhängig in die Lysosomen transportiert werden (Zhu und Conner, 1994; Grässel, Hasilik, 1992).

## **1.4 Proteolytische Modifikation von lysosomalen Enzymen am Beispiel von Cathepsin D**

Verschiedene lysosomale Enzyme werden während ihres Transportes zum Lysosom oder dort proteolytisch modifiziert. Am besten charakterisiert ist die lysosomale Aspartyl-Protease Cathepsin D (CtsD). CtsD wird als ein 53 kDa Vorläufer Glykoprotein im rauen ER synthetisiert. Die erste proteolytische Prozessierung ist die Entfernung eines N-terminalen Signalpeptids im ER. Danach erfolgt die Glykosylierung des Pro-CtsD mit Bildung mannosereicher und komplexer Oligosaccharide, wie unter 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben. Vom neusynthetisierten CtsD-Vorläuferprotein werden ca. 5-15 % sezerniert. Nach MPR-abhängiger Segregation im TGN sind intermediäre 47 kDa Formen ca. 60–90 min nach Synthese nachweisbar. Es wird angenommen, daß diese proteolytische Spaltung im endosomalen Kompartiment stattfindet. Die dritte proteolytische Modifikation findet im Lysosom bei einem sauren pH-Wert statt und resultiert in einer reifen (maturen) Form, die aus einer leichten Kette (14 kDa) und schweren Kette (31 kDa) besteht, die durch Disulfidbrücken zusammen gehalten werden. Diese internen proteolytischen Hydrolysen sind kaum untersucht worden aber sie sind abhängig von Cysteinproteasen (Gieselmann et al., 1983; Gieselmann et al., 1985).

## **1.5 Therapiemöglichkeiten lysosomaler Speichererkrankungen**

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Therapie von lysosomalen Speichererkrankungen (Vellodi, 2004). Eine ist die Enzymersatztherapie (EET), bei der das fehlende Enzym durch intravenöse Injektion von rekombinanten Enzymen substituiert wird. Derzeit wird die EET für 8 Speicherkrankheiten angewendet, bzw. befindet sich in der klinischen Erprobung (Phase 2 und 3). Die Substratdeprivation ist eine weitere Möglichkeit, die hauptsächlich den Glykolipidstoffwechsel betrifft. Dabei werden Iminozucker verwendet, die den ersten Schritt in der Glykosphingolipid-Biosynthese, die Ceramid-spezifische Glukosyltransferase, hemmen und somit zu einer Reduktion von neusynthetisierten Speichermaterial führen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Gentherapie mittels retroviraler Vektoren dar. Hierbei wird das therapeutische Gen durch einen retroviralen Vektor stabil in die Wirtszelle integriert. Verschiedene dieser Therapieformen werden z. Z. an Tiermodellen erprobt (Gieselmann, 2003). Die Knochenmarktransplantation stellt eine Therapieform dar, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

### **1.5.1 Knochenmarktransplantation**

Das therapeutische Prinzip der Knochenmarktransplantation (KMT) bei lysosomalen Speichererkrankungen basiert auf einer Substitution mit hämatopoetischen Zellen eines Spenders, die sezernierte M6P-haltige lysosomale Enzyme in die defizienten Zellen eines Empfängers, mittels MPR-abhängiger Endozytose, übertragen können (Chavany und Jendoubi, 1998). Die KMT scheint besonders für lysosomale Speichererkrankungen geeignet zu sein, bei denen die Substratakkumulation vorwiegend auf die periphere Organe beschränkt ist, wie z.B. Morbus Gaucher Typ I (Kaye, 1995), da es zu einer Entspeicherung mit z.B. Abnahme der Hepatosplenomegalie kommt.

KMT werden z. Z. als einzige verwendbare Therapie für angeborene lysosomale Speicherkrankheiten mit Zentralen Nerven System (ZNS)-Manifestation angesehen. Dem therapeutischen Konzept der KMT wird zugrunde gelegt, daß aus dem Knochenmark abstammende Monozyten/Makrophagen die Blut-Hirnschranke überwinden können und sich im ZNS zu perivaskulären Makrophagen und Mikroglia differenzieren. Die Sekretion von lysosomalen Enzymen aus Mikrogliazellen und die Rezeptor-abhängige Aufnahme durch umgebende, defiziente Hirnzellen mit Abbau akkumulierter Substrate, werden dabei als korrektiver Mechanismus angesehen. KMT führt bei den meisten Tiermodellen für

lysosomale Speicherkrankheiten jedoch weder zur Reduktion von Speichermaterial im Hirn noch zu meßbarer Erhöhung gewünschter Enzymaktivitäten.

Zur Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen mit neurologischer Beteiligung wird der Nutzen der KMT deshalb weiterhin kontrovers diskutiert, weil zirkulierende Enzyme im Gegensatz zu Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Im Tiermodell für den Mannosidase-Mangel konnte eine durch KMT gestiegene Mannosidase-Aktivität in Verbindung mit einem bedingten Rückgang neurologischer Symptome und z.T. auch eine Reduktion der Nervenschädigungen gezeigt werden (Gieselmann, 1995; Kaye 1995). Während nicht-transplantierte Tiere nach ca. 6 Monaten verstarben, wiesen die KMT-behandelten Tiere für einen Zeitraum bis zu 6 Jahren kaum neurologische Symptome auf. Dagegen war KMT bei Mäusen mit  $G_{M1}$ -Gangliosidose (Galactocerebrosidase-Defizienz) ohne Folgen (Kaye, 1995). Bei Fucosidose-Hunden konnte eine Besserung der neurologischen Symptomatik nach KMT nachgewiesen werden, wobei erhöhte Enzymaktivitäten im Gehirn erst 6 Monate nach der KMT meßbar waren, (Gieselmann, 1995). Worauf die Unterschiede in der Effektivität der KMT bei Erkrankungen mit Beteiligung des Nervensystems zurückzuführen sind, ist unklar. Seit der ersten KMT bei lysosomalen Speichererkrankung 1980, sind KMT inzwischen bei 20 der bekannten Speichererkrankungen durchgeführt worden (Vellodi, 2004). Während die KMT bei den Patienten zu einer variablen klinischen Verbesserung führte, kam es nur selten zur kompletten Umkehr des klinischen Phänotyps. Der Zeitpunkt der KMT scheint von wichtiger Bedeutung zu sein und es wird vermutet, daß eine KMT vor Auftreten neurologischer Symptome den Krankheitsverlauf eher beeinflussen könnte (Krivit et al., 1999).

## 2 ZIELSETZUNG

Studien an *in vitro* Zellkultursystemen, die den Enzymtransfer zwischen hämatopoetischen Donor-Zellen (Makrophagen) bzw. Mikrogliazellen und Enzym-defizienten Hirnzellen simulieren, zeigten, daß die untersuchten sezernierten lysosomalen Enzyme keine Mannose-6-Phosphat (M6P)-Reste trugen, die für die effiziente M6P-Rezeptor-abhängige Aufnahme notwendig sind (Muschol et al., 2002). Als Konsequenz kann vermutet werden, daß in Makrophagen auch der intrazelluläre Transport lysosomaler Enzyme M6P-unabhängig verläuft. Die fehlende M6P-Bildung ist möglicherweise zurückzuführen auf a) eine erniedrigte bzw. fehlende GlcNAc-Phosphotransferaseaktivität, b) strukturelle Eigenschaften der zu phosphorylierenden Oligosaccharidketten im Aufbau und Zusammensetzung, die die Erkennung durch die GlcNAc-Phosphotransferase verhindern oder c) die Präsenz eines endogenen (Makrophagen-spezifischen) Inhibitors der GlcNAc-Phosphotransferase.

Deshalb sollten zunächst isolierte humane Makrophagen in Hinblick auf Synthese, Transport und Prozessierung von lysosomalen Enzymen untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Makrophagen die GlcNAc-Phosphotransferase auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene exprimieren. Die experimentellen Voraussetzungen für diese Untersuchungen zu schaffen, bildet gleichzeitig den Schwerpunkt dieser Arbeit. Da zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit nur die cDNA der  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) der GlcNAc-Phosphotransferase bekannt war, sollte diese zunächst kloniert, exprimiert und gereinigt werden, um Antikörper zu generieren, die die zellbiologische Charakterisierung der GNPTAG in verschiedenen Zellsystemen ermöglichen. Gleichzeitig sollte versucht werden, die gereinigte GNPTAG als Affinitätsmatrix zu benutzen, um die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten zu reinigen und das kodierende Gen zu identifizieren. Die biologische Relevanz sollte an Zellen von Patienten mit Mukopolidose II und III verifiziert werden. Es wurde vermutet, daß die drei Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase unterschiedliche Funktionen ausüben. Die  $\gamma$ -Untereinheit der GNPTA soll dabei eine spezifische Konformationsstruktur lysosomaler Enzyme erkennen. Mutationen in der  $\gamma$ -Untereinheit sollen Defekte verursachen, die für Mukopolidose Typ III (ML III) Patienten typisch sind. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase sollen die katalytische Einheit bilden und bei biallelischen Defekten im Gen der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten zum klinisch schweren Krankheitsbild der

Mukopolidose Typ II (ML II) führen (Kornfeld und Sly, 2001). Deshalb war ein weiteres Ziel der Arbeit Mutationen in den GlcNAc-Phosphotransferase kodierenden Genen von ML II und ML III Patienten zu identifizieren und zu versuchen, sie mit dem biochemischen Phänotyp zu korrelieren.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Kits

Folgende Kits der Firma Qiagen, Hilden, wurden verwendet: QIAamp DNA Mini Kit, QIAplasmid Midi Kit, QIAplasmid Mini Kit, QIAquick PCR Purification und QIAquick Spin Gelextraction. Das verwendete RNA PCR Kit wurde von der Firma Perkin-Elmer, USA, und das FastStart DNA Master SYBR Green LightCycler Kit wurde von der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, bezogen.

#### 3.1.2 Radioaktive Substanzen

Die verwendeten Substanzen waren [ $^{32}\text{P}$ ]-P<sub>i</sub> und [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionine, 1000 Ci/mmol welche von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, bezogen wurden. [ $^{125}\text{I}$ ]-markierte Antikörper 2C2 und 21D3 wurden zur Verfügung gestellt von Thomas Braulke.

#### 3.1.3 Plasmide, DNA und DNA-Standards

Der Vektor pGEX-4T-3 wurde von der Firma Pharmacia, Freiburg, bezogen. pcDNA3.1(+) sowie die DNA-Standards 1 kb-Ladder und 100 bp-Ladder wurden von Invitrogen, Niederlande, geliefert. pFAST-BacMel wurde von CSS, Hamburg, bereitgestellt. EST-Klone wurden vom RZPD, Berlin, zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.4 Enzyme und Nukleotide

dNTP-Set (ultrapure)  
*Pfu-Turbo*<sup>TM</sup>-Polymerase  
Restriktionsendonucleasen  
*Taq*-DNA-Polymerase  
T4-Ligase  
DNase I  
Lysozym

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
Stratagene, USA  
New England BioLabs, Bad Schwalbach  
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
New England BioLabs, Bad Schwalbach  
Sigma, Deisenhof  
Merck, Darmstadt

### 3.1.5 Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Jodacetamid (JAA)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

### 3.1.6 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Genotyp: F'/ <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (NaI <sup>r</sup> ), <i>relA1</i> , D( <i>lacZYA-argF</i> ) <sub>U169</sub> , ( <i>j80lacZDM15</i> )
<i>Escherichia coli</i> BL-21	Genotyp: F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> (38, 39)
<i>Escherichia coli</i> TOP10F <sup>'</sup>	Genotyp: Rif <sup>r</sup> , F <sup>'</sup> , <i>proAB</i> , <i>lacIqz</i> $\Delta$ M15, Tn10, Tet <sup>r</sup>

### 3.1.7 Zell-Linien

Name	Beschreibung	Referenz
HeLa	humane Cervix-Karzinom Zellen	ATCC, Rockville, USA
MCF <sub>7</sub>	humane Brustkrebs Zellen	Capony et al., 1987
BHK	Baby-Hamster-Nieren Zellen	Clarke et al., 1970
ML II-MA ML II-ZB	ML II Patienten-Hautfibroblasten ML II Patienten-Hautfibroblasten	K. v. Figura, Universität Göttingen
ML III Pat. 1 - 9	ML III Patienten-Hautfibroblasten	M. Cantz, Universität Heidelberg
ML III Pat. 10	ML III Patienten-Hautfibroblasten	H. Reutter, Klinikum Nürnberg

### 3.1.8 Puffer, Medien und Lösungen

#### 3.1.8.1 Medien zur Aufzucht von Bakterien

Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Medien für die Aufzucht von Bakterien wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 1.1.1.1-4 (Ausubel et al., 2000), angesetzt.

### 3.1.8.2 Zellkulturlösungen

Dulbeccos (DMEM), Optimem-1, DMEM ohne Methionin, PBS für Zellkultur, Trypsin/EDTA-Lösung und Penicillin/Streptomycin wurden von der Firma GIBCO/BRL, Eggenstein, bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) wurde von der Firma PAA, Österreich, geliefert.

### 3.1.9 Antikörper

#### 3.1.9.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB	IF	IPP
human GNPTAG	K	EUROGENTEC, Belgien	1:100	1:250	n.g.
human CtsD	K	K. von Figura, Universität, Göttingen	1:500	1:500	1:1000
human $\beta$ -Hexosaminidase		K. von Figura, Universität, Göttingen	n.g.	n.g.	1:500
human $\beta$ -Glucuronidase	K	W. Sly University School of Medicine, USA	1:500	n.g.	n.g.
human PDI	M	StressGen, Kanada	n.g.	1:800	n.g.
human GM 130	M/mab	Transduction Laboratories, USA	n.g.	n.g.	n.g.
human LAMP-1 (H4A3)	M/mab	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	n.g.	1:100	n.g.
human MnSOD	K	Upstate Biotechnology, USA	1:500	n.g.	n.g.
His6	K	Dianova, Hamburg	1:500	n.g.	n.g.
Präimmunserum	K	EUROGENTEC, Belgien	n.g.	n.g.	1:1000

K: Kaninchen, M: Maus, Z: Ziege, mab: Monoklonaler Antikörper, IF: Immunfluoreszenz, IPP: Immunpräzipitation, WB: Western blot und n.g.: nicht getestet

### **3.1.9.2 Sekundärantikörper**

Alle folgenden Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova, Hamburg, bereitgestellt (WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz): Schaf anti Maus IgG, HRP-gekoppelt, 1:5000 im WB; Ziege anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt, 1:10000 im WB; Schaf anti Maus IgG, Cy3-gekoppelt, 1:000 in IF; Schaf anti Maus IgG, FITC-gekoppelt, 1:100 in IF; Ziege anti Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt, 1:2000 in IF; Streptavidin-Antikörper, HRP-gekoppelt, 1:5000 in WB

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol**

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die NaAc-Konzentration auf 0,3 M eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die DNA wurde durch Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 min und bei 14000 rpm gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

### **3.2.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE-Puffer bzw. Aqua bidest. Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA und 31  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotiden.

### **3.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **3.2.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen**

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische kurze Nukleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Um die optimalen Bedingungen für das jeweils benutzte Enzym zu schaffen, wurde einem Restriktionsansatz neben dem Restriktionsenzym und der zu spaltenden DNA der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Reaktionspuffer zugegeben (Endkonzentration 1 x). Ein 20  $\mu\text{l}$  Restriktionsansatz wurde beispielsweise wie folgt zusammenpipettiert:

x µl	DNA (ca. 0,1-1 µg)
2 µl	10 x Reaktionspuffer
1-2 µl	Restriktions-Enzym (10 U/ µl)
x µl	dH <sub>2</sub> O (ad 20 µl)

Der Restriktionsansatz wurde für 2–3 h bei 37 °C bzw. bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Restriktion von genomischer DNA erfolgte über Nacht. Um eine Hemmung des Enzyms durch eine zu hohe Glyzerinkonzentration zu vermeiden, wurde der Anteil des Restriktionsenzym am Gesamtvolumen des Ansatzes unter 10 % gehalten.

Wenn eine DNA mit zwei Restriktionsenzymen gespalten werden sollte, die verschiedene Reaktionsbedingungen benötigten, so wurde entweder ein Restriktionspuffer ausgewählt, in dem beide Enzyme laut Herstellerangaben noch eine gute Spaltaktivität zeigen, oder die DNA wurde zunächst mit dem einen Enzym gespalten, mit 3 Volumen 100 % Ethanol bei –80 °C für 30 min gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen und Aufnehmen in dH<sub>2</sub>O mit dem zweiten Enzym restringiert.

### 3.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle miteinander verbunden. Dies geschieht z.B. bei der Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. Dabei wird das zu klonierende DNA-Fragment im 4–5 fachen molaren Überschuß dem Reaktionsansatz zugegeben, so daß ein 10 µl-Ligationsansatz folgendermaßen zusammenpipettiert wurde:

1 µl	Vektor-DNA (ca. 50 ng)
6 µl	Insert-DNA
2 µl	5 x Ligations-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert)
1 µl	T4-DNA-Ligase (5 U/µl)

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

### 3.2.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente DH5 $\alpha$ -, TOP10- und BL21-*E. coli*-Zellen (100 µl, siehe 3.2.4.1) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor oder einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis wurden 0,4 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über

Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerolkulturen (siehe 3.2.4.2) verwendet.

### 3.2.4.1 Präparation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Die verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma, Steinheim, bezogen.

<u>Lösungen:</u>	<u>TfbI:</u>	100 mM	RbCl
		50 mM	MnCl <sub>2</sub>
		30 mM	KAc
		10 mM	CaCl <sub>2</sub>
		15 % (v/v)	Glyzerin
		pH 5,8	mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt
	<u>TfbII:</u>	10 mM	MOPS
		10 mM	RbCl
		75 mM	CaCl <sub>2</sub>
		15 % (v/v)	Glyzerin
		pH 7,0	mit NaOH eingestellt

TfbI und TfbII wurden jeweils frisch angesetzt und sterilfiltriert. 5 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie *E. coli* DH5 $\alpha$  von einer Stammplatte (LB-Agarplatte, ohne Antibiotikum) angeimpft und auf dem Drehrad bei 37 °C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium in einem 1 l Schüttelkolben angeimpft und 2 bis 2,5 h unter Schütteln (300 rpm) bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min in Eiswasser unter Schwenken abgekühlt und in JA-10 Zentrifugenbechern 5 min bei 3000 rpm (Beckman-Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 30 ml TfbI (4 °C) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 4 ml TfbII resuspendiert und in Aliquots von je 100  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.4.2 Anlegen einer Glycerolkultur

Vorkulturen mit einer OD<sub>600</sub> <1 wurden mit 0,25 Volumen an 80 % Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus einer Glycerolkultur kann direkt eine Vorkultur angeimpft werden.

### **3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Plasmid-Midi- und Minipräparationen wurden mittels des Plasmid-Midi-Kits ( für 20-100 µg DNA) und Plasmid-Mini-Kits (bis 20 µg DNA) nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen, Hilden), unter Verwendung der mitgelieferten Puffer, durchgeführt.

### **3.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 15 % Ficoll) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera aufgenommen.

#### **3.2.6.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kits nach Anweisung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aus der Agarose extrahiert.

### **3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist ein Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki et al., 1988).

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels verschiedener DNA-Präparations-Kits der Firma Qiagen, Hilden, isoliert worden war. Das dNTP-Set wurde auf 10 mM je Nukleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

DNA- Template	Primer 3' und 5' (10 pmol/μl)	DNTP (10 mM je Nukleotid)	10 x PCR-Puffer	Taq- Polymerase (5U/μl)	ad H <sub>2</sub> O
50 ng	je 1 μl	1 μl	5 μl	1 μl	50 μl

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonukleotid-Primer angesetzt.

### 3.2.7.1 PCR an humaner genomischer DNA

#### 3.2.7.1.1 Etablierung einer PCR zur ML III Diagnostik an humaner genomischer DNA

Um eine Diagnostik für das *GNPTAG*-Gen zu etablieren wurden alle 11 Exons des Gens an humaner genomischer DNA amplifiziert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden dann einer Sequenzierung zugeführt. Die Sequenz-Analysen der ML III-Patienten sollten Mutationen und Polymorphismen in den untersuchten Gen (*GNPTAG*) erkennen lassen. Für die Amplifizierung der Exons ergaben sich folgende Primer-Kombinationen (Oligonucleotid-Sequenz: siehe Anhang 9.1 a)

zu amplifizierendes Exon	Primer-Paar
1 - 2	1-2 <i>for</i> / 1-2 <i>rev</i>
3	3 <i>for</i> / 3 <i>rev</i>
4 - 7	4-7 <i>for</i> / 4-7 <i>rev</i>
8 - 9	8-9 <i>for</i> / 8-9 <i>rev</i>
10 - 11	10-11 <i>for</i> / 10-11 <i>rev</i>

Der PCR-Ansatz für die *GNPTAG*-Exons wurde wie folgt zusammenpipettiert:

x μl humane genomische DNA (ca. 100 ng)  
 5 μl 10 x PCR-Puffer  
 1,5 μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
 2 μl dNTP-Mix (je 10 mM)  
 je 1 μl Primer (10 pmol/μl)  
 0,5 μl Taq-DNA-Polymerase  
 Exon 1 – 3: 5 μl DMSO  
 Exon 4 – 11: 0,5 μl DMSO  
 ad 50 μl mit dH<sub>2</sub>O

Die PCR wurde in einem Thermocycler (T-personal, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das Programm der PCR war so aufgebaut, daß nach einer Denaturierung der DNA bei 96 °C für 2 min folgende Temperaturen für 40 Zyklen durchlaufen wurden:

Denaturierung	95 °C	15 sec
Anlagerung (Annealing)	45 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec

Um die Synthese angefangener PCR-Produkte zu vervollständigen, erfolgte abschließend ein Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min. Nach dem Ende der PCR wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen und die PCR-Produkte in Bezug auf ihre Größe überprüft (siehe Anhang 9.1 a). Die restlichen 45 µl des PCR-Ansatzes wurden der Aufreinigung und der Sequenzierung zugeführt. Bei der Sequenzreaktion wurden die selben Primer wie für die Amplifikation eingesetzt, wobei jedes Fragment von beiden Seiten aus sequenziert wurde.

### **3.2.7.1.2 Etablierung einer PCR zur ML II Diagnostik an humaner genomischer DNA**

Zur Evaluierung von Gendefekten des *MGC4170*-Gens bei ML II Patienten, wurden zur Amplifikation der 21 identifizierten Exons die im Anhang gezeigten Primer-Paare verwendet (siehe 9.1 b)

Der PCR-Ansatz für die 21 Exons wurde wie unter 3.2.7.1 a) beschrieben zusammengesetzt, mit der Ausnahme, das für jedes zu amplifizierende Exon 5 µl DMSO zugesetzt wurden. Für die Amplifikation wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Denaturierung	95 °C	30 sec
Anlagerung (Annealing)	x °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min

Die Annealing-Temperatur variierte bei den zu amplifizierenden Exons:

48 °C	Exon 5, 6, 13, 16 und 20
49°C	Exon 17
50°C	Exon 2, 8,11 und 14
52 °C	Exon 4, 9, 12, 19 und 21
54°C	Exon 7, 10 und 18
57°C	Exon 14 und 15
60°C	Exon 1 und 3

Um die Synthese angefangener PCR-Produkte zu vervollständigen, erfolgte abschließend ein Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min. Danach wurde weiter verfahren wie unter

3.2.7.1.1 beschrieben (die zu erwartenden Exon-Größen sind im Anhang (9.1 b) angegeben).

### 3.2.7.2 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens (Sanger *et al.*, 1977). Für eine Sequenzreaktion wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

x µl	Plasmid-DNA (ca. 1 µg)
1 µl	sequenzspezifischer Primer (10 pmol/µl)
8 µl	Big Dye-Terminator-Mix

Der Ansatz wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Der eingesetzte Mix enthielt dNTPs, fluoreszenz-markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden nach 5 min Denaturierung bei 96°C folgende Bedingungen für 25 Zyklen gewählt:

Denaturierung:	95 °C	10 sec
Anlagerung (Annealing):	50 °C	5 sec
Elongation:	60 °C	4 min

Nach der Amplifikation wurden dem Ansatz für die folgende Ethanol-Fällung 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 50 µl 95 % (w/w) Ethanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT gefällt. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % (w/w) Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 min) und bei 37 °C für 45 min getrocknet, bevor es der Sequenz-Analyse zugeführt wurde.

### 3.2.8 PCR-Mutagenese der *GNPTAG*-cDNA

Um gezielt die Mutation c.347\_349delACA in die *GNPTAG*-cDNA (siehe Anhang 9.2) zu bringen, wurde eine "Overlap Extension"-PCR durchgeführt. Es wurden Primer-Paare entworfen, die komplementär zum kodierenden bzw. zum nicht-kodierenden Template-Strang sind und die gewünschte Mutation einführen. Komplementäre Primer (*ACA-del for* und *ACA-del rev*, siehe Anhang 9.1 f) wurden für die PCR benutzt, um zwei DNA-Fragmente herzustellen, die sich überlappende Enden besitzen.

PCR-Programm:

25 Zyklen:	Denaturierung:	95 °C	15 sec
	Anlagerung (Annealing):	45 °C	15 sec
	Elongation:	72 °C	1 min

Die korrekten Größen und die Spezifität der PCR-Reaktion wurde durch Auftrennung im 1 % Agarosegel überprüft. Die gewünschten DNA-Fragmente (~ 450 bp) wurden aus dem Gel isoliert (3.2.6.1). Durch Kombination der hergestellten Fragmente in einer folgenden PCR-Reaktion (gleiche Zyklus-Bedingungen) mit den Primern PT *for* und PT *rev* (siehe Anhang 9.1 f) verbanden die sich überlappenden Enden. Das fusionierte Produkt (~ 930 bp) wurde dann zur Klonierung in den Expressions-Vektor pcDNA3.1(+) verwendet.

### **3.2.9 Klonierung und Aufreinigung eines GST-GNPTAG Fusionsprotein**

Die „full-length“ *GNPTAG* –cDNA (siehe Anhang 9.2) wurde mittels dem RZPD-Klon IRAKp961H1933.1 und PCR unter Verwendung der Primer GST-GNPTAG-*for* und GST-GNPTAG-*rev* (siehe Anhang 9.1 d), welche *NotI*-und *SmaI*-Schnittstellen vermittelten, amplifiziert. Das PCR Produkt (~ 950 bp) wurde in die *NotI* und *SmaI* Schnittstellen des Vektors pGEX-4T3 ligiert und anschließend für die Transformation in *E. coli* BL-21-Zellen benutzt. Die Induktion der GST-GNPTAG Expression erfolgte mit Isopropyl-1-Thio-βD Galactosid, Zell-Lyse und Affinitätsaufreinigung wurden wie bei Storch und Braulke (2001) beschrieben durchgeführt.

