

**Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Arbeitsbereich
Molekularbiologie des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**

Direktorin: Prof. Dr. med. Ania Carolina Muntau

**Funktion Mannose-6-Phosphat-haltiger Proteine im
Knochenstoffwechsel –
Untersuchungen am *Gnptab*^{c.3082insC}-Mausmodell
(*mus musculus*)**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von**

Kathrin Karkmann

aus Lamstedt

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Professor Dr. rer. nat. Thomas Braulke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Professor Dr. med. Michael Amling

Mündliche Prüfung: 17.08.2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Lysosomen.....	9
1.1.1	Biosynthese lysosomaler Enzyme	10
1.1.2	M6P-abhängiger Transport neu synthetisierter lysosomaler Proteine.....	10
1.1.3	M6P-unabhängiger Transport neu synthetisierter lysosomaler Proteine.....	11
1.1.4	GlcNAc-1-Phosphotransferase	12
1.2	Lysosomale Speichererkrankungen.....	13
1.2.1	Mukopolidose Typ II.....	15
1.2.2	Mukopolidose Typ II – Tiermodelle	17
1.2.3	Knochenphänotyp der <i>Gnptab</i> ^{c.3082insC} Maus	19
1.3	Knochenstoffwechsel.....	20
1.3.1	Osteoklasten.....	21
1.3.2	Osteoblasten.....	22
2.	Fragestellung.....	24
3.	Material und Methoden.....	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Geräte.....	25
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	27
3.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	28
3.1.5	Enzyme zur Modifikation von DNA, RNA und Proteinen	29
3.1.6	Molekulargewichtsmarker	29
3.1.7	Substrate zur Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	29
3.1.8	Puffer und Lösungen	29
3.1.9	Taqman-Assays	29
3.1.10	Kits.....	30
3.1.11	Online-Programme/Datenbanken	30
3.2	Methoden	31

3.2.1	Zellbiologische Methoden	31
3.2.1.1	Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks.....	31
3.2.1.2	Kultivierung und Ausdifferenzierung von Osteoklasten	31
3.2.1.3	Kultivierung von polarisierten Osteoklasten auf Dentin	32
3.2.1.4	Isolierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen aus neonatalen Schädeldächern	33
3.2.1.5	Kultivierung und Ausdifferenzierung von Osteoblasten	34
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.2.1	Herstellung von Zellextrakten	34
3.2.2.2	Konzentrierung von Proteinen.....	35
3.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.2.2.4	Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität	35
3.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	37
3.2.2.6	Western-Blot.....	39
3.2.2.7	Aufreinigung von lysosomalen Proteinen aus Zellkultur-Überständen von Osteoblasten.....	41
3.2.2.8	M6P-Affinitätschromatographie.....	43
3.2.2.9	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silberfärbung.....	44
3.2.2.10	Massenspektrometrie	44
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	46
3.2.3.1	Isolierung von genomischer DNA	46
3.2.3.2	Genotypisierung des <i>Gnptab</i> ^{c.3082insC} -Mausmodells mittels PCR.....	46
3.2.3.3	Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen.....	48
3.2.3.4	Isolierung von mRNA	49
3.2.3.5	Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen	49
3.2.3.6	cDNA-Synthese und Realtime-PCR.....	49
3.2.3.7	Microarray-Analyse.....	51
3.2.4	Immunfluoreszenz und Mikroskopiertechniken.....	53
3.2.4.1	Lektin-Färbung der Resorptionslakunen	53
3.2.4.2	Messung der Dentinresorption von Osteoklasten mittels Konfokalmikroskopie.....	54
3.2.4.3	Ausmessung einzelner Resorptionslakunen von Osteoklasten mittels Konfokalmikroskopie	55

3.2.5	Maushaltung	56
4.	Ergebnisse.....	58
4.1	Analyse der Resorptionsaktivität von MLII-Osteoklasten	58
4.1.1	Resorptionsaktivität von WT- und MLII- Osteoklasten.....	58
4.1.2	Charakterisierung der Resorptionslakunen von WT- und MLII- Osteoklasten	60
4.2	Transkriptionsanalyse kultivierter Osteoblasten	63
4.2.1	Untersuchung der Genexpression lysosomaler Proteine in Osteoblasten	63
4.2.2	Differentielle Genexpression in WT- und MLII-Osteoblasten.....	65
4.2.3	Funktionelle Gruppierung fehlregulierter Gene in WT- und MLII- Osteoblasten.....	67
4.3	Proteomanalyse M6P-haltiger Proteine von Osteoblasten	75
4.3.1	Isolierung von M6P-haltigen Proteinen aus <i>Acp2/Acp5</i> ^{-/-} -Osteoblasten	75
4.3.2	Isolierung M6P-haltiger Proteine aus Zellkulturüberständen von Osteoblasten.....	79
4.3.3	Massenspektrometrische Analysen von sezernierten M6P-haltigen Proteinen aus Osteoblasten	80
5.	Diskussion.....	88
5.1	Analyse der Resorptionsaktivität von MLII-Osteoklasten	88
5.2	Transkriptomanalyse kultivierter Osteoblasten	93
5.3	Proteomanalyse M6P-haltiger Proteine von Osteoblasten	99
6.	Zusammenfassung.....	106
7.	Literaturverzeichnis.....	108
8.	Anhang.....	137
8.1	Microarray-Ergebnisse	137
8.2	Massenspektrometrische Ergebnisse	146
9.	Danksagungen.....	161
10.	Publikationen, Tagungsbeiträge und Preise.....	162
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	163

Abkürzungsverzeichnis

Acp2	<i>acid phosphatase 2</i>
Acp5	<i>acid phosphatase 5</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	Basenpaare
° C	Grad Celsius
C _T	<i>cycle of threshold</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribunucleic acid</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribunucleic acid</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERT	<i>enzyme replacement therapy</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)

EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fötales Kälberserum
FPR	Falsch-Positiv-Rate
Frt-site	<i>Flp-recombinase targets</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC	<i>Inhibitor Cocktail</i>
IL	Interleukin
IPA	<i>ingenuity pathway analysis</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Lamp	<i>lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LoxP-site	<i>locus of crossing over of P1 phage</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
MLII	Mukopolipidose II
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MS	Massenspektrometrie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>NF-κB</i>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OPG	Osteoprotegerin

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSM	<i>peptide spectrum match</i>
PTH	Parathormon
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB-ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SLR	<i>single log ratio</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TGF	<i>transforming growth factor</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TGN	<i>trans-Golgi-Netzwerk</i>
TRAP	<i>tartrate resistant acid phosphatase</i>
UV	Ultraviolett
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
Wnt	<i>wingless ints</i>
WT	Wildtyp

x g x-fache Erdbeschleunigung

-/- Gen-Defizit

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder mit Drei- oder Einbuchstabencode bezeichnet.

Bei einigen Begriffen, wie Blot, Insert, Template usw. wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich ist.

1. Einleitung

1.1 Lysosomen

Eukaryotische Zellen sind in unterschiedliche funktionelle, membranumschlossene Kompartimente unterteilt, die als Organellen bezeichnet werden. Hierzu gehören die Lysosomen. Sie sind durch ein saures Milieu von pH 4,5 gekennzeichnet und enthalten mehr als 50 lysosomale Hydrolasen, die im sauren Milieu ihr Aktivitätsoptimum besitzen (Ohkuma und Poole, 1978; de Duve, 1983). Der niedrige pH-Wert in den Lysosomen wird durch eine V-Typ H^+ -ATPase aufrechterhalten, die in der lysosomalen Membran lokalisiert ist (Cuppoletti *et al.*, 1987). Lysosomen spielen beim intrazellulären Verdau von zellfremden und zelleigenen Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und Polysacchariden, die dem lysosomalen Kompartiment durch Endozytose und Autophagie zugeführt werden, eine zentrale Rolle (de Duve, 1983; Kornfeld und Mellman, 1989). Die Größe, Struktur, Anzahl und Funktion von Lysosomen unterscheiden sich je nach Zelltyp. Neben dem Verdau von Makromolekülen sind Lysosomen auch an anderen Prozessen beteiligt, wie z.B. an der Regulierung von Hormonen und Wachstumsfaktoren (Brix *et al.*, 2001), an der Integrin-vermittelten Migration von Zellen (Rainero und Norman, 2013) sowie an der Reparatur von Plasmamembranen in Epithelzellen (Xu *et al.*, 2012). Die lysosomale Membran enthält Strukturproteine, die die sauren Hydrolasen von der Umgebung isolieren und die Lysosomen vor dem Selbstverdau schützen (Schröder *et al.*, 2010). Andere Membranproteine fungieren als spezifische Transportkanäle, die Ionen und Abbauprodukte aus dem Lysosom zurück ins Zytosol transportieren, wo sie dem Zellstoffwechsel wieder zur Verfügung gestellt werden (Saftig und Klumpermann, 2009). Auf der zytosolischen Oberfläche von Lysosomen befindet sich zudem der *lysosome nutrient sensing* (LYNUS)-Komplex (Settembre *et al.*, 2013). Dieser Komplex reguliert die Aktivität des Transkriptionsfaktors EB (TFEB), der die Biogenese von Lysosomen und Autophagosomen steuert, und passt somit die lysosomale Aktivität der Stoffwechsellage der Zelle an (Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2013).

1.1.1 Biosynthese lysosomaler Enzyme

Die löslichen lysosomalen Enzyme werden, wie andere luminalen Proteine des sekretorischen Systems, an Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Durch eine aminoternale Signalsequenz werden die Polypeptidketten neu synthetisierter Proteine in das ER-Lumen transloziert. Nach der Abspaltung des Signalpeptids werden die neu synthetisierten Proteine *N*-glykosyliert und gelangen über Transportvesikel zum Golgi-Apparat (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Im Gegensatz zu neu synthetisierten lysosomalen Membranproteinen, deren Transport zu den Lysosomen durch Tyrosin- und Dileucin-Sortierungssignale im zytoplasmatischen Teil des Proteins vermittelt wird (Bonifacino und Traub, 2003), wird ein Großteil der luminalen lysosomalen Enzyme Mannose-6-Phosphat-abhängig vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert.

1.1.2 M6P-abhängiger Transport neu synthetisierter lysosomaler Proteine

Im Golgi-Apparat erfolgt zunächst das so genannte *Trimming* der *N*-glykosylierten Proteine, wobei die *N*-Glykane lysosomaler Proteine zu Mannose-reichen Oligosacchariden prozessiert werden. Die *N*-Glykane sekretorischer Proteine werden in weiteren Reaktionen zu komplexen Oligosacchariden umgewandelt. Die Modifikation der Mannose-reichen *N*-Glykane lysosomaler Enzyme mit einem Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rest verhindert hingegen die Prozessierung zum komplexen Typ (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die Synthese des M6P-Rests erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Im *cis*-Golgi befindet sich das Schlüsselenzym *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase), das den Transfer eines *N*-Acetylglucosamin-Phosphat-Rests von UDP-GlcNAc auf die C6-Hydroxylgruppe der Mannose-reichen Oligosaccharide unter Ausbildung eines Phosphodiesters katalysiert. Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) wird der terminale GlcNAc-Rest von einer GlcNAc-1-Phosphodiesterase (*uncovering enzyme*) entfernt und das M6P-Erkennungssignal somit demaskiert (Reitmann und Kornfeld, 1981; Waheed *et al.*, 1981; Pohl *et al.*, 2009a). M6P-Erkennungssignale können von zwei Typen von M6P-Rezeptoren (MPR300 und MPR46) erkannt werden, die die Translokation M6P-haltiger Enzyme in Clathrin-umhüllten Vesikeln vom TGN zum Endosom vermitteln (Braulke und Bonifacino, 2009). Beide MPRs sind Typ I integrale

Membranproteine, die im TGN, in frühen und späten Endosomen sowie auf der Plasmamembran, nicht aber in Lysosomen, zu finden sind (Ghosh *et al.*, 2003). Sie enthalten Sortierungssignale in den zytoplasmatisch lokalisierten C-Termini, die den Transport zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten über zytosolische Adaptorproteine vermitteln (Ghosh *et al.*, 2003). Das Adaptorprotein AP-1 und *Golgi-localized, γ -adaptin ear homology domain, ARF-binding proteins* (GGAs) sind für den Transport der MPR-Komplexe vom TGN zum Endosom in Clathrin-umhüllten Vesikeln verantwortlich (Boman *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2001; Braulke und Bonifacino, 2009). Das endosomale Kompartiment wird in frühe und späte Endosomen unterteilt, die sich in Proteinzusammensetzung, pH-Wert und Funktion unterscheiden. Das so genannte ESCRT-System (*endosomal sorting complex required for transport*) stellt einen Proteinkomplex dar, der die Reifung von frühen zu späten Endosomen beeinflusst. Es kommt zur Bildung von charakteristischen *multivesicular bodies* (MVBs) in den späten Endosomen, die am Abbau von Makromolekülen und an der Sortierung von Proteinen beteiligt sind (Metcalf und Isaacs, 2010; Hanson und Cashikar, 2012). Im absteigenden sauren pH-Milieu der Endosomen dissoziieren die lysosomalen Enzyme von den MPRs, die anschließend zum TGN rezirkulieren, während die MBVs mit den Lysosomen fusionieren (Henne *et al.*, 2011; Hanson und Cashikar, 2012). In Endosomen und Lysosomen wird ein Großteil der lysosomalen Proteine durch proteolytische Prozessierung von Vorläuferproteinen in ihren aktiven Zustand überführt (Guha und Padh, 2008).

Ein kleiner Teil (ca. 10 %) der M6P-haltigen Enzyme entgeht der Bindung an MPRs und wird sezerniert. Über plasmamembranständige MPR300 können diese Enzyme über Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert werden (Dahms *et al.*, 1989; Ghosh *et al.*, 2003).

1.1.3 M6P-unabhängiger Transport neu synthetisierter lysosomaler Proteine

Einige lösliche lysosomale Proteine erreichen Lysosomen unabhängig von MPRs. Das lysosomale Protein β -Glucocerebrosidase wird nicht mit M6P modifiziert, sondern bindet im ER das *lysosomal integral membrane protein 2* (LIMP-2) und wird in diesem Komplex zu den Lysosomen transportiert (Reczek *et al.*, 2007). Zudem sind weitere intrazelluläre Rezeptoren identifiziert worden, die lösliche lysosomale Proteine M6P-

unabhängig binden und zum Lysosom transportieren können (Petersen *et al.*, 1997). Zu diesen Rezeptoren zählen Sortilin (Ni und Morales, 2006; Zeng *et al.*, 2009) und Mitglieder der LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptorfamilie (Nielsen *et al.*, 2007; Derocq *et al.*, 2012).

Einen anderen Transportmechanismus nutzt die *lysosomal acid phosphatase* (LAP) (auch: *acid phosphatase 2* (Acp2)). Sie wird als membranständiges Vorläuferprotein synthetisiert, durch Erkennungssignale im zytoplasmatischen Proteinanteil von Adaptorproteinen erkannt, vom TGN zur Plasmamembran und dann via Endozytose über das Endosom zum Lysosom transportiert, wo die lösliche Acp2 durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird (Braun *et al.*, 1989).

1.1.4 GlcNAc-1-Phosphotransferase

Das Schlüsselenzym bei der Ausstattung löslicher, lysosomaler Proteine mit M6P-Erkennungssignalen ist die GlcNAc-1-Phosphotransferase. Bao *et al.* konnten an Untersuchungen der bovinen GlcNAc-1-Phosphotransferase zeigen, dass das Enzym einen hexameren Komplex bildet, der sich aus jeweils zwei α -, β - und γ -Untereinheiten zusammensetzt und eine molare Masse von 540 kDa aufweist (Bao *et al.*, 1996). Die Untereinheiten werden durch zwei Gene kodiert. Das *GNPTAB*-Gen kodiert die α/β -Untereinheiten, das *GNPTG*-Gen kodiert die γ -Untereinheiten (Raas-Rotschild *et al.*, 2000; Tiede *et al.*, 2005). Das α/β -Vorläuferprotein ist ein *N*-glykosyliertes Typ III-Membranprotein, das aus 1256 Aminosäuren (AS) im Golgi-Apparat durch die Site-1-Protease proteolytisch zwischen AS-928 und AS-929 gespalten und somit in die reife α - und β -Untereinheit prozessiert wird (Kudo *et al.*, 2005; Marschner *et al.*, 2011). Jeweils zwei α - und zwei γ -Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die α - und β -Untereinheiten bilden das katalytische Zentrum der GlcNAc-1-Phosphotransferase (Kudo und Canfield, 2006). Die γ -Untereinheit dagegen ist ein lösliches Glykoprotein, das über Disulfidbrücken Homodimere bildet. Die Funktion der γ -Untereinheit ist noch weitgehend unbekannt. Es wird diskutiert, dass sie an der Stabilisierung des GlcNAc-1-Phosphotransferase-Komplexes beteiligt ist und die Bindung lysosomaler Enzyme beeinflusst (Lee *et al.*, 2007; Pohl *et al.*, 2009b).

1.2 Lysosomale Speichererkrankungen

Unter lysosomalen Speichererkrankungen fasst man eine Gruppe von Erkrankungen zusammen, die sich durch eine Akkumulation von Speichermaterial in Lysosomen verschiedener Gewebezellen auszeichnen. Hierunter fallen mehr als 50 Erkrankungen, die vorrangig autosomal-rezessiv vererbt werden. Insgesamt beträgt die Prävalenz ca. 1:8000 (Meikle *et al.*, 1999; Wraith, 2002; Ballabio und Gieselmann, 2009). Einige lysosomale Speichererkrankungen weisen eine unterschiedliche geographische Häufigkeit auf und sind in bestimmten Bevölkerungsgruppen häufiger anzutreffen.

Mutationen in Genen, die ein lysosomales Enzym, Membranproteine oder andere nicht-enzymatische Proteine wie Cofaktoren kodieren, führen zu einem gestörten Abbau spezifischer Makromoleküle und zu ihrer pathologischen Anreicherung in den Lysosomen. Weiterhin können lysosomale Speichererkrankungen durch Mutationen in Proteinen hervorgerufen werden, die nicht in den Lysosomen lokalisiert sind, sondern z.B. für den Transport neu synthetisierter lysosomaler Proteine zum Lysosom oder für deren Aktivität essentiell sind (Futerman und van Meer, 2004).

Nach Art des Speichermaterials können lysosomale Speichererkrankungen in Mukopolysaccharidosen, Sphingolipidosen, Oligosaccharidosen, Neuronale Ceroid Lipofuszinosen und Mukolipidosen eingeteilt werden. Klassifiziert werden die lysosomalen Speichererkrankungen nach dem beschriebenen Enzymdefekt oder nach dem Speichermaterial, welches in den Zellen angehäuft wird (Futerman und van Meer, 2004). So zeichnen sich die Mukopolysaccharidosen durch die Akkumulation großer Mengen an Glykosaminoglykanen aus, die durch den Defekt von spezifischen Sulfatasen oder Glykosidasen in der Zelle nicht abgebaut werden können.

Gemeinsame klinische Merkmale der meisten Patienten mit lysosomalen Speichererkrankungen sind neurologische Dysfunktionen, Knochendysplasien, Organomegalien (z.B. Hepatosplenomegalie) sowie grobe Gesichtszüge (typisches „Speichergesicht“ mit flacher Nase, hoher Stirn und geschwollenen Augenlidern). Neben den typisch klinisch-morphologischen Charakteristika gehören u.a. röntgenologische Bildgebung mit typischen Knochendysplasien, Nachweis von Oligosacchariden im Urin, eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität verschiedener Hydrolasen im Plasma oder eine Sequenzanalyse des identifizierten Gens zur

Diagnostik. Eine pränatale Untersuchung ist bei einem begründeten Verdacht möglich (Wraith, 2013).

Therapieansätze gibt es bisher erst für wenige lysosomale Erkrankungen. Bei Patienten mit einem singulären Defekt eines löslichen Enzyms, das über Mannose-6-phosphat-Rezeptoren (MPR) transportiert wird, kann eine Enzym-Ersatz-Therapie (*enzyme replacement therapy*, ERT) mit rekombinanten Enzymen intravenös oder intrakraniell zugeführt werden, die das defekte Enzym des Patienten substituieren sollen (Platt und Lachmann, 2009; Katz *et al.*, 2014). Die defekten Zellen sind in der Lage, das zu substituierende Enzym über den plasmamembranständigen MPR300 in die Zelle aufzunehmen und zu dem Lysosom zu transportieren (Platt und Lachmann, 2009). Unter ERT konnten so z.B. Blutbildveränderungen und Organomegalien beim Typ 1 des Morbus Gaucher erfolgreich reduziert werden (Barranger und O'Rourke, 2001). Die extern zugeführten Enzyme können aufgrund fehlender Transportprozesse die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, weshalb die neurologischen Symptome durch eine ERT meist nicht behandelt werden können (Urbanelli *et al.*, 2011). Obwohl individuelle Dosisanpassungen erforderlich sind, um bei den Patienten vergleichbare Effekte zu erzielen (Barranger und O'Rourke, 2001), sprechen selbst mit hohen Dosen, die über eine lange Zeit verabreicht werden, Knochen-, Skelettmuskel- und Lungengewebe nicht in gleicher Weise auf eine ERT an wie die viszerale Organe (Wraith, 2006; Lachmann, 2011). Als weitere Therapieoption kommt z.B. beim α -L-Iduronidase-Mangel bzw. Hurler-Syndrom die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder Nabelschnurblut in Frage, was zu einer Produktion funktionsfähiger Enzyme durch Donor-Stammzellen führen soll (Beck, 2010; Urbanelli *et al.*, 2011). Auch durch die Transplantation konnte keine Besserung des Knochenphänotyps erreicht werden (Beck, 2010). Weitere neue Ansätze zur Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen sind die Subtraktionsreduktionstherapie, die pharmakologische Chaperon-Therapie oder die Gentherapie, die zum Teil noch in klinischer Erprobung sind bzw. bisher nur im Tierversuch durchgeführt wurden (Beck, 2010; Urbanelli *et al.*, 2011).

1.2.1 Mukopolidose Typ II

Mukopolidose II (MLII) ist eine seltene lysosomale Stoffwechselerkrankung, die durch Mutationen im *GNPTAB*-Gen hervorgerufen und autosomal-rezessiv vererbt wird. In Portugal (1:123.500), Japan (1:252.500), den Niederlanden (1:625.000) und einigen Regionen Kanadas (nordöstliche Region von Québec 1:6184) sind höhere Prävalenzen beschrieben (Okada *et al.*, 1985; Poorthuis *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2004; Plante *et al.*, 2008). MLII wird auch als *I-cell-disease* bezeichnet, da in mesenchymalen Zellen von Patienten zytoplasmatisches Speicherematerial in Form von so genannten *inclusion bodies* nachgewiesen werden konnte (Leroy *et al.*, 1972). Insgesamt sind über 100 Mutationen im *GNPTAB*-Gen beschrieben, die zu dieser Erkrankung führen (Cathey *et al.*, 2010; siehe auch *Human Gene Mutation Database Website HGMD*, <http://www.hgmd.org/>). Die schwere Form von MLII wird durch *Nonsense*- oder *Frameshift*-Mutationen verursacht. Die betroffenen Kinder versterben meist in den ersten 10 Lebensjahren an kardiopulmonalen Komplikationen. *Missense*-Mutationen im *GNPTAB*-Gen können dagegen zu einem weniger schweren Phänotyp, MLIII α/β , führen. In diesen Fällen ist noch eine Restaktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase vorhanden, wodurch unterschiedliche Anteile der lysosomalen Enzyme noch mit M6P-Resten versehen werden (Tiede *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2006).