### **3.2.10 Klonierung eines 6His-GNPTAG-Fusionsprotein**

*GNPTAG*-cDNA (RZPD-clone: IRAKp961H1933) wurde mittels PCR-eingeführter Restriktionsschnittstellen (*Nco* I und *Kpn* I; Primer: siehe Anhang 9.1 e) in den Baculovirus-Transfer Vektor pFast-BacMel kloniert und kommerziell in Sf9 Insektenzellen als ein sekretorisches 6His-Fusionprotein exprimiert (CSS, Hamburg). Die Firma stellte insgesamt ca. 1 l Sf9-Medium von 6His-GNPTAG überexprimierenden Sf9-Zellen zur Verfügung. Das 6His-GNPTAG-Fusionsprotein wurde dann mittels Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und eluiert wie vom Hersteller empfohlen.

### 3.2.11 Isolierung von humaner genomischer DNA

Zur Durchführung der PCR-Diagnostik (siehe 3.2.7.1.1-2) wurde humane DNA benötigt. Diese wurde aus 10 ml EDTA-Vollblut, kultivierten Patienten-Hautfibroblasten sowie kultivierten Patienten-Amnionzellen mittels des QIAamp-DNA Mini Kits nach den Instruktionen des Herstellers isoliert.

### 3.2.12 RNA-Isolation

#### 3.2.12.1 RNA-Isolation aus kultivierten Zellen

Die Aufarbeitung von total RNA aus kultivierten humanen Fibroblasten wurde mit dem Nucleospin II Kit nach den Instruktionen des Herstellers vorgenommen. Bei kleinen Zellmengen (z.B. konfluent bewachsene 35 mm Ø Kulturplatten) wurde die RNA-Isolierung wie unter 3.2.12.2 beschrieben durchgeführt.

#### 3.2.12.2 RNA-Isolation aus Gewebe nach Chirgwin (1979)

Die verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma, Steinheim, bezogen.

Gewebe-Guanidine-Lsg.	5 M	Guanidine-Thiocyanat (Sigma, Steinheim)
	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
Sarcosyl-Lsg.	20 % (w/v)	Sarcosyl (Sigma, Steinheim)
Cäsiumchlorid-Lsg.	5,7 M	Caesiumchlorid
		in 100 mM EDTA pH 8,0
Resuspensionspuffer	5 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	Sarcosyl
	5 %	β-Mercaptoethanol (unverdünnt)

Frisches oder bei -80 °C gelagertes Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 950 µl Gewebe-Guanidine-Lösung und 50 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe durch 20 Züge mit einer G24-Nadel homogenisiert und anschließend 10 min bei 13000 rpm und 12 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 µl Sarcosyllösung versetzt und 2 min bei 65 °C inkubiert. Auf 500 µl Cäsiumchloridlösung wurde der Überstand überschichtet und 20 h bei 43000 rpm und 22 °C im Swing-out-Rotor S55S zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall Discovery M120, Kendro, USA). Danach wurde das

Pellet in 400 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) kurz gemischt und für 30 s zentrifugiert. Der oberen Phase wurden 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, wieder kurz vermengt und erneut für 30 s zentrifugiert. Aus der oberen Phase wurde die RNA gefällt (siehe 3.2.1). Das RNA-Pellet wurde in 50 µl A. dest. aufgenommen und anschließend noch einer DNase-Behandlung nach den Instruktionen des Herstellers (Qiagen, Hilden) unterzogen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die RNA wiederholt durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (s.o.).

### 3.2.13 Quantitative PCR

Zunächst wurde die aus kultivierten Zellen isolierte RNA (siehe 3.2.12) durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA als Template für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt. Es wurde ein Kit der Firma Perkin Elmer (USA) verwendet. Anschließend folgte eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für *GNPTAG* und *β-Actin* (siehe 9.1 c) nach den Instruktionen des Herstellers. Schon während der PCR-Reaktion wird das fluoreszierende SYBR Green an die DNA gebunden und die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus bei 88 °C (für *GNPTAG*) und bei 89 °C (für *β-Actin*) durch den Light Cycler gemessen. Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Dies gilt ebenso für die Standardreihe. Als Standard wurden verschiedene Verdünnungen des PCR-Produktes der jeweiligen Primer verwendet. Die *GNPTAG*-Expressionsrate wurde dann auf die Expressionsrate des *β-Actin* (fg *GNPTAG*/pg *β-Actin*) hochgerechnet.

## 3.3 Zellbiologische Methoden

### 3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

ML II- und ML III-Hautfibroblasten wurden in RPMI mit 20 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle anderen Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.3.2 Isolation von Monocyten**

Die Isolierung von humanen Monocyten wurde nach Muschol et al. 2002 durchgeführt.

### **3.3.3 Trypsinieren von Zellen**

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen z.B. mit 0,5 ml Trypsin (0,05 % w/v)/EDTA (0,02 % w/v) pro 25 cm<sup>2</sup>-Flasche für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

### **3.3.4 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen**

Einfriermedium 10 % DMSO / 20 % FKS / 1 % Penicillin / Streptomycin in DMEM

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm in einer Minifuge (Heraeus Sepatech, Hanau) sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen (aus einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche) in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf drei Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei –80 °C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das eingelagerte Einfrierröhrchen für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 3,5 ml kaltes Medium (4 °C) überführt und in der Minifuge 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

### **3.3.5 Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen**

Zur Transfektion von Zellen wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen, USA) verwendet. Die Transfektion wurde nach den empfohlenen Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Lösungen:	10 mM	PBS
	3 %	Para-Formaldehyd (PFA) in PBS (w/v)
	0,1 mg/ml	Poly-L-Lysin in PBS
	1%	BSA in PBS

Sterile Deckgläschen wurden in eine 35 mm Ø Gewebekulturschalen ausgesät und mit 200 µl Poly-L-Lysin für 1 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gespült. Etwa 500-1.000 Zellen wurden auf den beschichteten Deckgläschen über Nacht gezüchtet. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 3 % PFA für 40 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und 6 min mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die Blockierung mit 1 % BSA in PBS über 30 min bei RT. Die Deckgläschen wurden auf einen Streifen Parafilm gelegt und 50 µl der Antikörperverdünnung als Tropfen darauf pipettiert. Eine mit feuchtem Filterpapier ausgekleidete Petrischale wurde als Verdunstungsschutz darüber gelegt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in 1% BSA/PBS für 2 h bei RT. Im Anschluß daran wurden die Zellen 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Die Bindung der an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte, wie für den Primärantikörper beschrieben, für 1 h bei RT unter Lichtausschluß. Danach wurden die Zellen zunächst wieder 3 x mit PBS und mit A. bidest. gewaschen, in Glycerol-Gelatine (Sigma) eingebettet und bei 4 °C gelagert.

Für Kolokalisationsstudien wurden die Zellen simultan mit den jeweiligen Primärantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies generiert worden waren, inkubiert. Durch geeignete Wahl der Sekundärantikörper konnten diese spezifisch dargestellt werden. Die digitale Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss, Oberkochen, und am Konfokalmikroskop LSM 510 der Firma Zeiss, Jena.

### 3.3.7 Metabolische Markierung von Zellen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin

Zur metabolischen Markierung wurden die Zellen typ-abhängig 1-3 Tage vor dem Experiment in der benötigten Dichte auf Kulturschalen (35 mm Ø) ausgesät. Die Zellen wurden mit 3 x 2 ml PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit Hungermedium

inkubiert, bevor das Medium gegen 0,7 ml Markierungsmedium ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 min bis 2 h inkubiert. Zur Bestimmung der Sortierung und Prozessierung von lysosomalen Hydrolasen wurde das Markierungsmedium abgenommen, die Zellen 1 x gewaschen und nach Zugabe von 0,7 ml Chase-Medium für 30 min bis 20 h inkubiert. Nach Markierung wurde das Medium in Reaktionsgefäße abgenommen, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 2 x 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1260 µl Zell-Lysispuffer mit einem Gummispatel abgeschabt. Die Zellextrakte und Medien wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Hungermedium:	Methionin-freies MEM
Markierungsmedium:	Methionin-freies MEM
	4 % (v/v) dialysiertes FKS (hitze-inaktiviert)
	30-200 µCi [ <sup>35</sup> S]-Methionin
Chase-Medium:	MEM
	0,1 % BSA
	0,25 mg/ml Methionin

### **3.3.8 Immunpräzipitation von Cathepsin D und β-Hexosaminidase**

Immunpräzipitationen von lysosomalen Hydrolasen wurden durchgeführt nach Braulke et al., 1990 und Muschol et al., 2002.

## **3.4 Biochemische Methoden**

### **3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Erwartete Proteinkonzentrationen von 20–100 µg wurden nach der Methode von Bradford mittels der Protokoll-Vorlage aus den „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.1.4 (Ausubel et al., 2000), und Proteinmengen unter 20 µg wurden nach der Methode von Lowry und der Protokoll-Vorlage aus „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.1.5 (Ausubel et al., 2000), bestimmt.

## **3.4.2 Färbung von Proteinen**

### **3.4.2.1 Coomassie-blue-Färbung**

Die Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blue (0,05 %) wurde für erwartete Proteinmengen von über 1 µg gemäß den Anleitungen der „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.6.1 (Ausubel et al., 2000), durchgeführt.

### **3.4.2.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen erfolgte bei einer erwarteten Proteinmenge von weniger als 1 µg nach dem Protokoll der „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.6.3 (Ausubel et al., 2000).

## **3.4.3 Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie**

Bei der Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen mit PPO (Diphenyloxazol in DMSO) wurde das Protokoll von Bonner und Laskey, 1974 befolgt, um eine Signalverstärkung von Radioaktivität in SDS-PAGE-Gelen zu erreichen.

## **3.4.4 Messung von lysosomalen Enzymaktivitäten in MLII- und ML III-Fibroblasten**

Zur Messung der Aktivität verschiedener lysosomaler Enzyme wurden je Aktivitätsbestimmung eine Kulturplatte (35 mm Ø) mit Fibroblasten angelegt und für 24 h mit MEM (0,1 % BSA) inkubiert. Danach wurde aus Medium und Zellen die jeweilige Aktivität bestimmt. Aus den unten beschriebenen Enzym-Aktivitätsmessungen geht als berechnete Einheit jeweils mU/ml hervor. Zur genaueren Bestimmung wurden diese Werte auf die Kulturzeit der Zellen (24 h) und die Zellprotein-Menge pro Kulturplatte hochgerechnet. Man erhielt dann als endgültige Werte für die Aktivität im Kulturmedium: mU/24h/mg Zellprotein; sowie für die gemessene Aktivität in Zellen: mU/mg Zellprotein. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und gemittelt.

### 3.4.4.1 Messung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität

Substratpuffer	10 mM	para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid
	100 mM	Na-Citrat pH 4,6
	0,04 %	NaN <sub>3</sub>
	0,2 %	BSA
Stop-Puffer	0,4 M	Glycin/NaOH pH 4,6

Pro Ansatz wurden zwischen 5-20  $\mu$ l der zu messenden Probe eingesetzt und mit A. dest. auf ein Volumen von 50  $\mu$ l gebracht. Nach dem Zufügen von 50  $\mu$ l Substratpuffer folgte eine Inkubation von 30 bis 60 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stop-Puffer beendet und die optische Dichte bei 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient von 18500 berücksichtigt.

### 3.4.4.2 Messung der Arylsulfatase-Aktivität

Substratpuffer	10 mM	para-Nitrocatecholsulfat
	100 mM	Na-Citrat pH 4,6
	0,04 %	NaN <sub>3</sub>
	0,2 %	BSA
Stop-Puffer	1 M	NaOH

Pro Ansatz wurden 100-200  $\mu$ l der zu messenden Probe eingesetzt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Substratpuffer wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600  $\mu$ l Stop-Puffer beendet. Die optische Dichte wurde dann bei 515 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Arylsulfatase-Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient von 12400 berücksichtigt.

### 3.4.4.3 Messung der $\beta$ -Glucuronidase- und $\beta$ Galaktosidase-Aktivität

Substratpuffer	100 mM	Na-Citrat pH 4,6
	0,08 %	NaN <sub>3</sub>
	0,4 %	BSA
Stop-Puffer	0,2 M	Glycin/NaOH, pH 10,8
Enzyme		Substrate (in Substratpuffer)
$\beta$ -Glucuronidase	1 mM	4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
$\beta$ Galaktosidase	1 mM	4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

Zur Bestimmung der Aktivität der Enzyme wurden folgende Ansätze gewählt:

Enzyme	Zellhomogenat/ Inkubationszeit	Medium/ Inkubationszeit	Substrat
β-Glucuronidase	10 µl / 30 Minuten	10 µl / 2 Stunden	50 µl
β Galaktosidase	10 µl / 30 Minuten	10 µl / 3 Stunden	50 µl

Die Proben wurden mit Substratlösung versetzt und bei 37 °C für die angegebene Zeit inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 2 ml Stop-Lösung beendet. Im Fluoreszenz-Spektrophotometer wurde nach Exzitation bei 365 nm die Emission bei 410 nm gemessen. Zur Umrechnung in mU/ml wurden die gemessenen Werte mit einem Faktor F multipliziert:

$$F = \text{Verdünnungsfaktor/Zeit(min)} \times 80 \text{ (1 nmol entsprach 80 Skalenteilen)}$$

### 3.4.5 Deglykosylierung von *N*-glykosylierten Proteinen

Mittels Peptid-*N*-Glycosidase F (PNGaseF) wurden alle Typen Asparagin (N)-gebundener *N*-Glycanketten an Proteinen abgespalten. Dazu wurde vorgegangen, wie vom Hersteller empfohlen (Roche, Mannheim).

### 3.4.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).

Proteine wurden nach ihrer molekularen Masse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Protokoll aus „Current Protocols in Molecular Biology“, Kapitel 10.2A.4-8 (Ausubel et al., 2000), aufgetrennt.

### 3.4.7 Western blot Analyse

Transferpuffer 1	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Western blot Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran geht auf Towbin et al., 1979, zurück und wurde für 90 min bei 900 mA in einer Elektroblot-Apparatur durchgeführt.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (10 mM PBS/ 5 % Milchpulver/ 0,05 % Tween-20) inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT. Danach wurde die Nitrozellulosemembran 3 x 5 min mit Waschpuffer (10 mM PBS/ 0,05 % Tween-20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA).

### **3.4.8 Overlay-Analyse mit biotinyliertem MPR 300**

Bei einem Overlay wird das nachzuweisende Protein, anders als beim Western blot, nicht mit einem Antikörper, sondern mit einem spezifischen Liganden, bzw. eines Rezeptors, des Proteins detektiert. Hier sollen die Gesamtheit der M6P-haltigen Proteine dargestellt werden durch Bindung einer löslichen, bindungskompetenten Form des MPR300 (Zur Verfügung gestellt von Prof Journet, Laboratoire de Chimie des Proteines, Grenoble, Frankreich). Dazu wurden die Proteine nach SDS-PAGE und Elektrotransfer auf Nitrocellulose zunächst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C in Blocklösung (10 mM TBS/ 1 % BSA/ 0,05 % Tween-20) inkubiert, gefolgt von einer 16 h Inkubation mit biotinyliertem MPR 300 (1 µg/ ml in Blocklösung) bei 4° C. Anschließend wurde die Nitrozellulose für 1 x 15 min und 4 x 5 min gewaschen und mit Streptavidin-HRP (1:10000 in Blocklösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Nitrozellulose erfolgte der Nachweis durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers.

### **3.4.9 Gewinnung von Antikörpern**

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen die GNPTAG wurde ein GST-GNPATG Fusionsprotein in *E. coli* BL-21 exprimiert und gereinigt (siehe 3.2.9). Ca. 300-500 µg des GST-GNPTAG Fusionsprotein wurden für die kommerzielle Immunisierung bei der Firma Eurogentech (Belgien) eingesetzt

### 3.4.9.1 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Startpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,4  
0,9 % NaCl  
0,02 % NaN<sub>3</sub>

Puffer 1: 0,2 M Glycin, pH 2,5

1 ml Affigel 10 (Bettvolumen: 0,5 ml) wurden in einer Mobicolsäule mit 3 ml Isopropanol und 3 ml A. bidest. bei 4 °C gewaschen. Die gewaschene Matrix wurde mit 200 µl 0,5 M HEPES/ pH 7,5 versetzt und mit 450 µg des GST-GNPTAG-Proteins (in 300 µl 0,5 M HEPES/ pH 7,5 gelöst) gemischt. Nach Inkubation der Suspension bei 4 °C für 24 h wurde der Durchfluß gesammelt und die Matrix zweimal mit 0,1 M HEPES (pH 7,5) gewaschen. Zur Blockierung von noch verbleibenden reaktiven Gruppen wurde das Gel in 1 ml 0,1 M HEPES (pH 7,5) resuspendiert, mit 200 µl 1 M Ethanolamin versetzt und für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Das Gel wurde mit 10 ml 10 mM PBS und anschließend mit Startpuffer bis zu einer OD<sub>280</sub> < 0,02 der Waschfraktionen gewaschen. Anschließend wurde 1 ml des Kaninchen-GNPTAG Antiserums (in 9 ml Startpuffer) auf die Säule aufgetragen und bei 4 °C über Nacht auf dem Drehrad inkubiert. Die nicht gebundenen Proteine wurden als Durchfluß gesammelt und die Säule mit 20 Säulenvolumen 10 mM PBS gewaschen, bis eine OD<sub>280</sub> < 0,02 erreicht war. Danach erfolgte eine Elution der spezifisch gebundenen Antikörper mit 10 x 0,25 ml Puffer 1. Die Fraktionen wurden sofort mit 2 M Tris-Base neutralisiert. Die OD<sub>280</sub> der einzelnen Fraktionen wurde gegen den Startpuffer gemessen und Fraktionen mit hoher OD<sub>280</sub> wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Coomassie-Blue-Färbung (siehe 3.4.5 und 3.4.2.1) analysiert.

### 3.4.10 ConA-Sepharose-Säule

Zur Konzentrierung von sezernierten, glykosylierten Proteinen aus Kulturmedien wurden 2 ml des Mediums auf eine mit 10 ml 10 mM PBS-äquilibrierte Concanavalin A-(Con A)-Sepharose-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml gegeben und über Nacht auf dem Drehrad inkubiert. Ungebundenes Material wurde als Durchfluß gesammelt und die Säule mit 10 ml 10 mM PBS gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 0,5 M  $\alpha$ -Methylmannopyranosid in 10 mM PBS.

### **3.4.11 Präparation einer GNPTAG-Affinitätsmatrix zur Identifizierung GNPTAG-bindender Proteine aus Golgimembranen**

Das gereinigte 6His-GNPTAG (siehe 3.2.10) wurde mittels Western blot Analyse durch die Benutzung eines anti-GNPTAG Antikörpers evaluiert (Tiede et al, 2004). GNPTAG (2,5 mg) wurde an 2 ml Affigel 10 (Bio-Rad, München) nach den Anweisungen des Herstellers gekoppelt.

#### **3.4.11.1 Präparation von Golgimembran-Extrakten**

Golgi-angereicherte Membranen wurden aus humaner Plazenta aufgereinigt wie von Boa et al., 1996a, beschrieben. Extrahierte Proteine (0,6 mg) wurden an 0,5 ml Bettvolumen BSA-gekoppelten Affigel 10 präabsorbiert und der Durchfluß wurde auf eine GNPTAG-Affinitätssäule (3.4.10) geladen und für 3 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Entfernung von ungebundenen Proteinen, wurde die Säule mit ca. 150 ml Puffer A (0,025 M Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 % N-Octyl-β-D-Glucopyranoside; 20 % Glycerol; 5 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen bis die OD<sub>280</sub> = 0 im Durchfluß zu messen war. Gebundene Proteine wurden mittels eines hoch-molaren Puffers B (Puffer A + 1.5 M NaCl) eluiert, gegen PBS dialysiert, konzentriert und separiert mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid). Silber-gefärbte Polypeptid-Banden (siehe 3.4.2.2) wurden ausgeschnitten und einer „In-gel trypsin digestion“ mittels „Promega’s modified trypsin solution“ zugeführt. „Matrix-assisted laser desorption ionization –time of flight“ (MALDI-TOF) Massen Spektroskopie der Peptid-Verdaue wurde kommerziell durchgeführt durch Protein Chemistry Unit, Biomedicum Helsinki, Finland, unter Benutzung eines Bruker Daltonics Autoflex Massen Spektrometers (Bremen). Für Peptide-Fingerprint-Analysen wurden die NCBIInr, Swiss prot und MSDB Datenbanken benutzt.

#### **3.4.12 GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivitätsbestimmung**

Zur GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivitätsbestimmung in humanen Makrophagen wurde eine *in vitro* Phosphorylierung von ASA mit [<sup>32</sup>P]-UDP-GlcNAc nach Waheed et al., 1982, durchgeführt. Gereinigte Rattenleber-Golgi-Membranen, die als Kontrolle dienten, [<sup>32</sup>P]-UDP-GlcNAc und rekombinante humane ASA wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Yaghootfam, Institut für physiologische Chemie, Bonn. Makrophagen-Membranen wurden

angereichert, nach Homogenisierung der Makrophagen in Puffer A (35 mM Na-Phosphatpuffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,7) mittels Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde dann für 45 min bei 43000 rpm zentrifugiert. 15, 30 und 60 µg Protein aus dem Pellet wurden pro Ansatz verwendet.

### 3.4.13 Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektrometrie

Der Biosensor BIAcore 3000 (BIAcore AB, Schweden) verwendet das optische Phänomen der Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR) um Interaktionen zwischen Biomolekülen zu untersuchen. Die Detektion beruht auf Veränderungen in der Massenkonzentration von Makromolekülen auf der Oberfläche eines Sensorchips, was zu einer Ablenkung eines Lichtstrahls führt. Das Ausmaß der Ablenkung hängt unter anderem vom Refraktionsindex des Mediums ab, welches auf die Oberfläche des Sensorchips trifft. Der Refraktionsindex korreliert wiederum mit der Konzentration von gelösten Molekülen im Medium, die sich durch Interaktion der zu untersuchenden Biomoleküle verändert. Eines der zu untersuchenden Biomoleküle wird auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Das andere Biomolekül, der Analyt, wird in einem kontinuierlichen Fluß über die Sensoroberfläche geleitet. Die Auswertung der Messungen erfolgt in Form eines Sensorgramms, in welchem die Veränderungen des Resonanzwinkels des reflektierten Lichts gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Veränderung des Resonanzwinkels wird durch Resonanzeinheiten (RU) dargestellt. Eine Veränderung um 1000 RU korrespondiert mit einer Zunahme der Oberflächenkonzentration auf dem Sensorchip um ca. 1 ng/mm<sup>2</sup>.

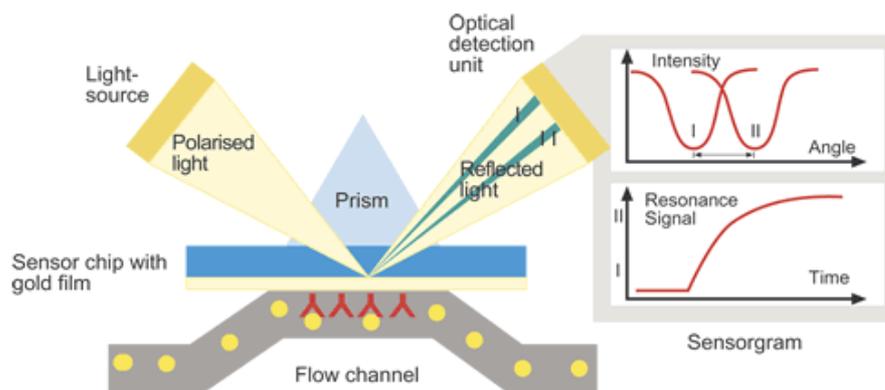


Abb. 5: Schematische Darstellung der BIAcore Oberflächen-Resonanz-Spektroskopie.

(Quelle: Biacore, 2004).

Alle Materialien und Lösungen wurden von BIAcore AB, Schweden bezogen. Der Sensorchip (CM5) besteht aus einem Glasträger, der mit einem Goldfilm (Dicke: 50 nm)

beschichtet ist. An diesen Goldfilm ist eine Dextran-Oberflächenmatrix kovalent gebunden. Die Aktivierung des Sensorchips erfolgte über N-hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid (EDC). Die Kopplung der Liganden erfolgte in einem Immobilisierungspuffer (10 mM Na-Acetat, pH 5,0) bei einer Ligandenkonzentration von 50 µg/ml und einem Fluß von 5 µl/min bis zu ca. 500 gemessenen RUs auf dem Sensorchip. Die Deaktivierung des Sensorchips erfolgte durch Zugabe von 1 M Ethanolaminhydrochlorid, pH 8,5. Es wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen diente ASA als Analyt und GNPTAG als Ligand, zum anderen wurde GNPTAG als Analyt und ASA als Ligand verwendet. Die Analyten, im vorliegenden Fall rekombinante humane ASA oder GNPTAG, wurden in HBS-P-Puffer (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% Polysorbate 20 (v/v), entgast, filtriert) gelöst. Die Messungen erfolgten mit einer Flußrate von 10 µl/min und einem Einspritzvolumen von 75µl. ASA oder GNPTAG wurden in folgenden Konzentrationen gemessen: 50, 70, 90, 125, 200, 250, 350, 500, 800, 1000 nM. Der Sensorchip wurde nach jeder Messung 3 x 1 min mit Triton X-100, 0,1%ig regeneriert. Die Berechnung der Assoziations- ( $k_a$ ), Dissoziations- ( $k_d$ ) und Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) erfolgte mit der BIAEvaluation® Software.

## **4 ERGEBNISSE**

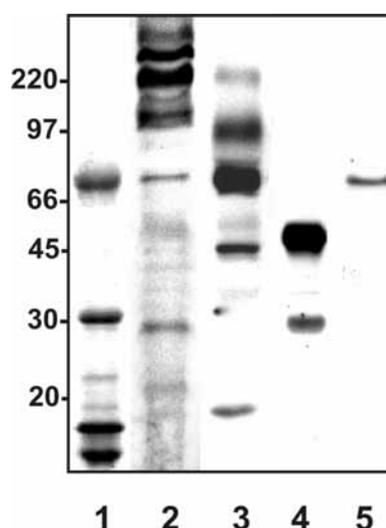
### **4.1 Analyse der Prozessierung und des Transportes von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen sowie der Expression der GlcNAc-Phosphotransferase in humanen Makrophagen**

Es wurde gezeigt, daß die von kultivierten humanen Makrophagen und murinen Mikroglia-Zellen (BV-2) sezernierten lysosomalen Enzyme CtsD und ASA keine oder nur wenige M6P-Reste trugen, was sich in einer ineffizienten MPR-Rezeptor-abhängigen Aufnahme in Akzeptor-Zellen auswirkte (Muschol et al., 2002). Diese Daten führten zu der Annahme, daß möglicherweise die Funktion der GlcNAc-Phosphotransferase in diesen Zellen gestört ist und lysosomale Enzyme in Makrophagen auch intrazellulär M6P-unabhängig transportiert werden.

#### **4.1.1 Gesamtbetrag M6P-haltiger Proteine aus Makrophagen-Sekreten**

An kultivierten humanen Makrophagen wurde bisher nur der Gehalt an M6P-Resten der neu synthetisierten lysosomalen Enzymen ASA und CtsD analysiert (Muschol et al., 2002). Um die Gesamtzahl an sezernierten M6P-haltigen Proteinen aus Makrophagen zu untersuchen, wurde für 24 h konditioniertes Makrophagen-Medium und zum Vergleich 24 h konditioniertes Medium von HeLa-Zellen mit Concanavalin A (ConA)-Sephrose inkubiert. Gebundene Glykoproteine wurden eluiert, geblottet und analysiert. Coomassie-blue-Färbung der ConA-gebundenen Proteine zeigt vier prominente Banden von ungefähr 66, 30, 19 und 15 kDa (Abb. 6, Spur 1). Durch tryptische Fingerprint Analyse konnten nur die 30 und 19 kDa Polypeptide als schwere und leichte Ketten des ConA identifiziert werden. Wenn die ConA-gebundenen Glycoproteine aus Makrophagen und HeLa-Zellen auf die Anwesenheit von M6P-haltigen Proteinen mittels der Overlay-Technik mit dem biotinylierten, löslichen 300 kDa Mannose 6-Phosphat-Rezeptor (bs-MPR) untersucht wurden, konnten im Medium von Makrophagen Polypeptide von ungefähr 97, 66, 55, 53,

38, 34, 28 und 17 kDa detektiert werden (Abb. 6, Spur 3). Die Analyse von ConA-gebundenen Proteine aus HeLa-Zell-Medium zeigte, ungleich mehr detektierbare M6P-haltige Glykoproteine, besonders im höher molekularen Bereich  $\geq 97$  kDa (Abb. 6, Spur 2). Bei der prominenten ConA-gebundenen 53 kDa Bande aus Makrophagen-Medium handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um den CtsD-Precursor, was durch Western blot Analyse bestätigt wurde (Abb. 6, Spur 4), wobei die 31 kDa reife CtsD-Form keine M6P-Reste trug (Abb. 6, Spur 4). Die anderen M6P-haltigen Proteine konnte bis jetzt nicht identifiziert werden. Weitere Western blot Analysen mit Antikörpern gegen verschiedene lysosomale Enzyme zeigten, daß die Glykoprotein-Fraktion aus Medien von Makrophagen auch die 78 kDa  $\beta$ -Glucuronidase enthielt (Abb. 6, Spur 5), nicht aber immunoreaktive ASA oder  $\beta$ -Galaktosidase (nicht gezeigt).

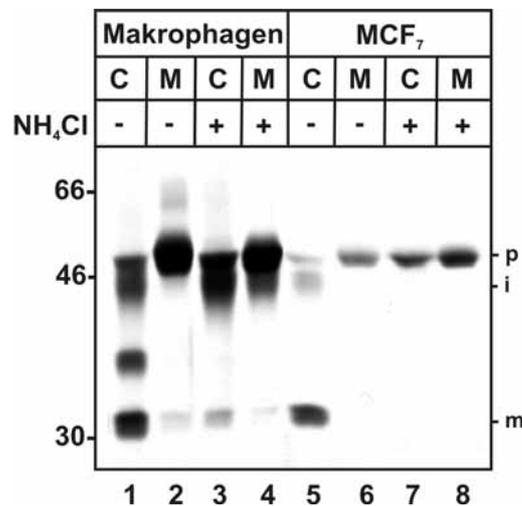


**Abb. 6: Identifizierung von sezernierten, glykosylierten Proteinen aus kultivierten Makrophagen und HeLa-Zellen.** 2 ml von einem für 24 h konditionierten Medium aus Makrophagen und HeLa-Zellen wurden für 3 h mit ConA-Sepharose inkubiert. Aliquots von eluierten Glycoproteinen wurden auf ein 10% SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen geladen. Spur 1 zeigt die aus Makrophagen-Medium eluierten, Coomassie-blue gefärbten Glykoproteine. Spur 2 und 3, bsMPR-Overlay von ConA-gebundenen Proteinen aus HeLa-Zellen (Spur 2) oder Makrophagen (Spur 3). Spur 4 und 5, CtsD-Western blot (Spur 4) und  $\beta$ -Glucuronidase-Western blot (Spur 5) von ConA-gebundenen Proteinen.

#### 4.1.2 M6P-unabhängiger lysosomaler Transport von CtsD in Makrophagen

Um zu zeigen, ob der intrazelluläre Transport von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen in Makrophagen M6P-unabhängig ist, wurde der Effekt der schwachen Base  $\text{NH}_4\text{Cl}$  getestet. Das lysosomotrophe Amin erhöht den pH-Wert in sauren intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen und Lysosomen und hemmt damit die pH-abhängige

Dissoziation des Komplexes aus MPR und lysosomalen Enzym (Ohkuma et al., 1978). Dies resultiert in einer schnellen Erschöpfung von unbesetzten MPR im Golgi und somit zu einer Hypersekretion von neusynthetisierten lysosomalen Enzymen ins Medium (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Braulke et al., 1987). Makrophagen und zum Vergleich MCF<sub>7</sub>-Zellen wurden für 16 h mit [<sup>35</sup>S]-Methionin in An- und Abwesenheit von 10 mM NH<sub>4</sub>Cl metabolisch markiert, gefolgt von einer Immunpräzipitation von CtsD. Aus den MCF<sub>7</sub>-Extrakten konnten alle drei Formen des CtsD (Precursor, Intermediat und reife Form) immunpräzipitiert werden (Abb. 7, Spur 5). Die 53 kDa Precursor-Form bindet an die MPRs im TGN und wird zum prälysosomalen/endosomalen Kompartiment transportiert, wo sie zur 47 kDa intermediären Form des CtsD's prozessiert wird. Die intermediäre Form gelangt zum Lysosom und wird dort zu den reifen 31 und 14 kDa Formen prozessiert (Hasilik und Neufeld, 1980b).



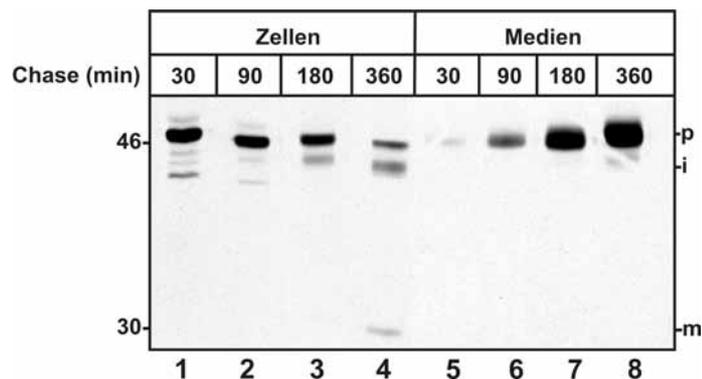
**Abb. 7: Effekt von NH<sub>4</sub>Cl auf den intrazellulären Transport, die Prozessierung und Sortierung von neusynthetisiertem CtsD in humanen Makrophagen und MCF<sub>7</sub>-Zellen.** Makrophagen und MCF<sub>7</sub>-Zellen wurden für 20 h mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (150 µCi/ml) in An- (+) und Abwesenheit (-) von 10 mM NH<sub>4</sub>Cl markiert. CtsD wurde immunpräzipitiert von Zell-Extrakten (C) und Medien (M). Die Proben wurden mittels 10% SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Position des Protein-Standards, der Precursor (p), der intermediären (i) und der reifen (m) Form des CtsD sind eingezeichnet.

Etwa 39 % der CtsD Vorläufer-Form werden ins Medium sezerniert (Abb. 7, Spur 6). Werden die Zellen 10 mM NH<sub>4</sub>Cl ausgesetzt, steigt die Menge des fehlsortierten CtsD auf 73 % (Abb. 7, Spur 8). Der intrazelluläre Transport und die Prozessierung waren unterbrochen, wie die Abwesenheit von intermediärer und reifer Form des CtsD's in den Zell-Extrakten zeigt (Abb. 7, Spur 7). In Zellextrakten von Makrophagen konnten vier Formen des CtsD detektiert werden. Zusätzlich zu den 53, 47 und 31 kDa Formen konnte eine zweite 35 bzw. 36 kDa intermediäre Form präzipitiert werden (Abb. 7, Spur 1), welche nach längerer Chase-Periode verschwanden (nicht gezeigt). Etwa 46 % des neusynthetisierten CtsD wurde als hoch glykosylierte Vorläufer (Precursor)-Form, was

sich durch eine leichte Reduktion der elektrophoretischen Mobilität erkennen ließ, aus dem Medium immunpräzipitiert (Abb. 7, Spur 2). In Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  waren die Mengen an reifer und der 35/36 kDa intermediären Form in Makrophagen stark reduziert (Abb. 7, Spur 3), obwohl weder die Prozessierung zu der 47 kDa intermediären Form oder der Prozentsatz des sezernierten CtsD verändert waren (Abb. 7, Spur 4). Diese Daten deuten an, daß in primär kultivierten Makrophagen die Sortierung in den Golgi und der Transport von neusynthetisierten CtsD zum endosomalen/prälysosomalen Kompartiment MPR-unabhängig ist. Zusätzlich wurde die proteolytische Reifung durch saure Proteasen (Gieselmann et al., 1985) mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inhibiert.

### 4.1.3 M6P-unabhängige Assoziation von zellulären Cathepsin D-Formen mit Membranen

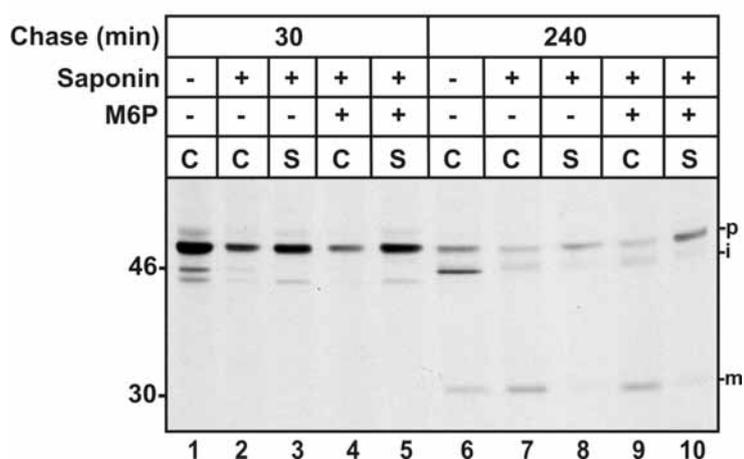
Als zweiter experimenteller Ansatz zum Nachweis des MPR-unabhängigen Transportes von CtsD in Makrophagen wurde die Saponin-Permeabilisierung metabolisch markierter Zellen gewählt. Der Zusatz von M6P zu permeabilisierten Zellen bedingt bei MPR-abhängigen Transport ein Übertreten von CtsD aus einer Membran-assoziierten Form in den löslichen Überstand. Zuvor wurde die Kinetik des Transportes und der Prozessierung von CtsD in Makrophagen detailliert untersucht. Dazu wurden Zellen für 30 min mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin markiert und dann einem Chase von 30, 90, 180 und 360 min unterworfen.



**Abb. 8: Zeitabhängige intrazelluläre Sortierung und Sezernierung von neusynthetisiertem CtsD in humanen Makrophagen.** Makrophagen wurden für 20 Tage kultiviert und anschließend für 30 min mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin (150  $\mu\text{Ci/ml}$ ) markiert gefolgt von verschiedenen Chase-Perioden mit den gezeigten Zeiten. CtsD wurde immunpräzipitiert aus Zell-Extrakten und Medien. Die Proben wurden analysiert mittels 10 % SDS-PAGE und Fluorographie. Die Position des Protein-Standards sowie die Precursor (p), intermediäre (i) und reife Form (m) des CtsD sind angezeigt.

Abbildung 8 zeigt, daß eine Stunde ( 30 min Pulse und 30 min Chase) nach Synthese, die Precursor-Form des CtsD aus dem Kultur-Medium immunpräzipitiert werden konnte. Diese Menge stieg kontinuierlich in einer bis zu sechs Stunden andauernden Chase-Periode. Die erste intrazelluläre, prozessierte, intermediäre Form des CtsD erschien nach dreistündiger Chase-Zeit. Sechs Stunden nach der Synthese wurden ca. 81 % des intrazellulären CtsD als Precursor (35 %), intermediäre (37 %) und reifer Form (9 %) immunpräzipitiert.

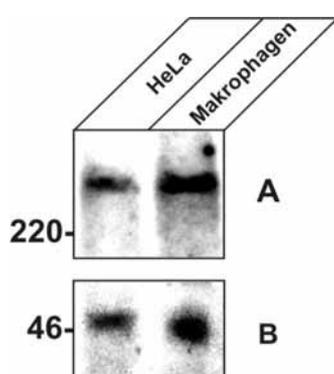
Nach selektiver Permeabilisierung mit Saponin ist aus Zellextrakten von Makrophagen, die für 30 min [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert und für 30 min einer Chase-Periode unterzogen wurden 30 % der CtsD-Precursor-Form membran-assoziiert (Abb. 9, Spur 2) und 70 % sind löslich (Abb. 9, Spur 3). In Anwesenheit von 10 mM M6P erhöht sich der Anteil von CtsD in Überstand auf 80 % (Abb. 9, Spur 5). D.h., daß eine Stunde nach Synthese sind ca. 60 % des neusynthetisierten CtsD über MPRs an Membranen assoziiert. Ca. 20 % des Precursors sind zu diesem Zeitpunkt an Membranen in M6P-unabhängiger Form assoziiert (Abb. 9, Spur 4). Nach 240 min Chase-Periode sind auch die 47 kDa intermediäre und die 31 kDa reife Form des CtsD membran-assoziiert (Abb. 9, Spur 7). Ca. 65 % des neusynthetisierten CtsD-Precursors konnten nach Saponin-Permeabilisierung in einer M6P-unabhängigen Weise von Membranen freigesetzt werden (Abb. 9, Spur 8). 35 % bleiben Membran-assoziiert. Unter 10 mM M6P und Saponin-Permeabilisierung steigt dieser Wert auf 85 %, d.h. nach 240 min sind ca. 60 % des CtsD-Precursors M6P-abhängig Membran-assoziiert (Abb. 9, Spur 10).



**Abb. 9: M6P-unabhängige Assoziierung von verschiedenen CtsD-Formen an humane Makrophagen-Membranen.** 20 Tage kultivierte Makrophagen wurden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (150 µCi/ml) für 30 min markiert und folgenden Chase-Perioden von 30 und 240 min ausgesetzt. Die Zellen wurden dann auf 4 °C abgekühlt und entweder geerntet (Spur 1 und 6) oder für 30 min permeabilisiert mit Saponin (2 mg/ml) in An-(+) (Spur 4 und 9) und Abwesenheit (-) (Spur 2 und 7) von 10 mM M6P. CtsD wurde immunpräzipitiert aus Zell-Extrakten (C) und PBS-Saponin-Überständen (S). Die Proben wurden analysiert mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Fluorographie. Die Positionen des Protein-Standards sowie die Precursor (p), intermediäre (i) und reife Form (m) des CtsD sind angezeigt.

#### 4.1.4 Expression von M6P-Rezeptoren in humanen Makrophagen und HeLa-Zellen

Um zu zeigen, daß trotz des M6P-unabhängigen Transportes lysosomaler Enzyme in Makrophagen beide M6P-Rezeptoren (300 kDa MPR und 46 kDa MPR) exprimiert werden, sind Zellextrakte von Makrophagen und HeLa-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet worden. Die Blot-Membran wurde anschließend mit [<sup>125</sup>I]-markierten spezifische Antikörper gegen MPR300 ([<sup>125</sup>I]-2C2) bzw. MPR46 ([<sup>125</sup>I]-21D3) inkubiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte aus HeLa-Zellen (Abb. 10 A und B).



**Abb. 10 A und B: Expression von MPR300 und MPR46 in humanen Makrophagen im Vergleich zu HeLa-Zellen.** Extrakte aus Makrophagen und HeLa-Zellen (je 50 µg) wurden mittels SDS-PAGE und Western blot analysiert. **A)** MPR300 wurde mittels [<sup>125</sup>I]-markierten 2C2-Antikörpers (300.000 c.p.m./ml) sowie **B)** MPR46 mittels [<sup>125</sup>I]-markierten 21D3-Antikörpers (300.000 c.p.m./ml) und Autoradiographie visualisiert.

Beide M6P-Rezeptoren, der MPR300 und der MPR46 werden bei Auftrag gleicher Proteinmengen in kultivierten Makrophagen in ähnlicher Expressionsrate wie in HeLa-Zellen exprimiert (Abb 10 A und B).

#### 4.1.5 Expression der GlcNAc-Phosphotransferase $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) in humanen Makrophagen

Die Bindung von lysosomalen Enzymen an die  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) der GlcNAc-Phosphotransferase soll eine Voraussetzung für den Transfer von Phosphat des GlcNAc-Phosphatrestes auf mannose-reiche Oligosaccharide durch die GlcNAc-Phosphotransferase sein. Um herauszufinden, ob die Unterdrückung der M6P-Rest-Generierung in Makrophagen auf eine reduzierte oder fehlende Expression der GlcNAc-Phosphotransferase zurück zu führen ist, wurde die GNPTAG-Expression auf mRNA- und Proteinebene (Nukleotid- und Aminosäuresequenz der GNPTAG, siehe Anhang 9.2) untersucht. Das *GNPTAG*-Gen kodiert für ein 305 Aminosäure großes Polypeptid. Nach der Abtrennung

eines 24 Aminosäure großen Signalpeptids formt das reife Protein einen über Disulfid-Brücken verbundenes Homodimer (Raas-Rothschild et al., 2004).

Quantitative PCR mit Primern, die ca. 400 bp der *GNPTAG*-cDNA amplifizieren (siehe Anhang 9.1 c), zeigte das GNPTAG in Makrophagen exprimiert wird und in Abhängigkeit von der Zeit der Kultivierung der Zellen zunimmt. Im Vergleich zu Makrophagen, die einen Tag in Kultur sind, nahm die *GNPTAG*-mRNA-Konzentration nach vier Wochen Kultivierungsdauer um das 3-fache zu (Tabelle 1). In Kontroll- und ML III-Fibroblasten sowie in HeLa-Zellen ist der *GNPTAG* mRNA-Gehalt ca. 2-2,5-fach höher als in 2-4 Wochen kultivierten Makrophagen. Der *GNPTAG* mRNA-Gehalt in MCF<sub>7</sub>-Zellen, die ihre lysosomalen Enzyme mit M6P-Resten ausstatten (Capony et al., 1987) betrug ca. die Hälfte des Gehalts an *GNPTAG* mRNA in Makrophagen.

**Tabelle 1. *GNPTAG* mRNA-Gehalt in humanen Makrophagen im Vergleich mit Fibroblasten, HeLa- und MCF<sub>7</sub>-Zellen.**

Zellen	Tage in Kultur	<i>GNPTAG</i> <sup>a, b</sup>	
Makrophagen	1	1.5 ± 0.2	
	7	1.6 ± 0.1	
	14	3.6 ± 0.1	
	21	4.8 ± 0.2	
	28	5.1 ± 0.1	
Fibroblasten			
	Kontrolle	14	10.0 ± 0.1
	ML III <sup>c</sup>	15	10.1 ± 0.2
HeLa	7	8.8 ± 0.1	
MCF <sub>7</sub>	7	2.4 ± 0.1	

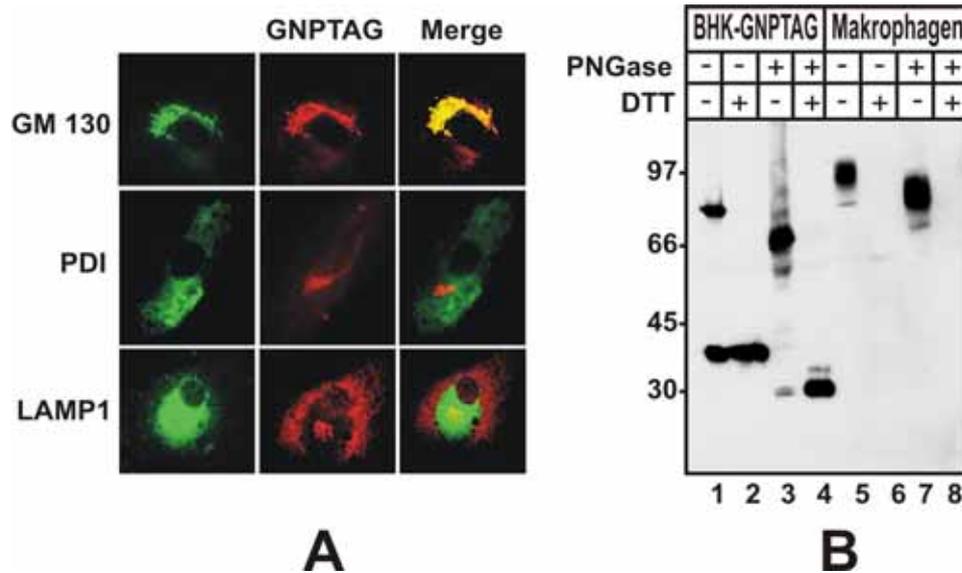
a = fg *GNPTAG* mRNA / pg *β-Actin* mRNA ± SD

b = Mittelwert von 4 unabhängige Experimenten mit 2-3 verschiedene RNA-Präparationen

c = Mittelwert der Bestimmung von mRNA aus Haut-Fibroblasten von 4 verschiedenen ML III Patienten (Pat. 4-7; in dieser Arbeit nicht näher beschrieben)

Um das GNPTAG-Protein zu untersuchen, wurde ein GNPTAG-Antikörper durch Immunisierung mit einem GST-GNPTAG-Fusionsprotein generiert. Das Antigen wurde über eine GST-GNPTAG-Affinitätschromatographie aufgereinigt und getestet. Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte, daß die Anwesenheit von GNPTAG in Makrophagen in völliger Kolokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 war (Abb. 11 A). Es wurde keine Kolokalisation mit dem ER-Markerprotein PDI oder mit den lysosomalen Markerprotein LAMP-1 gefunden (Abb. 11 A). GNPTAG-Western blot Analysen von Zellextrakten aus Makrophagen zeigten ein stark immunoreaktives

Polypeptid von ca. 97 kDa Größe, was wahrscheinlich dem GNPTAG-Dimer entspricht (Abb. 11 B, Spur 5) (Raas-Rothschild et al., 2004). Diese GNPTAG-immunopositive Bande war PNGaseF sensitiv und weist danach eine apparente molekulare Masse von ca. 80 kDa auf (Abb. 11 B, Spur 7). Unter reduzierenden Bedingungen war keine monomere GNPTAG-Form in Makrophagen vor und nach PNGaseF-Behandlung detektierbar (Abb. 11 B, Spur 6 und 8). Zum Vergleich wurde die *GNPTAG* cDNA in BHK-Zellen exprimiert und mittels Western blot analysiert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde eine 78 kDa dimere und 38 kDa monomere Form der GNPTAG im BHK-Zell-Extrakten beobachtet (Abb. 11 B, Spur 1), welche komplett in die monomere Form unter reduzierenden Bedingungen umgewandelt werden konnte (Abb. 11 B, Spur 2). Behandlung der BHK-Extrakte mit PNGaseF resultierten in einer 66 kDa dimeren und 33 kDa monomeren nicht-glykosylierten GNPTAG immunreaktiven Bande (Abb 11 B, Spur 3 und 4), die mit der vorhergesagten, abgeleiteten molekularen Massen der GNPTAG einher gehen (Raas-Rothschild et al., 2004).



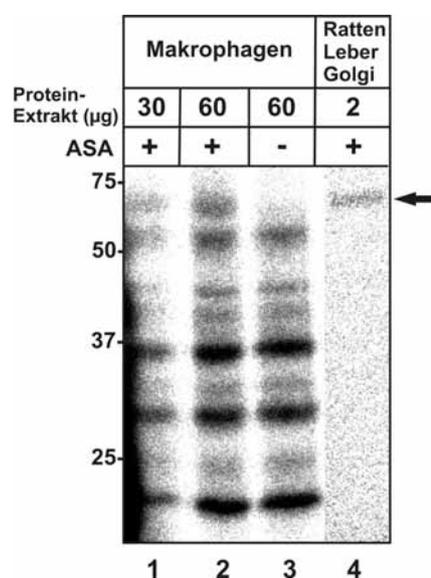
**Abb. 11 A und B: Expressions-Analyse von GNPTAG in humanen Makrophagen und GNPTAG-überexprimierenden BHK-Zellen.** **A)** GNPTAG (rot) zeigt in 21 Tage kultivierten Makrophagen Kolokalisation (gelb) mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 (grün) aber keine Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI (grün) noch mit dem lysosomalen Marker LAMP-1 (grün). **B)** Lysate von Makrophagen (Spur 5-8) und von GNPTAG-überexprimierenden BHK-Zellen (Spur 1-4) wurden nicht (-) oder (+) PNGaseF behandelt und unter nicht (-DTT) oder reduzierenden (+DTT) Bedingungen mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) und anschließendem Western blot analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sind angezeigt.

Die verschiedenen molekularen Massen der glykosylierten und nicht-glykosylierten dimeren Form der GNPTAG in humanen Makrophagen und BHK-Zellen lassen vermuten, daß Makrophagen zusätzliche postrtranslationale Modifikationen an der GNPTAG durchführen. Wenn GNPTAG in BHK-Zellen überexprimiert wird, kann GNPTAG auch

im Medium detektiert werden, was vermuten läßt, daß der Gehalt an endogenen  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase der limitierende Faktor für die intrazelluläre Retention der GNPTAG darstellt.

#### 4.1.6 GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität in Makrophagen

Angereicherte Membran-Fractionen aus 14 Tage kultivierten humanen Makrophagen wurden auf GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität *in vitro* untersucht. Dazu dienten [ $^{32}$ P]-UDP-GlcNAc als Donorsubstrat und rekombinante humane Arylsulfatase A (ASA), aus überexprimierenden Maus-L-Zellen, als Akzeptor. Als Kontrolle wurden aus Rattenleber gereinigte Golgimembranen benutzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (30 min) wurden die Reaktionsansätze solubilisiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Wie in Abb. 12 gezeigt, besitzen die aus Makrophagen isolierten Membranen GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität, was sich in der Phosphorylierung mehrerer prominenter, endogener Proteine (52, 36, 28 und 20 kDa) zeigen läßt (Abb. 12, Spur 3). Zusatz von 20  $\mu$ g rekombinanter ASA resultierte im Erscheinen eines zusätzlichen [ $^{32}$ P]-markierten Polypeptids von 69 kDa (Abb. 12, Spur 1 und 2). Dieses ca. 69 kDa [ $^{32}$ P]-markierte Polypeptid ist in der Abwesenheit von rekombinanter ASA nicht nachweisbar (Abb. 12, Spur 3).