Aufgrund des vollständigen Fehlens der Enzymaktivität der GlcNAc-1-Phosphotransferase bei MLII wird kein Mannose-6-phosphat-(M6P)-Erkennungssignal an lysosomale Proteine synthetisiert, was zu einer massiven Fehlsortierung der Enzyme in den Extrazellulärraum führt (Wiesmann *et al.*, 1971). Im Blutplasma von Patienten können erhöhte Enzymaktivitäten lysosomaler Hydrolasen nachgewiesen werden, sodass diese Analysen zur Diagnostik der Erkrankung herangezogen werden (Fuller *et al.*, 2011). Intrazellulär führt der generelle Mangel an M6P-haltigen Enzymen vor allem in Zellen mesenchymalen Ursprungs zur Akkumulation von Makromolekülen (Leroy *et al.*, 1972; Pazzaglia *et al.*, 1989; Fuller *et al.*, 2011; Braulke *et al.*, 2013). MLII-Patienten zeigen schon in der pränatalen Ultraschall-Untersuchung Wachstumsverzögerungen, kurze Femora, auffällige Epiphysen-Tüpfelung sowie unregelmäßig mineralisierte Metaphysen (Babcock *et al.*, 1986; Türker *et al.*, 2005; Cathey *et al.*, 2010). Bei der Geburt sind sie klein und untergewichtig (Braulke *et al.*, 2013). Perinatal kann es zu einem letalen

Verlauf kommen, was früher als Pacman-Dysplasie bezeichnet wurde, heute aber als pränatale Manifestationsform der MLII angesehen wird (Shohat *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2003; Saul *et al.*, 2005; Unger *et al.*, 2005). Wenn die Erkrankung nicht schon bei der Geburt erkannt wird, kommt es meist spätestens ab dem 6. Lebensmonat zu augenscheinlichen klinischen Symptomen, die zur Diagnose führen (Braulke *et al.*, 2013). Die Patienten sind im Wachstum verzögert und werden meist nicht größer als 90 cm. Das Wachstum kommt ab dem 2. Lebensjahr zum Stillstand. MLII-Patienten entwickeln charakteristische Gesichtszüge wie eine hohe Stirn, doppelte Lidfalten, geschwollene Augenlider, eine kleine Nase mit breiter, flacher Nasenwurzel, Gingivahyperplasie und Makroglossie. Typisch sind eine Hepatomegalie und umbilicale sowie inguinale Hernien. Die Patienten bekommen häufig respiratorische Infektionen und Mittelohrentzündungen. Auch eine kardiale Beteiligung mit verdickten Mitral- und Aortenklappen sowie Ventrikelhypertrophie sind charakteristisch. Korneale Trübungen sind nicht selten. Die kognitive und motorische Entwicklung ist verlangsamt und die sprachliche Kommunikationsfähigkeit geht meist nicht über ein paar Worte hinaus. Die generalisierten skelettalen Anomalitäten werden unter dem Begriff Dysostosis multiplex zusammengefasst. Kennzeichnende radiologische Befunde sind unter anderem kurze Extremitäten, Kyphoskoliose durch verformte Wirbelkörper, Gibbusdeformitäten, eine Aufweitung der Rippen sowie einer proximalen und distalen Zuspitzung der Metacarpi, was klinisch zum Eindruck einer Krallenhand führt (Braulke *et al.*, 2013). Histologische Untersuchungen an Knochenschnitten neonataler oder fetaler MLII-Patienten zeigten einen diffusen Verlust mineralisierter Knochenmatrix (Babcock *et al.*, 1986; Pazzaglia *et al.*, 1989). Es wurden zahlreiche multinukleäre Osteoklasten nachgewiesen (Pazzaglia *et al.*, 1989; Shohat *et al.*, 1993). Kennzeichnend für MLII sind die verzögerte chondrale Ossifikation sowie die gestörte endostale Knochenbildung, was vor allem die langen Röhrenknochen betrifft. Es zeigen sich vergrößerte Wachstumsfugen und hypertrophe Chondrozyten mit intrazellulärem Speichermaterial (Pazzaglia *et al.*, 1989). Die spongiösen Knochenanteile sind vor allem in den Wirbelkörpern verringert. Es bildet sich unreifer Lamellenknochen aus (Babcock *et al.*, 1986; Pazzaglia *et al.*, 1989). Differentialdiagnostisch sollte bei dem osteopenischen Knochenphänotyp und den radiologischen Auffälligkeiten an Rachitis, Hyperparathyreoidismus und Osteogenesis imperfecta gedacht werden. Es wurden

zudem radiologische Ähnlichkeiten mit der Ostitis fibrosa cystica beschrieben, einer Knochenerkrankung, die durch einen chronischen Hyperparathyreoidismus verursacht wird (David-Vizarra *et al.*, 2010). David-Vizarra *et al.* führten die morphologischen Veränderungen des Knochens bei MLII-Patienten auf eine erhöhte Sensitivität des Knochengewebes auf Parathormon (PTH) zurück (David-Vizarra *et al.*, 2010). Tatsächlich wurden bei einigen neonatalen und pränatalen MLII-Patienten vereinzelt erhöhte PTH-Spiegel beschrieben (Pazzaglia *et al.*, 1989; Türker *et al.*, 2005; Unger *et al.*, 2005; Sathasivam *et al.*, 2006; Heo *et al.*, 2012). Die PTH-Werte normalisieren sich jedoch innerhalb weniger Monate und sind bei älteren Patienten – trotz Voranschreiten der Knochendysplasien - nicht mehr beschrieben, weshalb von einem transienten idiopathischen neonatalen Hyperparathyreoidismus ausgegangen werden kann (Sathasivam *et al.*, 2006). Weiterhin wurden auch MLII-Patienten ohne erhöhte PTH-Werte beschrieben (Otomo *et al.*, 2011). Der Knochenphänotyp bei MLII-Patienten muss deshalb auf andere Faktoren als einen erhöhten PTH-Wert zurückgeführt werden. Eine Vitamin-D-Mangel-Rachitis kann bei MLII bei meist normalen Vitamin-D- und normalen Kalziumwerten ebenfalls ausgeschlossen werden (Unger *et al.*, 2005).

1.2.2 Mukopolidose Typ II – Tiermodelle

Bisher wurden verschiedene MLII-Tiermodelle für die Analyse des Pathomechanismus der Erkrankung herangezogen. Mutationen im *Gnptab*-Gen in einer Gruppe von Hauskatzen führten zu ähnlichen klinischen Symptomen wie bei MLII-Patienten und zeigten einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus (Bosshard *et al.*, 1996; Mazrier *et al.*, 2003). Die Katzen wiesen charakteristische Dysmorphien im Gesicht auf sowie Dysostosis multiplex und eine verdickte, steife Haut. Sie erblindeten aufgrund einer progredienten retinalen Degeneration und starben nach etwa 47 Tagen an kardiopulmonalen Komplikationen. Nachgewiesen werden konnten erhöhte Serumwerte lysosomaler Enzyme und typische *inclusion cells* in kultivierten Fibroblasten der Katzen. Durch Genanalysen konnte gezeigt werden, dass die Mutationen im *Gnptab*-Gen der Katzen zu einem verfrühten Stoppcodon führten. (Bosshard *et al.*, 1996; Mazrier *et al.*, 2003). Der dadurch induzierte Verlust der zweiten Transmembrandomäne verhindert den Export der verkürzten α -Untereinheit aus dem

endoplasmatischen Retikulum (Franke *et al.*, 2013) und führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität.

Das erste MLII-Mausmodell wurde von Gelfman *et al.* beschrieben (Gelfman *et al.*, 2007). Die Insertion eines *Gene Traps* in Intron 1 des *Gnptab*-Gens führte zu einem vorzeitigen Translationsabbruch des α/β -Vorläuferproteins nach 39 Aminosäuren. Die *Gnptab-knock-out* Mäuse zeigten typische MLII-Symptome (z.B. Hypersekretion von Hydrolasen ins Serum, Wachstumsverzögerung), entwickelten aber (wie die MLII-Katzen) eine retinale Degeneration, die zur Erblindung führte. Weiterhin zeigten sich bei *Gnptab-knock-out* Mäusen hypertrophe Chondrozyten. In Fibroblasten und anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs konnte allerdings kein charakteristisches Speichermaterial nachgewiesen werden. Der Defekt des *Gnptab*-Gens führte bei diesen Mäusen zudem nicht zu einer erhöhten Sterblichkeit (Gelfman *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2009). Flanagan-Steet *et al.* konnten durch die Verwendung von Morpholino Oligos ein *knock-down*-Zebrafischmodell von MLII erzeugen (Flanagan-Steet *et al.*, 2009). Die MLII-Zebrafisch-Embryos wiesen eine verminderte Aktivität lysosomaler Hydrolasen, craniofaziale Dysmorphien und veränderte Brustflossen auf. Weiterhin zeigten sie eine eingeschränkte Beweglichkeit sowie Störungen in der Differenzierung von Chondrozyten.

In der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Braulke wurde 2010 ein *knock-in* Mausmodell für MLII generiert. Hierzu wurde durch homologe Rekombination eine Patientenmutation in das *Gnptab*-Gen der Maus (Insertion eines Cytosin-Restes in Exon 16 des *Gnptab*-Gens, c.3082insC) eingefügt (Tiede *et al.*, 2005). Die Insertion führt zu einem *Frameshift* im Leseraster des *Gnptab*-Gens und zu einem verfrühten Stoppcodon mit Translationsabbruch des α/β -Vorläuferproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase, was zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität führt (Tiede *et al.*, 2005; Kollmann *et al.*, 2012). Die MLII-Mäuse sind kleiner als Wildtyp (WT)-Mäuse, zeigen schwere Knochendeformitäten (z.B. Gibbusbildung, craniofaziale Dysmorphien) und bleiben im Wachstum hinter WT-Mäusen zurück (Abb. 1.1A). Weiterhin entwickelt sich eine Neurodegeneration, die mit einer signifikanten Reduktion des Cerebellums einhergeht. Ab dem 6. Monat zeigen MLII-*knock-in* Mäuse ein breitbasiges, ataktisches Gangbild mit pathologisch erhöhten Reflexen der Extremitäten. Die Photorezeptoren degenerieren ab dem 3. Monat, was schließlich zur

Erbblindung führt. Die MLII-Mäuse sind infertil und zeigen eine erhöhte Sterblichkeit mit einer maximalen Lebenserwartung von 12 Monaten. Im Serum der Mäuse konnten zwei- bis 11-fach erhöhte Werte typischer lysosomaler Enzyme gemessen werden. MLII-Fibroblasten weisen typisches Speichermaterial und den kompletten Verlust M6P-haltiger Proteine auf (Kollmann *et al.*, 2012). Damit ähnelt die *Gnptab*^{c.3082insC}-Maus klinisch und biochemisch dem Phänotyp von MLII-Patienten.

1.2.3 Knochenphänotyp der *Gnptab*^{c.3082insC} Mäus

Histomorphometrische Untersuchungen an 4 und 12 Wochen alten *Gnptab*^{c.3082insC}-Mäusen zeigten, dass MLII-Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Geschwistertieren einen verminderten Anteil mineralisierter Knochenmatrix besitzen (Abb. 1.1B). Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen von Calcein-markierten Knochenanteilen wurde eine verminderte Bildungsrate der Knochenmatrix bei MLII nachgewiesen (Abb. 1.1C). Das Auszählen der Knochenzellen auf histologischen Knochenschnitten zeigte histomorphometrisch eine viermal so hohe Anzahl von Knochen-resorbierenden Osteoklasten im Vergleich zu WT-Mäusen, während die Anzahl der Knochen-bildenden Osteoblasten nahezu gleich war (Abb. 1.1D und E; Kollmann *et al.*, 2013). Die Messung von erhöhten Kollagenabbauprodukten (Crosslaps) im Serum von MLII-Mäusen bestätigte die gesteigerte Knochenresorptionsrate (Abb. 1.1E).

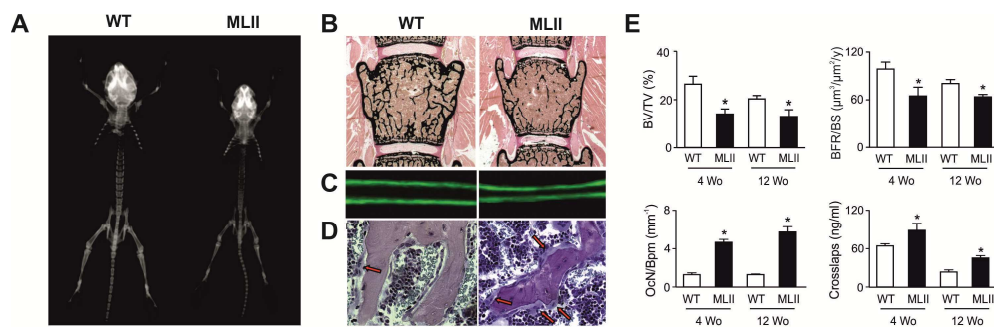


Abb. 1.1 Phänotypische Analyse des Knochenverlustes bei 4- und 12-Wochen alten MLII-Mäusen im Vergleich zu Kontrollgeschwistertieren (n = 5). (A) Radiographische Untersuchung 12 Wochen alter Mäuse. (B) Von Kossa/van Gieson Färbung nicht dekalzifizierter Wirbelkörperschnitte. (C) Fluoreszenzmikrographie eines Calcein-markierten Knochenschnittes. (D) Toluidine blau-gefärbte nicht dekalzifizierte Wirbelkörperschnitte (rote Pfeile weisen auf Osteoklasten). (E) Histomorphometrische Quantifizierung des Knochenvolumens pro Gewebvolumen (BV/TV), der Knochenformationsrate pro Knochenfläche (BFR/BS) und Anzahl der Osteoklasten pro Knochen-Perimeter (OcN/Bqm) sowie Serumkonzentration der Knochenresorptionsmarker Crosslaps (Abbaufragment des Kollagen Typ I) (Kollmann *et al.*, 2013).

Elektronenmikroskopische Analysen zeigten Speichermaterial in MLII-Zellen wie Chondrozyten, Osteoblasten und Fibroblasten, wohingegen Osteoklasten, die hämatopoetischen Ursprungs sind, keine Akkumulation von Speichermaterial aufwiesen. Durch Messung von Aktivitäten lysosomaler Enzyme und durch [35S]-Methionin-Pulse-Chase-Experimente an primär kultivierten Osteoblasten und Osteoklasten konnte eine Fehlsortierung lysosomaler Proteine in beiden MLII-Zelltypen festgestellt werden. Der Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität ist in MLII-Osteoblasten außerdem mit einer reduzierten Mineralisationsrate assoziiert (Kollmann *et al.*, 2013). Zusammenfassend konnten durch bisherige Analysen gezeigt werden, dass bei MLII eine erhöhte Resorptionsrate des Knochens vorliegt bei gleichzeitiger Mineralisationsstörung der Osteoblasten.

1.3 Knochenstoffwechsel

Morphologische Knöchendysplasien sind bei vielen lysosomalen Speichererkrankungen ein diagnostisches Kriterium. Wesentlich für die Entwicklung und die Stabilität von Knochengewebe ist das Zusammenspiel der Knochen-resorbierenden Osteoklasten und der Osteoblasten, die den Knochen bilden (so genanntes Knochen-Remodeling). Die *basic multicellular unit* (BMU) stellt die kleinste Einheit des Knochen-Remodelings dar (Abb. 1.2). Die Aktivität lysosomaler Enzyme in Osteoklasten ist dabei für die Knochenresorption essentiell. Welche weiteren Funktionen M6P-haltige, lysosomale Proteine im Knochenstoffwechsel haben, ist weitgehend unbekannt.

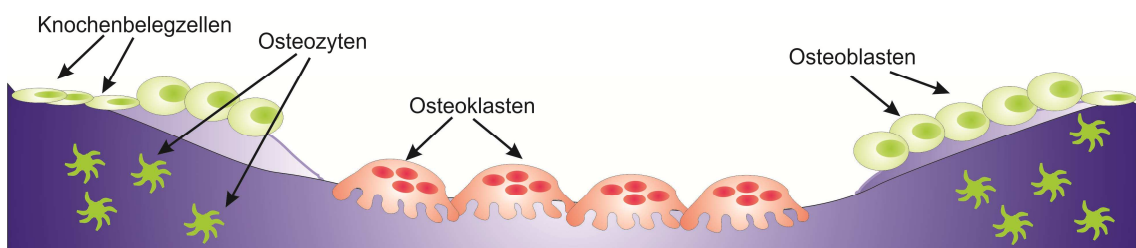


Abb. 1.2 Basic multicellular unit (BMU). Die Knochen-resorbierenden Osteoklasten (rot), die Knochen-bildenden Osteoblasten (grün) und ruhende, ausdifferenzierte Osteoblasten, die als Osteozyten bezeichnet werden, bilden zusammen die BMU, die am Knochen-Remodeling beteiligt sind. Knochenbelegzellen sind terminal differenzierte, inaktive Osteoblasten, die auf der gesamten Knochenoberfläche zu finden sind.

1.3.1 Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige, polare Riesenzellen hämatopoetischen Ursprungs, die durch die Fusion von monozytären Vorläuferzellen entstehen (Boyle *et al.*, 2003). Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu reifen Osteoklasten wird im Wesentlichen durch Faktoren beeinflusst, die von Osteoblasten gebildet werden. Die Hauptfunktion der Osteoklasten ist die Resorption mineralisierter Knochenmatrix.

Ein aktiver Osteoklast geht durch eine initiale Reorganisation der Plasmamembran und des Zytoskeletts in einen polarisierten Zustand über (Abb. 1.3). Auf der zum mineralisierten Knochen gerichteten Seite kommt es zur Bildung einer Versiegelungszone (*sealing zone*), die der Osteoklast durch die Bildung eines F-Aktin-Ringes fest umschließt (Lakkakorpi *et al.*, 1989). Innerhalb des Aktin-Ringes wird die Zellmembran stark vergrößert (*ruffled border*) und ein extrazelluläres Kompartiment, die Resorptionslakune, entsteht. Die *sealing zone* grenzt die *ruffled border* von der basolateralen Membrandomäne des Osteoklasten ab. Die *ruffled border* ist durch das Vorkommen typischer lysosomaler Membranbestandteile charakterisiert (z.B. MPR300, LAMP-1, H⁺-V-ATPase), weshalb davon ausgegangen wird, dass Vesikel endosomalen und/oder lysosomalen Ursprungs im Bereich der *ruffled border* mit der Plasmamembran verschmelzen (Baron *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1999; Mulari *et al.*, 2003a). Durch die V-H⁺-ATPase, den Chloridkanal ClC-7 und durch die Carboanhydrase II entsteht in der Resorptionslakune des Osteoklasten ein pH-Wert von 4,5 (Kornak *et al.*, 2000; Kornak *et al.*, 2001). Charakteristisch für Osteoklasten ist zudem eine starke Expression der lysosomalen Enzyme *tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b* (TRAP5b, auch: *acid phosphatase 5* (Acp5)) und Cathepsin K (Minkin, 1982; Drake *et al.*, 1996). Aufgrund des sauren pHs und des Vorkommens lysosomaler Enzyme in der Resorptionslakune sowie der typischen lysosomalen Membranbestandteile in der *ruffled border* wird die Resorptionslakune als externes Lysosom bzw. als ein spätendosomales Kompartiment angesehen (Baron *et al.*, 1988; Blair *et al.*, 1989; Väänänen *et al.*, 1990; Palokangas *et al.*, 1997). Die sauren Hydrolasen des Osteoklasten sind für den Verdau der Knochenmatrix essentiell. Die abgebauten Knochenbestandteile werden unter anderem durch transzytotische Vesikel zur *functional secretory domain* transportiert und hier in den Extrazellulärraum entleert (Nesbitt und Horton 1997; Salo *et al.*, 1997; Väänänen *et al.*, 2000).

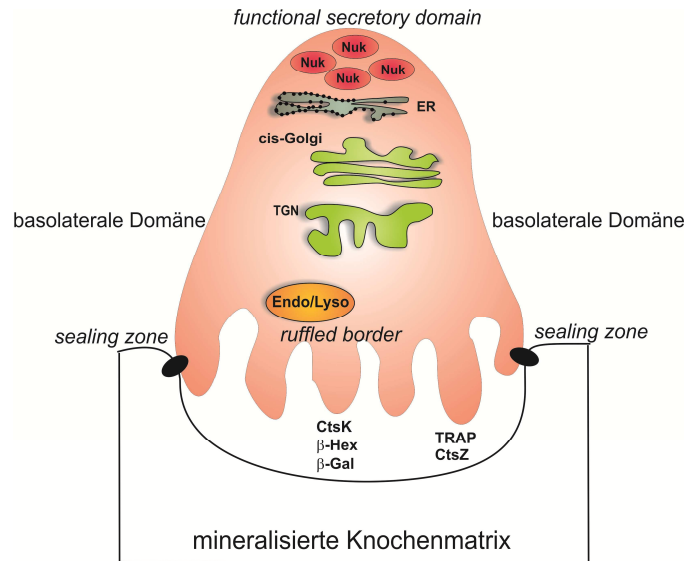


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines polarisierten, aktiven Osteoklasten. Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen (Nuk = Nukleus). Bei der Resorption mineralisierter Knochenmatrix gehen sie in einen stark polarisierten Zustand über und bilden verschiedene Transmembrandomänen aus: die *ruffled border*, die *sealing zone* und die *functional secretory domain*. In der Resorptionslakune sind neben typischen lysosomalen Enzymen wie der β -Hexosaminidase (β -Hex), der β -Galaktosidase (β -Gal) und Cathepsin Z (CtsZ) auch Osteoklasten-spezifische Enzyme wie die *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) und Cathepsin K (CatK) zu finden.

1.3.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten. Ihre Funktion ist die Bildung mineralisierter Knochenmatrix. Knochengewebe besteht aus Hydroxylapatit-Kristallen, aus extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteopontin, *bone sialoprotein* und einer Reihe von Proteoglykanen wie Versican, Decorin und Biglycan (Gundberg, 2003; Young, 2003). Die Osteoblasten bilden zunächst eine Schicht aus Kollagenfibrillen, die das Grundgerüst für die sich entwickelnde Knochenlamelle bildet und als Osteoid bezeichnet wird. Für die Mineralisation ist die Bildung von Kristallisationskernen aus Kalzium und Phosphat innerhalb der Osteoblasten wichtig. Sie werden in Vesikeln innerhalb der Osteoblasten gebildet und in den Extrazellulärraum sezerniert, wo sie an das Osteoid angelagert werden.

Die Differenzierung und Aktivität der Knochenzellen ist abhängig von lokalen und systemischen Faktoren. Osteoblasten haben bei der Verarbeitung dieser Signale eine zentrale Rolle. Die Osteoklastogenese wird unter anderem durch das RANK-RANKL-System kontrolliert, das maßgeblich durch Osteoblasten reguliert wird. RANKL

(*receptor activator of NF- κ B ligand*) wird von Osteoblasten über sekretorische Vesikel in den Extrazellulärraum sezerniert (Kariya *et al.*, 2009; Nickerson *et al.*, 2009; Zhao, 2012). Über die Bindung an seinen Rezeptor RANK auf Osteoklasten-Vorläuferzellen wird die Ausdifferenzierung von Osteoklasten stimuliert (Franzoso *et al.*, 1997). Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher Rezeptor, der ebenfalls von den Osteoblasten gebildet wird, kann RANKL binden und seine proliferierende Wirkung neutralisieren (Lacey *et al.*, 1998; Abb. 1.4).

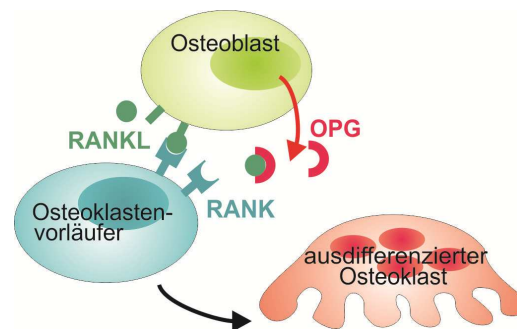


Abb. 1.4 RANK-RANKL-Interaktion. Osteoblasten sezernieren RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*), der an den RANK-Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen bindet und die Osteoklastogenese stimuliert. Antagonisiert wird dieser Prozess durch Osteoprotegerin (OPG), das RANKL abfängt und die Wirkung aufhebt.

Im Knochen sind Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. *transforming growth factor* (TGF)- β , *insulin-like growth factor* (IGF) I und II, *bone morphogenetic proteins* (BMPs)) gespeichert, die durch den Resorptionsprozess von Osteoklasten freigesetzt werden (Martin und Sims, 2005). Diese Faktoren führen zur Rekrutierung und Aktivierung von Osteoblasten sowie zur Stimulation der Osteoklastogenese (Pelton *et al.*, 1991; Fuller *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2009). Auch Parathormon (PTH) kann über die Bindung an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoblasten die Osteoblastogenese stimulieren und bei langfristig hohen Spiegeln auch die Osteoklastogenese (Esbritt und Alcaraz, 2013). Die Rolle lysosomaler Proteine in Osteoblasten ist weitgehend unbekannt.

2. Fragestellung

Mukopolidose II α/β (MLII) ist gekennzeichnet durch den vollständigen Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität, was die Bildung von Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltigen Proteinen verhindert und zur Fehlsortierung lysosomaler Enzyme führt. Die Lysosomen können daher ihrer ursprünglichen Funktion, dem Abbau von Makromolekülen, nicht mehr nachkommen. Von diesem Transportdefekt lysosomaler Enzyme ist das Knochengewebe in besonderem Maße betroffen. Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Defizienz auf Osteoklasten und Osteoblasten zu untersuchen. Bisherige *in vivo* Analysen der Arbeitsgruppe von Professor Bräulke (Kinderklinik Biochemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) haben gezeigt, dass in MLII-Mäusen eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten sowie eine verminderte Knochendichte vorliegen. Außerdem belegen *in vitro* Analysen die Fehlsortierung und vermehrte Sekretion von lysosomalen Enzymen sowohl in MLII-Osteoblasten als auch in MLII-Osteoklasten.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob die Fehlsortierung der Enzyme *in vitro* die Resorptionsaktivität der Knochenresorbierenden Osteoklasten beeinflusst. Im zweiten Teil dieser Arbeit ging es um die Frage, inwiefern die Defizienz der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der damit einhergehenden Akkumulation von Speichermaterial Einfluss auf die Transkription von MLII-Osteoblasten hat. Durch massenspektrometrische Analysen von Osteoblastensekreten erfolgte im dritten Abschnitt die Identifizierung von neuen M6P-haltigen Proteinen, die im Knochenstoffwechsel von MLII eine besondere Rolle spielen könnten.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Absaugpumpe Miniport	SMT
Autoklav 3850 EL	Systec, Wetzlar
Blockthermostat Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
ChemieDoc TM XRS	BioRad, München
CO ₂ -Inkubationsschrank	Sanyo, München
Eismaschine AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer Agagel Midi Wide (DNA)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer SE600 (Proteine)	Hofer, Holliston
Horizontalschüttler Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Inkubationsschüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 II AOBS	Leica, Wezlar
Kryo-Einfriergerät	Nalgene, Dänemark
Magnetrührer MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskop Phasenkontrast	Zeiss, Jena
Mikroskop Fluoreszenz Leica TCS SL; LeicaMicrosystems	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Promicro	Whirlpool, Stuttgart

pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultrospec 1100pro	Amersham, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Stickstoff-Einfriertank Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermocycler Realtime MX3000P™	Stratagene, Santa Clara
Transferkammer TE 50X	Hofer, Holliston
Ultraschall-Gerät Sonopuls HD60	Brandelin Electronic, Berlin
Ultra-Thurrax Dremel	BioSpec Products, USA
UV-Transilluminator Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad C 10	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegmaterialien für Zellkultur	Falcon, Sarstedt
Filterschwämme	Amersham
Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Göttingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
	Eppendorf, Hamburg

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilme	Kodak, Rochester
Skalpelle	Braun, Melsungen
Sterilfilter	VWR, Darmstadt
<i>Stripes</i> /Deckel für Realtime-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Teflonkämme	Hoefer, Holliston
Whatman-Papier	Whatman, Göttingen

Kunststoffreaktionsgefäße, sowie Kulturschalen und –flaschen wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Sartstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Albumin-Standard (2 mg/ml)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
BigDye®-v3.1 Cycle-Premix	Applied-Biosystems, Darmstadt
Bradford-Reagenz Roti-Quant®	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	Fermentas, St. Leon Rot
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
DreamTaq™-Green-Buffer (10 x)	Fermentas, St. Leon Rot

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Luminol	Roth, Karlsruhe
Maxima [™] -Realtime-qPCR-Master-Mix (2 x)	Fermentas, St. Leon Rot
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
dNTPs	Fermentas, St. Leon Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Realtime-PCR-Mastermix	Fermentas, St. Leon Rot
NNN´N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich, München
Trizma [®] base	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Roth, Mannheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Minimum Essential Medium Eagle (α-MEM)	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Dartmouth (USA)
Collagenase Type 1A	Sigma-Aldrich, München
Dispase Grade II	Roche, Mannheim

Rekombinantes murines M-CSF	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes murines sRANKL	PeptoTech, Hamburg
Ascorbat	Sigma-Aldrich, München
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax [®]	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Darmstadt

3.1.5 Enzyme zur Modifikation von DNA, RNA und Proteinen

<i>Taq</i> -Polymerase DreamTaq [®]	Fermentas, St. Leon Rot
MultiScribe-Reverse-Transkriptase	Applied-Biosystems, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

PageRuler [™] <i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon Rot
Gene Ruler [™] <i>-1 kb DNA Ladder</i>	Fermentas, St. Leon Rot
RNA Sample Loading Buffer	Sigma-Aldrich, München

3.1.7 Substrate zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-glucosamid	Sigma-Aldrich, München
---	------------------------

3.1.8 Puffer und Lösungen

- PBS (pH 7,4): 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄
- TBS (pH 7,4): 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl

3.1.9 Taqman-Assays

Die *Taqman*-Primer wurden von der Firma Fermentas (St. Leon Rot) bezogen.

Gen	Protein	Assay-Nummer
<i>Gnptab</i>	GlcNAc-1-Phosphotransferase (alpha/beta)	Mm01773334_m1
<i>HexB</i>	β -Hexosaminidase	Mm00599880_m1
<i>Man2b1</i>	Mannosidase 2, alpha B1, LAMMAN	Mm00487585_m1
<i>Fucal</i>	Fukosidase, alpha-L-1	Mm00502778_m1
<i>LAMP1</i>	<i>lysosomal-associated membrane glycoprotein 1</i>	Mm00495262_m1
<i>NPC-2</i>	Niemann Pick Typ C2	Mm00499230_m1
<i>BGLAP</i>	<i>bone gamma carboxyglutamate protein</i>	Mm03413823_mH
<i>IBSP</i>	<i>integrin binding sialoprotein</i>	Mm00492555_m1
<i>Actb</i>	β -Aktin, zytoplasmatisch	Mm00607939_s1

3.1.10 Kits

GeneJET TM RNA Purification Kit	Fermentas, St. Leon Rot
FireSilver Staining Kit	Proteome Factory, Berlin
Amicon Ultra- 0.5, Centrifugal Filter Units (CutOff: 3K)	Merck, Darmstadt

3.1.11 Online-Programme/Datenbanken

Ingenuity Systems	http://www.ingenuity.com/
MASCOT	http://www.matrixscience.com/
NCBI Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UniProt	http://www.uniprot.org/

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks

Osteoklasten gehören zum mononukleären (monozytären) Phagozyten-System (Loutit und Nisbet, 1982). Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie hämatopoetischer Stammzellen können daher aus Knochenmark isoliert und *in vitro* zu knochenresorbierenden Zellen differenziert werden (Boyle *et al.*, 2003). Um hämatopoetische Stammzellen zu gewinnen, wurden Tibiae und Femora ausgewachsener, weiblicher, 21 Wochen alter Mäuse präpariert und anschließend in 70 %-igem Ethanol sowie in PBS gewaschen. Die Epi- und Metaphysen des jeweiligen Knochens wurden an einer Seite entfernt, um das Knochenmark der Diaphysen freizulegen. Die Knochen wurden in ein 200 µl-Reaktionsgefäß mit einem Loch an der Unterseite und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 sek bei 8000 rpm und RT zentrifugiert. Die herausgelösten Knochenmarkszellen wurden in 1 ml vorgewärmtes Kultivierungsmedium aufgenommen. Die Zellsuspensionen eines Tieres wurden gepoolt und durch einen 40 µm-Filter gegeben. Im Anschluss wurde der Filter mit 30 ml Kultivierungsmedium gespült. Das Homogenat wurde 5 min bei 1300 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 5 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in der Thoma-Zählkammer ausgezählt und mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/cm² ausplattiert.

Kultivierungsmedium

α-Mem

2,2 g Natriumhydrogencarbonat (pH 6,9)

10 % fötales Kälberserum

1 % Penicillin/Streptomycin

3.2.1.2 Kultivierung und Ausdifferenzierung von Osteoklasten

Durch Zugabe der osteoklastenspezifischen Differenzierungsfaktoren 1,25-Dihydroxy-Vitamin D, RANKL (*receptor activator of NF-κB ligand*) und M-CSF (*macrophage*

colony-stimulating factor) zum Kultivierungsmedium entstehen *in vitro* aus monozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks multinukleäre Zellen, die morphologische Eigenschaften von Osteoklasten aufweisen und osteoklastenspezifische Markerproteine wie *tartrat-resistant acid phosphatase* (TRAP) sowie Cathepsin K exprimieren (Roodman *et al.*, 1985; Matsuzaki *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 2000).

Die isolierten Knochenmarkszellen (siehe 3.2.1.1) wurden in einem Zell-Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂ bei 37 °C in vorgewärmtem Kultivierungsmedium inkubiert, welches alle zwei Tage gewechselt wurde. Ab dem ersten Tag der Kultivierung wurde dem Medium zur Generierung von Osteoklasten der Osteoklasten-spezifischen Differenzierungsfaktor 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (10 nM) hinzugefügt, ab Tag 5 zusätzlich RANKL (40 ng/ml) sowie M-CSF (20 ng/ml).

3.2.1.3 Kultivierung von polarisierten Osteoklasten auf Dentin

Differenziert man monozytäre Vorläuferzellen des Knochenmarks auf knochenähnlichen Oberflächen, entstehen polarisierte Osteoklasten, die eine Resorptionslakune ausbilden. Um die Resorptionsaktivität von Osteoklasten zu untersuchen, wurden monozytäre Vorläuferzellen auf Dentin zu Osteoklasten differenziert. Es wurde Dentin aus Elfenbein verwendet, das von Uwe Kornak vom Max-Planck-Institut aus Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Dentin besteht etwa zu 70 % aus Kalziumhydroxylapatit, zu 20 % aus organischen Bestandteilen, wie z.B. Kollagen, und zu 10 % aus Wasser. Diese Zusammensetzung ähnelt dem mineralisierten Knochen, und stellt daher ein geeignetes Material dar, um *in vitro* die Resorptionsaktivität von Osteoklasten zu untersuchen (Boyde *et al.*, 1984; Chambers *et al.*, 1984; Väänänen und Zhao, 2008).

Zunächst wurden die Dentinchips mit Schleifpapier mittlerer (800 µm), feinerer (2000 µm) und abschließend mit 4000 µm-Körnung abgerieben. Sie wurden zweimal mit ddH₂O gewaschen und in ein 2 ml-Reaktionsröhrchen überführt, welches mit 1-1,5 ml ddH₂O gefüllt wurde. Die Chips wurden dann 5 min mit einer Ultraschallsonde bei 30 kHz behandelt, um die letzten Ablagerungen von der Oberfläche der Chips zu lösen. Im Anschluss wurden die Chips mehrfach mit ddH₂O gespült. Zur Desinfektion wurden sie in Kulturschalen gelegt und dort mit 70 %-igem Ethanol in PBS für 30 min behandelt. Anschließend wurden sie mehrfach mit PBS gespült und für ein paar Stunden

bei 40 °C inkubiert, um die Ethanol-Reste zu entfernen. Monozytäre Vorläuferzellen wurden isoliert (siehe 3.2.1.1) und in Zellkulturschalen kultiviert (siehe 3.2.1.2). Nach 16 h wurden die nicht-adhärenen Zellen der Kultur abgenommen, gezählt, in Differenzierungsmedium in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml auf den Dentinchips ausgesät und anschließend für 12 Tage auf den Dentinchips kultiviert.

3.2.1.4 Isolierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen aus neonatalen Schädeldächern

Für die Isolierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen wurden die Schädeldächer von drei bis fünf Tage alten neonatalen Mäusen verwendet. Schädeldächer verknöchern durch desmale Ossifikation, d.h. die Osteoblasten entstehen direkt aus embryonalem Bindegewebe (Mesenchymzellen) (Cohen, 2006). Mittels eines enzymatischen Verdaus ist es möglich, die Osteoblasten-Vorläuferzellen von anderen Bindegewebszellen zu trennen (Peck *et al.*, 1964; Wong und Cohn, 1975; Nefussi *et al.*, 1985, Aubin, 2008). Hierzu wurden die Schädeldächer der Mäuse unter sterilen Bedingungen präpariert, in ein mit PBS-gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und durch Invertieren kurz gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Schädeldächer mit 20 ml einer steril filtrierten Collagenase-Dispase-Lösung bei 37° C 10 min in einem Schüttelinkubator bei maximal 225 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut 30 min mit 20 ml Collagenase-Dispase-Lösung behandelt. Im nächsten Schritt wurde dieser zweite Überstand durch ein 70 µm-Zellsieb in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und bei 1300 x g 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Kultivierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der Thoma-Zählkammer ausgezählt und mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät.

Collagenase-Dispase-Lösung	1 mg/ml Collagenase Ia
	2 mg/ml Dispase in Kultivierungsmedium
Kultivierungsmedium	α-Mem
	2,2 g Natriumhydrogencarbonat (pH 6,9)
	10 % fötales Kälberserum

1 % Penicillin/Streptomycin

3.2.1.5 Kultivierung und Ausdifferenzierung von Osteoblasten

Durch Zugabe von β -Glycerolphosphat und Ascorbat lassen sich *in vitro* aus gewonnenen Knochenzellen Osteoblasten-ähnliche Zellen kultivieren, die die Fähigkeit haben, Knochen zu bilden (Barnes, 1975; Nefussi *et al.*, 1985; Masquelier *et al.*, 1990). Sie exprimieren Osteoblasten-spezifische Faktoren wie z.B. Alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Osteocalcin (auch: *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*) und *bone sialoprotein* (Cohen, 2006). In Zellkultur bilden sie auf Plastikoberflächen kleine Areale mineralisierter Knochenmatrix. Diese können zum Nachweis mit Alizarinrot angefärbt und sichtbar gemacht werden. Die mesenchymalen Stammzellen wurden in einem Zell-Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂ bei 37 °C in vorgewärmtem Kultivierungsmedium kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Bei einer 80 %-igen Konfluenz des Zellrasens wurde mit der Differenzierung der Zellen mit β -Glycerolphosphat (10 mM) und Ascorbat (50 μ g/ml) begonnen, welche dem Kultivierungsmedium frisch hinzugegeben wurden (Komplettmedium). Alle zwei Tage wurde das Medium mit den frisch hinzugefügten Differenzierungsfaktoren gewechselt.

Komplettmedium

Kultivierungsmedium

10 mM β -Glycerolphosphat

50 μ g/ml Ascorbat

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Um Proteinhomogenate aus Zellen herzustellen, wurden Osteoblasten auf 6-Well-Platten kultiviert (9,6 cm² Wachstumsfläche und 2-5 ml Arbeitsvolumen pro Well). Die Zellkulturüberstände wurden an Tag 5, 10 und 15 der Differenzierung aufgefangen und die Osteoblasten zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 60 min mit 250 μ l Lysispuffer auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Zellschaber

abgetragen und bei 4° C und 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysispuffer	1 x PBS
	1 x Inhibitor Cocktail
	2 % Triton-X-100

3.2.2.2 Konzentrierung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen aus Zellkulturüberständen wurden die Säulen des Kits Amicon Ultra-0.5, Centrifugal Filter Units (CutOff: 3K) der Firma Merck nach Herstellerprotokoll verwendet.

3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kalorimetrisch nach der Bradford-Methode gemessen. Hierbei werden die kationischen und hydrophoben Seitenketten von Proteinen, die sich in einer Lösung befinden, durch den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue komplexiert. In gebundener Form verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm, was photometrisch ermittelt werden kann. Es wurde eine Eichreihe von 0-20 µg Protein in 800 µl ddH₂O mit einem BSA-Standard angefertigt. Von jeder Probe wurden 5 µl mit 795 µl ddH₂O verdünnt. Jeder Reaktionsansatz wurde mit 200 µl Rotiquant® versetzt und invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die photometrische Messung bei 595 nm durchgeführt. Die Proteinkonzentration einer Probe wurde in Doppelbestimmung ermittelt und anschließend mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt.

3.2.2.4 Messung der β-Hexosaminidase-Aktivität

Die Messung der Enzymaktivität der β-Hexosaminidase gilt als sensibler Marker für die Detektion lysosomaler Enzyme. Bei der Nachweisreaktion werden Proteinlösungen in einem Citratpuffer (pH 4,5) mit dem Substrat p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-glucosamid inkubiert. Die β-Hexosaminidase hydrolysiert das Substrat und setzt p-Nitrophenol frei, dessen Konzentration anschließend bei einer Extinktion von 405 nm im Alkalischen bestimmt wird. Für die Bestimmung der β-Hexosaminidase-Aktivität wurden 20 µl

Zellhomogenate bzw. 10 µl von affinitätschromatographisch aufgereinigten Protein-Fractionen in einer 1:10-fachen Verdünnung und 10 µl unverdünnter Zellkulturüberstände verwendet. Die Proben wurden bis zu einem Volumen von 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt und jeweils mit 100 µl eines 10 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-glucosamid-haltigen Substratpuffers versetzt. Die Aktivität der Enzyme wurde in doppelten Reaktionsansätzen bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad für 60 min inkubiert. Durch die Zugabe von 800 µl Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet. Die Proben wurden 5 min 18.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm und die Berechnung der die enzymatische Aktivität mit der folgenden Formel.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{mU}{ml} \right] = \frac{\Delta E \cdot 10^6}{\varepsilon \left[\frac{l}{mol \cdot cm} \right] \cdot d [cm] \cdot t [min]} \cdot \frac{V_{\text{Testvolumen}} [\mu l]}{V_{\text{Pr obenvolumen}} [\mu l]} \cdot F_{\text{Verd. Probe}}$$

Formel 3.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität. $\Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Enzymeerwert}} - E_{\text{Substrateerwert}}$; Testvolumen = Reaktionsvolumen nach Abstoppen der Reaktion; F = Verdünnungsfaktor der Probe, ε = Extinktionskoeffizient; Probenvolumen = Volumen der eingesetzten Probe; t = Zeit, d = Dicke der Küvette (1 cm).

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden zusätzlich die Proteinkonzentrationen in den Zellhomogenaten nach der Bradford-Methode gemessen (siehe 3.2.2.3).

2x Reaktionspuffer	0,2 M Na-Citrat 0,4 % BSA pH 4,6
Substratpuffer	10 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-glucosamid in 2 x Reaktionspuffer pH 4,6
Stopp-Puffer	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,5

3.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). SDS ist ein anionisches Detergenz, welches im Solubilisierungspuffer und in den Gelen enthalten ist. Es denaturiert das Protein, bindet die Polypeptidkette und ermöglicht somit die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel, welche zwischen zwei Glasplatten (16 cm x 18 cm, Abstandhalter 1,5 mm dick) gegossen wurden. Zunächst wurde das Trenngel entsprechend dem Pipettierschema in Tab. 3.1 hergestellt und bis 4 cm unter den Rand zwischen die Glasplatten gegossen. Im Anschluss wurde es mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Die Trenngeloberfläche wurde nach Auspolymerisieren mit ddH₂O gespült. Anschließend erfolgte das Überschichten des Trenngels mit einem Sammelgel sowie das Einfügen eines Probenkammes. Nach 30 min war das Gel polymerisiert, sodass die Proben aufgetragen werden konnten.

Tab. 3.1 Pipettierschema für die Erstellung verschiedener Gele.

Lösungen	Trenngel (ml)	Minigel (ml)	Minigel (ml)	Sammelgel (ml)
	10 %	12,5 %	10 %	4 %
Acrylamidlösung	9,8	2,05	1,65	1,3
Trenngelpuffer	7,5	1,25	1,25	-
Sammelgelpuffer	-	-		2,5
10 % APS in ddH ₂ O	0,25	0,0415	0,0415	0,1
TEMED	0,025	0,00425	0,00425	0,01
ddH ₂ O	12,2	1,65	2,1	6
SDS (10 % Stock)	0,3	0,05	0,05	0,1

Zur SDS-Page wurden 100 µg Zellhomogenat für ein großes und 50 µg für ein Minigel eingesetzt. Von Zellkulturüberständen wurden 100 µl auf ein großes Gel bzw. 20 µl für ein Minigel eingesetzt. Die Proben wurden mit reduzierendem Solubilisierungspuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden sie 1 min bei RT und 16000 x g zentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit den Proben und einem Molekulargewichtsmarker beladen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit Anodenpuffer gefüllt und das Gel in die Kammer eingespannt. Anschließend wurden die Proben mit Kathodenpuffer überschichtet und im Gel entsprechend Tab. 3.2 in der Elektrophorese-Kammer aufgetrennt.

Tab. 3.2 SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese: Bedingungen.

	Dauer	Stromstärke	Spannung
Großes Gel	2,5 h	50 mA / Gel	--
	Über Nacht	--	50 mV
Minigel	1 h	--	Bei 85 V einlaufen lassen, dann auf 180 V
Anodenpuffer		25 mM Tris/HCl, pH 8,6 192 mM Glycin	
Kathodenpuffer		0,1 % SDS in Anodenpuffer	
5 x Trenngelpuffer		1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	
4 x Sammelgelpuffer		0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	
4 x Solubilisierungspuffer (reduzierend)		500 mM Tris/HCl, pH 6,8 4 % SDS 40 % Glycerin 40 mM DTT 2 % 2-Mercaptoethanol 0,2 % Coomassie R	

3.2.2.6 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine analytische Methode, die es ermöglicht spezifische Proteine in einer Proteinpräparation, z.B. in einem Zellhomogenat, quantitativ zu detektieren. Zunächst werden die Proteine durch SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt und im Blotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Auf der Membran können anschließend einzelne Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Um die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran zu übertragen, wurde das SDS-Gel in Transferpuffer äquilibriert und zusammen mit der Nitrocellulose-Membran sowie der Whatman-Filterpapiere entsprechend der Abb. 3.1 in einer Blothalterung angeordnet und in eine Blot-Kammer mit Transferpuffer gesetzt. Die Proteine wurden im Nass-Blot-Verfahren bei 900 mA über 4 h oder über Nacht bei 130 mA (großes Gel) bzw. 1 h bei 400 mA (Minigel) auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

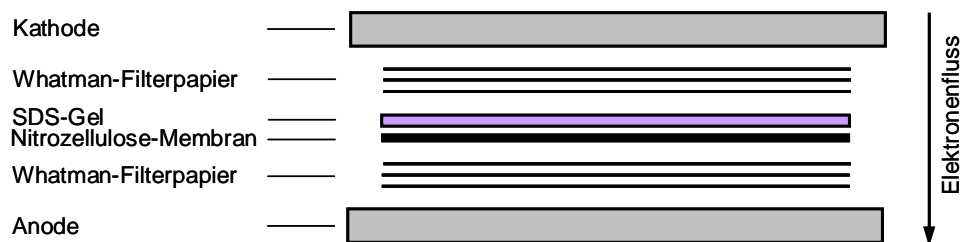


Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer Blotkammer.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit Waschlösung (TBST) äquilibriert und im Anschluss für 1 h mit Blockier-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Blotoberfläche abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem c-myc-konjugierten *single chain* anti-M6P-Antikörperfragment, der mit der Blockier-Lösung 1:500 verdünnt wurde, auf einem Wippschüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Dann wurde sie für 1 h mit einem c-myc-Antikörper inkubiert (1:10.000 in Blockier-Lösung) und erneut dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 1 h mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Ziege-anti-Maus, 1:3000 in Blockier-Lösung). Die Membran wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Die Entwicklerlösungen 1 und Entwicklerlösung 2 wurden frisch angesetzt

und anschließend für 1 min zusammen auf die Nitrocellulose-Membran gegeben. In der CCD-Kamera (ChemieDocTMXRS, BioRad) wurde die Chemoluminiszenz aufgenommen.

Die Nitrocellulose-Membran wurde, falls erforderlich, im Anschluss zweimal für 5 min mit ddH₂O, zweimal 5 min mit 0,2 M NaOH-Lösung und weitere zweimal mit ddH₂O gewaschen, um die Antikörper von den Proteinen abzuwaschen. Im nächsten Schritt konnte die Membran entweder an der Luft trocknen oder nach 30 min in Blockier-Lösung für eine andere Antikörperinkubation verwendet werden.