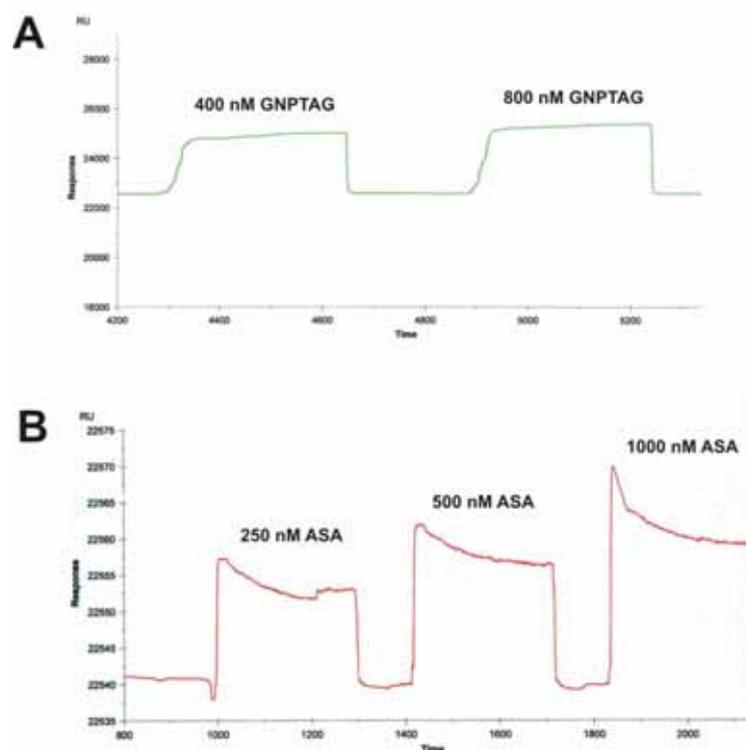


**Abb. 12: GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität in humanen Makrophagen.** Membran-Fractionen aus 14 Tage kultivierten Makrophagen wurden auf GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität mittels [ $^{32}$ P]-UDP-GlcNAc und rekombinanter ASA (aus überexprimierenden Maus-L-Zellen) als Donor- und Akzeptorsubstrat *in vitro* untersucht. Als Kontrolle dienten mittels Sucrose-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt Golgimembranen aus Rattenleber. Phosphorylierte Proteine wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie visualisiert. Die Positionen des Protein-Standards sowie die mit ASA korrespondierende Bande sind angezeigt.

Diese Daten zeigen, daß Makrophagen in der Lage sind exogene, rekombinante ASA mit [<sup>32</sup>P]-UDP-GlcNAc als Donorsubstrat zu phosphorylieren.

#### 4.1.7 Bindungsstudien der GNPTAG mit der lysosomalen Hydrolase Arylsulfatase A

Da vermutet wird, daß die  $\gamma$ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase für die Erkennung lysinhaltiger Oberflächensignale auf lysosomalen Enzymen verantwortlich ist, was eine Voraussetzung für eine effektive Ausstattung von M6P-Resten ist (Cuozzo et al., 1995; Raas-Rothschild et al., 2000), wurden Protein-Protein-Interaktionen zwischen rekombinanter GNPTAG und Arylsulfatase A (ASA) mittels der Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR) untersucht. Zum einen wurde GNPTAG aufgereinigt aus überexprimierenden Sf9-Insektenzellen auf der Sensorchip-Oberfläche immobilisiert und rekombinante ASA (zur Verfügung gestellt von Gieselmann, Universität Bonn) als Ligand verwendet. Zum anderen wurde ASA immobilisiert und GNPTAG als Analyt verwendet.



**Abb. 13: BIAcore Bindungsanalysen von GNPTAG an die lysosomale Hydrolase Arylsulfatase A (ASA).** A) zeigt die Bindung von ASA an den Sensorchip und GNPTAG in einer Konzentration von 400 und 800 nM als Analyt. B) zeigt GNPTAG gebunden an den Sensorchip und ASA (250, 500 und 1000 nM) als eingesetzten Analyten.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, wird bereits nach Beendigung der Analyt-Injektion und bei Pufferwechsel der entsprechende Analyt (GNPATG oder ASA) komplett abgelöst.

Diese Kurvenverläufe sind im Hinblick auf  $k_A$ ,  $k_D$  und  $K_D$  mathematisch nicht berechenbar gewesen. Beide Varianten ergaben auch bei verschiedenen Konzentrationen keine nachweisbare Bindung zwischen der GNPTAG und der ASA (Abb. 13).

## **4.2 Analysen des Transports/Sortierung lysosomaler Enzyme und Expressionsanalysen der GlcNAc-Phosphotransferase bei ML III Patienten**

Bei Patienten, die an Mukopolidose II (ML II) oder Mukopolidose III (ML III) leiden, ist der korrekte Transport von lysosomalen Enzymen zu den Lysosomen durch Defekte in der GlcNAc-Phosphotransferase gestört, was zur massiven Sezernierung und einer intrazellulären Defizienz von lysosomalen Hydrolasen führt (Kornfeld und Sly, 2001). Die bovine GlcNAc-Phosphotransferase ist aus drei dimeren Untereinheiten aufgebaut ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) (Bao et al., 1996a), die durch zwei separate Gene kodiert werden (Kornfeld und Sly, 2001). Das erste Gen (*GNPTA*, MIM# 607840) soll die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit kodieren. Die individuellen Untereinheiten ( $\alpha/\beta$ ) sollen durch proteolytische Prozessierung gebildet werden. Dieses Gen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) wird von einem separaten Gen kodiert (*GNPTAG*, MIM# 607838) (Kornfeld und Sly, 2001). Mutationen in der  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) der GlcNAc-Phosphotransferase sollen zum Krankheitsbild der ML III führen (Raas-Rothschild et al., 2000; Falik-Zaccai et al., 2003; Raas-Rothschild et al., 2004).

### **4.2.1 Untersuchungen der Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme bei zwei Geschwistern (Patient 1 und 2) mit ML III**

ML III (Pseudo-Hurler-Polydystrophie) wurde bei einem Geschwisterpaar (Patient 1: 12 Jahre alter Junge und Patient 2: 11 Jahre altes Mädchen) durch erhöhte Werte von lysosomalen Enzymen im Serum (Patient 1: Arylsulfatase A (ASA), 42-fach;  $\alpha$ -Fukosidase, 6-fach;  $\alpha$ -Mannosidase, 27-fach;  $\beta$ -Glucuronidase, 15-fach im Vergleich zu Kontroll-Zellen) sowie durch ML III typische Skelettdysplasien diagnostiziert. Untersuchungen der Aktivitäten verschiedener lysosomaler Enzyme in kultivierten Haut-Fibroblasten der Geschwister (da die Zellen von Pat. 2 schlecht wuchsen, wurden folgende

Experimente z.T. nur mit Fibroblasten von Pat. 1 durchgeführt) zeigten eine Reduzierung von 19–46 % im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten, obwohl dies weniger stark ausgeprägt war als bei anderen, beschriebenen ML III Patienten (Tabelle 2, (Kelly et al., 1975; Ward et al., 1993). Die Aktivitäten der lysosomalen Enzyme, mit Ausnahme von ASA, im Medium der Patienten-Zellen war ca. 2-fach erhöht im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

Tabelle 2: Aktivitäten lysosomaler Enzyme<sup>a</sup> in kultivierten Haut-Fibroblasten und Medien von ML III Patienten.

		Patient 1	% Kontrolle	(Kelly et al., 1975) n=12 % Kontrolle	(Ward et al., 1993) n=4 % Kontrolle
Zellen <sup>b</sup>	β-Hexosaminidase	17,5±0,1	46	20-31	15-18
	Arylsulfatase A	2,5±0,09	19	8-24	4-10
	β-Glukuronidase	0,005±0,001	25	k.D. <sup>c</sup>	k.D.
	β-Galaktosidase	0,030±0,002	33	6-50	22-34
Medien <sup>d</sup>	β-Hexosaminidase	34,2±0,2	251	k.D.	~200
	Arylsulfatase A	5±0,2	50	k.D.	k.D.
	β-Glukuronidase	0.02±0,007	270	k.D.	k.D.
	β-Galaktosidase	0,05±0,006	166	k.D.	k.D.

<sup>a</sup>= Mittelwert ± SD von unabhängigen Bestimmungen (n=5) von Zellen aus verschiedenen Passagen. Dreifach-Messungen von je zwei Kulturplatten pro Experiment.

<sup>b</sup>= mU/mg Zellprotein ± SD

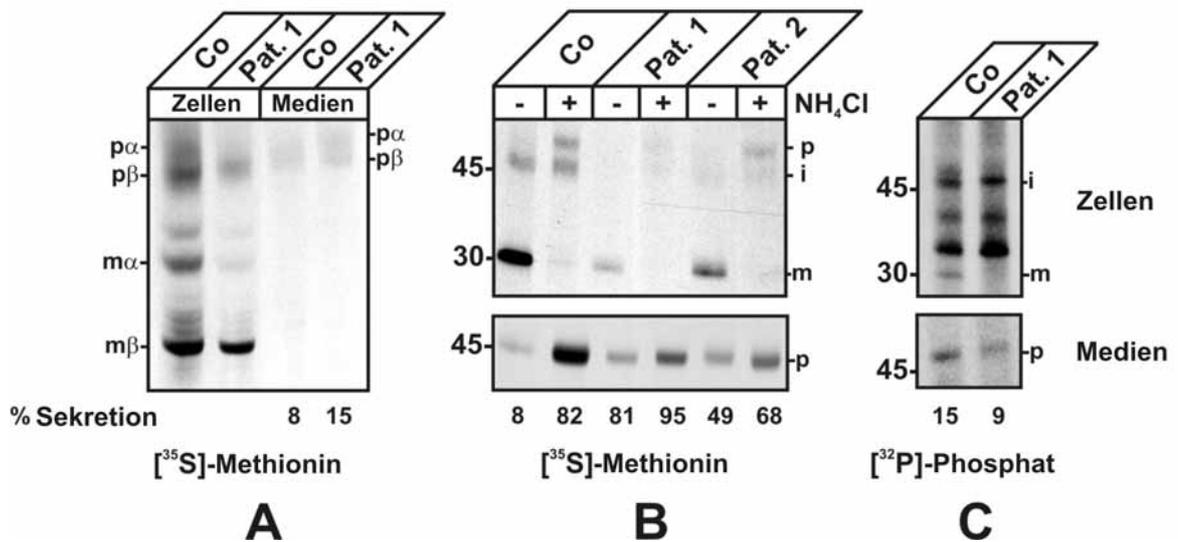
<sup>c</sup>= k.D., keine verfügbaren Daten

<sup>d</sup>= 24 h-Medien wurden von je zwei Kulturplatten von Zellen aus 5 verschiedenen Passagen gesammelt gefolgt von einer Dreifach-Messung der Enzymaktivitäten; mU/24 h/mg Protein ± SD

\*= aus Tiede et al., 2004

Um die absoluten Mengen der fehlsortierten lysosomalen Enzyme zu untersuchen, wurden die Patienten-Fibroblasten für 1 h mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert und einer sechsstündigen Chase-Periode unterzogen, gefolgt von einer Immunpräzipitation von β-Hexosaminidase und Cathepsin D (CtsD) aus Zellen und Medien. Der Hauptanteil in Kontrollzellen der beiden untersuchten lysosomalen Hydrolasen ist nach der Chase-Periode in die Lysosomen transportiert und proteolytisch prozessiert worden zu der 54 kDa reifen α und 29 kDa reifen β Form der β-Hexosaminidase sowie der 31 kDa reifen Form von CtsD (Abb. 14 A und B) (Hasilik und Neufeld, 1980).

Densitometrische Evaluation der Fluorogramme zeigt, daß ca. 8 % der neusynthetisierten β-Hexosaminidase und des CtsD aus dem Medium als Precursor-Formen immunpräzipitiert wurden. Reife β-Hexosaminidase- und CtsD-Formen wurden aus den Zellextrakten von Patient 1 und 2 immunpräzipitiert, obwohl die Menge der immunpräzipitierbaren β-Hexosaminidase-Precursor-Form aus den Medien der Patienten-Fibroblasten doppelt so hoch war (Abb. 14 A).



**Abb. 14 A-C: Sortierung von neusynthetisierter  $\beta$ -Hexosaminidase und Cathepsin D in ML III Fibroblasten.** Fibroblasten von Kontrollzellen (Co) und von den ML III Patienten 1 und 2 wurden 1 h mit [ $^{35}$ S]-Methionin (150  $\mu$ Ci/ml) markiert und einer Chase-Periode in An-(+) und Abwesenheit(-) von 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  für 6 h ausgesetzt.  $\beta$ -Hexosaminidase (A) und Cathepsin D (B) wurden aus Zell-Extrakten und Medien immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) und Flouorographie analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sowie der Precursor (p), intermediären (i) und reifen Form (m) der  $\beta$ -Hexosaminidase  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und des Cathepsin D sind angezeigt. (C) Kontroll-Fibroblasten (Co) und ML III Fibroblasten von Patient 1 wurden für 6 h mit [ $^{32}$ P]-ortho-Phosphat markiert, gefolgt von einer Immunpräzipitation von Cathepsin D aus Zell-Extrakten und Medien (aus Tiede et al., 2004).

Der Anteil der Precursor-Form des CtsD im Medium lag um 81 % bzw. 49 % erhöhter als in den Kontrollzellen (Abb. 14 B). Wurden die Kontrollzellen während der Chase-Zeit der schwachen Base  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) ausgesetzt, sezernierten sie ca. 82 % des neusynthetisierten CtsD als Precursor-Form. Die proteolytische Prozessierung zur reifen CtsD-Form wurde unterdrückt (Abb. 14 B). Wurden die Patientenzellen 1 und 2 in gleicher Art mit 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  behandelt, stieg die Sekretionsrate um 95 % bzw. 68 % an (Abb. 14 B). Diese Daten zeigen, daß in Kontroll-Fibroblasten der Hauptanteil des neusynthetisierten CtsD M6P-abhängig zum Lysosom transportiert wird, obwohl die Fibroblasten der Patienten nur 15–20 % neusynthetisiertes mit M6P-Resten ausgestattetes CtsD enthalten, welches an die M6P-Rezeptoren binden könnte. Dies wurde mit der metabolischen Markierung (6 h) mittels [ $^{32}$ P]-Phosphat und anschließender Immunpräzipitation von CtsD bestätigt. [ $^{32}$ P]-Einbau wurde in den Kontroll-Zellen und Patient 1-Zellen hauptsächlich in der 47 kDa intermediären und 33 kDa reifen Form beobachtet (Abb. 14 C). Auch [ $^{32}$ P]-phosphorylierter CtsD-Precursor konnte aus dem Medium immunpräzipitiert werden. Die Stöchiometrie der Phosphorylierung und der Gehalt an freien („uncovered“) M6P-Resten an Oligosacchardiketten von CtsD ist nicht bekannt (Isidoro et al., 1998).

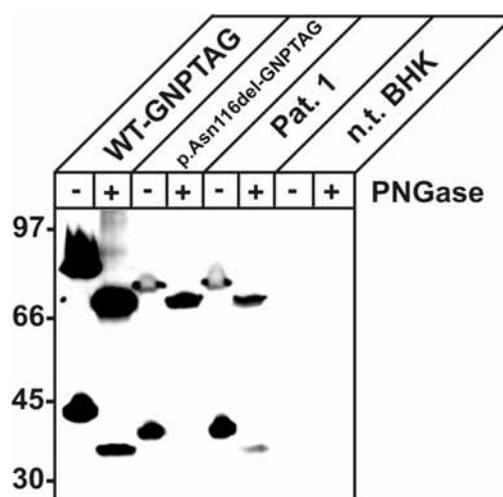
## 4.2.2 Molekulare- und Expressions-Analyse der $\gamma$ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase bei den Patienten 1 und 2

Aufgrund der Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme bei den Geschwistern, wie in 4.2.1 beschrieben, wurde die  $\gamma$ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase bei den Patienten 1 und 2 auf DNA- und Proteinebene untersucht.

Die Sequenzierung genomischer DNA aus Patient 1 und 2 zeigte in beiden Patienten eine homozygote 3 bp-Deletion in Exon 6 der  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG), (Nucleotidsequenz, siehe Anhang 9.2). Diese neue Mutation (c.347\_349delACA) führt zum Verlust eines Asparagin-Restes (p.Asn116del), welcher Teil einer potentiellen *N*-Glykosylierungststellen-Konsensus-Sequenz ist (<sup>115</sup>NNT). Die 3 bp Deletion hat keinen Effekt auf die *GNPTAG*-mRNA Menge in den Patienten-Fibroblasten, was mittels quantitativer PCR untersucht wurde (Kontrollzellen, 10 $\pm$ 0,1; Patient 1, 9,0 $\pm$ 0,1; Patient 2, 9,5 $\pm$ 0,1 fg *GNPTAG*-mRNA/pg  *$\beta$ -Actin* mRNA).

Western blot Analysen zeigten bei Kontroll-Fibroblasten ein 97 kDa Protein (Abb. 18), daß das Disulfid verbundene Dimer repräsentiert. Die molekulare Masse der GNPTAG in den Patienten-Fibroblasten (Patient 1, Abb. 15) beträgt ca. 78 kDa. Um die nachgewiesenen proteinchemischen Veränderungen der GNPTAG in Patientenzellen zu verifizieren, wurde die 3 bp Deletion in die cDNA der GNPTAG eingeführt und parallel zur Wildtyp (WT) GNPTAG cDNA in BHK-Zellen exprimiert. Western blot Analyse zeigte, daß in Extrakten aus WT-GNPTAG überexprimierenden BHK-Zellen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen, eine 85 kDa dimere und 35 kDa monomere immunoreaktive Form der GNPTAG detektierbar war (Abb. 15). Nach Deglykosylierung durch PNGaseF veränderte sich die Mobilität des 85 kDa WT-GNPTAG-Dimers, um ca. 15 kDa, auf 70 kDa und die der 40 kDa monomeren Form um 8 kDa auf ca. 32 kDa (Abb. 15). p.Asn116del-GNPTAG überexprimiert in BHK-Zellen, zeigt im Western blot eine Mobilitätsveränderung um ca. 7 kDa im Vergleich mit der WT-GNPTAG. Deglykosylierung der p.Asn116del-GNPTAG resultiert in einer Mobilitätsveränderung um nochmals 7-8 kDa auf ebenfalls 70 kDa, welche auch die WT-GNPTAG nach Deglykosylierung aufwies. D.h. beide potentiellen *N*-Glykosylierungststellen, der in BHK-Zellen überexprimierten WT-GNPTAG, werden glykosyliert, wobei der Verlust einer *N*-gebundene Oligosaccharidkette eine Mobilitätsveränderung von ca. 7-8 kDa verursachte. Auch die immunoreaktive GNPTAG

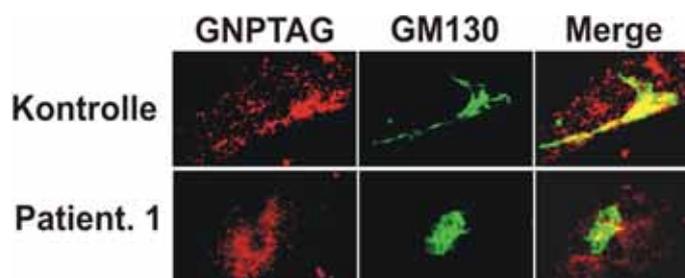
aus Fibroblasten des Pat. 1 zeigte diese Veränderungen. Vor Deglykosylierung hat die GNPTAG aus Pat. 1 eine Größe von 78 kDa, was im Vergleich mit WT-GNPTAG ungefähr der Benutzung einer *N*-Glykosylierungsstelle entspricht. Die Größe von 75 kDa der p.Asn116del-GNPTAG im Gegensatz zu 78 kDa der WT-GNPTAG resultiert durch eine unterschiedliche Glykosylierung in BHK-Zellen und humanen Fibroblasten. Die monomere Form der p.Asn116del-GNPTAG zeigte das gleiche Laufverhalten wie die monomere Form der GNPTAG des Pat. 1. Im Gegensatz zu der monomeren Form der WT-GNPTAG (40 kDa), wiesen beide anderen monomeren Formen der p.Asn116del-GNPTAG und Pat. 1-GNPTAG eine Größe von ca. 35 kDa auf. Nach Deglykosylierung von p.Asn116del-GNPTAG und Pat. 1-GNPTAG zeigen die dimeren Formen jeweils die gleiche Größe von 70 kDa. Nach Deglykosylierung ist bei Pat. 1-GNPTAG auch eine monomere Form detektierbar, die in der Größe der monomeren Form der WT-GNPTAG entspricht (Abb. 15). Zellextrakte von nicht-transfizierten BHK-Zellen zeigten keine GNPTAG immunoreaktivität.



**Abb. 15: Western blot Analyse von überexprimierter Wildtyp (WT)-GNPTAG und mutierter GNPTAG.** WT-GNPTAG- und mutierte GNPTAG (p.Asn116del)-Konstrukte wurden in BHK-Zellen transient transfiziert und für 24 h überexprimiert. Zell-Extrakte (30 µg Protein) aus nicht-transfizierten (n.t.) und transfizierten BHK-Zellen sowie den Fibroblasten von Patient 1, wurden in An(+) und Abwesenheit(-) von PNGaseF 16 h inkubiert und nicht-reduzierend mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, gefolgt von GNPTAG-Western blot Analyse.

Dies zeigt, daß die deglykosylierte wildtyp und mutierte GNPTAG aus BHK-Zellen und ML III-Patienten-Zellen bei Dimer und Monomer ähnliche molare Massen aufweisen und die Mutation (p.Asn116del) tatsächlich nur die Glykosylierung betrifft.

Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, daß das GNPTAG-Protein in Kontroll-Fibroblasten mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 kolokalisiert ist (Abb. 15). In Fibroblasten von Patient 1 und 2 läßt sich keine Kolokalisation zwischen GNPTAG-Protein und dem *cis*-Golgi nachweisen. Die GNPTAG-Immunoreaktivität ist punktuell (Abb. 16).

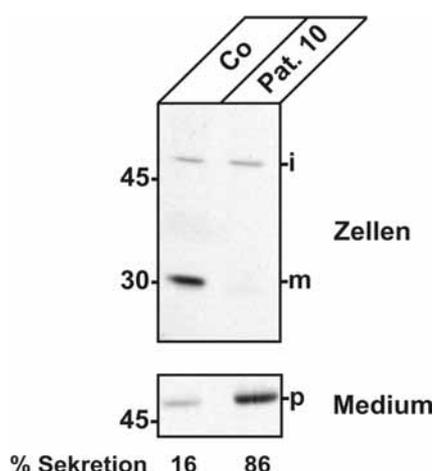


**Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von GNPTAG in ML III Fibroblasten.** Kontroll-Fibroblasten und vom Patient 1 wurden mit anti-GNPTAG (rot) und GM130 (grün) Antikörpern inkubiert und durch Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Gelb zeigt die Kollokalisierung von *cis*-Golgi-Marker GM130 und GNPTAG.

### 4.2.3 Biochemische- und Expressions-Analysen der GNPTAG bei einem ML III Patienten (Patient 10) mit einem milden klinischen Phänotyp

Nachfolgend wurden Fibroblasten eines 14 Jahre alten Jungen (Patient 10), mit einem milden klinischen Phänotyp der ML III aber mit typisch erhöhten Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum, analysiert. Pulse-Chase-Experimente zeigen die Fehlsortierung von neusynthetisiertem CtsD in kultivierten Fibroblasten (Abb. 17).

Der Hauptanteil des neusynthetisiertem CtsD wird in Kontroll-Zellen zum Lysosomen transportiert und dort proteolytisch zur reifen Form (31 kDa) prozessiert (Abb. 17).



**Abb. 17: Sortierung von neusynthetisiertem CtsD in Fibroblasten von ML III Patient 10.** Kontroll- und Pat. 10-Fibroblasten wurden für 1 h mit [ $^{35}$ S]-Methionin (150  $\mu$ Ci/ml) markiert und einer Chase-Periode von 6 h ausgesetzt. CtsD wurde immunpräzipitiert aus Zell-Extrakten und Medium. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt und durch Fluorographie visualisiert. Der Prozentsatz des ins Medium sezernierten CtsD ist angegeben. Die Positionen des Protein-Standards sowie die Precursor (p), intermediäre (m) und reife Form des CtsD sind angezeigt.

Die densitometrische Auswertung des Fluorogramms zeigt, daß 16 % des neu synthetisierten CtsD aus dem Medium als 53 kDa Precursor-Form immunpräzipitiert wurde. In den Zellen von Pat. 10 wurden 86 % des neusynthetisierten CtsD aus dem Medium als Precursor immunpräzipitiert und keine reife Form war intrazellulär nachweisbar. Diese Daten zeigen, daß zumindest CtsD keinen funktionierenden M6P-Rest besitzt und somit nicht fähig ist an einen der beiden MPRs binden, was in einer Fehlsortierung im Golgi resultiert.

Um zu untersuchen, ob die Fehlsortierung der lysosomalen Enzyme in Zellen dieses ML III-Patienten mit Defekten in der GNPTAG einher geht, wurde die genomische DNA sequenziert. Es wurde keine Mutation im kodierenden *GNPTAG*-Genbereich gefunden. Die Quantifizierung des *GNPTAG*-mRNA-Gehalts in den Fibroblasten des Patienten mittels quantitativer PCR zeigt keine Abweichungen im Vergleich mit Kontroll-Zellen oder von anderen ML III-Patienten (Tab. 3).

**Tabelle 3. Expression der *GNPTAG* mRNA in Fibroblasten des ML III Patienten 10.**

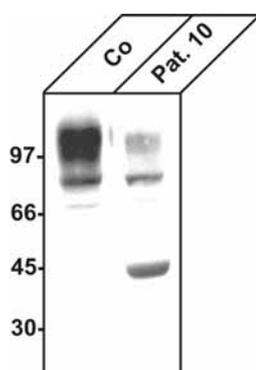
Fibroblasten	Tage in Kultur	<i>GNPTAG</i> <sup>a, b</sup>
Kontrolle	14	10.0 ± 0.1
ML III <sup>c</sup>	15	10.1 ± 0.2
Pat. 10	14	9.7 ± 0.2

a = fg *GNPTAG* mRNA / pg  $\beta$ -Aktin mRNA  $\pm$  SA

b = Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten mit 2-3 verschiedenen RNA Präparationen

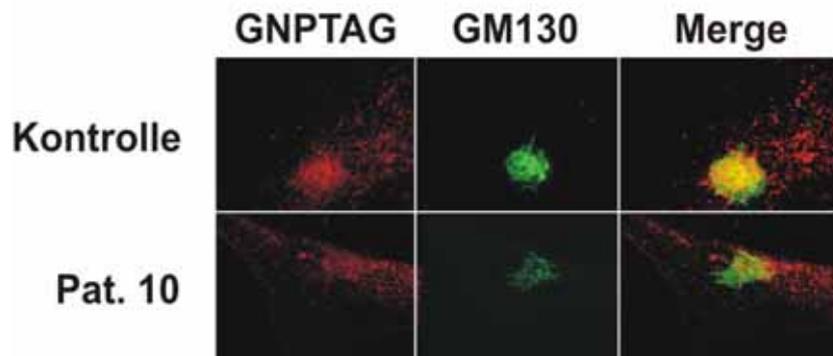
c = Mittelwert der Auswertung des mRNA-Gehalt von Fibroblasten von 4 verschiedenen ML III Patienten

Bei Untersuchung der GNPTAG-Expression mittels Western blot zeigte sich in Kontroll-Fibroblasten das 97 kDa Disulfid-gebundene Dimer, beim Patienten 10 hingegen, war das 97 kDa Polypeptid stark reduziert, verbunden mit dem Erscheinen eines 40 kDa immunreaktiven Polypeptids, das in Kontroll-Zellen nicht nachweisbar ist (Abb. 18).



**Abb. 18: Expression der GNPTAG in Fibroblasten des Patienten 10.** Zell-Extrakte von Kontroll- und Pat. 10-Fibroblasten wurden mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid) unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch GNPTAG-Western blot analysiert. Die Positionen des Protein-Standards sind angezeigt.

Die Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigt eine Kolokalisation des *cis*-Golgi-Markers GM130 mit der GNPTAG in Kontroll-Fibroblasten (Abb. 19). In den Fibroblasten des ML III-Pat. 10 war nur eine schwache Kolokalisation mit GM130 und GNPTAG nachweisbar (Abb. 19).



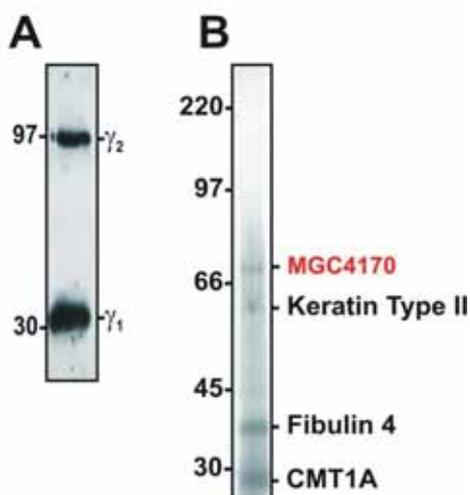
**Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von GNPTAG in ML III Fibroblasten.** Kontroll-Fibroblasten und vom Patient 10 wurden mit anti-GNPTAG (rot) und und GM130 (grün) Antikörpern inkubiert und durch Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert Gelb zeigt die Kolokalisation von *cis*-Golgi-Marker GM130 und GNPTAG.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Translation des GNPTAG-Proteins, in den Fibroblasten des Patienten 3, nicht betroffen ist. Posttranslational scheint jedoch die GNPTAG bei Pat. 10 modifiziert oder degradiert zu werden, was sich in einem Verlust der katalytischen Aktivität der GlcNAc-Phosphotransferase auswirkt. Zusammenfassend kann man für alle untersuchten ML III Patienten (1-10) feststellen, daß nur Patient 1 und 2 eine homozygote Deletion im *GNPTAG*-Gen aufweisen, was darauf schließen läßt, daß bei den anderen 8 Patienten (inkl. Pat. 10) unbekannte Gendefekte an einem ML III ähnlichen Phänotyp beteiligt sein müßten. Die Daten, die in Kapitel 4.2.3 dargestellt sind, sind zur Publikation eingereicht (Tiede et al., 2005a)

### 4.3 Identifizierung des für die $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase kodierenden Gens

Um das *GNPTA*-Gen zu identifizieren, das die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase kodiert, wurde ein affinitätschromatographischer Ansatz zur Reinigung der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten gewählt. Humane GNPTAG wurde mittels eines sekretorischen 6His-Fusionsproteins in Sf9 Insekten-Zellen überexprimiert und über Nickel-Chelat-Agarose aufgereinigt (Abb. 20 A). Die gereinigten monomeren und dimeren

Formen der GNPTAG wurden kovalent an das Trägermaterial „Affigel 10“ gebunden und mit präabsorbierten (über BSA-Affigel 10) Extrakten von Golgi-Membranen aus humaner Plazenta inkubiert. Gebundene Proteine wurden eluiert und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung visualisiert (Abb. 20 B).



**Abb. 20: Identifizierung eines neuen Golgi-Membran-Proteins, durch GNPTAG-Affinitätschromatographie.** **A)** Monomere ( $\gamma_1$ ) und dimere ( $\gamma_2$ ) Formen des 6His-GNPTAG-Fusionsproteins wurden aus Medien überexprimierender Insekten-Zellen (Sf9) gereinigt, mittels GNPTAG-Western blot analysiert und kovalent an Affigel 10 (Biorad) gekoppelt. **B)** Extrakte von Golgi-Membranen, gereinigt aus humaner Plazenta, wurden auf die GNPTAG-Affinitätssäule gegeben und gebundene Proteine wurden mit 1,5 M NaCl im Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung sichtbar gemacht. Die angegebenen Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und durch MALDI-TOF-Analysen identifiziert, wie angezeigt.

Die vier angefärbten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-Analyse untersucht (Abb. 20 B). Die Identifizierung der Banden ergab drei bekannte Proteine: Keratin Typ II, Fibulin 4 und CMT1A (Charcot Marie Tooth 1A) sowie ein hypothetisches Protein MGC4170. Durch Benutzung der „NCBI Entrez Gene“-Datenbanken wurde herausgefunden, daß das MGC4170 kodierende Gen 21 Exons enthält, welche über ca. 80 kb auf Chromosom 12q23.2 liegen. Es kodiert für ein Protein mit 1256 Aminosäuren und einer vorhergesagten Masse von 144 kDa. Struktur-Analysen, mittels der Expasy-Datenbank, zeigen jeweils eine N- und C-terminale Transmembran-Domäne sowie 21 potentielle N-Glykosylierungsstellen (siehe Anhang 9.3). Es wird angenommen, daß die individuellen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten durch proteolytische Prozessierung eines  $\alpha/\beta$ -Vorläufers generiert werden (Kornfeld und Sly, 2001).

### 4.3.1 Sequenzanalysen von *MGC4170* bei ML II- und ML III-Patienten

Zur Sequenzanalyse von zwei klinisch und biochemisch diagnostizierten ML II-Patienten (Patient M.A. und Z.B.) sowie von zwei klinisch und biochemisch diagnostizierten ML III Patienten (Patient 3 und 10) wurde aus kultivierten Hautfibroblasten genomische DNA isoliert. Durch Sequenzierung der 21 Exons von *MGC4170* der zwei ML II- und zwei ML III-Patienten mittels PCR, ergaben sich 6 verschiedene Mutationen im *MGC4170*-Gen identifiziert (Tabelle 4). Dies läßt die Evaluation des *MGC4170*-Gens als ML II und ML III verursachendes Kandidatengen eindeutig erscheinen.

Beim ML II-Patient Z.B. fanden sich zwei Mutationen (c.3252delA und c.3566insA) in Exon 17 und 19, welche jeweils zu einer Leseraster-Verschiebung mit frühzeitigen Translations-Abbruch im C-terminalen Bereich führen (p.Pro1084fsX6n und p.His1189fsX7). Der ML II-Patient M.A. zeigt eine 1 bp-Insertions-Mutation (c.1625insC), die ebenfalls zum frühzeitigen Translationsabbruch führt (p.Ala542fsX2). Durch Sequenzanalyse des *MGC4170*-Gens bei zwei ML III-Patienten, ohne Mutation in *GNPTAG*-Gen, wurden drei verschiedene Mutationen gefunden (Tabelle 4).

**Tabelle 4. Mutationen in *GNPTA* (*MGC4170*) verursachen ML II und ML III.**

ML II Patienten	Mutation (cDNA)	Mutation (Protein)	betroffenes Exon
M.A.	c.1625insC	p.Ala542fsX2	13
Z.B.	c.3252delA	p.Pro1084fsX6	17
	c.3566insA	p.His1189fsX7	19
ML III Patienten			
Pat. 3	c.3707A>T	p.Lys1236Met	21
Pat. 10	c.1220A>C	p.Asp407Ala	10
	c.1985C>G	p.Ala662Gly	13

Nummerierung der Nucleotide beginnt mit +1 beim A des ATG; Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit dem ersten vom ATG kodierten Methionin.

Der unter 4.2.3 beschriebene Pat. 10 mit einer milden Verlaufsform der ML III und ohne molekularen Defekt in der *GNPTAG*, zeigte zwei Substitutionen von jeweils einer Base, welche das Leseraster nicht beeinflussten (c.1220A>C, p.Asp407Ala und c.1985C>G, p.Ala662Gly). Ebenso der klinisch und biochemisch auf ML III diagnostizierte Pat. 3, mit einer schweren Verlaufsform der ML III (Dysostosis multiplex, einhergehend mit geistiger Retardierung), der die typischen Fehlsortierungen von lysosomalen Hydrolasen zeigte und

ebenfalls keine Mutation im *GNPTAG*-Gen aufwies, trägt eine Missense-Mutation im *MGC4170*-Gen, die keinen Einfluß auf das Leseraster hat (c.3707A>T, p.Lys1236Met).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die schwere Verlaufsform der Mukopolidose Typ II mit Mutationen im *MGC4170*-Gen zusammenhängt, die die Expression des Proteins nicht zulassen, somit zur Defizienz der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten führen und es zum völligen Aktivitätsverlust der GlcNAc-Phosphotransferase kommt.

Bei ML III-Patienten hingegen sind nicht nur, wie bisher angenommen, Defekte im *GNPTAG*-Gen Ursache für die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme (siehe 4.2.2), sondern auch Defekte in den  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten kodierendem Gen *MGC4170*.

## 5 DISKUSSION

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die GlcNAc-Phosphotransferase, die den initialen Schritt bei der Generierung des M6P-Erkennungsmarkers lysosomaler Enzyme katalysiert. Dabei wurden im ersten Teil die molekularen Grundlagen und zellbiologische Konsequenzen einer unzureichenden Ausstattung von lysosomalen Enzymen mit M6P-Resten in humanen Makrophagen untersucht. Der zweite Teil konzentrierte sich auf die Klonierung, molekulare Analyse und biochemische Charakterisierung der  $\gamma$ -Untereinheit der GlcNAc-Phosphotransferase in Fibroblasten von Mukopolidose III-Patienten. Der dritte Teil beschreibt die erstmalige Identifizierung des Gens, das die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase kodiert, sowie erste Mutationsanalysen in diesem Gen bei Patienten mit Mukopolidose II und III.

### **5.1 GlcNAc-Phosphotransferase und M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Enzyme in humanen Makrophagen**

Frühere experimentelle Daten aus Aufnahmestudien von lysosomalen Enzymen in Akzeptor-Zellen zeigten, daß aus humanen Makrophagen sezernierte lysosomale Enzyme nur unzureichend (Cathepsin D) oder nicht (Arylsulfatase A) mit M6P-Resten ausgestattet sind (Muschol et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Gesamtheit von M6P-haltigen, sezernierten Proteinen aus Makrophagen mit Hilfe eines löslichen biotinylierten M6P-Rezeptor-Overlays (MPR300) analysiert. Die Zahl M6P-haltiger Proteine in den Medien von Makrophagen ist deutlich geringer als in Medien von HeLa-Zellen und die molaren Massen der MPR300-bindenden Proteine sind unterschiedlich. Vergleichende Western blot Analysen zeigten, daß Cathepsin D (CtsD) und  $\beta$ -Glucuronidase zu den deutlich präsentierten M6P-haltigen Proteinen gehören, während z.B. Arylsulfatase A (ASA) und  $\beta$ -Galaktosidase nicht nachweisbar waren. Wie gezeigt wurde, spielen M6P-Reste auch für den intrazellulären Transport zumindest für das neusynthetisierte lysosomale Enzym CtsD in Makrophagen keine wichtige Rolle. Die Saponin-Permeabilisierungsversuche in Gegenwart von M6P zeigten deutlich, daß in Makrophagen sowohl Precursor, Intermediat als auch die reife CtsD-Form in M6P-unabhängiger Weise mit Membranen assoziiert sind. Darin unterscheiden sich

Makrophagen offensichtlich von anderen Zellen, in denen M6P-unabhängiger Transport von CtsD nachgewiesen wurde, wie z.B. in Hepatoma-HepG2-Zellen, Makrophagen der Maus, in transformierten NIH3T3-Zellen und in humanen Brusttumor MCF<sub>7</sub>-Zellen (Diment et al., 1988; Rijnboutt et al., 1991a und 1991b; Mc Intyre und Erickson 1991; Capony et al., 1994). In diesen Zellen sind 50-90 % des 53 kDa CtsD-Precursors mit Membranen M6P-unabhängig assoziiert. Unterschiedlich glykosylierte Formen von Prosaposin (68 und 72 kDa) werden für die Komplexbildung mit der CtsD-Precursor-Form und den M6P-unabhängigen sowie NH<sub>4</sub>Cl-insensitiven Transport zum Lysosom verantwortlich gemacht (Zhu und Conner, 1994; Capony et al., 1994). Welche Carrier-Proteine mit anderen lysosomalen Proteinen für die ein M6P-unabhängigen Transport beschrieben wurde, z.B. pro-Cathepsin L, pro-Cathepsin B und Sphingolipid-Activating-Protein (Mc Intyre und Erickson, 1991; Sloane et al., 1994; Rijnboutt et al., 1991a) sowie mit den verschiedenen molekularen Formen von CtsD in humanen Makrophagen interagieren, ist unbekannt.

Die hier beschriebenen *in vitro* Versuche mit Membranfraktionen aus Makrophagen haben gezeigt, daß GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität *in vitro*, mit rekombinanter ASA als Akzeptorsubstrat, nachweisbar ist (Abb. 12). Da es sich aber nicht um einen quantitativen GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivitätsnachweis handelte, lassen die Untersuchungen offen, ob die *in vivo* Bedingungen für eine effiziente M6P-Generierung durch die GlcNAc-Phosphotransferase gegeben sind. D.h., die Anwesenheit eines Makrophagen-spezifischen Inhibitors der GlcNAc-Phosphotransferase oder der Phosphodiesterase könnte die Fähigkeit der M6P-Bindung reduzieren bzw. verhindern. Alternativ könnte die Konzentration bzw. subzelluläre Verteilung der GlcNAc-Phosphotransferase die M6P-Ausstattung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme begrenzen.

Die GNPTAG unterliegt in Makrophagen offensichtlich anderen posttranslationalen Modifikationen als die überexprimierte humane GNPTAG in BHK-Zellen (Abb. 11 B). So ist die GNPTAG unter nichtreduzierenden Bedingungen als breite Bande von ca. 97 kDa nachweisbar, die auch nach Entfernung aller *N*-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten noch eine molekulare Masse des Dimers von ca. 80 kDa aufweist. Monomere Formen sind in Makrophagenextrakten weder vor noch nach PNGaseF-Behandlung nachweisbar. Dagegen präsentiert sich die dimere überexprimierte GNPTAG in BHK-Zellen als 75 kDa Polypeptid und nach PNGase-Behandlung als ein deglykosyliertes Dimer mit einer erwarteten, kalkulierten molaren Masse von 66 kDa. Deglykosylierte monomere GNPTAG ist in BHK-Zellextrakten erwartungsgemäß als

33 kDa Protein detektierbar. Diese Daten weisen eindeutig auf zusätzliche Modifikationen der GNPTAG in Makrophagen hin, die beim Dimer der GNPTAG ca. 16 kDa der molaren Masse betragen. Ob es sich bei den zusätzlichen Modifikationen z.B. um *O*-glykosidische Zuckerketten handelt ist unklar und muß untersucht werden. Weiterhin sollten sich Studien anschließen, um zu klären, ob diese Modifikationen spezifisch für GNPTAG oder auch an der  $\alpha/\beta$ -Untereinheit zu finden sind, und ob diese Modifikationen die Generierung von M6P-Resten beeinflussen. Alternativ könnten strukturelle Gegebenheiten der lysosomalen Enzyme selbst zur fehlenden bzw. eingeschränkten Ausstattung mit M6P-Resten beitragen. Es könnten auch bei diesen Proteinen die Zusammensetzung der *N*-gebundenen Oligosaccharide und die Art der Verknüpfung so verändert sein, daß sie von der GlcNAc-Phosphotransferase nicht mehr erkannt werden können. Diese Vermutung wird unterstrichen durch die Beobachtung, daß die elektrophoretische Mobilität der ASA in Medien von Makrophagen gegenüber von in BHK-Zellen exprimierter ASA verändert ist (Muschol et al., 2002). Um dies experimentell zu untersuchen, müßte z.B. ASA oder CtsD in Makrophagen überexprimiert, gereinigt und die Zuckerketten auf ihre Zusammensetzung hin getestet werden.

### **5.1.1 Knochenmarktransplantation als therapeutischer Ansatz bei lysosomalen Speicherkrankheiten**

Die Knochenmarktransplantation (KMT) gilt zur Zeit als einziger therapeutischer Ansatz für lysosomale Speichererkrankungen mit Beteiligung des ZNS. Die aus dem Knochenmark stammenden Monocyten bzw. Makrophagen können die Blut-Hirn-Schranke passieren und sich zu perivaskulären Makrophagen und Mikroglia differenzieren (Krivit et al., 1995a, 1999). Demnach sollen Makrophagen als „Enzymlieferanten“, durch Sekretion lysosomaler Enzyme dienen, die von defizienten Neuronen und Gliazellen durch Mannose-6-phosphat-Rezeptor vermittelte Endocytose wieder aufgenommen werden können („secretion-recapture-concept“). Die KMT verbessert neurologische und somatische Funktionen und verlängert die Lebenserwartung in verschiedenen Tiermodellen für lysosomale Krankheiten, jedoch sind diese Wirkungen abhängig vom Enzymdefekt und vom Zeitpunkt der Transplantation in Relation zum Einsetzen klinischer Symptome. Eine Reduktion von Speichermaterial im Gehirn und morphologische Veränderungen der Neuronen wurden bisher allerdings nur nach KMT von Mannosidase-defizienten Katzen und Fucosidase-defizienten Hunden berichtet (Taylor et al., 1992, Walkley et al., 1994). In

verschiedenen experimentellen *in vitro* Ansätzen zur Simulation des Transfers lysosomaler Enzyme von Makrophagen auf ASA-defiziente Astroglia wurde die niedrige Effizienz der Enzymaufnahme auf das Fehlen bzw. die geringe Präsenz von M6P-Resten zurückgeführt (Muschol et al., 2002). Erste gentherapeutische Ansätze durch Transplantation von Knochenmarkzellen die ASA überexprimieren und nur zu einer partiellen Korrektur der Sulfolipidspeicherung in viszeralen Organen, nicht aber im Gehirn führten (Matzner et al., 2000), bestätigten die *in vitro* Studien. Der hier geführte erweiterte Nachweis, daß neben Cathepsin D nur  $\beta$ -Glucuronidase und wenige andere sezernierte Proteine aus Makrophagen M6P-Reste in einer unbekanntem Stöchiometrie tragen, läßt die KMT als therapeutisches Konzept für alle lysosomalen Speichererkrankungen zweifelhaft erscheinen. Das wird besonders deutlich am Beispiel der KMT bei  $\beta$ -Galactosidase-Defizienz (G<sub>M1</sub>-Gangliosidose), da in Sekreten von kultivierten Makrophagen die  $\beta$ -Galactosidase in Western blot nicht nachweisbar war. Im Zusammenhang damit wird die KMT bei infantilen Patienten, die von Sphingolipidosen betroffen sind, als kontraindiziert diskutiert (Krivit et al., 1995b).

## **5.2 GlcNAc-Phosphotransferase in Zellen von Mukopolidose II (ML II) und –III (ML III) Patienten**

Das biochemisch-diagnostische Kriterium für die Diagnose von ML II und III-Patienten sind die erhöhten Serum-Aktivitäten von lysosomalen Enzymen (Kelly et al., 1975; Ward et al., 1993; Kornfeld und Sly, 2001). Die klinische Differential-Diagnose zwischen ML II und ML III ergibt sich aus dem Grad der neurologischen Beteiligung, sowie in der Schwere von auftretenden Skelettdysplasien. Während die ML II von einem schweren Phänotyp mit einer totalen Defizienz der GlcNAc-Phosphotransferase-Aktivität gekennzeichnet ist, weist die ML III eine breite klinische Heterogenität auf, die sich aber bisher nur bei einer kleinen Zahl von analysierten Patienten auf Mutationen im *GNPTAG*-Gen zurückführen ließen (Raas-Rothschild et al., 2000, 2004; Tiede et al., 2004). So sind auch intra-familiäre Varianten bei ML III-Patienten beschrieben worden und betroffene Jungen scheinen einen schwereren Phänotyp zu erreichen als ihre betroffenen Schwestern (Tylki-Szymanska et al., 2002).

### 5.2.1 GlcNAc-Phosphotransferase in ML III-Patientenzellen

In die Untersuchungen wurden Fibroblasten-Zelllinien von insgesamt 10 ML III-Patienten einbezogen. Alle Patienten waren diagnostiziert worden durch erhöhte Serum-Aktivitäten von lysosomalen Enzymen sowie durch Hypersekretion von lysosomalen Enzymen und reduzierten intrazellulären Aktivitäten in kultivierten Fibroblasten. Das Ausmaß der Hypersekretion in ML III-Fibroblasten war bei 6 Patienten für 4 verschiedene lysosomale Enzymaktivitäten individuell unterschiedlich (nicht gezeigt) und wiesen Patientenspezifische Enzymmuster auf. Versuche mit metabolisch markierten Fibroblastenzellen von verschiedenen ML III-Patienten mit anschließender Immunpräzipitation von Cathepsin D oder  $\beta$ -Hexosaminidase bestätigten die Fehlsortierung, aber dokumentierten gleichzeitig Restaktivität der GlcNAc-Phosphotransferase aufgrund des [ $^{32}$ P]-Einbaus in die Enzyme (Abb. 14 C). Die Stöchiometrie der Phosphorylierung und der Gehalt an Phosphomonoester (M6P)-Resten in den Oligosaccharidketten der untersuchten lysosomalen Enzyme sind noch unbekannt.

Es wurde vermutet, daß die GNPTAG der GlcNAc-Phosphotransferase für die Erkennung lysosomaler Enzyme verantwortlich sein soll, und daß Mutationen in *GNPTAG*-Gen, das die  $\gamma$ -Untereinheit kodiert, zur ML III führen (Raas-Rothschild, 2000). *GNPTAG* ist auf Chromosom 16p13.3 lokalisiert enthält 11 Exons und kodiert für ein 305 Aminosäuren großes Polypeptid. Nach der Abtrennung eines 24 Aminosäuren großen Signalpeptids formt das reife Protein (2 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen) ein über Disulfid-Brücken verbundenes Homodimer.

Bisher wurden 7 verschiedene Mutationen in 11 betroffenen Familien entdeckt (Raas-Rothschild et al., 2000, 2004; Tiede et al., 2004). Western blot Analysen mit dem selbst erzeugten Antikörper gegen die humane GNPTAG zeigte reduzierte Spiegel der GNPTAG in den 10 untersuchten Patienten-Fibroblasten. Nach Sequenzierung wurde nur bei zwei betroffenen Patienten, die Geschwister sind (Pat. 1 und 2), eine Mutation im *GNPTAG*-Gen gefunden, die zum Verlust einer *N*-Glykosylierungsstelle führt. Es wird angenommen, daß der Verlust einer einzelnen *N*-gebundenen Oligosaccharidkette die molare Masse des Glykoproteins um 2-5 kDa reduziert (Wendland et al., 1991; Tanaka et al., 1992; Yamashita et al., 1993; Millat et al., 1997; Tsiakas et al., 2004). D.h., für das p.Asn116del mutante GNPTAG-Dimer wäre eine molekulare Masse von ca. 93-87 kDa anstatt von 75 kDa zu erwarten gewesen (Abb. 15). Dies läßt vermuten, daß die Zuckerzusammensetzung und/oder zusätzliche Modifikationen, die die Ladung und Masse

der GNPTAG-Oligosaccharide verändern, variieren und in einer Zelltyp-spezifischen Weise auftreten. Der Verlust einer Zuckerkette resultiert offensichtlich in einer reduzierten Aktivität der GlcNAc-Phosphotransferase. Nach intensiver Literatursuche gibt es nur 3 Studien, die bisher über Mutationen in Glykosylierungsstellen eines Genproduktes bei Patienten mit lysosomalen Speichererkrankungen berichten. Das sind zum einen Mutationen im lysosomalen, nicht-enzymatischen Sphingolipid-Aktivator-Protein, die zur Metachromatischen Leukodystrophie führen (Regis et al., 1999; Wrobe et al., 2000) und in der Tripeptidylpeptidase 1, die zur Neuronalen Ceroid Lipofuscinose CLN2 führt (Tsiakas et al., 2004). Bei einem weiteren ML III-Patienten (Pat. 10) mit mildem, klinischen Phänotyp war eine schwache Expression der GNPTAG in Extrakten aus Fibroblasten nachweisbar, verbunden mit dem Auftreten einer 40 kDa immunoreaktiven Bande, die wahrscheinlich ein Degradationsprodukt darstellt. Bei diesem Patienten war keine Mutation in der GNPTAG, aber in der GNPTA (5.3) nachweisbar. Das spricht dafür, daß möglicherweise Mutationen in der  $\alpha/\beta$ -Untereinheit die Assemblierung, Stabilität und oder die intrazelluläre Verteilung der GNPTAG beeinflussen (Tiede et al, 2005a).

### **5.2.2 Untersuchungen mit rekombinanter GNPTAG aus Insektenzellen**

Die  $\gamma$ -Untereinheit (GNPTAG) der GlcNAc-Phosphotransferase wird für die Bindung lysosomaler Proteine durch Erkennung einer spezifischen Oberflächenstruktur verantwortlich gemacht. Um diese Annahme experimentell zu untersuchen, wurde rekombinante GNPTAG, die aus Medien überexprimierender Insektenzellen gereinigt wurde, in BIAcore-Analysen auf die Bindungsfähigkeit mit rekombinanter lysosomaler Arylsulfatase A (ASA) getestet. Es konnte keine meßbare Bindungsaffinität zwischen GNPTAG und ASA nachgewiesen werden, unabhängig ob GNPTAG oder ASA auf dem Sensorchip fixiert wurde. Möglicherweise verhindert die Insektenzellen-spezifische Glykosylierung der GNPTAG die Interaktion zur ASA, oder die effiziente Bindung der lysosomalen Enzyme benötigt die  $\alpha_2\beta_2$ -Untereinheiten der GNPTA. Diese Frage kann erst weiter verfolgt werden, wenn auch die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten rekombinant als lösliche Proteine vorliegen und sich heterohexamere Komplexe rekonstituieren lassen.