Waschpuffer (TBST)	0,1 % Tween 20 in TBS
Blockier-Lösung	1 % BSA in TBST
Entwicklerlösung 1	100 mM TrisHCl, pH 8,5
	5 mM Luminol
	0,9 mM p-Cumarinsäure
	4,5 ml ddH ₂ O
Entwicklerlösung 2	100 mM TrisHCl, pH 8,5
	0,06 % H ₂ O ₂
	4,5 ml ddH ₂ O
Transferpuffer	25 mM Tris (Trizma Base), pH 9
	192 mM Glycin
	20 % Methanol
Primärantikörper	<i>single chain fragment</i> M6P (scFvM6P) (1:500): Müller-Loennies <i>et al.</i> , 2010
	c-myc (Maus, 1:10.000): Cell Signaling Technology Inc., Danvers (USA)
Sekundärantikörper	Ziege-anti-Maus HRP-konjugiert (1:3000): Dianova Hamburg

3.2.2.7 Aufreinigung von lysosomalen Proteinen aus Zellkultur-Überständen von Osteoblasten

Für die Aufreinigung Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltiger Proteine aus Zellkultur-Überständen von Osteoblasten, wurden die Zellen mit 10 mM bzw. 15 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) behandelt, die als schwache Base den intrazellulären pH-Wert erhöht. M6P-markierte Proteine können unter diesen Bedingungen nicht von dem M6P-Rezeptor dissoziieren. Die neu synthetisierten Proteine werden nicht mehr zum Lysosom transportiert, sondern verlassen über den sekretorischen Transportweg die Zelle (Brulke *et al.*, 1987b; Chang *et al.*, 1988). Damit die sezernierten Proteine nicht durch den Proteinanteil des bovinen fötalen Kälberserums (FKS), welches dem konventionellen Zellmedium zugeführt werden muss, verunreinigt werden, wurde dem Medium während der NH_4Cl -Inkubation kein FKS zugesetzt. Dieses Medium wird im weiteren Verlauf als Erntemedium (EM) bezeichnet. Zur Regeneration der Zellen erfolgte nach einer Inkubation mit EM eine Inkubation mit Komplettmedium (KM), welches FKS enthält. Für die Aufreinigung von Proteinen wurden Osteoblasten isoliert (siehe 3.2.1.4) und nach einer 80 %-igen Konfluenz des Zellrasens ausdifferenziert (siehe 3.2.1.5), wobei der erste Tag, an dem die Differenzierungsfaktoren zugegeben wurden, Tag 0 entspricht. Am Tag 8 wurde mit der NH_4Cl -Behandlung begonnen (Abb. 3.2).

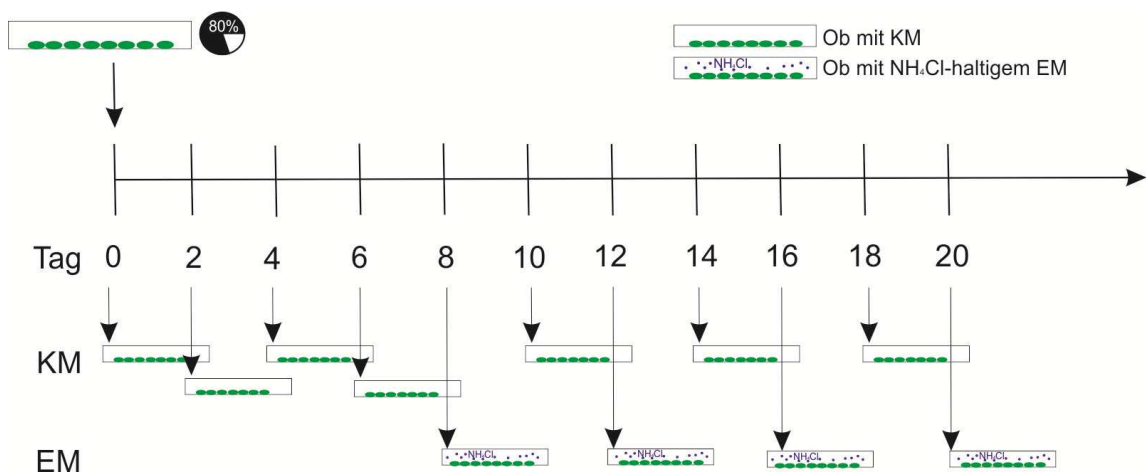


Abb. 3.2 Protokoll zur Gewinnung lysosomaler Proteine aus Osteoblastenkulturen. Nachdem die primär kultivierten Osteoblasten (Ob) eine 80 %-ige Konfluenz des Zellrasens aufwiesen, wurde mit der Differenzierung durch Hinzufügen des Komplettmediums (KM) begonnen (Tag 0). Am Tag 8 wurden die Zellen mit dem NH_4Cl -haltigen Erntemedium (EM) behandelt. Nach einem bestimmten Zeitraum (hier 48 h) wurde das Medium regelmäßig gewechselt bis die Zellen ca. 20 Tage alt waren.

Bei jedem Medienwechsel wurden 2 ml EM zur Analyse der Aktivität lysosomaler Hydrolasen in Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Für die Präzipitation aller restlichen Proteine wurden die Zellkulturüberstände mit 0,5 g/ml Ammoniumsulfat versetzt und bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden nach Abnahme der Zellkulturüberstände zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss an eine Inkubation mit EM wurden die Zellen 1 h mit Waschmedium in einem Zell-Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von Rückständen des NH₄Cl zu befreien. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem KM inkubiert. Die Überstände wurden so lange gesammelt bis die Zellen maximal ca. 20 Tage alt waren.

Die präzipitierten Proteine der mit EM behandelten Zellen wurden bei 20.000 x g, 45 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Rotor SS-34, Sorvall) pelletiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert und in einen Dialyseschlauch überführt (Spectra/Por MWCO: 3,5 kDa (Cut-Off)). Der verschlossene Dialyseschlauch wurde gegen 2 l PBS bei 4 °C im Kühlraum über Nacht auf einem Rührer dialysiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine erneut für 6 h gegen 2 l PBS dialysiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lösungsvolumen wurde bestimmt und mit 0,2 % Triton-X-100 sowie Inhibitor-Cocktail versetzt.

Komplettmedium

α-Mem

2,2 g Natriumhydrogencarbonat (pH 6,9)

10 % fötales Kälberserum

1 % Penicillin/Streptomycin

β-Glycerolphosphat (10 mM)

Ascorbat (50 µg/ml)

Erntemedium

Komplettmedium ohne 10 % fötales Kälberserum

10 mM oder 15 mM NH₄Cl (aus 1 M Stocklösung frisch hinzugefügt)

Waschmedium

 α -Mem

1 % Penicillin/Streptomycin

3.2.2.8 M6P-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Isolation eines Analyten aus einer Lösung verschiedener Stoffe. Der Trennungseffekt basiert auf der spezifischen Affinität des Proteins zu einem Liganden. Dies kann ein Inhibitor, Substrat oder Cofaktor des Proteins sein oder aber ein Proteinbindungspartner wie z.B. ein Antikörper. Für die Isolierung Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltiger Proteine wurde eine *Affi-Gel-Sepharose*-Säule verwendet, an die ein *single-chain Fragment variable*-M6P-Antikörper (scFv-M6P-Antikörper) gekoppelt wurde (Müller-Loennies *et al.*, 2010; Affi Gel 10v, A7738-1, Biorad, München).

Die eingesetzte Säule hatte ein Bettvolumen von 500 μ l mit an *Affi-Gel-Sepharose* immobilisierten scFV-M6P-Antikörpern. Die Säule wurde zunächst mit Säulen-Puffer 1 gewaschen. Anschließend wurden 2 ml der *Load*-Fraktion auf die Chromatographie-Säule aufgetragen und bei 4 °C auf dem Drehrad über 4 h inkubiert. Der Durchlauf (*Flow-Through*, FT) und alle weiteren Fraktionen wurden aufgefangen und analysiert. Die Säule wurde mit 5 ml Waschpuffer 1 (Waschfraktion 1, W 1) und anschließend mit 10 ml Waschpuffer 2 (Waschfraktion 2, W 2) gewaschen. Waschpuffer 2 enthielt 10 mM Glucose-6-phosphat und 10 mM Mannose. Dies sind Monosaccharide, die M6P strukturell ähnlich sind. Die Zugabe dieser Zucker eluiert unspezifisch gebundene Zuckerstrukturen, z.B. glykosylierte Proteine ohne M6P-Modifikation. Anschließend wurde dreimal für 10 min 500 μ l Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen. Dieser enthielt 10 mM M6P, sodass die M6P-haltigen Proteine durch die kompetitive Bindung des freien M6Ps an den immobilisierten Antikörper eluiert wurden. Die eluierten Lösungen wurden in einem Reaktionsröhrchen gepoolt. Die gewonnene Elutions-Fraktion wurde dann 10 x erneut über die Säule gegeben und tröpfchenweise aufgefangen (Abb. 3.3). Nach Verwendung der Säule wurde diese mit 5 ml PBS gewaschen und der Durchlauf aufgefangen. Mit 2 ml PBS wurde erneut nachgespült. Anschließend wurde zum Lagern 1,5 ml vom Säulen-Puffer 2 auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C abgestellt. Die M6P-Affinitätschromatographie fand stets bei 4 °C im Kühlraum statt. Um eine

Keratinkontamination zu vermeiden, wurde unter streng sterilen Bedingungen gearbeitet.

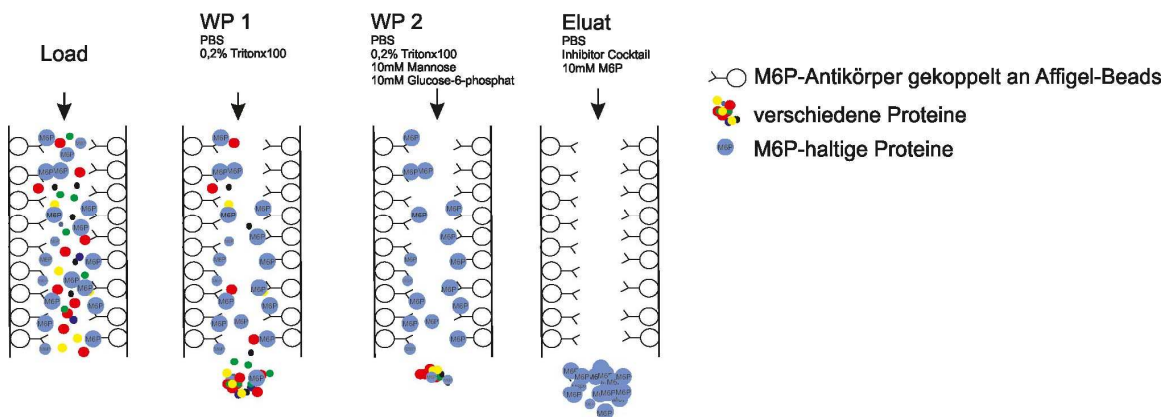


Abb. 3.3 M6P-Affinitätschromatographie. Die aufgereinigten Proteine wurden als *Load*-Fraktion auf die M6P-gekoppelten Affigel-Beads gegeben. Nach mindestens 4 h wurden die Beads mit dem Waschpuffer 1 (WP 1) und dem Waschpuffer 2 (WP 2) gewaschen. Für das Eluat wurden die M6P-haltigen Proteine kompetitiv mit einem M6P-haltigen Elutionspuffer abgelöst.

Säulen-Puffer 1	5 ml (PBS + IC+ 1 mM 1,10-Phenanthrolin)
Waschpuffer 1	5 ml (PBS + 0,2 TritonX-100)
Waschpuffer 2	10 ml (PBS+0,2 % TritonX-100+10mM Glucose-6-phosphate+10 mM Mannose)
Elutionspuffer	3 x 500 μ l (PBS+IC +10 mM Mannose-6-phosphat)
Säulen-Puffer 2	1,5 ml (PBS+IC+1,10-Phenanthroline+0,02 % Natriumazid)

3.2.2.9 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silberfärbung

Die Silberfärbung von Gelen für die Massenspektrometrie (siehe 3.2.2.10) erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des FireSilver Staining Kit der Firma Proteome Factory.

3.2.2.10 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen eines Aufreinigungsexperiments wurden von der *Core Facility* für Massenspektrometrische Proteomanalytik des

Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte hier durch Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (*liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS/MS)). Die Analyse wurde mit Hilfe eines Ionenfallen-Massenspektrometers (LC/MSD Trap XCT, Agilent), dem eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, nanoHPLC) vorgeschaltet war, durchgeführt. Für die Vorbereitung der Proben wurden 10 %-ige Minigele (siehe 3.2.2.5) angefertigt. Die aufkonzentrierten Proteine (siehe 3.2.2.2) wurden mit reduzierendem Solubilisierungspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel geladen. Bei 85 V wurden die Proben kurz elektrophoretisiert bis das Material sich gerade im Trenngel angesammelt hatte. Im Anschluss erfolgte eine Silberfärbung der Gele (siehe 3.2.2.9). Der sich anschließende tryptische Verdau der Proteine und die weiteren massenspektrometrischen Analysen erfolgten durch die *Core Facility*. Mit Hilfe der ermittelten Peptidmassen wurden die murinen Proteine in den Proben mittels Mascot-Datenbank-Analyse identifiziert. Den analysierten Peptiden wurden *Protein Scores* zugewiesen. Je höher ein *Protein Score* ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein in der Fraktion vorliegt.

Die massenspektrometrische Analyse eines zweiten Aufreinigungsexperiments wurde durch den Service Massenspektrometrie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn durchgeführt. Hier erfolgte die Vorbereitung für einen tryptischen Verdau der Proteine in Lösung. Die Peptide wurden über ein nanoflow-HPLC-System (Ultimate3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific) und auf eine ID C18-Vorsäule (Nanoseparations, Niederlande) geladen. Die HPLC war online mit einem LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt. Die Rohdaten wurden mit der Software *Proteome-Discoverer 1.3* (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte auch hier über eine Mascot-Datenbank-Suche. Über die Abschätzung der Falsch-Positiv-Rate (FPR) konnten die Peptide bestimmten Proteinen zugeordnet werden. Das *peptide spectrum match* (PSM) stellte hier ein Maß für das Vorkommen eines Proteins in der untersuchten Fraktion dar.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Gewinnung von DNA von Mukopolidose Typ II (MLII)-Mäusen wurden Ohrstanzen oder Schwanzspitzen verwendet. Die Gewebe-Proben wurden mit 500 µl Gewebe-Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 56 °C auf einem Heizschüttler inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluss bei RT für 5 min und 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde sie 5 min bei RT und 18000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 15 min bei RT und 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen. Dieser Schritt wurde erneut wiederholt. Das DNA-Pellet wurde bei 37 °C für 15 min im Inkubator getrocknet und anschließend über Nacht in 100 µl ddH₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Gewebe-Lysispuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 7,4
	0,2 M NaCl
	5 mM EDTA
	15 µl SDS-Lösung (10 %)
	20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)

3.2.3.2 Genotypisierung des *Gnptab*^{c.3082insC}-Mausmodells mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und diente hier dazu, den Genotyp der zu untersuchenden *Gnptab*^{c.3082insC}-Mäuse zu bestimmen. Bei dem *Gnptab*^{c.3082insC}-Mausmodell wurde eine bekannte menschliche Mutation des *GNPTAB*-Gens in das homologe *Gnptab*-Gen der Maus eingefügt. Bei der Mutation handelt es sich um eine Insertion eines Cytosin-Restes in Exon 16 (c.3082insC). Die Insertion der Mutation im *Gnptab*-Gen führt zu einem *Frameshift* im Leseraster des Gens und zu einem verfrühten Stoppcodon. Zur Generierung des *Gnptab*^{c.3082insC}-Mausmodells nutzt man die integrierten Frt- oder LoxP-Sequenzen in Intron 13 und 15 des *Gnptab*-Gens,

die bei der Herstellung des Mausmodells zusätzlich in das Gen eingefügt wurden (siehe Kollmann *et al.*, 2012, *Supplemental Data*) und verwendet Primer, die im *Gnptab*-Gens spezifisch vor und hinter der eingefügten Sequenzen binden (Abb. 3.4).

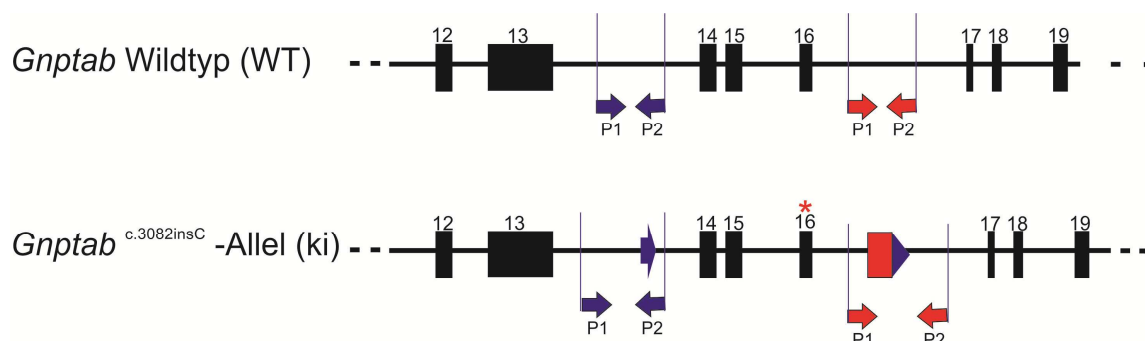


Abb. 3.4 *Gnptab*-Wildtyp (WT) und knock-in (ki)-Allel im *Gnptab*^{c.3082insC}-Mausmodell. In Intron 13 des ki-Allels ist eine LoxP-Sequenz (blau) eingefügt. In Intron 15 liegt eine Frt- (rot) und eine LoxP-Sequenz (blau) vor. Die verwendeten Primer-Bindungsstellen sind mit Pfeilen markiert.

Pro PCR-Ansatz wurden 10 µl isolierter DNA mit den Reagenzien der Tab. 3.3 vermischt. Die 50 µl-PCR-Ansätze wurden dann nach folgendem PCR-Programm im Thermocycler inkubiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel aufgetrennt und detektiert (siehe 3.2.3.3).

Tab. 3.3 PCR-Pipettierschema.

Menge (µl)	Reagenz
5	10x <i>Green</i> - PCR- Reaktionspuffer
1	10 mM dNTP-Mix
2	DMSO
2,5	10 µM forward-Primer
2,5	10 µM reverse-Primer
0,25	DNA-Polymerase
26,75	ddH ₂ O

PCR-Programm:	3 min	95 °C
	40 x	95 °C
		61 °C
		72 °C

4 min	72 °C
∞	10 °C

Primer-Sequenzen (Sequenz 5'-3')

Gnptab^{c.3082insC}_for CATCCCACCGACTCAGGAAG

Gnptab^{c.3082insC}_rev GCAGCAGTGCCCATCTGATA

3.2.3.3 Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen

Zur Identifizierung von DNA-Fragmenten und zur qualitativen Analyse von RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für DNA wurden 3 %-ige Agarose-Gele verwendet. Es wurden 5,4 g Agarose mit 180 ml TAE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle so lange aufgeköcht bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Im Anschluss wurde die Lösung auf 60 °C abgekühlt und anschließend 20 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Das Gel wurde in eine Form gegossen. Nachdem es ausgehärtet war, wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Die Taschen des Gels wurden mit 15 µl der amplifizierten DNA-Proben aus der PCR (siehe 3.2.3.2) gefüllt. Nach ca. 20 min (bei einer Spannung von 3-4 V/cm) waren die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und kann durch die Veränderung des Absorptionsspektrums sichtbar gemacht werden. Daher erfolgte im Anschluss die Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht und die Dokumentation mittels UV-Kamera-System.

Zur qualitativen Analyse von RNA wurde ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Dazu wurde 2 mg Agarose in 200 ml TAE-Puffer verwendet und das Gel wurde wie oben beschrieben vorbereitet. Für die Proben wurde 1 µl RNA mit 1 µl RNA-Ladepuffer verwendet. Bei 120 V wurde die RNA in ca. 20 min elektrophoretisch getrennt und im Anschluss mit dem UV-Kamera-System sichtbar gemacht.

TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl, pH 8,3
	20 mM Essigsäure
	2 mM EDTA

3.2.3.4 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte nach dem *GeneJETTM RNA Purification Kit* (Fermentas). Die Vorgehensweise entspricht dem Herstellerprotokoll (Protokoll B: *Mammalian Cultures Cells Total RNA Purification Protocol*). Die RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.3.5) und der Überprüfung der Qualität in Agarosegelen (siehe 3.2.3.3) für die cDNA-Synthese (siehe 3.2.3.6) sowie Microarray-Analysen (siehe 3.2.3.7) eingesetzt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen

Um die Konzentration von RNA in den Proben zu bestimmen, wurden jeweils 2 µl der RNA-Probe mit 98 µl DEPC-H₂O verdünnt. Die RNA-Konzentration in den RNA-Lösungen wurde dann mittels photometrischer Absorption bei 260 nm gegen ddH₂O in einer UV-Küvette ermittelt. Dabei entsprach eine OD_{260nm} von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Reine RNA hat einen OD_{260/280}-Quotienten von 2,0.

3.2.3.6 cDNA-Synthese und Realtime-PCR

Mit Hilfe der Realtime-PCR kann die Expressionsrate spezifischer Gene untersucht und die Transkriptionsmenge quantifiziert werden. Zur Realtime-Analyse wurde der *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) verwendet. Dieser enthält die spezifischen Primer und Fluoreszenz-markierte Sonden für das zu bestimmende Gen. Am 5'-Ende enthält die *TaqMan*-Sonde einen Reporter- und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff. Bevor die *Taq*-Polymerase gebunden hat, sind Quencher- und Reporter-Sonde so nah aneinander, dass der Quencher-Farbstoff die Lichtsignale des Reporter-Farbstoffs absorbiert und diese somit nicht detektiert werden können. Während der PCR entfernt die *Taq*-Polymerase diese Sonden, indem sie ausgehend von dem gebundenen Primer die cDNA amplifiziert. Hierdurch verlieren Reporter- und Quencher-Farbstoff die räumliche Nähe zueinander und die Lichtsignale des Reporters können freigesetzt und detektiert werden (Abb. 3.5). Die Detektion der Lichtsignale korreliert mit der Amplifikation des PCR-Produktes, die wiederum von der eingesetzten *Template*-Menge abhängt und somit die Konzentration der mRNA des untersuchten Gens in der Probe anzeigt.

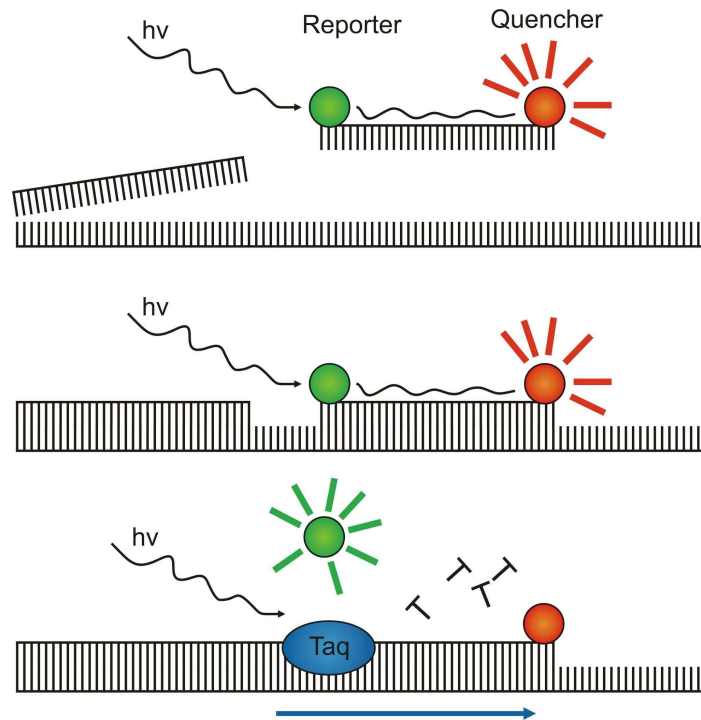


Abb. 3.5 Schematische Darstellung des Taqman-Prinzips. Reporter- und Quencher-Farbstoff liegen eng aneinander, sodass der Quencher die Lichtsignale der Reporter-Sonde absorbiert. Die *Taq*-Polymerase verlängert während der PCR ausgehend von einem Primer den Nukleotidstrang. Dadurch wird die Sonde entfernt und der Reporterfarbstoff wird freigesetzt. Seine Lichtsignale können dann detektiert werden.

Es wurde zunächst mRNA aus Zellen isoliert (siehe 3.2.3.4) und mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die Reaktionsansätze auf Eis gemischt und dann im Thermocycler inkubiert.

Reaktions-Ansatz:	2 μ l	10 x RT-Puffer
	0,8 μ l	25 x dNTP-Mix (100 mM)
	2 μ l	10 x RT-Random-Primer
	1 μ l	MultiScribe-Reverse-Transkriptase
	4,2 μ l	DEPC- H ₂ O
	1 μ g	RNA in 10 μ l DEPC-H ₂ O
Programm:	10 min	25 °C
	120 min	37 °C
	5 sek	85 °C

Die erzeugte cDNA wurde anschließend nach folgendem Schema als Template in der Realtime-PCR eingesetzt. Alle cDNA-Proben wurden in dreifacher Bestimmung pipettiert und gemessen.