Die isolierte rekombinante GNPTAG wurde weiterhin zur Konstruktion einer Affinitätsmatrix verwendet, über die versucht werden sollte, die  $\alpha/\beta$ -Untereinheit aus

Golgi-Membran-Fractionen humaner Plazenta zu reinigen und das kodierende Gen zu identifizieren.

### **5.3 Identifikation des kodierenden Gens der $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase**

Mit Hilfe der GNPTAG-Affinitätsmatrix konnte ein unbekanntes Protein gereinigt werden, das nach MALDI-TOF-Analyse den Zugang auf das kodierende Gen *MGC4170* ermöglichte. Das Gen ist auf Chromosom 12q23.3 lokalisiert, umfaßt einen Bereich von 85 kb und besteht aus 21 Exons. Das Gen kodiert ein Protein von 1256 Aminosäuren und einer vorhersagbaren Masse von 144 kDa, das 21 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen enthält. Hydrophobizitäts-Analysen wiesen 2 Transmembrandomänen auf. Diese Daten stimmen mit einigen, als persönliche Mitteilung von Dr. Canfield veröffentlichte Angaben zur GNPTA-Gen, überein (Kornfeld und Sly, 2001). Dieses Gen soll bei Patienten mit Mukopolidose II defekt sein. Durch Sequenzierung aller amplifizierten Exone dieses Gens von ML II-Patienten und der Identifikation von Nonsense- und Insertions-Mutationen konnte die Relevanz des Gens für die Krankheit erstmalig belegt werden (Tiede et al., 2005 b).

Wie in Abb. 20 dargestellt, besitzt das *MGC4170* Genprodukt eine komplexe Modulstruktur, die aus mindestens 6 Domänen zusammengesetzt ist. Die N-terminale Domäne (aa 60-430) des *MGC4170* ähnelt der N-terminalen Domäne des XcrA-Proteins aus *Neisseria meningitidis* (Sero-Gruppe X), das in die Biosynthese der  $\alpha$ -1,4-gebundenen *N*-Acetyl-D-Glucosamin-1-Phosphat-Kapsel involviert ist (Tzeng et al., 2003). Diese XcrA-ähnliche Domäne enthält eine große Insertion (aa 102-325) (Abb. 21 und 22), die möglicherweise die UDP-GlcNAc-Bindungsstelle beinhaltet. *MGC4170* enthält weiterhin zwei Tandem-Domänen, die „Notch-Repeats“ (aa 430-473) ähneln sowie eine weitere Domäne, die Ähnlichkeit mit der DMAP-1 (Transkriptioneller Co-Repressor)-Bindungsdomäne (aa689-820) besitzt (Abb. 20 und 21). Die Funktionen dieser drei *MGC4170*-Domänen sind nicht bekannt, aber ihre Ähnlichkeit mit bekannten Domänen-Strukturen läßt vermuten, daß diese eventuell in Interaktionen mit anderen Proteinen, z.B. bei der Assemblierung der Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase, involviert sind. Die modulare Organisation von *MGC4170* ist in Maus-, Ratte-, Hund-, Huhn- und Zebrafisch-äquivalenten Proteinen konserviert. *Drosophila melanogaster* (Abb. 21) und *Tetraodon nigroviridis* haben eine einfachere Version des Proteins, ohne Insertion in der

N-terminalen Domäne, nur eine Notch-Repeat-ähnliche Domäne und keine DMAP1-Bindungs-Domäne. Die Proteine von *Dictyostelium discoideum* und *Entamoeba histolytica* sind deutlich dem bakteriellen Kapsel-Biosynthese-Protein ähnlicher als dem MGC4170. MGC4170 hat keine Sequenz-Ähnlichkeiten mit der GlcNAc-1-Phosphat-Transferase, die die Reaktion von UDP-GlcNAc und Dolichol-Phosphat zu UMP und *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Diphosphodolichol im Glykosylierungs-Weg katalysiert (Eckert et al., 1998).

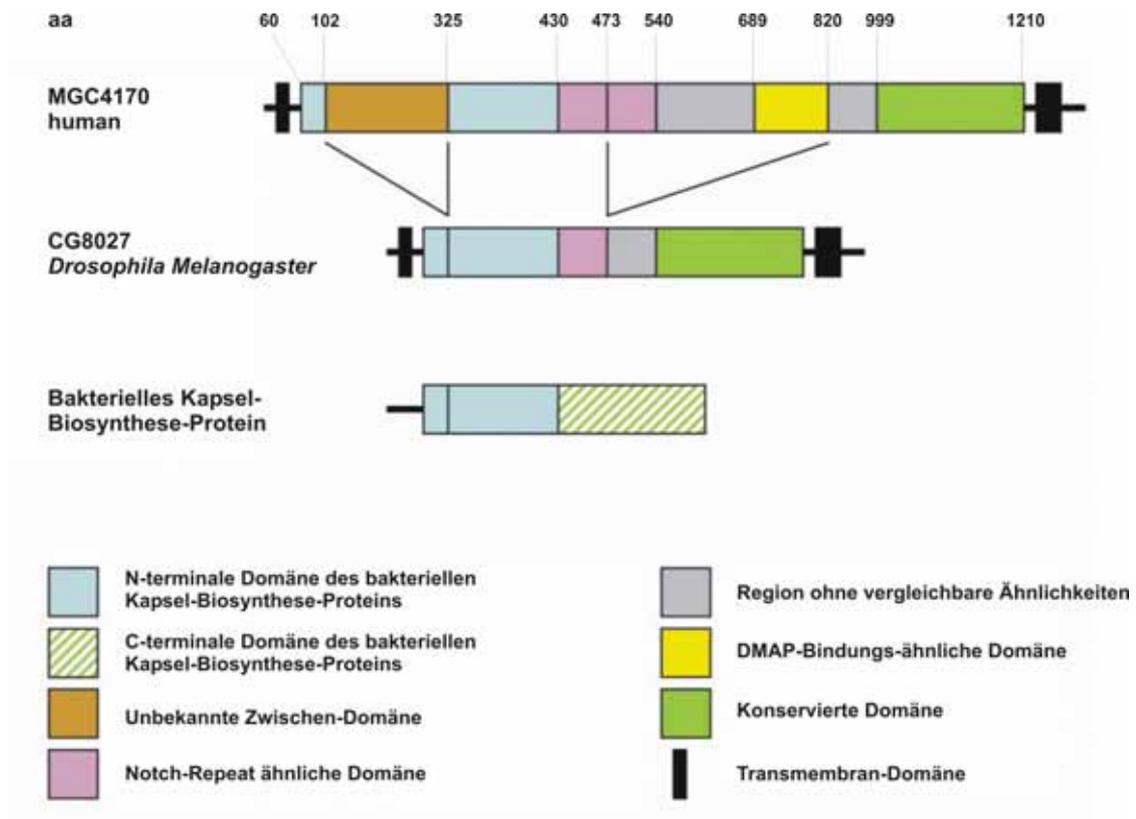


Abb. 20: Domänen-Organisation von MGC4170 und Vergleiche mit *Drosophila CG8027* und dem bakteriellen Kapsel-Biosynthese-Protein.

**A**

**NOTCH-Repeat ähnliche Domäne**

```

MGC4170-repeat 1 (433) WPFVNCCA----EGCPGSWIKDGYCDKACNNSACDWDGGDCS (469)
MGC4170-repeat 2 (500) NSVSYCN---QGCANSWLADKFCQQACNVLSCGFDAGDCG (536)
CG8027 (204) WMVPGCA---LDCPWTYIGDGACDRHCNIDACQFDGGDCS (240)
Notch-repeat 1 (1473) QQRAMCDK---RGC-TEKQNGICDSDCNTYACNFDGNDCS (1513)
Notch-repeat 2 (1517) NPWANCTA---NEC-WNKFKNGKCNEECNNAACHYDGHDCE (1553)
Notch-repeat 3 (1556) RKLKSCDTLFDAYC-QKHYGDGFCDYGCNNAECSWDGLDCE (1593)
    
```

**B**

**Domänen-Ähnlichkeit zum bakteriellen Kapsel-Biosynthese-Protein**

```

MGC4170 (73)  MFIDVVYTWV  NGTDLELLKE  LQQVREQMEE  EQKAMREILG  KNTTEPTKKS
CG8027 (62)  TAIDAVYTWV  NGSDPNFIED  IRRF-----  -----
DICTYOST (51) EDIDLIYTWV  NGSDLKHIES  RIYYHNLEKI  QKNEKLLKLLK  QQDEEEDDEE
XcbA (70)    FPIDVVYTWV  DSDDEKFNEE  RLKFNQSSSTS  ETLQGKA---  -----
CpsY (201)  FIDIMVFSWV  DGSDPEFRAR  RMAQMSQYVV  GEGDDAE---  -----
    
```

```

MGC4170  EKQLECLLTH  CIKVPMLVLD  PALPANITLK  DLPSLYPSFH  SASDIFNVAK
CG8027  -----
DICTYOST  EENY-----  -----
XcbA     -----
CpsY     -----
    
```

```

MGC4170  PKNPSTNSV  VVFDSTKDVE  DAHSGLLKGN  SRQTVWRGYL  TTDKEVPLV
CG8027  -----
DICTYOST  -----
XcbA     -----
CpsY     -----
    
```

```

MGC4170  LMQDLAFLSG  FPPTFKETNQ  LKTKLPENLS  SKVKLLQLYS  EASVALLKLN
CG8027  -----
DICTYOST  -----
XcbA     -----
CpsY     -----
    
```

```

MGC4170  NPKDFQELNK  QTKKNMTIDG  KELTISPAYL  LWDLSAISQS  KQEDISASR
CG8027  -----  -----  -----  -----  --DDKYDPSR
DICTYOST  -----  -----  -----  -----  --DNEEESQR
XcbA     -----  -----  -----  -----  --ESTDIAR
CpsY     -----  -----  -----  -----  -----AR
    
```

```

MGC4170  FEDNEELRYS  LRSIERHAPW  VRNIFIVTNG  QIPSWLNLDN  PR-VTIVTHQ
CG8027  FDDKNELRYS  LRSLEKHAAW  IRHVYIVTNG  QIPSWLDLSY  ER-VTVVPHE
DICTYOST  FRDYGSLKYS  LRSVRKYAPW  INKIYIITAN  QIPSWFNQSN  SDNVKFIPE
XcbA     FQSRDELKYS  LRSLMKYAPW  VNHIVIVTNG  QIPKWLDTNN  TK-VTIIPHS
CpsY     IRQIDELKYA  LRSVNMFAFW  IRRIFIATDS  TPPPWLAEH-  PK-ITIVRAE
    
```

```

MGC4170  DVFRNLSHLP  TFSSPAIESH  IHRIEGL-SQ  KFIYLNDDVM  FGKDVVPDDF
CG8027  VLAPDPDQLP  TFSSSAIETF  LHRIPKL-SK  RFLYLNDDIF  LGAPLYPEDL
DICTYOST  KFYKNKKDLP  TFNSNSIESN  FWNLPNQVSN  CFIYLNDDLF  FREKVEIDDF
XcbA     TII-DSQFLP  TFNSHVIESS  LYKIPGL-SE  HYIYFNDDVM  LARDLSPSYF
CpsY     DHFSDRSALP  TYNSHAVESQ  LHHIPGL-SE  HFIYLNDDMF  FGRPLKASMF
    
```

```

MGC4170  YSHSKGQKVY (430)
CG8027  YTEAEGVRVY (201)
DICTYOST  FDNEYYHNLF (222)
XcbA     FTSSGLLKLF (218)
CpsY     FSPGGVTRFI (346)
    
```

**Abb. 21: Sequenz und Domänen Vergleiche.** **A)** Vergleich der Notch Repeat-ähnlichen Domänen von MGC4170 mit verwandten Domänen. **B)** Vergleich der N-terminalen Domäne von MGC4170 mit verwandten Domänen. Die grau-unterlegte Region zeigt die große Insertion in MGC4170. Gleiche Aminosäuren sind rot markiert und ähnliche Aminosäuren sind blau-markiert. MGC4170 : MGC4170 Protein (human; GenBank NP\_077288.2); CG8027 : CG8027 Protein (*Drosophila melanogaster*; SwissProt Q8SX14); Notch : Notch Protein (*Drosophila melanogaster*; SwissProt P07207); XcbA : XcbA Protein (*Neisseria meningitidis*; GenBank AAP44500.1); CpsY : CpsY Protein (*Mycobacterium tuberculosis*; GenBank CAB09105.1); DICTYOST : ORF (*Dictyostelium discoideum*; AA052495.1).

Bei den in Zusammenarbeit mit israelischen Kollegen bisher sequenzierten 5 ML II Patienten mit schwerem klinischen Phänotyp, wurden nur Mutationen entdeckt, die alle zum frühzeitigen Translationsabbruch führen und somit für den Abbau und

Funktionsverlust der GlcNAc-Phosphotransferase verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu, konnte bisher auch bei 2 Patienten mit klinisch diagnostizierter ML III, die keine Mutation in der *GNPTAG* aufweisen, Mutationen im *MGC4170*-Gen identifiziert werden. So wurden 2 Missense-Mutationen bei Pat. 10 gefunden, die offensichtlich die Stabilität, den Transport und die intrazelluläre Verteilung der GNPTAG der GlcNAc-Phosphotransferase beeinflussen (Tiede et al., 2005a). Die Mutation p.A662G des Pat. 10 betrifft eine Region des  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten-Precursors, die keine Homologie zu anderen Proteinen zeigt. Die Mutation p.D407A ist hingegen in einer hochkonservierten Domäne im N-terminalen Bereich, die der des bakteriellen Kapsel-Biosynthese-Proteins ähnlich ist lokalisiert. Der Austausch eines sauren Aspartat-Restes durch einen kleinen unpolaren Alanin-Rest bewirkt sicherlich eine Konformationsänderung der möglichen UDP-*N*-Acetylglucosamin-Bindungsstelle. Während der Zusammenstellung dieser Arbeit wurde in einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls eine Mutation bei einem ML III-Patienten im *MGC4170*-Gen entdeckt, wodurch das Exon 7 herausgespleißt wird. Der vorhergesagte Verlust der Aminosäuren 213-257 betrifft das inserierte GNPTA-spezifische Modul in der N-terminalen konservierten Domäne (Steet et al., 2005). Diese Mutation führt ebenfalls zu einem milden, spät auftretenden Phänotyp der ML III.

Ein weiterer ML III-Patient (Pat. 3) mit schwerem Phänotyp (Dysosotosis multiplex in Verbindung mit geistiger Retardierung) wies keine Mutationen im *GNPTAG*-Gen auf. Allerdings konnte auch bei diesem Patienten eine Mutation im *MGC4170*-Gen (p.Lys1236Met) nachgewiesen werden. Diese homozygote Mutation betrifft die C-terminale Transmembran-Domäne, was eventuell im Kontext mit dem schweren ML III-Phänotyp steht, denn die GlcNAc-Phosphotransferase kann sich wahrscheinlich nicht korrekt in die *cis*-Golgi-Membran integrieren und verliert einen großen Teil ihrer katalytischen Aktivität.

## 5.4 Ausblick

Die Identifizierung des lang gesuchten Gens, das die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der Phosphotransferase kodiert, ermöglicht jetzt die beobachtete Heterogenität im biochemischen und klinischen Phänotyp sowohl bei Mukopolidose II als auch Mukopolidose III-Patienten zu untersuchen. Außerdem werden dadurch die Möglichkeiten der prä- und postnatalen Diagnose betroffener Patienten wesentlich verbessert. Weiterhin können jetzt gezielt Tiermodelle der Mukopolidosen II und III entwickelt werden, die das

Verständnis der molekularen Veränderungen während der Pathogenese dieser Krankheiten verbessern werden.

Schließlich ist keines der bakteriellen Proteine, die Ähnlichkeit zur N-terminalen Domäne von MGC4170 aufweisen, biochemisch bisher charakterisiert worden und sie existieren in Sequenzdatenbanken nur als hypothetische Proteine oder als „putative capsule biosynthesis protein“. Die vorliegende Arbeit untermauert die mögliche Involvierung dieser Proteine in die Bildung von Zucker-1-phosphat Verbindungen bei Kapselpolysacchariden und ermöglicht damit eventuelle funktionelle Nachweisverfahren als Voraussetzung neue antibakterielle Verfahren zu entwickeln, die auf diesen mikrobiellen Enzymen beruhen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die GlcNAc-Phosphotransferase katalysiert den initialen Schritt bei der Generierung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-Resten, die wichtig für den Transport lysosomaler Enzyme entlang des Biosynthese- und Endozytoseweges zum Lysosom sind. Die GlcNAc-Phosphotransferase stellt ein Heterohexamer dar, das aus drei Untereinheiten,  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ , zusammengesetzt ist. Die  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten werden durch ein unbekanntes Gen, die  $\gamma$ -Untereinheit durch ein separates *GNPTAG*-Gen kodiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß humane Makrophagen, die nur wenige lysosomale Enzyme sezernieren, die M6P-Reste tragen, die *GNPTAG* zwar exprimieren, aber diese Untereinheit neben *N*-gebundenen Oligosaccharidketten weitere Makrophagen-spezifische posttranslationale Modifikationen tragen, die möglicherweise die Formierung von M6P-Resten behindern. Für die lysosomale Protease Cathepsin D wurde ein M6P-unabhängiger intrazellulärer Transport nachgewiesen, bei dem die verschiedenen Cathepsin D-Formen Membran-assoziiert sind.

Defekte im *GNPTAG*-Gen werden verantwortlich gemacht für die lysosomale Speicherkrankheit Mukopolipidose III (ML III). Die molekularen Analysen des *GNPTAG*-Gens bei 10 ML III-Patienten ergab aber nur bei einem Geschwisterpaar eine Mutation, die eine *N*-Glykosylierungsstelle betraf und zur Fehlsortierung lysosomaler Enzyme sowie zu zellulären Umverteilung der *GNPTAG* führte.

Mit Hilfe einer *GNPTAG*-Affinitätschromatographie konnte aus Extrakten von Golgi-Membranen aus humaner Plazenta ein unbekanntes Protein isoliert und identifiziert werden, das durch das *MGC4170*-Gen kodiert wird. Das Gen ist auf Chromosom 12q23.3 lokalisiert und besteht aus 21 Exons. Das Genprodukt umfaßt 1256 Aminosäuren, besitzt zwei Transmembrandomänen und weist eine komplexe Modulstruktur auf, die aus mindestens 6 Domänen besteht. Die N-terminale Domäne weist Ähnlichkeiten zu bisher nicht charakterisierten bakteriellen Proteinen auf, die an der Bildung von Zucker-1-Phosphat-Verbindungen bei der Kapselpolysaccharidsynthese beteiligt sind. Im *MGC4170*-Gen wurde bei 2 Patienten mit Mukopolipidose II (I-cell disease) und bei 2 Patienten mit ML III (pseudo-Hurler-Polydystropie) Mutationen identifiziert. Die Daten zeigen, daß es sich bei *MGC4170* um das kodierende Gen der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten der GlcNAc-Phosphotransferase handelt.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Achkar, C.; Gong, Q.; Frankfater, A.; Bajkowski, A.S. (1990)**  
Differences in targeting and secretion of cathepsin B and L by BALB/3T3 Fibroblasts and Moloney murine sarkoma virus-transformed BALB/3T3 Fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 13650-13654
- 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.; Murray, G.J. (1988)**  
Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **964**, 303-308
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2000)**  
Current protocols in molecular biology.  
in: *Current Protocols*, Vol I-IV, John Wiley & Sons Inc, USA
- Bao, M.; Booth, J.L.; Elmendorf, B.J.; Canfield, W.M. (1996a)**  
Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Purification and subunit structure.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 31437-31445
- Bao, M.; Elmendorf, B.J.; Booth, J.L.; Drake, R.R.; Canfield, W.M. (1996b)**  
Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 31446-31451
- Baron, R. (1989)**  
Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclasts.  
*Anat Rec.* **244**, 317-324
- Beck, M.; Barone, R.; Hoffmann, R.; Kratzer, W.; Rakowsky, T.; Nigro, F.; Fiumara, A. (1995)**  
Inter- and intrafamilial variability in mucopolipidosis II (I-cell disease).  
*Clin. Gen.* **47**, 191-199
- Bonner, W.M., Laskey, R. (1974)**  
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.  
*Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88
- Braulke, T.; Geuze, H.J., Slot, J.W.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987)**  
On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells.  
*Eur. J. Cell Biol.* **43**, 316-321
- Braulke, T. (1996)**  
Origin of lysosomal proteins.  
In Lloyd JB, Mason RW, editors. *Subcellular Biochemistry. Biology of the Lysosome*, vol 27. New York: Plenum Press. P 15-49
- Braun, M., Waheed, A., von Figura, K. (1989)**  
Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface.  
*EMBO J.* **8**, 3633-3640
- Capony F, Morisset M, Barrett AJ, Capony JP, Broquet P, Vignon F, Chambon M, Louisot P, Rochefort H (1987)**  
Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells.  
*J. Cell. Biol.* **104**, 253-262

- Capony, F.; Braulke, T.; Rougeot, C.; Roux, S.; Montcourrier, P.; Rochefort, H. (1994)**  
 Specific mannose 6-phosphat receptor-independant sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells.  
*Exp. Cell Res.* **215**, 154-163
- Chang, S.H.; Lin, S.J.; Lee, Y.Y.; Yang, R.C.; Yan, S.L. (1996)**  
 I-cell disease: report of a case.  
*Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* **12**, 295-300
- Chavany, C., Jendoubi, M. (1998)**  
 Biology and potential strategies for the treatment of GM2 gangliosidoses.  
*Mol. Med. Today* **4**, 158-165
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald R.J., Rutter, W.J. (1979)**  
 Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.  
*Biochemistry*, **18**, 5294-5299
- Couso, R.; Lang, L.; Roberts, R.; Kornfeld, S. (1986)**  
 Phosphorylation of the oligosaccharide of uteroferrin by UDP-GlcNAc-Phosphotransferase from rat liver, *A. castellani*, and *D. discoideum* requires  $\alpha$ 1,2 -linked mannose residues.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 6326-6331
- Cuozzo, J.W., Sahagian, G.G. (1995)**  
 Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 144490
- Dahms, N.M.; Wick, D.A.; Brzycki-Wessell, M.A. (1994)**  
 The bovine mannose 6-phosphate / insulin-like growth factor II receptor. Localization of the insulin-like growth factor II binding site to domains 5-11.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 3802-3809
- Diment, S.; Leech, M.S.; Stahl, P.D. (1988)**  
 Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes.  
*J. Biol. Chem.* **263**, 6901-6907
- Dittmer, F., Hafner, A., Ulbrich E.J., Moritz, J.D., Schmidt, P., Schmahl, W., Pohlmann, R., von Figura, K. (1999)**  
 I-cell disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors.  
*Transgenic Res.* **7**, 473-483
- Duncan, J.R.; Kornfeld, S. (1988)**  
 Intracellular movement of two mannose-6-phosphate receptors: return to Golgi apparatus.  
*J. Cell Biol.* **106**, 617-628
- Eckert, V., Blank, M., Mazhari-Tabrizi, R., Mumberg, D., Funk, M., Schwarz, R.T. (1998)**  
 Cloning and functional expression of the human GlcNAc-1-P transferase, the enzyme for the committed step of the dolichol cycle, by heterologous complementation in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Glycobiology* **8**, 77-85
- Endo, H.; Miyazaki, T.; Asano, S.; Sagami, S. (1987)**  
 Ultrastructural studies of the skin and cultured fibroblasts in I-cell disease.  
*J. Cutan. Pathol.* **14**, 309-317
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P. (2003)**  
 At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins.  
*Trends Cell Biol.* **13**, 137-145
- Falik-Zaccai, T.C., Zeigler, M., Bargal, R., Bach, G., Borochowitz, Z., Raas-Rothschild, A. (2003)**  
 Mucopolipidosis III type C: first trimester biochemical and molecular prenatal diagnosis.  
*Prenat. Diagn.* **23**, 211-214

- Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. (1983)**  
Biosynthesis and Transport of Cathepsin D in Cultured Human Fibroblasts.  
*J. Cell Biol.* **97**, 1-5
- Gieselmann, V., Hasilik, A., von Figura, K. (1985)**  
Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 3215-3220
- Gieselmann, V. (1995)**  
Lysosomal storage diseases.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1270**, 103-136
- Gieselmann, V. (2003)**  
Metachromatic leukodystrophy: recent research developments.  
*J. Child Neurol.* **18**, 591-594
- Glickman, J.N.; Kornfeld, S. (1993)**  
Mannose 6-phosphate-independant targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts.  
*J. Cell Biol.* **123**, 99-108
- Gonzalez-Noriega, A.; Grubb, J.H.; Talkad, V.; Sly, W.S. (1980)**  
Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal secretion by impairing receptor recycling.  
*J. Cell Biol.* **85**, 839-852
- Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C.L., Mellmann, I., Helenius, A. (1990)**  
Characterisation and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 12036-12043
- Grässel, S.; Hasilik, A. (1992)**  
Human cathepsin D precursor is associated with a 60 kDa glycosylated polypeptide.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 276-282
- Guanieri, F.G., Arterburn, L.M., Penno, M.B., Cha, Y., August, J.T. (1993)**  
The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 1941-1946
- Hanewinkel, H.; Glossl, J.; Kresse, H. (1987)**  
Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **262**, 12351-12355
- Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980a)**  
Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts: synthesis as precursors of higher molecular weight.  
*J. Biol. Chem.* **255**, 4937-4945
- Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980b)**  
Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblastst: phosphorylation of mannose-residues.  
*J. Biol. Chem.* **255**, 4946-4950
- Hasilik, A.; Voss, B.; von Figura, K. (1981)**  
Transport and processing of lysosomal enzymes by smooth muscle cells and endothelial cells.  
*Exp. Cell Res.* **133**, 23-30
- Hasilik, A.; von Figura, K.; Conzelmann, E.; Nehr Korn, H; Sandhoff, K. (1982)**  
Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts: activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of  $\beta$ -Hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2.  
*Eur. J. Biochem.* **125**, 317-312

- Hasilik, A.; Waheed, A.; von Figura, K. (1981)**  
Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in presence of UDP-N-Acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell-fibroblasts.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 761-767
- Hasilik, A.; Waheed, A.; Cantz, M.; von Figura, K. (1981)**  
Impaired phosphorylation of lysosomal enzymes in fibroblasts of patients with mucopolipidosis III.  
*Eur. J. Biochem.* **122**, 119-123
- Hasilik, A. (1992)**  
The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation.  
*Experientia* **48**, 130-151
- Hasilik, A.; von Figura, K. (1981)**  
Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complexoligosaccharides in cathepsin D and  $\beta$ -hexosaminidase.  
*Eur. J. Biochem.* **121**, 125-129
- Hille-Rehfeld, A. (1995)**  
Mannose 6-phosphat receptors in sorting and transport lysosomal enzymes.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 177
- Hoflack, B.; Kornfeld, S. (1985)**  
Purification and characterization of cation-dependent-mannose-6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 12008-12014
- Hoflack, B.; Fujimoto, K.; Kornfeld, S. (1987)**  
The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependant mannose 6-phosphate receptor.  
*J. Biol. Chem.* **262**, 123-129
- Honey, N.K.; Mueller, O.T.; Little, L.E.; Shows, T.B. (1982)**  
Mucopolipidosis III is genetically heterogenous.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7420-7424
- Höning, S., Hunziker, W. (1995)**  
Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-1) in MDCK cells.  
*J. Cell. Biol.* **128**, 464-473
- Imort, M.; Zühlsdorf, M.; Feige, U.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1983)**  
Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes in human monocytes and macrophages.  
*Biochem. J.* **214**, 671-678
- Isidoro, C.; Radons, J.; Baccino, F.M.; Hasilik, A. (1990)**  
Suppression of the uncovering of mannose-6-phosphate residues in lysosomal enzymes in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .  
*Eur. J. Biochem.* **191**, 591-597
- Isidoro, C., Baccino, F.M., Hasilik, A. (1998)**  
Human and hamster procathepsin D, although equally tagged with mannose-6-phosphate, are differentially targeted to lysosomes in transfected BHK cells.  
*Cell. Tissue. Res.* **292**, 303-310
- Karlsson, K., Carlsson, S. (1998)**  
Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose-6-phosphate receptor/g-Adaptin vesicles at the trans-Golgi network.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 18966-18973

- Kaye, E.M. (1995)**  
Therapeutic approaches to lysosomal storage diseases.  
*Curr. Opin. Pediatr.* **7**, 650-654
- Kelly, T.E., Thomas, G.H., Taylor, H.A. Jr, McKusick, V.A., Sly, W.S., Glaser, J.H., Robinow, M., Luzzatti, L., Espiritu, C., Feingold, M., Bull, M.J., Ashenurst, E.M., Ives, E.J. (1975)**  
Mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): Clinical and laboratory studies in a series of 12 patients.  
*Johns. Hopkins. Med. J.* **137**, 156-175
- Kelly, B.A.; Carchmann, R.A. (1987)**  
The relationship between lysosomal enzyme release and protein phosphorylation in human monocytes stimulated by phorbol esters and opsonized zymosan.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 17404-17411
- Kornfeld, S. (1992)**  
Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.  
*Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330
- Kornfeld, S.; Mellman, I. (1989)**  
The biogenesis of lysosomes.  
*Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**, 483-525
- Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C., Canfield, W.M. (1999)**  
Molecular cloning and functional Expression of two splice forms of human N-Acetylglucosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 32778
- Kornfeld, S.; Sly, W.S. (2001)**  
I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization.  
In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol.II (Scriver, C.R.)
- Krivit, W., Sung, J.H., Shapiro, E.G., Lockman, L.A. (1995a)**  
Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation fo lysosomal storage diseases.  
*Cell Transplant.* **4**, 385-392
- Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG. (1995b)**  
The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome.  
*J. Inherit. Metab. Dis.* **18**, 398-412
- Krivit, W., Peters, C., Shapiro, E.G. (1999)**  
Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syndromes, and Gaucher disease type III.  
*Curr. Opin. Neurol.* **12**, 167-176
- Lazzarino, D.A., 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**, 10118-10126
- Lazzarino, D.A., Gabel, C.A. (1989)**  
Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 5015-5023

- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U., Hoflack, B. (1998)**  
The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 29451-29461
- Lemansky, L.P.; Gieselmann, V.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1985)**  
Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I-cell fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 9023-9030
- Leroy, J.G.; Ho, M.W.; McBrinn, M.C.; Ziehlke, K.; Jakob, J.; O'Brian, J.S. (1972)**  
I-cell disease: biochemical studies.  
*Pediatr. Res.* **6**, 752-757
- Lobel, P., Dahms, N.M., Kornfeld, S. (1988)**  
Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphat receptor.  
*J. Biol. Chem.* **253**, 2563-2570
- Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A.J., Davenport, M.L., Efstratiadis, A. (1996)**  
Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in IGF2 and IGF1 null backgrounds.  
*Dev. Biol.* **177**, 517-535
- Malhorta, V.; Serafini, T.; Orci, L.; Shepherd, J.C.; Rothman, J.C. (1989)**  
Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the golgi stack.  
*Cell* **58**, 329-336
- Maroteaux, P.; Lamy, M. (1966)**  
La pseudo-polydystrophy de Hurler.  
*Presse Med.* **74**, 2889-2892
- Marron-Terada, P.G., Brzycki-Wessell, M.A., Dahms, N.M. (1998)**  
The two mannose 6-phosphate binding sites of the insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor display different ligand binding properties.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 22358-22366
- Martin J.J.; Leroy J.G.; van Eygen M.; Ceuterick C. (1984)**  
I-Cell disease. A further report on its pathology.  
*Act. Neuropath.* **64**, 234-242
- Matzner, U., Harzer, K., Mansson, J.E., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Learish, R., Barranger, J., Gieselmann, V. (1999)**  
Long term expression and efficient brain transfer of arylsulfatase A in arylsulfatase A-deficient mice treated by stem cell gene therapy.  
Abstract 72 of 12<sup>th</sup> Europ. Study Group on Lysosomal Diseases
- Matzner, U., Harzer, K., Learish, R.D., Barranger, J.A., Gieselmann, V. (2000)**  
Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector.  
*Gene Ther.* **7**, 1250-1257
- McIntyre, G.F., Erickson, A.H. (1991)**  
Procatepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 15438-15445
- Millat, G., Froissart, R., Maire, I., Bozon, D. (1997)**  
Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine-84 residue.  
*Biochem. J.* **326**, 243-247

- Munier-Lehmann, H.; Mauxien, F.; Bauer, U.; Lobel, P.; Hoflack, B. (1996)**  
Re-expression of the Mannose 6-Phosphate Receptors in Receptor-deficient Fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 15166-15174
- Mullis, K.G., Kornfeld, R.H. (1994)**  
Characterization and immunolocalization of bovine N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 1727-1733
- Muschol, N., Matzner, U., Tiede, S., Gieselmann, V., Ullrich, K., Braulke, T. (2002)**  
Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages.  
*Biochem. J.* **368**, 845-853
- Ohkuma, S., Poole, B. (1978)**  
Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **75**, 3327-3331
- Ohm, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F. (2002)**  
Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB.  
*PNAS* **100**, 1902-1907
- Oude Elferink, R.P.; Van Doorn-Van Wakeren, J.; Strijland, A.; Reuser, A.J.; Tager, J.M. (1985)**  
Biosynthesis and intracellular transport of alpha-Glucosidase and Cathepsin D in normal and mutant human fibroblasts.  
*Eur. J. Biochem.* **153**, 55-63
- Okada S.; Owada M.; Sakiyama T.; Yutaka T. (1985)**  
I-Cell-disease: clinical studies of 21 Japanese cases.  
*Clin. Gen.* **28**, 207-215
- Owada, M.; Neufeld E. F. (1982)**  
Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of M-6-P recognition? Evidence from I-Cell-disease.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 814-820
- Pearse, B.M.F.; Robinson, M.F. (1990)**  
Clathrin, adaptors and sorting.  
*Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 151-171
- Pohlmann, R., Nagel, G., Schmidt, B., Stein, M., Lorkowski, G., Krentler, C., Cully, J., Meyer, H.E., Grzeschik, K.H., Mersmann, G., Hasilik, A., von Figura, K. (1987)**  
Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: Cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor.  
*Cell* **50**, 181-185
- Pohlmann, R.; Wendland, M.; Boeker, C.; von Figura, K. (1995)**  
The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 27311-27318
- Raas-Rothschild, A., Cormier-Daire, V., Bao, M., Genin, E., Salomon, R., Brewer, K., Zeigler, M., Mandel, H., Toth, S., Roe, B., Munnich, A., Canfield, W.M. (2000)**  
Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolidosis IIIC).  
*J. Clin. Invest.* **105**, 673-681

- Raas-Rothschild, A., Bargal, R., Goldman, O., Ben-Asher, E., Groener, J.E., Toutain, A., Stemmer, E., Ben-Neriah, Z., Flusser, H., Beemer, F.A., Penttinen, M., Olender, T., Rein, A.J., Bach, G., Zeigler, M. (2004)**  
Genomic organisation of the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) and its mutations in mucopolipidosis III.  
*J. Med. Genet* **41**, e52
- Regis, S., Filocamo, M., Corsolini, F., Caroli, F., Keulemans, J.L., van Diggelen, O.P., Gatti, R. (1999)**  
An Asn > Lys substitution in saposin B involving a conserved amino acidic residue and leading to the loss of the single N-glycosylation site in a patient with metachromatic leukodystrophy and normal arylsulphatase A activity.  
*Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 125-130
- Reitman, M.L., Kornfeld, S. (1981)**  
Lysosomal enzyme targeting: N-acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes.  
*J. Bio. Chem.* **256**, 11977
- Rijnboutt, S.; Aerts, H.M.; Geuze, H.J.; Tager, J.M.; Strous, G.J. (1991a)**  
Mannose 6-phosphate-independant membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 4862-4868
- Rijnboutt, S.; Kal, A.J.; Geuze, H.J.; Aerts, H.M.; Strous, G.J. (1991b)**  
Mannose 6-phosphate-independant targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 23586-23592
- Robey, P.G.; Neufeld, E.F. (1982)**  
Defective phosphorylation and processing of  $\beta$ -Hexosaminidase by intact cultured fibroblasts from patients with mucopolipidosis III.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **213**, 251-257
- Rohrer, J., Kornfeld, R. (2001)**  
Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network.  
*Mol. Biol. Cell.* **12**, 1623-1631
- Sahagian, G.G.; Distler, J.; Jourdian, G.W. (1981)**  
Characterization of a membrane associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular  $\beta$ -galactosidase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4289-4293
- Sahagian, G.G.; Neufeld, E.F. (1983)**  
Biosynthesis and turnover of the mannose-6-phosphate receptor in cultured chinese hamster ovary cells.  
*J. Biol. Chem.* **258**, 7121-7128
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988)**  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
*Science* **239**, 487-491
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977)**  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467
- Schmid, S.; Fuchs, R.; Kielian, M.; Helenius, A.; Mellmann, I. (1989)**  
Acidification of endosome subpopulations in wild-type chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants.  
*J. Cell Biol.* **108**, 1291-1300

- Sleat, D.E.; Lobel, P. (1997)**  
Ligand Binding Specificities of the Two Mannose 6-Phosphate Receptors.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 731-738
- Sloane, B.F., Moin, K., Sameni, M., Tait, L.R., Rozhin, J., Ziegler, G. (1994)**  
Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene.  
*J. Cell. Sci.* **107**, 373-384
- Smith, E.; Warren, G. (1991)**  
The mechanism of receptor-mediated endocytosis.  
*Eur. J. Biochem.* **202**, 689-699
- Steet, R.A., Hullin, R., Kudo, M., Martinelli, M., Bosshard, N.U., Schaffner, T., Kornfeld, S., Steinmann, B. (2005)**  
A splicing mutation in the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in an adult onset form of mucopolysaccharidosis III associated with sensory neuropathy and cardiomyopathy.  
*Am. J. Med. Genet.* **132**, 369-375
- Stein, M.; Braulke, T.; Krentler, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987a)**  
46-kDa mannose-6-phosphate-specific receptor: purification, subunit composition, chemical modification.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 927-936
- Stein, M.; Braulke, T.; Krentler, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987b)**  
46-kDa mannose-6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 413-418
- Storch, S., Braulke, T. (2001)**  
Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contributes to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3.  
*J. Biol. Chem.* **276**: 4298-4303
- Storch, S., Braulke, T. (2005)**  
Transport of lysosomal Enzymes.  
in *Lysosomes* (Saftig/Eurekah, Landes Bioscience)
- Tanaka, J., Gasa, K., Miyazaki, T., Kasai, M., Makita, A. (1992)**  
Characterization of the subunits and sugar moiety of human placental and leukemic  $\beta$ -glucuronidase.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**, 57-62
- Tapper, H.; Sundler, R. (1990)**  
Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion.  
*Biochem. J.* **272**, 407-414
- Thomas G.H.; Tiller, G.E.; Reynolds, L.W. et al. (1976)**  
Increased levels of sialic acid associated with sialidase deficiency in I-cell disease fibroblasts.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 188-195
- Tiede, S., Cantz, M., Raas-Rothschild, A., Muschol, N., Burger, F., Ullrich, K., Braulke, T. (2004)**  
A Novel Mutation in UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase Gamma Subunit (GNPTAG) in Two Siblings with Mucopolysaccharidosis Type III Alters an Used Glycosylation Site  
*Hum. Mutat.* **24**, 535
- Tiede, S., Muschol, N., Reutter, G., Cantz, M., Ullrich, K., Braulke, T. (2005a)**  
Missense Mutations in N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$  Subunit Gene in a Patient with Mucopolysaccharidosis III and a Mild Clinical Phenotype.  
in *Revision*

- Tiede, S., Storch, S., Henrissat, B., Lübke, T., Raas-Rothschild, A., Braulke, T. (2005b)**  
Mucopolipidosis II is caused by mutations in MGC4170 gene encoding the  $\alpha/\beta$  GlcNAc-1-phosphotransferase.  
*in Revision*
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)**  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354
- Tsiakas, K., Steinfeld, R., Storch, S., Ezaki, J., Lukacs, Z., Kominami, E., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. (2004)**  
Mutation of the glycosylated asparagines residue 286 in human CLN2 protein results in loss of enzymatic activity.  
*Glycobiology* **14**, 1C-5C
- Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Groener JE, Lugowska A. (2002)**  
Clinical variability in mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy).  
*Am. J. Med. Genet.* **108**, 214-218
- Tzeng, Y.L., Noble, C., Stephens, D.S. (2003)**  
Genetic basis for biosynthesis of the (alpha 1-->4)-linked N-acetyl-D-glucosamine 1-phosphate capsule of *Neisseria meningitidis* serogroup X.  
*Infect Immun.* **71**, 6712-6720
- Varki, A.P.; Kornfeld, S. (1981)**  
Purification and characterization of rat liver GlcNAc-Phosphodiesterase.  
*J. Biol. Chem.* **256**, 9937-9943
- Varki, A.P.; Reitmann, M.L.; Kornfeld, S. (1981)**  
Identification of a variant of mucopolipidosis III: a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7773-7777
- von Figura, K.; Hasilik, A. (1986)**  
Lysosomal enzymes and their receptors.  
*Ann. Rev. Biochem.* **55**, 167-193
- Wada, R., Tiffit, C.J., Proia, R.L. (2000)**  
Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoo disease and is suppressed by bone marrow transplantation.  
*PNAS* **97**, 10954-10959
- Ward, C., Singh, R., Slade, C., Fensom, A.H., Fahmy, A., Semrin, A., Sjovall, A., Talat, A., Hasilik, A., Klein, I., et al. (1993)**  
A mild form of mucopolipidosis type III in four Baluch siblings.  
*Clin. Genet.* **44**, 313-319
- Warner, J.B., Thalhauser, C., Tao, K., Sahagian, G.G. (2002)**  
Role of n-Linked Oligosaccharide Flexibility in Mannose Phosphorylation of Lysosomal Enzyme Cathepsin L.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 41897-41905
- Waheed, A., Hasilik, A., von Figura, K. (1982)**  
UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Partial purification and characterization of the rat liver Golgi enzyme.  
*J. Biol. Chem.* **257**, 12322-12331

- Walkley, S.U., Thrall, M.A., Dobrenis, K., Huang, M., March, P.A., Siegel, D.A., Wurzelmann, S. (1994)**  
Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 2970-2974
- Wendland, M., Waheed, A., Schmidt, B., Hille, A., Nagel, G., von Figura, K., Pohlmann, R. (1991)**  
Glycosylation of the  $M_r$  46,000 mannose 6-phosphate receptor. Effect on ligand binding, stability, and conformation.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 4598-4604
- Whelan, D.T.; Chang, P.L.; Cockshott, P.W. (1983)**  
Mucopolipidosis II. The clinical, radiological and biochemical features in three cases.  
*Am. J. Med. Gen.* **38**, 111-131
- Wrobe, D., Henseler, M., Huettler, S., Pascual, S.I., Chabas, A., Sandhoff, K. (2000)**  
A non-glycosylated and functionally deficient mutant (N215H) of the sphingolipid activator protein B (SAP-B) in a novel case of metachromatic leukodystrophy (MLD).  
*J. Inherit. Metab. Dis.* **23**, 63-76
- Vellodi, A. (2004)**  
Lysosomal storage disorders.  
*Br. J. Haematol.* **128**, 413-431
- Yamashita, K., Ohkura, T., Ideo, H., Ohno, K., Kanai, M. (1993)**  
Electrospray ionization-mass spectrometric analysis of serum transferring isoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome.  
*J. Biochem.* **114**, 766-769
- Zhu, Y.; Conner, G.E. (1994)**  
Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 3846-3851

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäuren
A. bidest / dH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ASA	Arylsulfatase A
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
ConA	Concanavalin A
c.p.m.	counts per minute (Impulse pro Minute)
CtsD	Cathepsin D
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ø	Durchmesser
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Reticulum
FKS	fötales Kälberserum
GNPTA	GlcNAc-Phosphotransferase, $\alpha/\beta$ -Untereinheiten
GNPTAG	GlcNAc-Phosphotransferase, $\gamma$ -Untereinheit
h	Stunde
HeLa	humane Tumorzelllinie
HEPES	N-[Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	horseradish peroxidase
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
k.o.	Knock out
LB	liquid broth
min	Minute
M6P	Mannose-6-Phosphat
ML	Mukolipidose
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
MS-MALDI-TOF	Mass spectrometry - matrix assisted laser desorption

## Abkürzungsverzeichnis

---

	ionization - time of flight
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMP-BSA	Pentamannose 6-Phosphat gebunden an BSA
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nerven System

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

## 9 ANHANG

### 9.1 Oligonucleotide (Primer)

Für Klonierung und Sequenzierung benutzte Oligonucleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

a) Primer zur *GNPTAG*-Exon-Amplifikation und Sequenzierung:

1-2 <i>for</i>	5'-GTCACGTGACCGTCACTTCAC-3'	
1-2 <i>rev</i>	5'-AGGCTGCTCACCCAAACGCGT-3'	.....253 kb
3 <i>for</i>	5'-AGGTGCAGCGAAGATGAAGGT-3'	
3 <i>rev</i>	5'-GTCACTCATCCATCCTCCAC-3'	.....267 kb
4-7 <i>for</i>	5'-CAGACAGGTTCTGTGCTTGG-3'	
4-7 <i>rev</i>	5'-GGACACAGATGGCATGAGG-3'	.....659 kb
8-9 <i>for</i>	5'-CTGAGCCTGGCTTCTCTTGG-3'	
8-9 <i>rev</i>	5'-GAGTTCAAGGGAAAGCCCAG-3'	.....384 kb
10-11 <i>for</i>	5'-CTGGGCTTTCCCTTGAAGTC-3'	
10-11 <i>rev</i>	5'-GTCCTACCAGCCAGCTTCTC-3'	.....367 kb

b) Primer zur *MGC4170*-Exon-Amplifikation und Sequenzierung:

1 <i>for</i>	5'-TGAATGGCGGCTCGCTGAGGC-3'	
1 <i>rev</i>	5'-CTGGGCAACATGGCAAAACCC-3'	.....310 kb
2 <i>for</i>	5'-GAAAGTTATATACTCTTAGTC-3'	
2 <i>rev</i>	5'-TGCTAATGAGAACACATCAGA-3'	.....260 kb
3 <i>for</i>	5'-ACACCTGGGTGAATGGCACAG-3'	
3 <i>rev</i>	5'-TGAGCCACCATGCCTGGCCTG-3'	.....210 kb
4 <i>for</i>	5'-TACAGTGGGAGGTATAGTAGC-3'	
4 <i>rev</i>	5'-CTATGCACTCAGCACTGCAAA-3'	.....230 kb
5 <i>for</i>	5'-AGCTTCTCATTGCTGATTA-3'	
5 <i>rev</i>	5'-TCAAACATCCAATGATAACAT-3'	.....280 kb
6-7 <i>for</i>	5'-CATAGTTGAGTATTCATTA-3'	
7 <i>rev</i>	5'-GTAAGGAGTGAGGCTCTTCTG-3'	.....640 kb
8-10 <i>for</i>	5'-CTTCATCCTTGAGATTCAGTC-3'	
10 <i>rev</i>	5'-GCTAAGTGACTTCCACGCTAG-3'	.....1230 kb
11 <i>for</i>	5'-TGTATCAGAAGCCAGAAGTCA-3'	
11 <i>rev</i>	5'-TAGCACATGTTCAATAATGAT-3'	.....230 kb
12 <i>for</i>	5'-ACTGTCTTTCAAATTTGTAAT-3'	
12 <i>rev</i>	5'-TCTCTCTACCTGTCAAGGATG-3'	.....300 kb
13 <i>for</i>	5'-ATCATGTTTCTGTTTTTTCCT-3'	
13 <i>rev</i>	5'-AATGAAACCATGTAAGAAAAG-3'	.....1240 kb
14-15 <i>for</i>	5'-CTAAACATAATGCTGAGTTAC-3'	
15 <i>rev</i>	5'-CGTGTTGCCAGGTTGGTCTC-3'	.....810 kb
16 <i>for</i>	5'-CACAGTCATTACTTACAATGC-3'	
16 <i>rev</i>	5'-AAAGACATATAAAACCATAGA-3'	.....260 kb

---

17-18 <i>for</i>	5'-AGTTTCAGCTCTGATGTGATA-3'	
18 <i>rev</i>	5'-CTACTCCCTTCTTTCCAGTCC-3'	.....540 bp
19 <i>for</i>	5'-AGGTCAGGATTATCCATATGT-3'	
19 <i>rev</i>	5'-CATGTATACTCACCACAC-3'	.....240 bp
20 <i>for</i>	5'-CCATATACAGAAGTACATAGT-3'	
20 <i>rev</i>	5'-CTAGTATACCAAGAAATACCA-3'	.....180 bp
21 <i>for</i>	5'-TTCTTTCATCAACGTGAGAA-3'	
21 <i>rev</i>	5'-GACATCTCTGTGAAGCTGAGT-3'	.....170 bp

c) Primer zur Quantifizierung der *GNPTAG* mittels quantitativer PCR Analyse:

<i>GNPTAG-for</i>	5'-GCAGCGGCAGTGGGACCAGGT-3'
<i>GNPTAG-rev</i>	5'-TCCACCTCTGCTCTCCACCA-3'
<i>β-Actin for</i>	5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'
<i>β-Actin rev</i>	5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'

d) Primer zur Klonierung eines GST-GNPTAG-Fusionsprotein

<i>GST-GNPTAG-for</i>	5'-TTCCCGGGTCATGGCGGCGGGGCT-3'
<i>GST-GNPTAG-rev</i>	5'-AGCGGCCGCAAACCTCCACGCAGT-3'

e) Primer zur Klonierung eines 6His-GNPTAG-Fusionsprotein

6His-*for* 5'-CCATGGCGGCGGGGCTGGCGCGG-3'

6His-*rev* 5'-GGGGTACCTCAATGATGATGATGATGATGCAAACCTCCACGCA  
GTCCTGG-3'

f) Primer zur Mutagenese der *GNPTAG*-cDNA (c.347\_349delACA)

<i>PT for</i>	5'-CACCATGGCGGCGGGGCTGGCGCGG-3'
<i>PT rev</i>	5'-TCACAAACTCCCACGCAGTCCTGGGTC-3'
<i>ACA-del for</i>	5'-TCGCCAACACTTTCACGGGCATGTGGA-3'
<i>ACA-del rev</i>	5'-CCGTGAAGGTGTTGGCGATCTCCCACT-3'

## 9.2 Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der GNPTAG

GTAGAGCGCAGGTGCGCGGCTCGATGGCGGCGGGGCTGGCGGGCTCCTGTTGCTCCTCGGGCTCTCGGCCGGCG	75
<u>M A A G L A R L L L L L G L S A G</u>	17
GGCCCCGCGCCGGCAGGTGCAGCGAAGATGAAGGTGGTGGAGGAGCCCAACGCGTTTGGGGTGAACAACCCGTTCT	150
<u>G P A P A G A A K M K V V E E P N A F G V N N P F</u>	42
TGCCTCAGGCCAGTCGCCTCCAGGCCAAGAGGGATCCTTCACCCGTGTCTGGACCCGTGCATCTCTCCGACTCT	225
<u>L P Q A S R L Q A K R D P S P V S G P V H L F R L</u>	67
CGGGCAAGTGCTTCAGCCTGGTGGAGTCCACGTACAAGTATGAGTTCTGCCCGTTCCACAACGTGACCCAGCAGC	300
S G K C F S L V E S T Y K Y E F C P F H <u>N V T</u> Q H	92
AGCAGACCTTCGCGTGAACGCCTACAGTGGGATCCTCGGCATCTGGCAGGAGTGGGAGATCGCCAACAACACCT	375
E Q T F R W N A Y S G I L G I W H E W E I A <u>N N T</u>	117
TCACGGGCATGTGGATGAGGGACGGTGACGCCTGCCGTTCCCGGAGCCGGCAGAGCAAGGTGGAGCTGGCGTGTG	450
F T G M W M R D G D A C R S R S R Q S K V E L A C	142
GAAAAAGCAACCGGCTGGCCCCATGTGTCCGAGCCGAGCACCTGCGTCTATGCGCTGACGTTTCGAGACCCCCCTCG	525
G K S N R <u>L A H V S E P S T C V Y</u> A L T F E T P L	167
TCTGCCACCCCCACGCTTGTAGTGTACCCAACCTGCCAGAGGCCCTGCAGCGGCAGTGGGACCAGGTAGAGC	600
V C H P H A L L V Y P T L P E A L Q R Q W D Q V E	192
AGGACCTGGCCGATGAGCTGATCACCCCCAGGGCCATGAGAAGTTGCTGAGGACACTTTTGGAGGATGCTGGCT	675
Q D L A D E L I T P Q G H E K L L R T L F E D A G	217
ACTTAAAGACCCCAGAAGAAAATGAACCCACCCAGCTGGAGGGAGGTCCCTGACAGCTTGGGGTTTGAGACCCCTGG	750
Y L K T P E E N E P T Q L E G G P D S L G F E T L	242
AAAAGTGCAGGAAGGCTCATAAAGAACTCTCAAAGGAGATCAAAAAGGCTGAAAGGTTTGTCTCACCCAGCACGGCA	825
E N C R K A H K E L S K E I K R L K G L L T Q H G	267
TCCCCTACAGAGGCCACAGAAACTTCCAAGTGGAGCACTTGGCCACGAGACGCCAGAGCCAAGTCTCCAG	900
I P Y T R P T E T S N L E H L G H E T P R A K S P	292
AGCAGCTGCGGGGTGACCCAGGACTGCGTGGGAGTTTGTGACCTTGTGGTGGGAGAGCAGAGGTGGACGCGGCCG	975
E Q L R G D P G L R G S L *	305
AGAGCCCTACAGAGAAGCTGGCTGGTAGGACCCGAGGACCAGCTGACCAGGCTTGTGCTCAGAGAAGCAGACAA	1050
AACAAAGATTCAAGGTTTAAATTAATTCCCATACTGATAAAAAATAACTCCATGAATTCTGTAAACCATGCATAA	1125
ATGCTATAGTGTAAAAAAATTTAAACAAGTGTTAACTTTAAACAGTTCGCTACAAGTAAATGATTATAAAATACTA	1200
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1219

Nucleotid- und abgeleitet Aminosäuresequenz der humanen GlcNAc-Phosphotransferase  $\gamma$ -Untereinheit-cDNA. Die Proteinsequenz ist unter der DNA-Sequenz angegeben. Ein putatives Signalpeptid ist durch den gepunkteten Unterstrich gekennzeichnet. Homologe Sequenzen zur bovinen  $\gamma$ -Untereinheit sind durch einfachen Unterstrich gekennzeichnet. Zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen sind doppelt unterstrichen.