Realtime-PCR-Ansatz:	10 μ l	2 x PCR-Master-Mix
	7 μ l	DEPC-H ₂ O
	2 μ l	cDNA
	1 μ l	TaqMan-Assay

Im PCR-Gerät Stratagene Mx3000P wurden die Ansätze nach dem folgenden Modus analysiert:

PCR-Programm:	<u>10 min</u>	<u>95 °C</u>
	40 x 30 sek	95 °C
	<u>1 min</u>	<u>60 °C</u>

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Als C_T -Wert (*cycle of threshold*) wird der PCR-Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz in der *TaqMan*-PCR-Reaktion des untersuchten Gens erstmals signifikant höher ist als die Hintergrundfluoreszenz. Als Referenz wird für jede cDNA-Probe der C_T -Wert von β -Aktin ermittelt, um die C_T -Werte der untersuchten Gene zu normalisieren. Den normalisierten C_T -Wert bezeichnet man als ΔC_T . Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert stellt den Unterschied der C_T -Werte eines Gens nach Normalisierung mit Aktin dar.

3.2.3.7 Microarray-Analyse

Die Affymetrix-Genchip-Analyse ermöglicht die gleichzeitige Messung der Expression von mehr als 40.000 Genen zwischen zwei oder mehr Proben. Auf den Affymetrix-Genchips befinden sich spezifische Oligonukleotide, mit denen aus mRNA umgeschriebene cDNA hybridisiert, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals können Aussagen über die Expression spezifischer Gene im Vergleich zwischen zwei Proben gemacht werden.

Für die Analyse wurde mRNA aus 10 Tage alten WT- und MLII-Osteoblasten isoliert (siehe 3.2.3.4). Das Experiment wurde mit dem Affymetrix *Mouse Genom 430 2.0* Genchips im Labor des *Array Service Centers* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt und ausgewertet. Mit dem *3'IVT Express Kit* (Affymetrix)

wurde 100 ng mRNA in Biotin-markierte cDNA umgeschrieben. Für die Hybridisierung wurden 15 µg fragmentierter cDNA mit 200 µl der Hybridisierungs-Lösung auf den Genchips in dem Hybridisierungs-Ofen (Affymetrix) bei 45 °C für 16 h inkubiert. Die Genchips wurden im Anschluss nach dem Herstellerprotokoll gewaschen und mit der Affymetrix *Fluidics Station 450* gefärbt. Nachdem die Fluoreszenz-Intensität mit dem Affymetrix GeneChip Scanner 7G ausgelesen wurde, wurden die Daten durch zwei interne Kontrollhybridisierungsproben (GAPDH, β-Aktin) und mit Hilfe der Software *GCOS* (Version 1.4, Affymetrix) auf ein Zielsignal von 200 normalisiert. Es erfolgte ein paarweiser Kreuzvergleich der Signalintensitäten der Gene in allen vier Proben (Abb. 3.6).

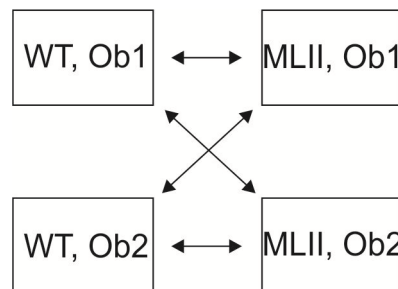


Abb. 3.6 Analyse der Genexpression von WT- und MLII-Osteoblasten. Die Genexpressionsmuster von 10 Tage alten primär kultivierten WT- und MLII-Osteoblasten aus zwei unabhängigen Experimenten (pro Genotyp n = 2) wurden durch einen paarweisen Kreuzvergleich der einzelnen Proben untereinander ermittelt.

In die weitere Analyse wurden die Gene einbezogen, für die in allen Proben ein Signal detektierbar war und bei denen sich die Expressionsänderung in allen Vergleichen gleichgerichtet verhielt. Gene, deren Signalintensitätsunterschiede in WT und MLII einen p-Wert > 0.05 aufwiesen, wurden als *change call* angegeben, d.h. es handelte sich hier um eine signifikante Änderung in der Expression. Für die quantitative Abschätzung der Expressionsänderung wurde diese als SLR (*Signal Log Ratio*) angegeben. Die SLR misst das Ausmaß und die Richtung der Änderung zwischen den Transkripten von WT- und MLII-Osteoblasten und steht mit dem Signalintensitätsunterschied (*Fold Change*) in folgendem mathematischen Verhältnis:

$$Fold\ Change = 2^{SLR},\ wenn\ SLR > 1$$

$$Fold\ change = (-1) \times 2^{-SLR},\ wenn\ SLR \leq -1$$

Eine SRL von 1 entspricht somit einer 2-fach erhöhten Expression, eine SLR von -1 einer 2-fachen Reduktion der Expression. Die fehlregulierten Gene wurden im

Anschluss durch die Internet-basierte Software *ingenuity pathway analysis* (IPA) (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, USA) analysiert und gruppiert.

3.2.4 Immunfluoreszenz und Mikroskopiertechniken

3.2.4.1 Lektin-Färbung der Resorptionslakunen

Um die Resorptionsaktivität von Osteoklasten *in vitro* zu untersuchen, wurden monozytäre Vorläuferzellen auf Dentin zu Osteoklasten isoliert (siehe 3.2.1.1) und kultiviert (siehe 3.2.1.2). Nach einer Inkubationsphase von 12 Tagen wurden die Zellen entfernt und die Dentin-Oberfläche mit biotinyliertem *wheat germ agglutinin* (WGA)-Lektin und Alexa Fluor® 546-Streptavidin angefärbt, welches freigelegte Sialinsäure-Reste der Dentinoberfläche bindet (Selander *et al.*, 1994). Anschließend konnte die Dentinoberfläche mittels Konfokalmikroskopie dargestellt und untersucht werden. Nach der Inkubation von Osteoklasten auf Dentin (siehe 3.2.1.3) wurde das Medium abgenommen und die Chips für 10 min bei RT in 200 µl 1 % SDS inkubiert. Im Anschluss wurden die Chips auf Filterpapier gelegt und auf der Rückseite markiert. Danach wurden sie in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 20 ml PBS überschichtet und auf Eis 5 min mit Ultraschall behandelt. Die Chips wurden mit PBS abgespült und in 24-Well-Platten gelegt. Pro Well wurden 250 µl Lektin-Lösung aufgetragen und die Chips für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült und für 1 h mit 250 µl der Fluoreszenz-Lösung bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Dentinchips dreimal mit PBS gewaschen und mit Glycerol-Gelatine auf Objektträgern eingedeckelt.

Lektin-Lösung	1 % BSA in PBS 0,01 mg/ml biotinyliertes <i>wheat germ agglutinin</i> (WGA)- Lektin
Fluoreszenz- Lösung	1 % BSA in PBS 1 µg/µl Alexa Fluor® 546-Streptavidin

3.2.4.2 Messung der Dentinresorption von Osteoklasten mittels Konfokalmikroskopie

Um die Resorptionsaktivität von Osteoklasten zu untersuchen, wurden primär kultivierte Osteoklasten auf Dentinchips kultiviert (siehe 3.2.1.3). Es erfolgte die Färbung dieser Dentinchips mit Fluoreszenz-markiertem WGA-Lektin (siehe 3.2.4.1), um die Resorptionslakunen durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem Konfokalmikroskop detektieren zu können. Mit Hilfe des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 II AOBS wurde das zur Färbung der Knochenoberfläche verwendete Alexa Fluor® 546-Streptavidin (siehe 3.2.4.1) im Resonanzscan-Modus mit einem 561 nm-Laser angeregt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem GaAsP-Hybrid-Detektor gesammelt. Für eine dreidimensionale Erfassung der Resorptionslakunen wurde die z -Ebene mit einer festen z -Stack-Größe von 6 μm detektiert. So konnte die Tiefe der Resorptionsbereiche ermittelt werden. Um die gesamte Fläche des Chips zu erfassen, wurde die Position der oberen, unteren, linken und rechten Kante des Chips mit dem motorisierten Tisch des Mikroskops angefahren und markiert. Die *TileScan*-Funktion ermöglichte es, den markierten Bereich abzufahren, zu scannen und die erzeugten Einzelbilder zu einer Gesamtaufnahme zusammenzufügen (Abb. 3.7).

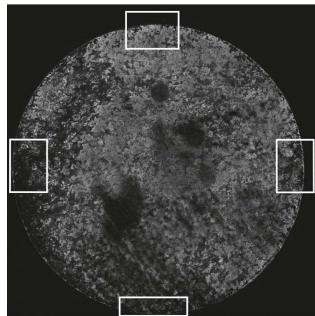


Abb. 3.7 *TileScan*-Funktion am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 II AOBS. Mit Hilfe eines Joysticks und des motorisierten Tisches des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 II AOBS wurden vier Positionen markiert (weiße Rechtecke), um den Scan-Bereich festzulegen. Der gesamte Dentinchip wurde anhand dieser Markierungen mit der *TileScan*-Funktion durchgescannt. Am Ende wurden die Einzelbilder zu dem Gesamtbild des Dentinchips, wie er hier dargestellt ist, zusammengefügt.

Die Berechnung der mit Resorptionslakunen besetzten Oberfläche erfolgte mit Hilfe der Bildanalyse-Software *Volocity 6.1* der *Microscopy Imaging Facility* des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Zunächst wurde der Radius jedes Dentinchips ausgemessen, um die komplette Fläche (ebene Fläche eines Kreises πr^2 , A_K) zu berechnen. Im Anschluss wurde die maximale Projektion der Abbildung ermittelt

(*maximal intensity projection*). Alle Pixel mit einer Intensität, die höher war als ein festgelegter Schwellenwert (nicht niedriger als 30, nicht höher als 255), wurden aufaddiert. Diese Summe wurde als die insgesamt resorbierte Fläche (A_r) des Dentinchips definiert. Hieraus wurde der prozentuale Anteil der mit Resorptionslakunen besetzten Fläche an der Gesamtfläche ermittelt ($(A_r/A_k) \cdot 100$).

Tab. 3.4 Einstellungen am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 II AOBS zur Detektion der Resorptionsbereiche von Osteoklasten auf Dentinchips.

Objektiv	HCPL FLUOTAR 10x/ NA 0.30 DRY
Z- Stack- Größe	6 μm
Zoom	1,70
Gain	10%
Laser	OPSS 561
Detektor	GaAsP Hybrid
Auflösung	10fach
Mode	Resonanz-Scanner

3.2.4.3 Ausmessung einzelner Resorptionslakunen von Osteoklasten mittels Konfokalmikroskopie

Neben der Detektion der resorbierten Knochenfläche pro Dentinchip (siehe 3.2.4.2) erfolgte die Ausmessung und Charakterisierung einzelner Resorptionslakunen. Anhand des motorisierten Tisches des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 II AOBS und der *Multipoint*-Analyse wurden einzelne Positionen auf den Dentinchip mit einem Joystick angefahren, um die Resorptionslakunen unter dem Resonanzscan-Modus aufzunehmen und zu markieren (Abb. 3.8A). Es wurden mindestens sechs Positionen aufgesucht, um eine statistisch signifikante Anzahl von Resorptionslakunen zu erhalten. Für eine dreidimensionale Detektion der Lakunen wurden der höchste und der tiefste Punkt einer Resorptionslakune bestimmt. Entlang der z-Achse wurden zwischen höchstem und tiefstem Punkt Einzelaufnahmen mit einem festen Abstand von 0,6 μm generiert und zu einem Aufnahmenstapel (*z-Stack*) zusammengefügt (Abb. 3.8B). Mit Hilfe der Bildanalyse-Software *Volocity 6.1* konnten aus dem *z-Stack* zweidimensionale Abbildungen der xy-, xz- und yz-Ebene und dreidimensionale Topologieabbildungen erzeugt werden. Die Ausmessung der Resorptionslakunen wurde manuell anhand des Lineal-Tools der Software in der xz-(yz-)Ebene durchgeführt. Es wurde von der tiefsten

Stelle einer Resorptionslakune bis zur Knochenoberfläche gemessen und zur Dokumentation ein Snapshot der einzeln ausgemessenen Resorptionslakunen gemacht (Abb. 3.8C). Die vermessenen Resorptionslakunen-Tiefen wurden in eine Excel-Tabelle überführt und die Mittelwerte und die Standardabweichungen ermittelt.

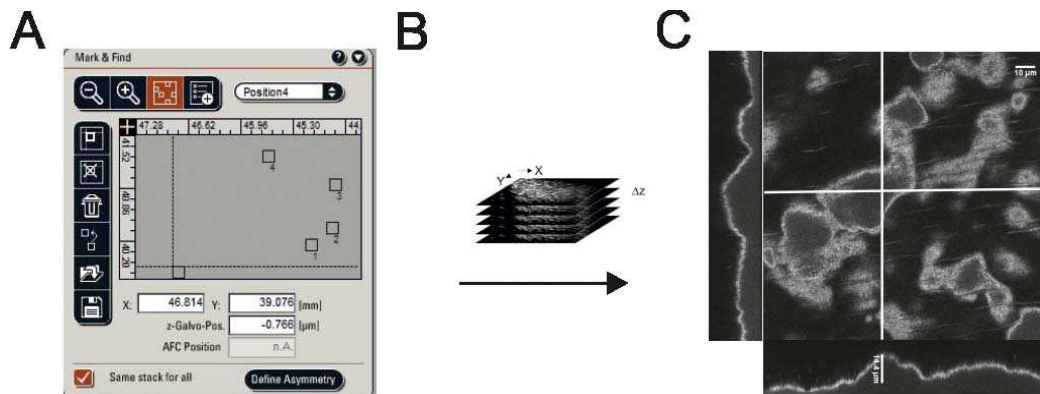


Abb. 3.8 Messung der Resorptionslakunen von Osteoklasten mittels Multipoint-Analyse. (A) Anhand des motorisierten Tisches und des *Multipoint*-Analyse-Tools des Leica TCS SP5 II AOBS konnten mittels Joystick verschiedene Positionen auf dem Dentinchip angefahren und markiert werden. (B) Mit einer *z*-Stack-Größe von 0,6 μm wurden die Resorptionslakunen aufgenommen. (C) Mit Hilfe der Bildanalyse-Software *Velocity 6.1* erfolgte eine Darstellung der *xy*-, *xz*- und *yz*-Ebene. Die Ausmessung erfolgte in der *xz*- (*yz*-)Ebene mit Hilfe eines Lineal-Tools.

Tab. 3.5 Einstellungen am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 II AOBS zur Detektion einzelner Resorptionslakunen von Osteoklasten auf Dentinchips.

Objektiv	HCX PLAPO CS 63x/ NA 1.40 OIL
Z- Stack- Größe	0,6 μm
Zoom	1,70
Gain	10%
Laser	OPSS 561
Detektor	GaAsP Hybrid
Auflösung	10fach
Mode	Resonanz-Scanner

3.2.5 Maushaltung

Die Wildtyp-Mäuse (C57-black) wurden von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt (Reinzucht, The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)). Homozygote *Acp2/Acp5*^{-/-}-Mäuse wurden von Professor Paul Saftig von der Christian-Albrechts-Universität in Kiel bereitgestellt (Suter *et al.*, 2001). Die *Gnptab*^{c.3082insC}-Mäuse (MLII-Mäuse) entstammen der

Arbeitsgruppe von Professor Thomas Braulke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Kollmann *et al.*, 2012). Die verwendeten Mäuse wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Dort erfolgte die Züchtung unter pathogenfreien Bedingungen und einem geregelten Tag- und Nacht-Rhythmus.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Resorptionsaktivität von MLII-Osteoklasten

Untersuchungen am Mukopolidose Typ II (MLII)-Mausmodell zeigten, dass 1. die Konzentration an Knochenabbauprodukten im MLII-Mausserum erhöht ist (Kollmann *et al.*, 2013), 2. im Knochengewebe eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten nachweisbar ist und 3. verschiedene lysosomale Enzyme, u.a. Cathepsin K, aufgrund des Mannose-6-Phosphat (M6P)-Verlusts von Osteoklasten in den Extrazellulärraum fehlsortiert werden (Kollmann *et al.*, 2013). Deshalb erschien es möglich, dass die erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme in die Resorptionslakune erfolgt, was zu einer erhöhten Resorptionsaktivität individueller MLII-Osteoklasten führen würde. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Resorptionsaktivität individueller Osteoklasten bei MLII zusätzlich zur Erhöhung der *in vivo*-Umsatzrate beiträgt, wurden Osteoklasten von Wildtyp (WT)- und MLII-Mäusen isoliert, auf Dentinchips kultiviert und die Resorptionsaktivität der Zellen nach 12 Tagen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert.

4.1.1 Resorptionsaktivität von WT- und MLII- Osteoklasten

Auf Dentin kultivierte Osteoklasten differenzieren in einen aktiven, polarisierten Zustand, bilden eine Resorptionslakune aus und resorbieren Knochenmatrix. Um zu untersuchen, ob sich die Differenzierung und die Ausbildung der Resorptionslakunen von MLII-Osteoklasten *in vitro* vom WT unterscheiden, wurden aus dem Knochenmark von 21 Wochen alten, weiblichen WT- und MLII-Mäusen (n = 3) isoliert. Die gleiche Anzahl von Zellen eines Tieres ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurde auf jeweils zwei Dentinchips ausplattiert und für 12 Tage in Kultur differenziert. Zur Analyse der auf einem Dentinchip ausgebildeten Resorptionsflächen und -lakunen wurden die Zellen vom Dentin gelöst und die freigelegten Sialinsäurereste auf der Dentinoberfläche mittels Alexa Fluor® 546-markiertem WGA-Lektin angefärbt. Am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 II AOBS wurde die gesamte Oberfläche des Dentinchips gescannt, um die mit Resorptionslakunen bedeckte Fläche zu ermitteln. Der Anteil der resorbierten

Fläche an der gesamten Dentinoberfläche wurde im Anschluss mit Hilfe der Bildanalyse-Software *Volocity 6.1* quantifiziert.

Abb. 4.1 zeigt Dentinchips, auf denen WT- bzw. MLII-Osteoklasten kultiviert wurden sowie 50-fache Vergrößerungen der Dentinoberfläche (weiße Rechtecke). Sowohl WT- als auch MLII-Osteoklasten sind auf Dentin in einen aktiven Zustand differenziert und haben Resorptionslakunen ausgebildet, die durch die Lektinfärbung markiert werden konnten. Die Resorptionslakunen waren auf der Dentinchip-Oberfläche sehr heterogen verteilt. In einigen Bereichen lagen die Resorptionslakunen sehr dicht nebeneinander oder gingen ineinander über, sodass nicht beurteilbar war, ob an der Ausbildung des Resorptionsbereichs ein oder mehrere Osteoklasten beteiligt waren. Dazwischen lagen Bereiche mit wenigen, klar abgegrenzten Resorptionsflächen. Die Resorptionslakunen wiesen variationsreiche Formen auf: teilweise waren runde bis ovale Lakunen zu finden, teilweise waren linienförmige Spuren zu erkennen, die durch Wanderung der Osteoklasten während der Resorptionsphase auf der Dentinoberfläche entstanden.

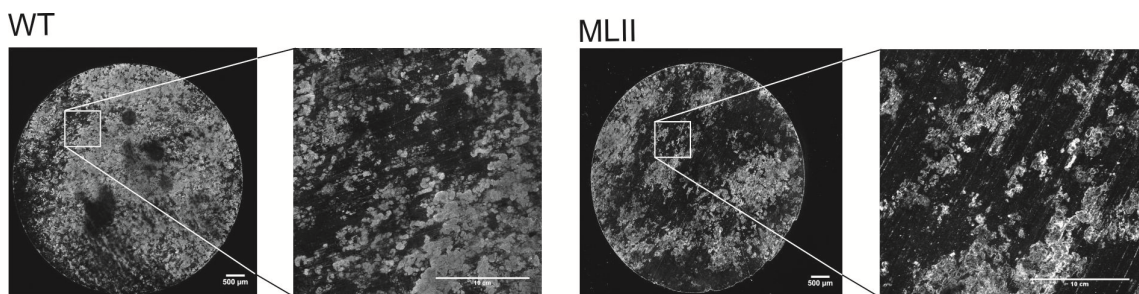


Abb. 4.1: Resorbierte Fläche von WT- und MLII-Osteoklasten auf Dentin. WT- und MLII-Osteoklasten wurden 12 Tage auf Dentinchips kultiviert. Die mit Resorptionslakunen besetzte Fläche wurde nach Ablösung der Zellen mit biotinyliertem WGA-Lektin sowie Alexa Fluor® 546-Streptavidin markiert. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurden die Resorptionsbereiche am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 AOBS detektiert. Die weißen Rechtecke sind in einer 50-fachen Vergrößerung dargestellt. Balken 500 µm, 10 µm.

Um zu quantifizieren, ob MLII-Osteoklasten auf Dentin mehr Knochen resorbieren als WT-Osteoklasten, wurde der Anteil der Resorptionsflächen auf der Dentinoberfläche bestimmt (Abb. 4.2). Der Flächenanteil der Resorptionslakunen auf den Dentinchips (A_r/A_k) schwankte bei WT-Osteoklasten zwischen 24 % und 91 % und bei MLII-Osteoklasten zwischen 47 % und 90 % (Abb. 4.2A). Dies ist hauptsächlich durch die heterogene Verteilung der Resorptionslakunen zu erklären. Insgesamt konnten durch die Quantifizierung der Resorptionsflächen zwischen WT-Osteoklasten und MLII-Osteoklasten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Knochenresorption

detektiert werden (Abb. 4.2B). In vorangegangenen Experimenten konnte ermittelt werden, dass bei der Differenzierung von MLII- und WT-Osteoklasten in Kultur eine gleiche Anzahl von Osteoklasten entstehen (Kollmann *et al.*, 2013). Die hier durchgeführten Experimente bestätigen diese Ergebnisse und zeigen zudem, dass zwischen MLII- und WT-Osteoklasten keine Unterschiede bei der Ausbildung von Resorptionslakunen vorliegen.



Abb. 4.2 Quantifizierung der durch Resorptionslakunen besetzten Fläche nach 12-tägiger Kultivierung von WT- und MLII-Osteoblasten auf Dentinchips. (A) Tabellarische Darstellung der von Resorptionslakunen bedeckten Fläche. A_k gibt die rechnerisch ermittelte Größe des gesamten Dentinchips in μm^2 an, A_r die resorbierte Fläche in μm^2 , A_r/A_k gibt die resorbierte Fläche pro Dentinchip in % an; $n = 3$ biologische Replikate; pro Tier wurden zwei Dentinchips untersucht. (B) Grafische Darstellung der relativen A_r/A_k in %. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der sechs WT- und MLII-Dentinchips aus (A).

4.1.2 Charakterisierung der Resorptionslakunen von WT- und MLII-Osteoklasten

Zusätzlich zur Untersuchung der resorbierten Fläche pro Dentinchip können Veränderungen der Resorptionsaktivität von Osteoklasten durch die Analyse der Morphologie und Tiefe von Resorptionslakunen nachgewiesen werden. Deshalb wurden die Resorptionslakunen auf den Dentinchips mikroskopisch näher charakterisiert. Mit Hilfe des *Multipoint*-Analyse-Tools des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 II AOBS wurden verschiedene Positionen auf den Dentinchips angefahren. An diesen Positionen wurden von der Knochenoberfläche bis zum tiefsten Punkt der Resorptionslakunen in einem Abstand von $0,6 \mu\text{m}$ konfokale Aufnahmen angefertigt und zu einem dreidimensionalen *z-Stack* zusammengeführt.

Mit Hilfe des *z-Stacks* wurden topologische Projektionen angefertigt, um die Morphologie der Lakunen darzustellen (Abb. 4.3A und B). Die blauen Bereiche markieren die Dentinchip-Oberfläche. Über grün, gelb bis rot nimmt die Tiefe der

Lakunen bis 35 μm zu. In der dreidimensionalen (Abb. 4.3A) und der ebenen Darstellung derselben Bereiche (Abb. 4.3B) sind qualitativ die Tiefen der verschiedenen Resorptionslakunen anhand der Farbkodierung zu erkennen.