### 9.3 Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der GNPTA (MGC4170)

CGGGCCGGCGGGAGCCGAGCGGGGCGTCCGTCGCGGAGCTGCAATGAGCGGGCGCCCGAGGGTGTGACCTGCGCGCGGGGGCCGACCGGGGCGCCCTGAATGGCGGGC	110
TGCGTGTAGGCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGCTCAGGCTCCTCGGGGCGGTGGCGTGGCGGTGAAGGGGTGATGCTGTTCAAGCTCCTGCAGAGACAGACCTATACCTGCCT	220
M L F K L L L Q R Q T Y T C L	
GTCCACAGATATGGGCTTACGCTGTGCTTGGGCGTCTGTCCACATCTGCTCCGCTTCAGTTCGGAGAGGTGGTCTGGAATGGAGCCGAGATCAATACCATG	330
E L L K E L Q Q V R E Q M E E E Q K A M R E T L G K N T T E P T K K S B K	
Q F G E V V L E W S R D Q Y H	
TTTTTTTGTATTCTATAGAGACAAATATTGCTGGAAAGTCTTTCAGAAATCGCTTTGCTGCGCATCCGGATTCAGCTTTGTTACACCTGGGTAATGGCACAGATCTT	440
V L F D S Y R D N I A G K S F Q N R L L C L P M F I D V V Y L T W N G T D L	
GAACTCTGAAGCACTACAGCAGGTGAGAGACAGATGGAGGAGGAGCAGAAGCAATGAGAGAAATCCTTGGGAAAAACACACGGAACTACTAAGAAGA GTGAGAA	550
E L L K E L Q Q V R E Q M E E E Q K A M R E T L G K N T T E P T K K S B K	
Q F G E V V L E W S R D Q Y H	
CGACTTAGAGTCTTTCAGCACTGATTAAGGTGCCAATCTTCTGCTGACCCAGCCCTGCCAGCCACATCACCTGAAGGACCTGCCATCTTTCCTTCTT	660
Q L E C L L T H C I K V P M L L V L D P A L P A N I T L K D L F S L Y F S	
TCATCTGCGCAGTACATTTCAAGTTCGAAAACAAAAACCTTCTACCAATGCTCAGTTGTGTGTTTTGACAGTACTAAGATGTTGAAGATGCCACTCTGGA	770
F H S A S D I F N V A K P K N E S T N V S V V V F D S T K D V E D A H S G	
CTGCTTAAAGAAAATAGCAGACAGACAGATGGAGGGGCTACTTGCACACAGATAAAGAAGTCCCTGGATTAGTCTAATGCAAGATTGGCTTTCCTGAGT GGATTTCC	880
L L K G N S R Q T V W R G Y L L T D K E V P G L V L M Q D L A F L S G F P	
ACCAACATCAAGAAAACAAATCAACTAAAAACAAATGGCCAGAAAATCTTCCCTCAAAGTCAAAGTCTGCGAGTTGATTCAGAGCCGAGTACGCTCTTCAAAC	990
P T F K E T N Q L K T K L P E N L S S K V K L L Q L Y S E A S V A L L K	
TGAATAACCCAAAGATTTTCAAGAAATGAATAAGCAAACTAAGAAGAACAATGACCATGATGGAAAAGAACTGACCAATAGTCCCTGCATATTTATGGGATCTGAGC	1100
L N N P K D F Q E L N K Q T K K N M T I D G K E L T I S P A Y I L W D L S	
GCCATCAGCCAGTCAAGCAGGATGAAGACATCTCGCCAGCTCGTTTGAAGATAACGAAGAAGTACGAGTACTCATTGCGATCTATCGAGAGGATCGACCA TGGTTCG	1210
A E S Q S I S A S R F E D N E E L R Y S L R S I E R H A S I A N K W K T I H L	
GAATATTTTCAATGTCACCAAGGGGAGATTTCCATCTGGCTGAACCTTGACAAATCTCGAGTGACAATAGTAACACACAGGATGTTTTGCAAAATTTGAGCCACTTGC	1320
N I F I V T N G T I F S F W L N L D N P R V D I E V T H Q D V F E R N L S H R E	
CTACCTTAGTCTCCCTGCTTGAAGTCAGATTTCATCGCATGAAGGCTTCCCGAGAAGTTATTACCTAAATGATGATCTCATGTTGGGAAGGATCTTGCCA	1430
P T F S S P A I E S H I H R I E G L S C Q F F I Y L N D D V M F G K D V M P	
GATGATTTTACAGTCACTCAAAGCCAGAGGTTTATTGACATGCCTGPGCCAACTGCGCAGGGCTGCCAGGTTCCTGGATTAGGATGGCTA TGTGCAAA	1540
D D F Y S H S K D G Q K V Y L T W P V P N C A E G C P G S W I K D G Y C D K	
GCCTCTGATAAATCAGCCTGCGATGGGATGGGATGCTCTGGAAGAGTGGAGGGATCGCTATATTGAGGAGGTGGAGTACTGGGATTTGGAATGGGAC	1650
A C N S A C D W D G D G C S G N S G S R Y I A G G G G T G S I G V G	
AGCCCTGGCAGTTGGGAGGAAATAACAGTCTCTACTGTAATCAGGATGGGAAATCTTGGCTCGCTGATAAGTCTGTGACCAAGATGCAATCTTGTCC	1760
Q P W Q F G V G I N S V S Y C T N Q G C A N S W L A D K F C D Q A C N V L S	
TGTGGGTTGATGCTGGCCAGTGGGCAAGATCATTTTCATGAATGTATAAGTGATCCTCTCCCAAACAGACTCACTATATTTCCAAAAGGTGAATCGCTGCC	1870
C G F D A G D C H E L Y K V I L P N Q T H Y I I P K G E C L P	
TTATTCAGCTTGCAGAAGTAGCCAAAAGAGGAGTTGAAGTGCCTATAGTGACAAATCCAATTCGACATGCTTCTATTGCCAACAGTGAAAACCATTCACCTCA	1980
Y F S F A E V A K R G V E G A Y S D N P I I R H A S I A N K W K T I H L	
TAATGCAGTGGAAATGAATGCCACCAATAACATTTAATCTCAGCTTCAAATCAACAGGATGAAGAGTTCAAAATCGAGATAACAGTGGAGTGGACCAAGGGAG	2090
I M H S G M T N G T I F S F W L N L D N P R V D I E V T H Q D V F E R N L S H R E	
GAACCAAAATGAATTTACAGCCAGAGGTTACGAATAATTTAGTTAGTCCATAACACTTCCTCCAGAGCCGAAATCCCTTTTGGAGATTTCCCAA AGAAAACG	2200
G P K L N S T A Q K G Y E N L V E I T L L P E A E I L F E D I P K E R K	
CTTCCCAAGTTTAAAGACATGATTTAACTCAACAAGGAGCCAGAGGAGGAAATTCCTCCGTAAATATTTCCTCCTCCCAAAGCCGCAAGTGTAGCT	2310
F P K F K R H D V N S T R R A Q E E V K I P L V N I S L L P K D A Q L S	
TCATATCTGGATTGCAACTGGAACATGGACATCACITTTGAAGGATACAATTTGFCCAAGTCAAGCTTGGCTGAGATCATTCTGATGACTCAGAGTCTGATAA	2420
L N T L D L Q L E L H G D I T L K G Y N L S K S A L L R S F L M N S Q H A K	
ATAAAAAATCAAGTATAACAGATGAACAAATGACAGTTGGTGGCTCCACAGGAAACAGGTTTCAATAAAGCATCTTGCACCAAGTCTTGGCAACCTTAGGAGT GTCTGAAA	2530
I K N Q A I I T D E T N D S L V A P Q E K Q V H K S I L P N S L G V S E R	
ATTGCAGAGTTGACTTTTCTGCAAGTGAATAAGTGAATGGTTCATGACCCAGGTCAGAAATCCACCCCTGGACTGGAGACCAAGGATTTAGAGTGGAACTC	2640
L Q R L T G F P A V S V K V N G H D Q G Q N P P L D L E T T A R F R V E T	
ACACCCAAAACATAGCCGGAATGTGACAAAAGAAAAGCCCCATCTCTGATTTGTTCCATGGAAAGCCAGATGACAAAAGAAAAGAAAACACAGGGAAGAAA	2750
H T Q K T I G G N V T K E K P P S L I V P L E S Q M T K E K K I T G K E K	
GAGAACAGTAGAATGGAGAAAATGCTGAAAATCAGATAGCGCTTACTGAAAGTGTACTGGAAAGAGTTCGACATGATAGTTACTTGGGCTT TTTCCCATG	2860
E N S R M E E N A E N H I G S V T E V L L G R K L Q H Y T D S Y L G F L P W	
GGAAAAAAAAGTATTTCAAGATCTTCGAGGAGCAAGCTGATTTGAAGACAAATGGCCTACTGATAGCAAAAATACTGGGAGCAACTAAGACTACAT	2970
E K K Y F L D E F E A E S L K T Q L Y F T D S K N T G R K N T D T	
TGCGATTTCCCTCAGATGTAATAAATTTCAATAGCAAGTTGGATTACATCGCCGAAAGTCCCTGCTCAGTACATGCTCAGATGATGACCGGATTTGTCGAA	3080
F A D S L R Y V N K E G F T S R K V P A H M P H M I D R I V M Q	
GAATGCAAGATGTTCCCTGAAGAATTGACAGAGCTGATTTCAAAAGTGGCCACTTGGAGGATGAGGATTTGGCTTCTTATTTTATATCT CATGAGTGC	3190
E L Q D M F E E F D M F T S F H K S V R H S E D M Q F A F S Y F Y L M S A	
AGTGCAGCCACTGAATATCTCAAGTCTTTGATGAAGTGTATACAGATCAATCTGGTGTCTGTCTGACAGAGAAATCCGCAACACTGGCTACAGAAATCCAGAACTC	3300
V Q P L N I S Q V F D E V D T D Q S G V L S D R E I R T L A T R I H E	
CGTTAAGTTTGCAGGATTTGACAGGCTGGAACACATGCTAATAAATTTGCTCAAAAATGCTTCCCTGATATACCCAGCTAAATAATTTCCACCACTCAGGAATCC	3410
P L S L E T L G L E I N S K M L P A D I T Q L N N I I P P T Q E S	
TACTATGCTCCCAAGCTGCCACCGTCACTAAAAGCTAGTAAACAACTGTAACACAGTAACTGACAAAATCCCAAGCATATAAGGCAAAAACAAATA TAGGTTGA	3520
Y Y D P N L P V T K S L V T N C K P V T D K I H K A Y K D K N K Y R F E	
AATCATGGGAGGAGAAATCGCTTTTAAATGATTCGTACCAAGCTTTCTCATGTTGGCCAGTTGGATGACATAAGAAAACCCCTAGGAAGTTTGTTTGCTGCTGA	3630
I M G E E E I A F K M I R T N V S H V L Q L D D I R K N F R K F V C L	
ATGACAATGACCAATATAAGATGCTCAGAGAGTGAAGGCTGCTTCCAGGACTCTATGAAATCCATGTTCCCATACCTTCCCAATTTGAACTGCAAGAGAG	3740
N D N T D H N B K D A Q T V K R V L R D F Y E S M F P I P S Q F E L P R E	
TATCGAAAACCTTCCCTCATATGATGAGCTGCAAGAAATGAGAGGCTTACGAGACAAATGAAGTTTGGACCCATCTTACTAGCAACATGATAT GTTACTAT	3850
Y R N R L H M H E L Q E W R A Y R D K L K F W T H C V L A T L I M E T I	
ATTCATTTTGGCTGAGCACTTAATGCTCTTAAGCGGAAGATATTTCCCAAGAGGAGTACACAAGAAGTACTCCCAATCGAATCAGATATAGAAGTCTTCA	3960
F S F A E O L I A L K R K I F P R R R I H K E A S P N R I R V ***	
TTTGAACCACTACTCAGCACTTAAACCTCAGCTTCCAGAGATGCTTTGTGATGATGCTTAGCAGTTGGCCGGAAGAGAA AATATCCA	4070
GTACCATGCTGTTTTGGCATGAAATATAGCCACTGACCAAGAAATATTACCAACCCACTGAAAACCTGGTGTGAGCAGCTGTAACCT GATTTTACTTTTAAAGA	4180
ATTTGCTCATGGACCTGTCATCTTTTTATAAAAAAGCTCACTGACAAGAGACAGCTGTTAATTTCCACAGCAATCATTGCAGACTAATTTATTAGGAGAGCCCTATG	4290
CCAGCTGGGAGTGATTGCTAAGAGGCTCCAGTCTTTGCATTTCCAAAGCTTTTGGCTAAAGTTTTGCACCTTTTTTTTTTTCATTTCCCATTTTTTAAGTAGTTACTAAGTTA	4400
ACTAGTTATTCTGCTCTGAGTATAACGAATTTGGGATGCTAAACCTATTTTTATAGATGTTATTTAAATAATGCAGCAATACACCTCTATTGACAAT ACCTAAAT	4510
ATGAGTTTTATTAATTTAAGACTGTAATGGTCTTAAACCACTAATCTACTGAAGAGCTCAATGATTGACATCTGAAATGCTTTGTAATTTAGACTTCAGCCCTAAG	4620
AATGCTATGATTCAGCTGCAGGCTAATTTCAAAGGGCTAGAGTACTACTTACCAGATGTAATTTGTTTTGGAAGTGTACATATCAACAGAAAGTGCCTCATT	4730
TFAGAAATGAGTAGGCTGATGGCAGTGGCAGATTTACAGTGGTCTGTTTAAATCTCATGGTATATCCAGTAGCTATCTCTCAGTTGGTTTTTGA TAGAACAGA	4840
GGCCAGCAACCTTCTTTGAAAAGGCTGGTTAGTAAATTTATGCGAGCCACCTGGTCTTGTACATACATCTCTTGTGCTGTTGTTAGTTTGGTTTTTTTCAAACAAC	4950
CCTCTAAAATGTAAAAACCATGTTTAGCTGACAGCTGACAAAACCTGCCCCAGCCAGATGTGACCCCTCAGCCATCATTTGCCAATCACTGAGAATTAGTTTTTST	5060
TGTTGTTGTTGTTGTTGTTTTGAGACAGAGTCTCTCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGGCTCCCGGGTCAAGCAGT	5170
TCTGCTCAGCCTTCTGAGTAGCTGGACTACAGGTGCATGCCACCACACCTGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTCCACCATATTGGCTCAGGCTTATC	5280
TTGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCTCTGCCTCCAAAGTCTGAGATTACAGGCATAAGCCAGTGCACCCAGCCGAGAATTAGTATTTTATGATGTTTAA	5390
ACTTGGGCTTAGCCATTTTTATGTCATAATACAATGGATTTTGTGAAGAGCAGATCCATGAGTAACCTGCACAGTATTTTATAGATCTTCAACA ATATCTTCTC	5500
CAAAATGGCATACTCTTTTGTACAAGAAGCTTGAATGTAATAACTGTGTTGTGCTGTAAGAGTGTGTTTTCAAAAACTGAAATCTCAATAAAAAGTTAAATTTTTTG	5610
TCTGAAAAAATAAAAAAAAAA 5631	

Nucleotid- und abgeleitet Aminosäuresequenz der humanen MGC4170-cDNA. Die Proteinsequenz ist unter der DNA-Sequenz angegeben. Die eingerahmten Sequenzen stellen Membran-Domänen dar, die unterstrichen zeigen hypothetische N-Glykosylierungs-Stellen. Die dreifach Sterne markieren das Stop-Codon.

## 9.4 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 % / Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	BioRad, München
Coomassie R, Serva Blue	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat (LiAc)	Merck, Darmstadt
Lipofectamin 2000	GIBCO/BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Protein A Agarose	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

## 9.5 Geräte

ABI-Sequenator 337	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA
Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Thermocycler T-Personal	Biometra, München
LighCycler	Roche, Mannheim

Dounce-Homogenisator Drehrad für Eppendorfgefäße	Wheaton, Millville, USA Eigenbau, Werkstatt der Universität Göttingen
Drygalski-Spatel Eismaschine AF 10 Elektrophoresekammern für Agarosegele Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele Filmentwicklungsmaschine Modell Gevomatic 60 Gammastrahlenzähler, 1470 Wizard™ Gefrierschrank –80 °C Geltrockner, Modell Gel Air Dryer Homogenisator Typ Tissue Tearor, Model 985-370 Heizblock Modell Thermostat 5320 Inkubationsschüttler Modell G25 LightCycler Instrument Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Schütt Labortechnik, Göttingen Scotsman BioRad, München Hoefer Scientific Instruments, USA  Agfa-Gevaert, Leverkusen  Wallac, Finnland New Brunswick, Edison BioRad Herkules, USA Biospec Products, France  Eppendorf, Hamburg New Brunswick Sc., Edison Roche Diagnostics, Mannheim Janke & Kunkel, Staufen
<u>Mikroskope:</u> Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100 Zusatzausstattung für das Axiovert 100: DP 50-Kamera Software: Analysis Soft Imaging System Fluoreszenzfilter für das Axiovert 100: Fluorochrom:	Zeiss, Oberkochen  Zeiss, Oberkochen  Olympus, Hamburg  Anregungsfilter: Farbteiler: Emissionsfilter:
FITC, Cy2 Texas-Rot, Cy3 Mikrowellenherd Multipette, Combitips Blot-System, Transphor Typ SE 600 Netzgerät Standard Power Pack P25 Netzgerät EPS 1001 PH-Meter Knick 647 Photometer, Model RS 232 C Sterilbank HS 12 Sterilfilter Minisart NML Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55 Tissue Tearer UV-Handlampe (312 nm und 254 nm) Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450 Vakuum Konzentrator Model Speed Vac SPD 111V Vortex-Genie Wasserbad Typ HOR 7225	BP 450-490      FT 510      LP 515-565 BP 546            FT 580      LP 590 Bosch Eppendorf, Hamburg Hoefer Scientific Instruments, USA Biometra, Göttingen Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Schütt, Göttingen Eppendorf Hamburg Heraeus Osterode Sartorius AG, Göttingen Air Liquide, Frankreich Dremel, USA Bachofer, Reutlingen Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA Vacuubrand, Wertheim  Bender & Hobein AG, Zürich Köttermann, Häningsen

Zentrifugen:

Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Hanau
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, Newtown, Conneticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products, Newtown, Conneticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Du Pont OTD SOB	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
<u>Rotoren für die Minifuge:</u>	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
<u>Rotoren für die Sorvall-Zentrifugen:</u>	
SS-34	Eppendorf Hamburg
SLA-3000	Eppendorf Hamburg
<u>Rotoren für die Ultrazentrifugen:</u>	
S 100 AT4, S55S, SW55	Kendro Laboratory Products, Newtown, Conneticut USA

## 9.6 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm <sup>2</sup>	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen, Ø 36, 60 und 100 mm	Greiner, Nürtingen
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Linspapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulose Blotting Membrane	BioRad, München
0,2 µm	
Objektträger und Deckgläser	Menzel Gläser
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Dasse
Whatman GB003-Papier, extra dick	Schleicher & Schüll, Dassel
<u>Zentrifugenbecher:</u>	
SS-34 Polypropylen	Nalgene, München
JA-10 Polypropylen	Nalgene, München

## Veröffentlichungen

- Muschol, N., Matzner, U., Tiede, S., Gieselmann, V., Ullrich, K., Braulke, T. (2002)**  
Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages.  
*Biochem. J.* **368**, 845-853
- Tiede, S., Cantz, M., Raas-Rothschild, A., Muschol, N., Burger, F., Ullrich, K., Braulke, T. (2004)**  
A Novel Mutation in UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase Gamma Subunit (GNPTAG) in Two Siblings with Mucopolipidosis Type III Alters an Used Glycosylation Site.  
*Hum. Mutat.* **24**, 535
- Tiede, S., Cantz, M., Muschol, N., Bürger, F., Ullrich, K., Braulke, T. (2004)**  
Molecular Analysis of N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase in Fibroblasts of Mucopolipidosis Type III Patients.  
*Acta Paediatr.* **93**, wird gedruckt
- Tiede, S., Muschol, N., Reutter, G., Cantz, M., Ullrich, K., Braulke, T. (2005a)**  
Missense Mutations in N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase  $\alpha/\beta$  Subunit Gene in a Patient with Mucopolipidosis III and a Mild Clinical Phenotype.  
*in Revision*
- Tiede, S., Storch, S., Henrissat, B., Lübke, T., Raas-Rothschild, A., Braulke, T. (2005b)**  
Mucopolipidosis II is caused by mutations in MGC4170 gene encoding the  $\alpha/\beta$  GlcNAc-1-phosphotransferase.  
*in Revision*
- Tiede, S., Muschol, N., Yaghootfam, A., Journet, A., Gieselmann, V., Ullrich, K., Braulke, T. (2005c)**  
Mannose 6-Phosphate-independent Transport of Lysosomal Enzymes in Macrophages. Expression Analysis of N-Acetylglucosamine 1-Phosphotransferase.  
*eingereicht*

## Vorträge

- Tiede, S., Cantz, M., Muschol, N., Bürger, F., Ullrich, K., Braulke, T. (2003)**  
Molecular Analysis of N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase in Fibroblasts of Mucopolipidosis Type III Patients.  
Vortrag beim: 14<sup>th</sup> European Study Group on Lysosomal Diseases Workshop, Pödebrady, Tschechische Republik
- Tiede, S., Cantz, M., Muschol, N., Bürger, F., Ullrich, K., Braulke, T. (2004)**  
Molecular Analysis of N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase in Fibroblasts of Mucopolipidosis Type III Patients.  
Vortrag beim: 8. Internationalen Symposium über Mukopolysaccharidosen und andere Speicherkrankheiten, Mainz

## **Danksagung**

Prof. Dr. Thomas Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas und für die kollegiale Unterstützung dieser Arbeit danken.

Bei Prof. Dr. Lothar Renwantz möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Bei Dr. Thomas Weimar und Thies Köhli, von der MU Lübeck, möchte ich mich für die Bereitstellung des BIAcore Gerätes und für ihre Hilfe bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Annick Raas-Rothschild von der Hadassah University Medical Center, Israel, bei Prof. Dr. Bernard Henrissat von der CNRS, Universités Aix-Marseille I & II, Frankreich, bei Prof. Dr. Michael Cantz, der Universität Heidelberg und besonders bei einer, von ML III betroffenen, Familie bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Kurt von Figura der Universität Göttingen, der diese Arbeit aus der Distanz mitverfolgte und durch seine Diskussionen und Hilfestellungen bereicherte.

Prof. Dr. Bernd Meyer möchte ich für die Aufnahme als Stipendiat in das Graduiertenkolleg 464 „Glykokonjugate“ und Prof. Dr. Hans-Joachim Seitz für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 336 „Endokrinologie“ als Kollegiat danken.

Danken möchte ich weiterhin Nicola Ott, Sandra Oesterreicher, Sandra Pohl, Bettina Koch, Stephan Storch, Bernd Kübler, Franziska Stellmer, Inke Stange, Juliane Bergmann, Adrian Meder und Chris Mühlhausen für 3 Jahre Motivation.

## Lebenslauf

<b>Persönliche Information</b>	Geburtsdatum: 25.10.1972 Geburtsort: Lübeck	
<b>Ausbildung</b>	1979 - 1983	Marien Grundschule, Lübeck
	1983 - 1990	Holstentor-Realschule, Lübeck Mittlere Reife
	1990 - 1991 1991 - 1994	Berufsorientierung Dorothea-Schlözer-Fachgymnasium Abitur
	1994 – 1995 1995 - 2001	Grundwehrdienst (Marine, Neustadt i. H.) Ernst-August-Universität, Göttingen Studium der Biologie Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Humangenetik und organische Chemie
	2001 – 2001	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Universität Göttingen Thema: Molekulare Analyse des <i>tctx2</i> -Gens und Evaluation als Kandidaten-Gen für die „Primäre Ziliäre Dyskinesie“ Erlangung des Grades „Diplom-Biologe“ Note „gut“
	2002 – 2005	Promotionsstudiengang Fachrichtung Biologie, Universität Hamburg Doktorarbeit am UKE, Kinderklinik, Abt. Biochemie bei Prof. Dr. T. Braulke Titel: „Synthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungsmarker lysosomaler Enzyme: Molekulare Analyse der UDP- <i>N</i> - Acetylglucosamin:lysosomales Enzym- <i>N</i> -Acetylglucosamin-1 Phosphotransferase“ Erlangung des Grades „ <i>doctor rerum naturalis</i> “ Note „sehr gut, mit Auszeichnung“
	2002 – 2005 2002 – 2005 seit 2005	Stipendiat des Graduiertenkollegs 464 « Glykokonjugate » Kollegiat des Graduiertenkollegs 336 « Endokrinologie » PostDoc-Position am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, Kinderklinik-Biochemie
<b>Sprachkenntnisse</b>	Englisch und Französisch	
<b>EDV-Kenntnisse</b>	Office-Software, Bildbearbeitung	