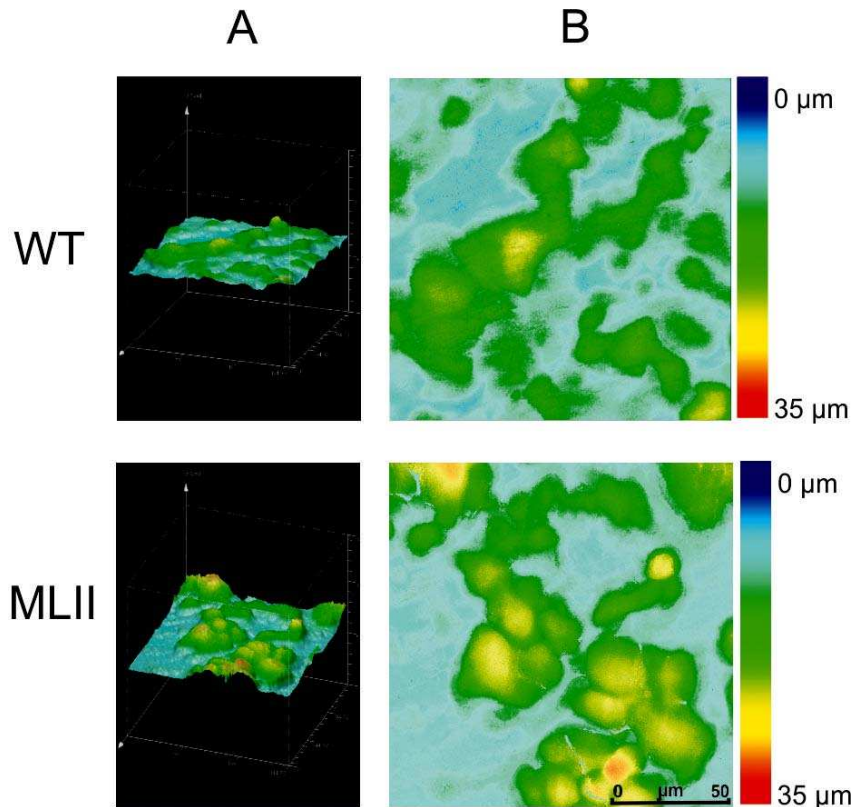


Abb. 4.3 Aufnahmen von WT- und MLII- Resorptionslakunen mittels Konfokalmikroskop. (A) Dreidimensionale, farbkodierte Darstellung von Resorptionslakunen, die *in vitro* von WT- und MLII-Osteoklasten innerhalb von 12 Tagen auf Dentinchips gebildet und mittels *Multipoint*-Analyse des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 II AOBs aufgenommen wurden. (B) Zweidimensionale Darstellung der in (A) detektierten Resorptionslakunen. Die hellblauen Bereiche markieren die Dentinchip-Oberfläche. Über grün, gelb bis rot nimmt die Tiefe der einzelnen Resorptionslakunen zu.

Die Morphologie der untersuchten Resorptionslakunen wies ebenfalls eine starke Heterogenität auf. Die Ausbuchtungen an der Oberfläche des Dentinchips waren in manchen Bereichen sehr großflächig und langgezogen. Zudem konnten die Begrenzungen einzelner Lakunen in diesen Bereichen nicht eindeutig definiert werden. Die Resorptionslakunen hatten teilweise nicht einen tiefsten Punkt, sondern wiesen mehrere Vertiefungen auf. An anderer Stelle fanden sich eher kleine, runde oder ellipsoid geformte Resorptionslakunen. Aufgrund der morphologischen Unterschiede wurde zur Quantifizierung der Lakuneneigenschaften die maximale Tiefe der einzelnen Lakunen vermessen. Nicht quantifiziert wurde der Durchmesser oder das Volumen der Resorptionslakunen.

Um die Tiefe der Lakunen auszumessen, wurden bei allen Lakunen entlang des tiefsten Punktes Projektionen in z-Ebene angefertigt und der Abstand von Knochenoberfläche und tiefstem Punkt einer Resorptionslakune im senkrechten Winkel vermessen (Abb. 4.4).

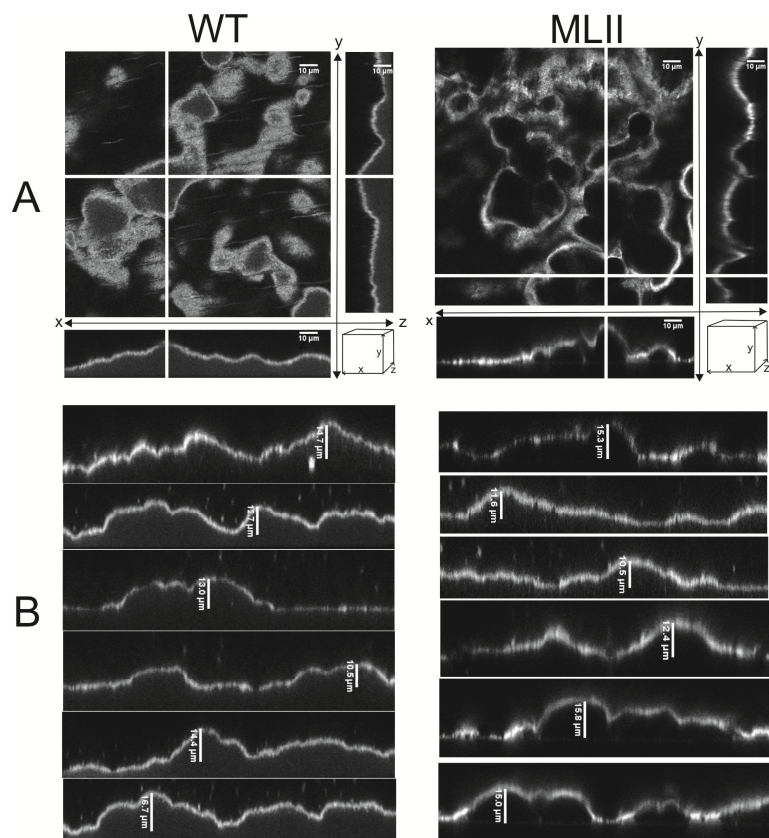


Abb. 4.4 Ausmessung der Tiefe von WT- und MLII-Resorptionslakunen. (A) Das weiße Fadenkreuz markiert die tiefste Stelle der betreffenden Resorptionslakune, die anhand der yz- und xz-Projektion ermittelt werden konnte (weiße Linien). (B) Exemplarische Darstellung von sechs Resorptionslakunen in der Seitenansicht, die von WT- und MLII-Osteoklasten gebildet wurden. Die ermittelte Tiefe der Lakunen ist in μm angegeben.

Auf jedem Dentinchip wurden ca. 45 Resorptionslakunen detektiert. Insgesamt wurden bei WT-Osteoklasten 275 und bei MLII-Osteoklasten 285 Lakunen ausgemessen. Ca. 80 % der Lakunen waren zwischen $5 \mu\text{m}$ und $15 \mu\text{m}$ tief (Abb. 4.5A). Im Durchschnitt waren die Resorptionslakunen sowohl bei WT- als auch MLII-Osteoklasten $10 \mu\text{m}$ tief (Abb. 4.5B). In Abb. 4.5A ist die Verteilung der Lakunentiefen dargestellt. Bei MLII-Osteoklasten fanden sich mehr Lakunen, die tiefer als $10 \mu\text{m}$ und kleiner als $5 \mu\text{m}$ waren als bei WT-Osteoklasten. Im Mittel ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt kann anhand der charakterisierten

Resorptionslakunen nicht auf eine erhöhte Resorptionsaktivität bei MLII-Osteoklasten geschlossen werden.

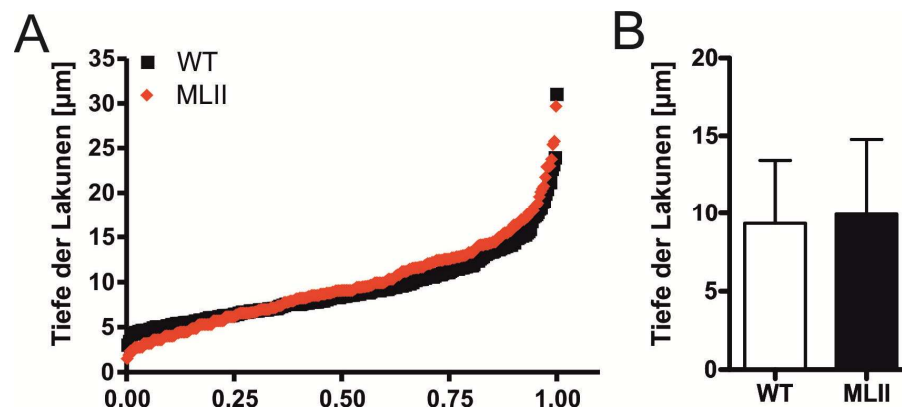


Abb. 4.5 Quantifizierungen der Resorptionslakunen. (A) Verteilung der Tiefe der Lakunen auf die einzelnen Lakunen in Relation zur Gesamtanzahl detektierter Lakunen. Ca. 80 % der Lakunen sind zwischen 5 und 15 μm tief. (B) Die durchschnittliche Tiefe der Resorptionslakunen von WT- und MLII-Osteoklasten liegt bei ca. 10 μm .

4.2 Transkriptionsanalyse kultivierter Osteoblasten

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Mannose-6-Phosphat (M6P)-Markers in MLII-Osteoblasten zur Fehlsortierung lysosomaler Proteine und zu einer gestörten Knochenmineralisation führt (siehe 1.2.3; Kollmann *et al.*, 2013). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob der Verlust des M6P-Markers und die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme die Expression von Genen in Osteoblasten beeinflusst.

4.2.1 Untersuchung der Genexpression lysosomaler Proteine in Osteoblasten

Zunächst wurden die mRNA-Spiegel verschiedener lysosomaler und Osteoblastenspezifischer Proteine sowie des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase (*Gnptab*) in WT- und MLII-Osteoblasten an drei verschiedenen Tagen der Differenzierung mit Hilfe von Realtime-PCR-Analysen untersucht. Dazu wurden mRNAs an Tag 5, 10 und 15 aus primär kultivierten Osteoblasten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Alle Werte wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert und die relative Expression der Gene im Vergleich zu WT-Osteoblasten am Tag 5 der Differenzierung ermittelt.

Die relative Expression des α/β -Vorstufenproteins der GlcNAc-1-Phosphotransferase (*Gnptab*) nahm zwischen dem 5. und 15. Tag der Differenzierung von WT-Osteoblasten um 50 % zu, während die mRNA-Spiegel der mutierten *Gnptab* über die Zeit nur 20-30 % der WT-Spiegel an Tag 5 erreichten (Abb. 4.6). Die Transkriptmenge von *lysosome-associated membrane glycoprotein 1* (*Lamp1*) und *Niemann Pick type C2 protein* (*Npc2*) verdoppelte sich, die der α -Mannosidase (*Man2b1*) vervierfachte sich bei WT-Osteoblasten, die Expression der α -Fucosidase (*Fuca1*) und der β -Hexosaminidase (*Hexa*) veränderten sich dagegen mit der Kultivierungsdauer nicht. Nur für *Fuca1* und *Hexa* konnten erhöhte mRNA-Spiegel in den MLII-Osteoblasten am Tag 10 der Kultivierung gegenüber WT-Zellen festgestellt werden, während die Transkriptionsmengen von *Lamp1*, *Npc2* und *Man2b1* sich in MLII-Osteoblasten kaum von WT-Osteoblasten unterschieden. Die Genexpression der untersuchten Osteoblastenspezifischen Proteine *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein* (*Bglap*) und *bone sialoprotein 2* (*Ibsp*) stiegen bei WT-Osteoblasten erwartungsgemäß mit der Differenzierung an, während sie in MLII-Osteoblasten stark reduziert bzw. kaum detektierbar waren.

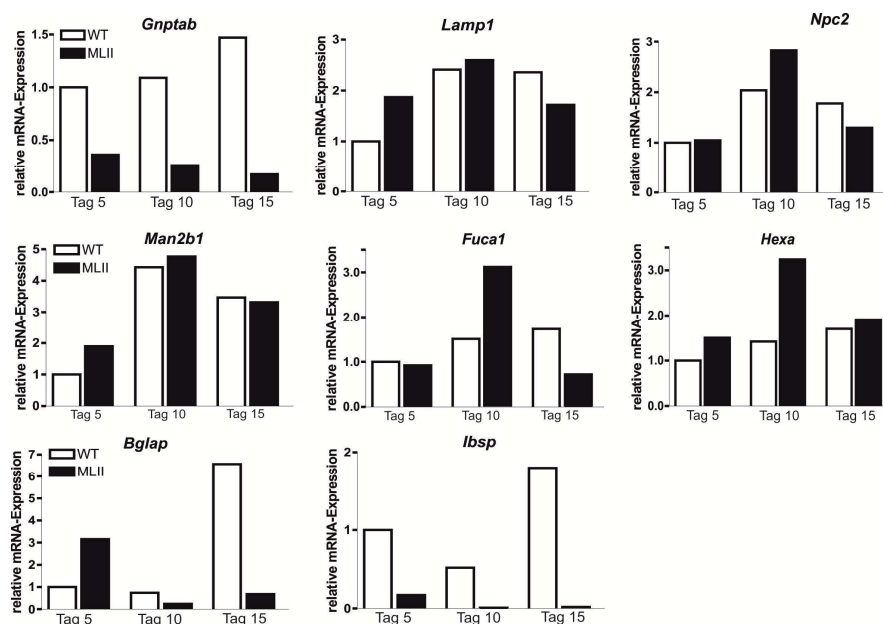


Abb. 4.6 Realtime-PCR lysosomaler und Osteoblasten-spezifischer Gene von WT- und MLII-Osteoblasten am 5., 10. und 15. Tag der Differenzierung. Relative Genexpression der lysosomalen Proteine *lysosome-associated membrane glycoprotein 1* (*Lamp1*), *Niemann Pick type C2 protein* (*Npc2*), α -Mannosidase (*Man2b1*), α -Fucosidase (*Fuca1*), β -Hexosaminidase (*Hexa*), GlcNAc-1-Phosphotrasferase (*Gnptab*) sowie der Osteoblasten-spezifischen Faktoren *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein* (*Bglap*), *bone sialoprotein 2* (*Ibsp*) im Vergleich zu WT-Osteoblasten am 5. Tag der Differenzierung.

Zusätzlich zur Transkriptionsmenge wurde für die β -Hexosaminidase die Enzymaktivität in den Zellen und Zellkulturüberständen von WT- und MLII-Osteoblasten am 5., 10. und 15. Tag in Kultur untersucht. In WT-Osteoblasten konnte eine mit der Zeit zunehmende Enzymaktivität der β -Hexosaminidase nachgewiesen werden, die in MLII-Osteoblasten erwartungsgemäß reduziert war. In den Kulturüberständen der MLII-Osteoblasten war die β -Hexosaminidase-Aktivität im Vergleich zu WT-Zellen erhöht (Abb. 4.7).

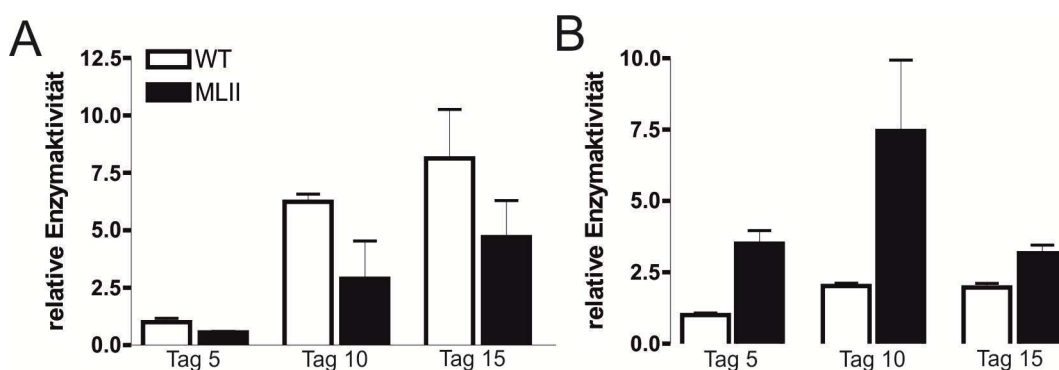


Abb. 4.7 Fehlsortierung der β -Hexosaminidase in MLII-Osteoblasten an Tag 5, 10 und 15 der Differenzierung. (A) Relative, intrazelluläre β -Hexosaminidase-Aktivität von WT- und MLII-Osteoblasten. (B) Relative Enzymaktivität in den Zellkulturüberständen von WT- und MLII-Osteoblasten zwischen dem 5. und 15. Tag der Differenzierung. Es wurde die relative Enzymaktivität im Vergleich zu WT-Osteoblasten an Tag 5 der Differenzierung dargestellt.

Zusammenfassend stieg die Genexpression lysosomaler Proteine sowohl bei WT- als auch bei MLII-Osteoblasten von Tag 5 auf Tag 10 an. Dies galt jedoch nicht für die Expression von *Bglap*, *Ibsp* und *Gnptab*, deren mRNA-Spiegel in MLII-Osteoblasten kontinuierlich niedrig waren. Die erniedrigten Konzentrationen der β -Hexosaminidase in MLII-Osteoblasten waren jedoch nicht auf Unterschiede in der Transkription, sondern auf Proteinsortierungsdefekte zurückzuführen.

4.2.2 Differentielle Genexpression in WT- und MLII-Osteoblasten

Für die Genexpressionsanalysen wurden primär kultivierte MLII- und WT-Osteoblasten in zwei unabhängigen Experimenten (pro Genotyp n=2) isoliert und über 10 Tage differenziert. Anschließend wurde aus den Zellen mRNA isoliert und zur Transkriptionsanalyse mittels *Mouse Genome 430 2.0* Microarray der Firma Affymetrix eingesetzt. Die Ergebnisse der vier Proben wurden durch einen paarweisen Kreuzvergleich miteinander verglichen. Die Daten wurden in der *NCBI*-Datenbank

Gene Expression Omnibus hinterlegt und sind unter der GEO Seriennummer GSE43854 einsehbar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE43854>). Insgesamt wurden 45037 Gene identifiziert, von denen 20157 Gene in die Analyse mit einbezogen wurden. Im Anhang sind die reduziert exprimierten Gene aufgelistet, die eine *Single Log Ratio* (SLR) von $\leq -5,00$ aufwiesen (103 Gene, Tab. 8.1), sowie die aktivierten Gene mit einer $SLR \geq 3,00$ (83 Gene, Tab. 8.2). Die Funktion von einigen der fehlregulierten Gene wird im Folgenden näher beschrieben.

Unter den reduziert exprimierten Genen hatte das *interferon-activable protein 202* (*Ifi202b*) die niedrigste Transkriptionsmenge mit einer SLR von -10,05. Dieses Gen reguliert die Aktivität von B-Zellen (Choubey und Panchanathan, 2008) und inhibiert verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B, c-Myc, AP-1 und p53, wodurch es anti-apoptotische sowie anti-inflammatorische Wirkungen hat (Datta *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2009). *Col22a1* zeigte eine SLR von -8,45 und gehört zur Gruppe der FACIT-Kollagene (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*), die unter anderem Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Bisher wurde es in Muskel- und Herzgewebe, Sehnen, Haut sowie Gelenkknorpel identifiziert (Koch *et al.*, 2004). *Panx3* wies eine SLR von -8,03 auf und wird vor allem in Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Es kann die Differenzierung von Osteoblasten u.a. über den Transkriptionsfaktor Runx2 (Bond *et al.*, 2011) oder über die Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges stimulieren (Ishikawa *et al.*, 2014).

Prl2c2 kodiert für Prolaktin und hatte die höchste SLR von 6,88. Dieses Wachstumshormon spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Angiogenese und der Wundheilung (Groskopf *et al.*, 1997). Es kann über den Kationen-unabhängigen 300kDa-M6P-Rezeptor transportiert werden (Lee und Nathans, 1988; Volpert *et al.*, 1996). Die Gene *Kng1* (SLR 5,23) und *Il6* (SLR 5,18) sind wichtige Mediatoren im Rahmen von Entzündungsprozessen (Moreau *et al.*, 2005; Edwards und Williams, 2010). Interleukin-6 (IL-6) kann aber auch über die Regulation des *receptor activator for NF- κ B ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) die Osteoklastogenese stimulieren (Edwards und Williams, 2010).

4.2.3 Funktionelle Gruppierung fehlregulierter Gene in WT- und MLII-Osteoblasten

Mit Hilfe der Internet-basierten *ingenuity pathway analysis* (IPA)-Software können Gene aus verschiedenen Geweben und Zellen übergeordneten Gruppen (z.B. Signalwegen, Funktionen, subzellulären Organellen) zugeordnet werden (Thomas und Bonchev, 2010). Die fehlregulierten Gene der MLII-Osteoblasten aus Abschnitt 4.2.2 wurden mit dieser Software gruppiert. Für die Gene, die eine reduzierte Expression aufwiesen, wurden diejenigen in die Analyse mit einbezogen, die eine *Single Log Ratio* (SLR) ≤ -3 aufwiesen (insgesamt 1225 Gene). Für die Gene, die eine erhöhte Expression zeigten, wurde eine SLR von ≥ 2 gewählt, wodurch insgesamt 960 Gene in die Analyse eingingen.

In Tab. 4.1 sind die 54 in MLII-Osteoblasten reduziert exprimierten Gene aufgelistet, für die regulatorische Funktionen für die Morphologie des Skelettsystems beschrieben wurden (Tab. 4.1; Gruppe 1). Hiervon betreffen acht Gene die Funktion von Osteoblasten (Tab. 4.1; Gruppe 1.1) und sechs Gene die Entwicklung von Osteoblasten (Tab. 4.1; Gruppe 1.2). Das *Ibsp*-Gen zeigte mit einer SLR von -6,75 die niedrigste mRNA-Expression. Das Gen kodiert für das Osteoblasten-spezifische Protein *integrin-binding sialoprotein*, das an der Mineralisierung der Knochenmatrix beteiligt ist (Stubbs *et al.*, 1997). Hierbei spielen auch die Gene *Dmp1* (SLR -6,55) und *Mepe* (SLR -5,18) eine wesentliche Rolle (Harris *et al.*, 2007). Mutationen in dem *Dmp1*-Gen führen zur hypophosphatämischen Rachitis (Feng *et al.*, 2006; Lorenz-Depiereux *et al.*, 2006). Die Gene *Dkk1*, *Fzd9*, *Wnt5a*, *Ror2*, *Pth1r* und *Pthlh* können die Osteoblastogenese regulieren (Jongen *et al.*, 1996; Lanske *et al.*, 1999; Bounoutas *et al.*, 2006; Niehrs, 2006; Andersson *et al.*, 2010; Eapen *et al.*, 2010; Albers *et al.*, 2011). *Ror2* (SLR -5,00) und *Wnt5* (SLR -3,18) sind darüber hinaus an der Ausbildung einer physiologischen Wachstumsfugenarchitektur und dem Längenwachstum von Extremitäten beteiligt (Gao *et al.*, 2011; Nemoto *et al.*, 2012; Randall *et al.*, 2012). *Smpd3* (SLR -5,70) kodiert für *sphingomyelin phosphodiesterase 3*, die die Knochenresorption hemmen kann (Takeda *et al.*, 1998; Aubin *et al.*, 2005). Auch die Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (*Alpl*), die als das Leitenzym der Osteoblasten angesehen wird (Anderson *et al.*, 2004), wies eine verminderte Expression auf (SLR -4,53). Defekte im *Colla2* (SLR -5,15) führen zur

Osteogenesis imperfecta Typ IV, einer Kollagen-Erkrankung, die zu Kleinwuchs führt (Pace *et al.*, 2008).

Tab. 4.1 Reduziert exprimierte Gene in MLII-Osteoblasten (SLR \leq 3) mit regulatorischer Wirkung zur Morphologie des Skelettsystems.

1. Morphologie des Skelettsystems

Gensymbol	Genname	Mittlere SLR
<i>Ibsp</i>	Integrin-binding sialoprotein	-6,75
<i>Dmp1</i>	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	-6,55
<i>Dkk1</i>	Dickkopf-related protein 1	-6,48
<i>Smpd3</i>	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	-5,70
<i>Ano1</i>	Anoctamin-1	-5,58
<i>Msi1</i>	RNA-binding protein Musashi homolog 1	-5,53
<i>Galnt3</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	-5,45
<i>Mepe</i>	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	-5,18
<i>Ror2</i>	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2	-5,00
<i>Cftr</i>	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	-4,95
<i>Col11a2</i>	Collagen alpha-2(XI) chain	-4,95
<i>Dph1</i>	Diphthamide biosynthesis protein 1	-4,90
<i>Ssbp2</i>	Single-stranded DNA-binding protein 2	-4,75
<i>Trps1</i>	Zinc finger transcription factor Trps1	-4,70
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	-4,53
<i>Man2b1</i>	Lysosomal alpha-mannosidase	-4,53
<i>Ednra</i>	Endothelin-1 receptor	-4,53

<i>Satb2</i>	DNA-binding protein SATB2	-4,50
<i>Pth1r</i>	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	-4,35
<i>Sost</i>	Sclerostin	-4,25
<i>Slc35d1</i>	UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter	-4,23
<i>Phex</i>	Metalloendopeptidase homolog PEX	-4,18
<i>Ltbp3</i>	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3	-4,13
<i>Mbt1</i>	MBT domain-containing protein 1	-4,00
<i>Hoxa4</i>	Homeobox protein Hox-A4	-4,00
<i>Pcsk6</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	-3,93
<i>Fgfr3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	-3,93
<i>Eya1</i>	Eyes absent homolog 1	-3,90
<i>Fgfr2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	-3,83
<i>Ryr1</i>	Ryanodine receptor 1	-3,83
<i>Lef1</i>	Lymphoid enhancer-binding factor 1	-3,78
<i>Prkra</i>	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	-3,73
<i>Fzd9</i>	Frizzled-9	-3,70
<i>Ptch1</i>	Protein patched homolog 1	-3,58
<i>Itga10</i>	Integrin alpha-10	-3,53
<i>Egln3</i>	Egl nine homolog 3	-3,48
<i>Igflr</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	-3,45
<i>Hira</i>	Protein HIRA	-3,45
<i>Pbx1</i>	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	-3,43

<i>Esrra</i>	Steroid hormone receptor ERR1	-3,38
<i>Hip1</i>	Huntingtin-interacting protein 1	-3,33
<i>Slc39a14</i>	Zinc transporter ZIP14	-3,28
<i>Stat1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	-3,28
<i>Jag2</i>	Protein jagged-2	-3,28
<i>Gsk3b</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	-3,25
<i>Hells</i>	Lymphocyte-specific helicase	-3,23
<i>Ifnar1</i>	Interferon alpha/beta receptor 1	-3,20
<i>Wnt5a</i>	Protein Wnt-5a	-3,18
<i>Xpa</i>	DNA repair protein complementing XP-A cells homolog	-3,18
<i>Pthlh</i>	Parathyroid hormone-related protein	-3,15
<i>Hoxc6</i>	Homeobox protein Hox-C6	-3,15
<i>Sim2</i>	Single-minded homolog 2	-3,10
<i>Rai1</i>	Retinoic acid-induced protein 1	-3,05
<i>Gpc3</i>	Glypican-3	-3,03

1.1 Funktion von Osteoblasten

Gensymbol	Gename	Mittlere SLR
<i>Mepe</i>	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	-5,18
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	-4,53
<i>Satb2</i>	DNA-binding protein SATB2	-4,50
<i>Pth1r</i>	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	-4,35
<i>Sost</i>	Sclerostin	-4,25

<i>Fgfr2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	-3,83
<i>Fzd9</i>	Frizzled-9	-3,70
<i>Gsk3b</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	-3,25

1.2 Entwicklung von Osteoblasten

Gensymbol	Genname	Mittlere SLR
<i>Ror2</i>	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2	-5,00
<i>Satb2</i>	DNA-binding protein SATB2	-4,50
<i>Pth1r</i>	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	-4,35
<i>Wnt5a</i>	Protein Wnt-5a	-3,18
<i>Pthlh</i>	Parathyroid hormone-related protein	-3,15
<i>Setdb1</i>	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1	-3,00

In Tab. 4.2 ist eine Selektion von Genen gruppiert, die in MLII-Osteoblasten vermehrt exprimiert wurden. In der Gruppe „Rheumatoide Arthritis“ sind 32 Gene zusammengefasst, 25 Gene betreffen allgemeine Entzündungsreaktionen, und 9 Gene die Differenzierung von Osteoklasten. Einige dieser Gene und ihre Funktionen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, bei der es durch eine Störung des Immunsystems zur Bildung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 (IL-1) sowie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) kommt, die zu lokal destruirenden Knorpel- und Knochenschäden vor allem an Gelenken der Hände führen. Zytokine werden ubiquitär exprimiert und haben zahlreiche Funktionen, wie die Regulation von immunologischen Prozessen oder der Migration von Zellen. Bei MLII-Osteoblasten fanden sich fünf Gene (*Il6*, *Il1rl1*, *Ptger2*, *Ptgs2* und *Fos*), für die beschrieben ist, dass sie an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, an Entzündungsprozessen sowie an der Differenzierung von Osteoklasten beteiligt sind. *Il6* und *Il1rl1* kodieren für Zytokine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren können (Edwards und Williams, 2010). *Ptger2*

und *Ptgs2* spielen eine Rolle im Stoffwechsel der Prostaglandine. Hierbei handelt es sich um Gewebshormone, die Entzündungsprozesse regulieren können (Ricciotti und FitzGerald, 2011). Das Gen *Fos* kodiert für ein Proto-Onkogen, das als Transkriptionsfaktor inflammatorische Prozesse stimulieren und die Differenzierung von Zellen beeinflussen kann (Teitelbaum und Ross, 2003). Insgesamt konnten weitere acht Gene proinflammatorischer Chemokine identifiziert werden (*Cxcl6*, *Cxcl2*, *Fabp4*, *Cxcl10*, *Ccl7*, *Ccl13*, *Cxcl1* und *Tac1*). Auch bei *Kn1* und *Hp* handelt es sich um Gene, die Entzündungsprozesse vermitteln können (Baseler und Burrell, 1983; Moreau *et al.*, 2005; Nakae *et al.*, 2013).

Tab. 4.2 Erhöht exprimierte Gene in MLI-Osteoblasten (SLR \geq 2) mit regulatorischer Funktion bei der rheumatoiden Arthritis, Entzündungsreaktionen bzw. der Differenzierung von Osteoklasten.

Rheumatoide Arthritis		
Gensymbol	Genname	Mittlere SLR
<i>Il6</i>	Interleukin-6	5,18
<i>Kcnj15</i>	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 15	4,75
<i>Ccl6</i>	C-C motif chemokine 6	4,28
<i>Cxcl6</i>	C-X-C motif chemokine 6	4,00
<i>Cxcl2</i>	C-X-C motif chemokine 2	4,00
<i>Mmp3</i>	Stromelysin-1	3,45
<i>Ngfr</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	3,40
<i>Acox2</i>	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2	3,15
<i>Fabp4</i>	Fatty acid-binding protein, adipocyte	3,03
<i>Abcb1</i>	Multidrug resistance protein 1	3,00
<i>Fos</i>	Proto-oncogene c-Fos	2,95
<i>Aif1</i>	Allograft inflammatory factor 1	2,90
<i>Gabbr1</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-1	2,80
<i>Brms1</i>	Breast cancer metastasis-suppressor 1 homolog	2,73

<i>Ntf3</i>	Neurotrophin-3	2,70
<i>Cxcl10</i>	C-X-C motif chemokine 10	2,68
<i>Egfl8</i>	Epidermal growth factor-like protein 8	2,63
<i>Cd80</i>	T-lymphocyte activation antigen CD80	2,63
<i>Ccl7</i>	C-C motif chemokine 7	2,55
<i>Hcls1</i>	Hematopoietic lineage cell-specific protein	2,53
<i>Ccl13</i>	C-C motif chemokine 13	2,50
<i>Ccl9</i>	C-C motif chemokine 9	2,40
<i>Ppm1h</i>	Protein phosphatase 1H	2,35
<i>Hp</i>	haptoglobin	2,30
<i>Csgalnact1</i>	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	2,28
<i>Col10a1</i>	Collagen alpha-1(X) chain	2,25
<i>Cxcl1</i>	Growth-regulated alpha protein	2,15
<i>Gzmb</i>	Granzyme B	2,13
<i>Tac1</i>	Protachykinin-1	2,13
<i>Slc7a11</i>	Cystine/glutamate transporter	2,13
<i>Cd99l2</i>	CD99 antigen-like protein 2	2,03
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin G/H synthase 2	2,03

 Entzündungsreaktion

Gensymbol	Gename	Mittlere SLR
<i>Kn1</i>	Kininogen-1	5,23
<i>Il6</i>	Interleukin-6	5,18
<i>Pla2g2e</i>	Group IIE secretory phospholipase A2	4,78
<i>Cxcl2</i>	C-X-C motif chemokine 2	4,00
<i>Cxcl6</i>	C-X-C motif chemokine 6	4,00

<i>Lcn2</i>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	3,68
<i>Ctla2a/Ctla2b</i>	Protein CTLA-2-beta	3,55
<i>Casp4</i>	Caspase-4	3,55
<i>Il1rl1</i>	Interleukin-1 receptor-like 1	3,18
<i>Fabp4</i>	Fatty acid-binding protein, adipocyte	3,03
<i>Fos</i>	Proto-oncogene c-Fos	2,95
<i>Bcl2a1</i>	Bcl-2-related protein A1	2,70
<i>Cxcl10</i>	C-X-C motif chemokine 10	2,68
<i>Ccl7</i>	C-C motif chemokine 7	2,55
<i>Atf3</i>	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3	2,53
<i>Ccl3l1/Ccl3l3</i>	C-C motif chemokine 3-like 1	2,50
<i>Ccl13</i>	C-C motif chemokine 13	2,50
<i>Ptger2</i>	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	2,40
<i>Gadd45a</i>	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha	2,25
<i>Cela1</i>	Chymotrypsin-like elastase family member 1	2,18
<i>Cxcl1</i>	Growth-regulated alpha protein	2,15
<i>Tac1</i>	Protachykinin-1	2,13
<i>Itgam</i>	Integrin alpha-M	2,10
<i>Ptx3</i>	Pentraxin-related protein PTX3	2,10
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin G/H synthase 2	2,03
<hr/>		
Differenzierung von Osteoklasten		
<hr/>		
Gensymbol	Genname	Mittlere SLR
<i>Il6</i>	Interleukin-6	5,18
<i>Atp6v0D2</i>	V-type proton ATPase subunit d 2	3,68
<i>Il1rl1</i>	Interleukin-1 receptor-like 1	3,18

<i>Fos</i>	Proto-oncogene c-Fos	2,95
<i>Ccl3l1/Ccl3l3</i>	C-C motif chemokine 3-like 1	2,50
<i>Ptger2</i>	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	2,40
<i>Ccl9</i>	C-C motif chemokine 9	2,40
<i>Fosl1</i>	Fos-related antigen 1	2,15
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin G/H synthase 2	2,03

Insgesamt zeigten die Analysen, dass bei MLII wesentliche Differenzierungsmarker von Osteoblasten wie *Ibsp*, *Dmpl* und *Alpl* reduziert exprimiert wurden, während proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Kininogene eine erhöhte Genexpression aufwiesen.

4.3 Proteomanalyse M6P-haltiger Proteine von Osteoblasten

Ein Defekt in der Fehlsortierung von einzelnen oder mehreren Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltigen Proteinen in Mukopolidose Typ II (MLII)-Osteoblasten kann als eine mögliche Ursache für den osteopenischen Knochenphänotyp dieser Erkrankung angesehen werden. Die Identität möglicher Kandidaten-Proteine, die den Knochenstoffwechsel bzw. das Reifungs- und Differenzierungsprogramm der Osteoblasten bei MLII beeinflussen, ist bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurde daher das Proteom M6P-haltiger Proteine von primär kultivierten WT- und *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten untersucht, denen die Fähigkeit zur Dephosphorylierung von M6P-Resten fehlt (Makrypidi *et al.*, 2012). Das M6P-Proteom einer Osteoklasten-Zelllinie wurde bereits von Czupalla *et al.* beschrieben (Czupalla *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden M6P-haltige Proteine aus den Medien kultivierter Osteoblasten gewonnen und affinitätschromatographisch an einer anti-M6P-Antikörper-Säule isoliert. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

4.3.1 Isolierung von M6P-haltigen Proteinen aus *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten

Acid phosphatase 5 (*Acp5*, auch: *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP)) und *acid phosphatase 2* (*Acp2*, auch: *lysosomal acid phosphatase* (LAP)) sind lysosomale

Phosphatasen, die an der Dephosphorylierung Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltiger Proteine beteiligt sind (Makrypidi *et al.*, 2012). Um das vollständige M6P-Proteom von Osteoblasten zu identifizieren, sollte die Möglichkeit zur ungewollten Dephosphorylierung verhindert werden. Deshalb wurden primär kultivierte Osteoblasten von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten (n = 9) in Gegenwart von Ammoniumchlorid inkubiert, was die Bindung der M6P-Rezeptoren (MPR) im Golgi-Apparat verhindert und zur Sekretion aller neu synthetisierten M6P-haltigen Proteine führt (Braulke *et al.*, 1987b). Ammoniumchlorid wirkt als schwache Base, die den intrazellulären pH-Wert in azidifizierten Organellen (Endosomen, Lysosomen) erhöht (Ohkuma und Poole, 1978). Unter diesen Bedingungen können M6P-haltige Proteine in den Endosomen nicht von den MPRs dissoziieren, sodass die Ligand-besetzten MPRs im Golgi-Apparat keine neu synthetisierten M6P-haltigen Proteine binden können und ihre Sekretion bewirken (Braulke *et al.*, 1987a; Chang *et al.*, 1988). Die *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten wurden bis zum Tag 8 differenziert und danach alle 48 h mit Ammoniumchlorid-haltigem Medium für 24 h inkubiert, gefolgt von einer 24 h-Inkubation in normalem Kulturmedium. Die hierdurch gewonnenen Überstände wurden gesammelt, die Proteine mit Ammoniumsulfat präzipitiert (0,5 g/ml) und bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Nach ca. 20 Tagen (10 Medienwechsel) wurden alle präzipitierten Proteine vereinigt, in PBS resuspendiert und gegen PBS dialysiert.

In Vorversuchen wurden zunächst die *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten in verschiedenen Experimenten ohne oder mit 10 und 15 mM Ammoniumchlorid inkubiert und der Gehalt sezernierter M6P-haltiger Proteine über die Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität an Tag 8, 12 und 16 der Differenzierung in den abgenommenen Überständen gemessen (Abb. 4.8A). In den Medien der Zellen, die ohne Ammoniumchlorid inkubiert wurden, war am Tag 8 eine β -Hexosaminidase-Aktivität von 3,0 mU/ml messbar. Nach der Behandlung der Osteoblasten mit 10 mM Ammoniumchlorid stieg die Aktivität auf ca. 7,6 mU/ml an. Die Inkubation in Gegenwart von 15 mM Ammoniumchlorid ergab eine Aktivität der β -Hexosaminidase von 7,2 mU/ml. Insgesamt konnte durch den Zusatz von Ammoniumchlorid zu den Osteoblasten eine wesentliche Steigerung der β -Hexosaminidase-Aktivität erzielt werden, die bei 10 mM Ammoniumchlorid bereits maximal war. Anschließend wurden die M6P-haltigen Proteine in den Zellkulturüberständen durch einen anti-M6P-Antikörper im Western-Blot dargestellt

(Abb. 4.8B). Dieses Experiment bestätigte, dass die Inkubation in Gegenwart von Ammoniumchlorid den Anteil von M6P-haltigen Proteinen in den Zellkulturüberständen der *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten erhöht. Die Menge an M6P-haltigen Proteinen war an Tag 8 am größten und nahm im Verlauf der Differenzierung ab.

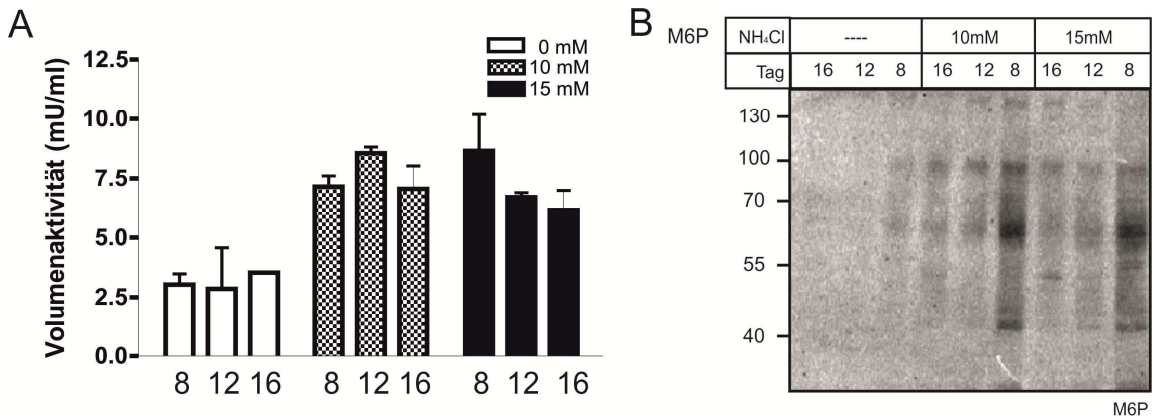


Abb. 4.8 Wirkung von Ammoniumchlorid auf die Sekretion von β -Hexosaminidase und M6P-haltige Proteine im Laufe der Differenzierung von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. (A) *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten wurden an Tag 8, 12 und 16 der Differenzierung ohne oder mit 10 und 15 mM Ammoniumchlorid kultiviert und die Medien auf die Sekretion der β -Hexosaminidase und (B) der Sekretion M6P-haltiger Proteine durch einen anti-M6P-Western-Blot analysiert (Auftragung: 100 μ l Medium).

Für die Affinitätschromatographischen Aufreinigungen wurden die über einen Zeitraum von 20 Tagen gesammelten Zellkulturüberstände von den mit 15 mM Ammoniumchlorid-behandelten *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten verwendet (insgesamt 90 ml). Die eingeeingte und dialysierte Proteinfraktion (*Load*-Fraktion) hatte ein durchschnittliches Volumen von 3,5 ml. Von dieser Fraktion wurden ca. 2 ml auf eine *Affi-Gel-Sepharose*-Säule aufgetragen, an die ein *single-chain Fragment variable*-M6P-Antikörper (scFv-M6P-Antikörper) gekoppelt wurde (Müller-Loennies *et al.*, 2010). Nach einer 4-stündigen Bindungszeit wurde die Durchflussfraktion (*Flow-Through* 1, FT 1) gesammelt. Die Matrix wurde ausführlich gewaschen (Wasch-Fraktion W 1 und W 2) und schließlich wurden gebundene Proteine spezifisch mit M6P eluiert (E 1). Die FT 1-Fraktion wurde dann erneut auf die Säule aufgetragen und nach 6 h Bindung das Wasch- und Elutionsverfahren wiederholt (Abb. 4.9).

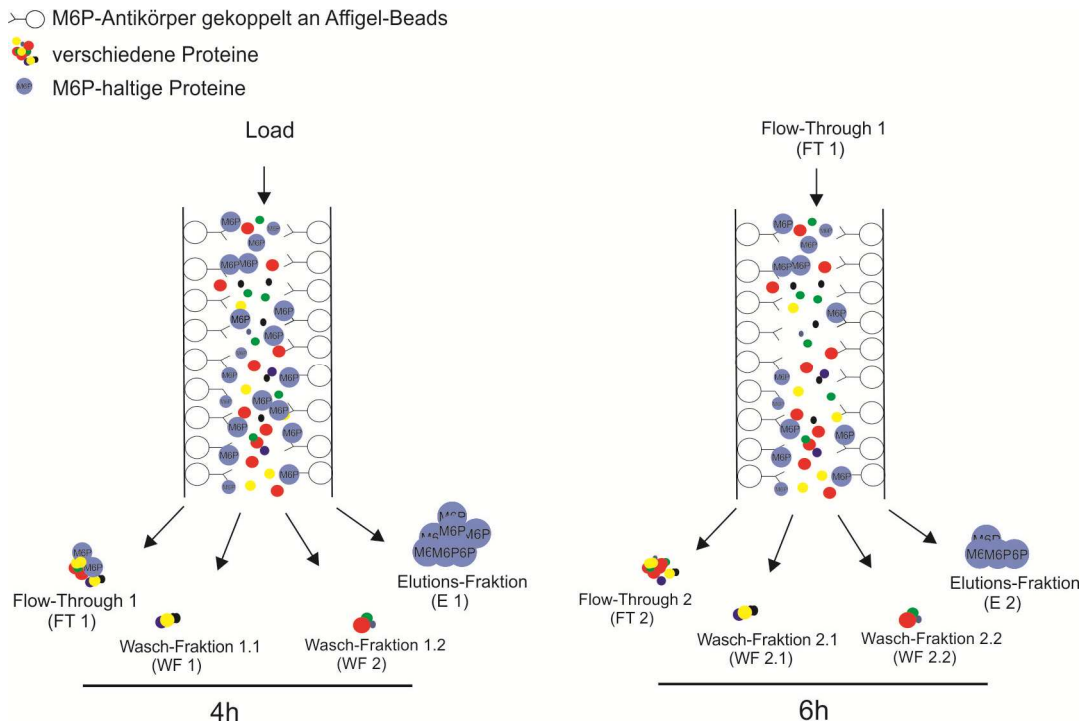


Abb. 4.9 Schematische Darstellung der Fraktionen der M6P-Affinitätschromatographie von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. Die Zellkulturüberstände der mit 15 mM Ammoniumchlorid inkubierten *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten wurden als *Load*-Fraktion auf M6P-Antikörper-Säulen aufgetragen und nach 4-stündiger Bindungszeit verschiedene Fraktionen gewonnen: *Flow-Through* 1 (FT 1), Wasch-Fraktion 1.1 (WF 1.1), Wasch-Fraktion 1.2 (WF 1.2) und die Elutions-Fraktion 1 (E 1). In einem zweiten Durchgang wurde FT 1 erneut für 6 h auf die Beads gegeben.

Durch die Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität und M6P-Western-Blot-Analysen konnte die Aufreinigungseffizienz der verschiedenen Fraktionen ermittelt werden (Abb. 4.10). Es wurde eine Gesamtaktivität der β -Hexosaminidase von 75,0 mU in der *Load*-Fraktion ermittelt (100 %). Im FT 1 wurden 64,4 mU (86 %) der *Load*-Fraktion gemessen. In der Elutions-Fraktion E 1 konnten dagegen nur 1,3 mU (1,7 %) der Ausgangsaktivität detektiert werden. Auch im zweiten Durchgang (6 h) konnte nur 1 mU (1,6 %) β -Hexosaminidase-Aktivität in E 2 gemessen werden. Ca. 81,5 % fanden sich hier in der FT 2-Fraktion wieder (ca. 52,5 mU). Durch einen M6P-Western-Blot konnten jedoch viele M6P-haltige Proteine in den verschiedenen Fraktionen verifiziert werden, die in ihrer molaren Masse zwischen 35 kDa und 170 kDa variierten.

Obwohl nur ein geringer Anteil der β -Hexosaminidase an die Matrix gebunden wurde, zeigte die Western-Blot-Analyse einen hohen Anteil M6P-haltiger Proteine in den Elutions-Fraktionen. Daher wurden die Elutions-Fraktionen E 1 und E 2 für weitere massenspektrometrische Analysen eingesetzt. Die Bindungskapazität der M6P-Antikörpersäule war jedoch insgesamt sehr gering, was die anschließende

massenspektrometrische Analyse negativ beeinflusste. Daher wurden im Anschluss M6P-haltige Proteine aus den Medien von Wildtyp-Osteoblasten aufgereinigt.

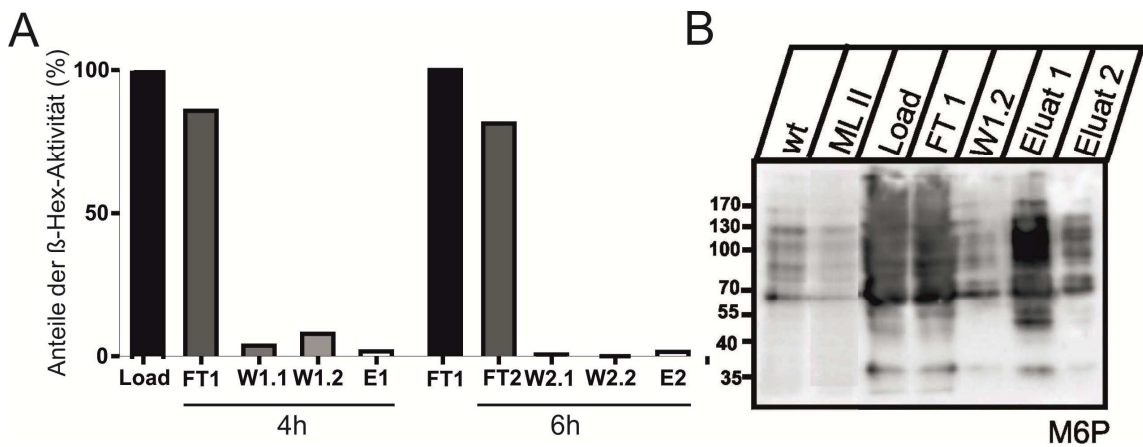


Abb. 4.10 Affinitätschromatographische Aufreinigung von M6P-haltigen Proteinen aus Medien von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. (A) Relative β -Hexosaminidase-Aktivität der Fraktionen der M6P-Affinitätschromatographie über 4 h und 6 h Bindungszeit. (B) M6P-Nachweis von eluierten Proteinen mittels Western-Blot-Verfahren.

4.3.2 Isolierung M6P-haltiger Proteine aus Zellkulturüberständen von Osteoblasten

Um M6P-haltige Proteine aufzureinigen und zu identifizieren, wurden Wildtyp (WT)-Osteoblasten für acht Tage kultiviert und anschließend im Abstand von 32 h für ein Intervall von 16 h mit 10 mM Ammoniumchlorid inkubiert. Die Ammoniumchlorid-Behandlung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 18 Tagen. Aus den 180 ml gesammeltem Medium wurden die Proteine anschließend mit Ammoniumsulfat präzipitiert (0,5 g/ml). Nach Zentrifugation wurden die gefällten Proteine in 4 ml PBS gelöst und dialysiert. Für die anti-M6P-Affinitätschromatographie wurden anschließend 2 ml eingesetzt (*Load*-Fraktion). Die Bindungszeit an die anti-M6P-Antikörper-Matrix betrug 4 h bei 4° C im Kühlraum.

Zur Ermittlung der Aufreinigungseffizienz wurde die β -Hexosaminidase-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen bestimmt (Abb. 4.11). Es wurde 127,0 mU β -Hexosaminidase-Aktivität auf die Säule geladen. Im Eluat wurden 42,1 mU (33 %) β -Hexosaminidase-Aktivität wiedergefunden. In der Durchfluss-Fraktion (*Flow-Through*, FT) wurden ca. 20 mU (15 %) β -Hexosaminidase-Aktivität gemessen.

Im Vergleich zu den *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten konnten die M6P-haltigen Proteine der WT-Osteoblasten effektiver an die Affinitätsmatrix binden. Die Unterschiede in der Aufreinigungseffizienz könnten auf die verwendeten M6P-Beads, die bei der Affinitätschromatographie zum Einsatz kamen, zurückzuführen sein. Der Verlust der β -Hexosaminidase-Aktivität in beiden Experimenten könnte durch eine geringe Bindungskapazität der M6P-Beads zu erklären sein. Weiterhin könnte die Absättigung von Bindungsstellen dazu geführt haben, dass einige Proteine nicht an die Beads binden konnten. Außerdem wurde in den Zellen ein Teil der Proteine nicht phosphoryliert, was die Bindung an die anti-M6P-Beads verhinderte.

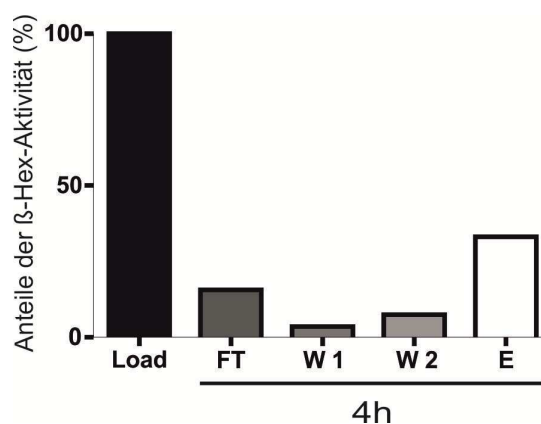


Abb. 4.11 Relative β -Hexosaminidase-Aktivität nach Fraktionierung von Medien aus WT-Osteoblasten an der anti-M6P-Affinitätsmatrix. Im *Flow-Through* (FT), in den Wasch-Fractionen (W 1, W 2) und der Elutions-Fraktion (E) wurde nach 4-stündiger Bindungszeit der relative Anteil der β -Hexosaminidase von der *Load*-Fraktion bestimmt.

Für die weiteren massenspektrometrischen Analysen wurden die M6P-Elutions-Fractionen aus den Medien von *Acp2/Acp5*^{-/-}- und WT-Osteoblasten getrennt weiter untersucht.

4.3.3 Massenspektrometrische Analysen von sezernierten M6P-haltigen Proteinen aus Osteoblasten

Für die Identifizierung sezernerter Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltiger Proteine aus Osteoblasten wurden die M6P-Elutions-Fractionen von WT- und *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten massenspektrometrisch untersucht. Die Proteine wurden nach tryptischem Verdau mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (*liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS/MS)) analysiert. Im Anschluss wurden die murinen Proteine durch eine Mascot-Datenbank-Analyse identifiziert.

Zunächst wurden die bereits bekannten lysosomalen Proteine gruppiert (Tab. 4.4), und die verbliebenen Proteine wurden mit Hilfe der Internet-basierten Datenbank www.uniprot.org auf das Vorliegen von *N*-Glykosylierungsstellen und Signalpeptiden untersucht. Alle Proteine, die eine (potentielle) *N*-Glykosylierung und ein Signalpeptid aufweisen, wurden als potentiell neue lysosomale Kandidaten-Proteine angesehen. Die Proteine, die keine *N*-Glykosylierung und kein Signalpeptid enthielten, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Hierzu gehörten unter anderem Proteine, die anderen Zellkompartimenten zuzuordnen sind, z.B. nukleäre oder zytoplasmatische Proteine (Tab. 4.3, „andere“).

Die Analyse der Elutions-Fraktionen E 1 und E 2 der *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten erfolgte mit Hilfe der *Core Facility* für Massenspektrometrische Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Den identifizierten Proteinen wurden sogenannte *Protein Scores* zugewiesen, die ein Maß für die Wahrscheinlichkeit darstellen, mit der ein Protein in der untersuchten Fraktion auftritt. Hiermit konnten in E 1 44 Proteine und in E 2 67 Proteine identifiziert werden, die z.T. die gleichen Proteine enthielten. In beiden Fraktionen wurden zusammen 26 bekannte lysosomale Proteine detektiert, sowie 24 Kandidaten-Proteine. Eine vollständige Auflistung der Proteine findet sich im Anhang (Tab. 8.3). Die Analyse der Elutions-Fraktion der WT-Osteoblasten erfolgte durch den Service Massenspektrometrie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Ein Protein galt hier als identifiziert, wenn mindestens zwei Peptide eine Falsch-Positiv-Rate von 1 % aufwiesen (1 % FPR). Zusätzlich wurde eine 5 % FPR erstellt. Hierbei galt ein Protein als identifiziert, wenn mindestens ein Peptid eine FPR von 5 % aufwies. Das *peptide spectrum match* (PSM) kann hierbei für die Abschätzung des Vorkommens eines Proteins in der untersuchten Fraktion herangezogen werden. Hiermit konnten 37 bekannte lysosomale Proteine und 28 Kandidaten-Proteine in der M6P-Elutions-Fraktion von WT-Osteoblasten gefunden werden. Eine vollständige Liste aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (siehe 8.2). In der Tab. 4.3 sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie zusammengefasst.

Tab. 4.3 Massenspektrometrisch basierte Identifizierung von sezernierten M6P-haltigen Proteinen aus *Acp2/Acp5*^{-/-}- und WT-Osteoblasten.

Protein	<i>Acp2/Acp5</i> ^{-/-}		WT	
	E 1	E 2	5 % FPR	1 % FPR
lysosomal	26 ¹⁾	17	38 ²⁾	27
andere	7	29	80	32
Kandidaten	11	21	27	14
insgesamt	44	67	145	73

¹⁾ Protein Score der Elutions-Fraktionen E 1/E 2 von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. ²⁾ Peptide spectrum match der Falsch-Positiv-Rate 5 % bzw. 1 % der Elutions-Fraktion von WT-Osteoblasten.

Insgesamt konnten in allen untersuchten Elutions-Fraktionen zusammen 41 bekannte lysosomale Proteine detektiert werden (Tab. 4.4). Hiervon wurden 23 Proteine in beiden massenspektrometrischen Analysen von WT- und *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten gefunden. Die β -Glucuronidase, Cathepsin S und die Dipeptidyl-Peptidase 1 fanden sich ausschließlich bei den *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. Weitere 15 lysosomale Proteine konnten ausschließlich bei den WT-Osteoblasten gefunden werden. Da es sich bei der Massenspektrometrie um eine nicht quantitative Methode handelt, wurden die Analysen der WT- und der *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten als gleichwertig angesehen.

Tab. 4.4 Massenspektrometrisch basierte Identifizierung von sezernierten M6P-haltigen lysosomalen Proteinen aus *Acp2/Acp5*^{-/-}- und WT-Osteoblasten.

Nr.	Gen	Proteinname	<i>Acp2/Acp5</i> ^{-/-}	WT
1	<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	336/135 ¹	27/24 ²
2	<i>Man2b2</i>	Epididymis-specific alpha-mannosidase	290/90	14/6
3	<i>Plbd2</i>	Putative phospholipase B-like 2	285/116	57/37
4	<i>Man2b1</i>	Lysosomal alpha-mannosidase	233/74	27/23
5	<i>Epdr1</i>	Mammalian ependymin-related protein 1	227/97	9/9
6	<i>Ctsb</i>	Cathepsin B	221/225	49/47
7	<i>Hexa</i>	Beta-hexosaminidase subunit alpha	190/89	37/31

8	<i>Gns</i>	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	174/68	96/73
9	<i>Lgmn</i>	Legumain	167/143	63/54
10	<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	112/109	102/86
11	<i>Ctsa</i>	Lysosomal protective protein	104/61	50/43
12	<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	102/102	120/103
13	<i>Ctsll</i>	Cathepsin L1	94/75	54/37
14	<i>Psap</i>	Sulfated glycoprotein 1 (Prosaposin)	47/105	33/26
15	<i>Glb1</i>	Beta-galactosidase	125/--	18/16
16	<i>Cpq</i>	Carboxypeptidase Q	90/--	5/2
17	<i>Arsb</i>	Arylsulfatase B	84/--	17/10
18	<i>Scpep1</i>	Serine carboxypeptidase 1	61/--	18/14
19	<i>Gaa</i>	Lysosomal alpha-glucosidase	45/--	26/22
20	<i>Asah1</i>	Acid ceramidase	31/--	33/29
21	<i>Aga</i>	N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase	142/--	3/--
22	<i>Dpp7</i>	Dipeptidyl peptidase 2	82/--	3/--
23	<i>Creg1</i>	Protein CREG1	63/--	10/5
24	<i>Gusb</i>	Beta-glucuronidase	295/100	--/--
25	<i>Ctss</i>	Cathepsin S	165/91	--/--
26	<i>Ctsc</i>	Dipeptidyl peptidase 1	60/61	--/--
27	<i>Ctsk</i>	Cathepsin K	--/--	56/51
28	<i>Ctsh</i>	Pro-cathepsin H	--/--	50/46
29	<i>Tpp1</i>	Tripeptidyl-peptidase 1	--/--	42/40
30	<i>Ctsf</i>	Cathepsin F	--/--	23/18
31	<i>Pla2g15</i>	Group XV phospholipase A2	--/--	14/13
32	<i>Arsa</i>	Arylsulfatase A	--/--	12/4

33	<i>Rnaset2</i>	Ribonuclease T2	--/--	6/--
34	<i>Dnase2</i>	Deoxyribonuclease-2-alpha	--/--	6/--
35	<i>Naaa</i>	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase	--/--	6/--
36	<i>Neu1</i>	Sialidase-1	--/--	4/--
37	<i>Ifi30</i>	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	--/--	3/--
38	<i>Cln5</i>	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog	--/--	3/--
39	<i>Lipa</i>	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	--/--	3/--
40	<i>Grn</i>	Granulins	--/--	3/--
41	<i>Manba</i>	Beta-mannosidase	--/--	1/--

¹⁾ *Protein Score* der Elutions-Fractionen E 1/E 2 von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. ²⁾ *Peptide spectrum match* der Falsch-Positiv-Rate 5 %/1 % der Elutions-Fraktion von WT-Osteoblasten.

Insgesamt wurden in den untersuchten Elutions-Fractionen der WT-Osteoblasten und der *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten 42 Kandidaten-Proteine identifiziert, die in neun Gruppen eingeteilt werden konnten (Tab. 4.5). In den aufgereinigten Elutions-Fractionen der *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten (E 1, E 2) konnten acht Kandidaten-Proteine übereinstimmend in beiden Fractionen gefunden werden. Hierbei handelt es sich um die α 2-Kette des Kollagen Typ I, Fibronectin, Biglycan, Lumican, die *acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a*, die *procollagen C-endopeptidase enhancer 1*, der Plasma Protease C1-Inhibitor und die Matrix-Metalloproteinase 3.

Tab. 4.5 Massenspektrometrisch-basierte Identifizierung von M6P-haltigen Kandidaten für lysosomale Proteine aus *Acp2/Acp5*^{-/-}- und WT-Osteoblasten.

Nr.	Gen	Proteinname	<i>Acp2/Acp5</i> ^{-/-}	WT
Kollagen-Familie				
1	<i>Colla2</i>	Collagen alpha-2(I) chain	194/251 ¹	6/2 ²
2	<i>Colla1</i>	Collagen alpha-1(I) chain	104/--	3/--
3	<i>Coll2a1</i>	Collagen alpha-1(XII) chain	--/--	95/78
4	<i>Col6a2</i>	Collagen alpha-2(VI) chain	--/--	3/--

Nicht-kollagene Matrix-Proteine (*noncollagenous matrix proteins, NCP*)

1	<i>Fn1</i>	Fibronectin	854/1268	169/140
2	<i>Thbs1</i>	Thrombospondin-1	--/44	76/65
3	<i>Matn4</i>	Matrilin-4	--/174	--/--
4	<i>Matn1</i>	Cartilage matrix protein	--/47	--/--
5	<i>Sparc</i>	SPARC	--/22	--/--
6	<i>Postn</i>	Periostin	--/--	61/53
7	<i>Thbs2</i>	Thrombospondin-2	--/--	30/28
8	<i>Fbn1</i>	Fibrillin-1	--/--	9/--
9	<i>Nov</i>	Protein NOV homolog	--/--	9/--
10	<i>Fbln2</i>	Fibulin-2	--/--	3/--

Kleine Leucin-reiche Proteoglykane

1	<i>Bgn</i>	Biglycan	183/240	23/20
2	<i>Lum</i>	Lumican	55/114	--/--
3	<i>Dcn</i>	Decorin	--/84	--/--
4	<i>Ogn</i>	Mimecan	--/--	7/--
5	<i>Fmod</i>	Fibromodulin	--/--	3/--

Extrazelluläre Hydrolasen

1	<i>Smpd3a</i>	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	122/53	14/9
2	<i>Pcolce</i>	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	21/49	25/20
3	<i>Qsox1</i>	Sulfhydryl oxidase 1	--/50	--/--
4	<i>Fuca2</i>	Plasma alpha-L-fucosidase	--/--	14/12
5	<i>Lox</i>	Protein-lysine 6-oxidase	--/--	11/9
6	<i>Loxl3</i>	Lysyl oxidase homolog 3	--/--	5/--

7	<i>Plat</i>	Tissue-type plasminogen activator	--/--	3/--
---	-------------	-----------------------------------	-------	------

Serpine

1	<i>Serping1</i>	Plasma protease C1 inhibitor	35/114	--/--
2	<i>Serpinf1</i>	Pigment epithelium-derived factor (Serpin F1)	--/133	3/--
3	<i>Serpina3a</i>	Serine protease inhibitor A3A	--/37	--/--
4	<i>Serpinh1</i>	Serpin H1	--/--	18/17
5	<i>Serpine2</i>	Glia-derived nexin	--/--	6/--

Extrazelluläre Chaperone

1	<i>Clu</i>	Clusterin	--/73	--/--
2	<i>Fkbp10</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	--/--	3/--

Peptidasen

1	<i>Aebp1</i>	Adipocyte enhancer-binding protein 1	--/79	32/30
2	<i>Mmp3</i>	Matrix-Metalloproteinase 3 (Stromelysin 1)	38/98	--/--
3	<i>Cpa4</i>	Carboxypeptidase A4	16/--	--/--
4	<i>Mmp2</i>	72 kDa type IV collagenase	--/--	9/--

Komplement-Faktoren

1	<i>C4b</i>	Complement C4-B	--/61	--/--
2	<i>C3</i>	Complement C3	--/24	--/--

Sonstige

1	<i>Celsr3</i>	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	35/--	--/--
2	<i>Lphn1</i>	Latrophilin-1	--/25	--/--
3	<i>Pdgfrl</i>	Platelet-derived growth factor receptor-like protein	--/--	5/2

¹⁾ *Protein Score* der Elutions-Fractionen E 1/E 2 von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten. ²⁾ *Peptide spectrum match* der Falsch-Positiv-Rate 5 %/1 % der Elutions-Fraktion von WT-Osteoblasten.

Durch einen Vergleich mit vorangegangenen M6P-Proteomanalysen anderer Zellen oder Gewebetypen wurden die Kandidaten-Proteine näher eingegrenzt

(Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005; Czupalla *et al.*, 2006; Sleat *et al.*, 2006a; Sleat *et al.*, 2006b; Qian *et al.*, 2007; Sleat *et al.*, 2008; Lübke *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2010). Die Proteine, die schon einmal in einem M6P-Proteom detektiert werden konnten, und (noch) nicht als lysosomales Protein klassifiziert wurden, könnten als aussichtsreiche Proteine für weitere Analysen in Frage kommen. Weiterhin wurden für diese Proteine bisher bekannte assoziierte Erkrankungen aufgelistet (Tab. 4.6).

Tab. 4.6 M6P-haltige Kandidaten aus WT- und *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten und ihr Bezug zu Erkrankungen sowie zu anderen M6P-Proteomanalysen.

Gen	Proteinname	Assoziierte Erkrankung	M6P-Proteom-Analyse
Kleine Leucin-reiche Proteoglykane			
<i>Bgn</i>	Biglycan	Wachstumsretardierung, Osteoporose	Sleat <i>et al.</i> , 2006b
<i>Dcn</i>	Decorin	Ehlers-Danlos-Syndrom	Sleat <i>et al.</i> , 2008
<i>Lum</i>	Lumican	Ehlers-Danlos-Syndrom	Sleat <i>et al.</i> , 2006a
Extrazelluläre Hydrolasen			
<i>Smpdl3a</i>	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	Urothelkarzinom	Sleat <i>et al.</i> , 2006b
<i>Fuca2</i>	Plasma alpha-L-fucosidase	Helicobacter pylori- induziertes Magenkarzinom	Sleat <i>et al.</i> , 2008
Serpine			
<i>Serping1</i>	Plasma protease C1 inhibitor	Hereditäres Angioödem	Sleat <i>et al.</i> , 2006a
<i>Serpinf1</i>	Pigment epithelium-derived factor (Serpin F1)	Osteogenesis imperfecta Typ VI	Sleat <i>et al.</i> , 2006a
Extrazelluläre Chaperone			
<i>Clu</i>	Clusterin	Morbus Alzheimer	Sleat <i>et al.</i> , 2005; Sleat <i>et al.</i> , 2006b

5. Diskussion

Mukopolidose Typ II (MLII) gehört zu den lysosomalen Speichererkrankungen. Durch eine Mutation im *GNPTAB*-Gen kommt es zu einem Verlust der GlcNAc-1-Phosphotransferase-Aktivität. Hierdurch fehlt den Glykoproteinen, die zum Lysosom transportiert werden sollen, die notwendige Mannose-6-Phosphat (M6P)-Markierung. Dies führt zu einer Fehlsortierung der lysosomalen Proteine in den Extrazellulärraum sowie zur pathologischen Speicherung von nicht abgebauten Makromolekülen. Die betroffenen Kinder weisen von Geburt an einen schweren osteopenischen Knochenphänotyp auf mit Wachstumsretardierung und schweren Knochendeformitäten. Die genetischen und biochemischen Vorgänge der Erkrankung sind bisher gut beschrieben (Braulke *et al.*, 2013). Warum der Knochenstoffwechsel von der M6P-Defizienz im Besonderen betroffen ist und welche Knochenzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, ist bisher wenig verstanden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Knochenzellen, Osteoklasten und Osteoblasten, von MLII-Mäusen genauer untersucht.

5.1 Analyse der Resorptionsaktivität von MLII-Osteoklasten

MLII ist gekennzeichnet durch einen osteopenischen Knochenphänotyp mit verminderter Knochendichte. Bisher konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Fehlen M6P-haltiger Proteine und dem Knochenphänotyp bei MLII-Patienten hergestellt werden. Es lag nahe, dass die Hypersekretion von lysosomalen Proteinen, einschließlich der Protease Cathepsin K, in die Resorptionslücke von Osteoklasten für den Phänotyp verantwortlich ist (van Meel *et al.*, 2011). Diese Vermutung wurde mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen von auf Dentinchips kultivierten WT- und MLII-Osteoklasten *in vitro* untersucht. Osteoklasten gehen nur dann in einen aktiven Zustand mit der Ausbildung verschiedener Membrandomänen über, wenn sie auf mineralisierter Knochenmatrix kultiviert werden. In dieser Arbeit wurden Dentinchips aus Elfenbein verwendet, die eine vergleichbare Zusammensetzung mineralisierter Knochenmatrix aufweisen. Obwohl eine konstante Anzahl von Osteoklasten pro Dentinchip ausplattiert wurde, blieb es unklar, ob eine Resorptionslücke von einem, mehreren oder sich auf der Knochenoberfläche

wandernden Osteoklasten gebildet wurde. Durch die Auswertung einer signifikant hohen Anzahl an Resorptionslakunen in dieser Arbeit (275 Lakunen von WT-Osteoklasten, 285 Lakunen von MLII-Osteoklasten) konnten jedoch statistisch aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden, die zeigen, dass entgegen den Erwartungen individuelle WT- und MLII-Osteoklasten die gleiche Resorptionsaktivität aufweisen. Daher ist davon auszugehen, dass in MLII-Osteoklasten die Fehlsortierung neu synthetisierter lysosomaler Proteine nicht zur apikalen Resorptionslakune erfolgt, sondern dass sie über die basolaterale Membrandomäne des Osteoklasten abgegeben werden. Es bleibt aber unklar, über welche alternativen Rezeptoren einige der lysosomalen Enzyme, wie z.B. Cathepsin K und β -Hexosaminidase, in geringen Mengen intrazellulär zurückgehalten werden. Im Folgenden sollen die bisher beschriebenen Transportmöglichkeiten lysosomaler Proteine in Osteoklasten diskutiert werden.

Von besonderem Interesse bisheriger Analysen war der Transport lysosomaler Enzyme in die Resorptionslakune aktivierter Osteoklasten. Von großer Bedeutung für die Funktion von Osteoklasten ist die Expression der M6P-haltigen Enzyme Cathepsin K und der *tartrate-resistant acid phosphatase type 5* (TRAP, Synonym: *acid phosphatase 5*, Gen: *Acp5*) (Minkin, 1982; Drake *et al.*, 1996). Beide Enzyme werden in Osteoklasten in intrazellulären Vesikeln gespeichert, die Ähnlichkeiten mit Lysosomen aufweisen und durch niedrige pH-Werte entweder autokatalytisch wie bei Cathepsin K oder mit Hilfe anderer Enzyme aktiviert werden (Littlewood-Evans *et al.*, 1997; Yamaza *et al.*, 1998; Reinholt *et al.*, 1999; Hayman *et al.*, 2000; Hollberg *et al.*, 2002). Anhand von immunhistochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Cathepsin K- und TRAP-positive Lysosomen in aktivierten Osteoklasten mit der *ruffled border* verschmelzen (Littlewood-Evans *et al.*, 1997; van Meel *et al.*, 2011). Nach diesem Modell erfolgt in WT-Osteoklasten der Transport von neu synthetisiertem Cathepsin K und TRAP vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zu Lysosomen über einen M6P-abhängigen Transportmechanismus.

Es wurde zunächst vermutet, dass der Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase in Osteoklasten zu einer erhöhten Sekretion lysosomaler Enzyme in die Resorptionslakune führen könnte. Bei MLII werden die Vorläuferproteine von Cathepsin K und TRAP über den sekretorischen Weg in den Extrazellulärraum abgegeben. Um ihre katalytische

Aktivität zu erreichen, muss Cathepsin K jedoch wie viele andere lysosomale Hydrolasen proteolytisch aktiviert werden, wozu ein saures Milieu wie in den Lysosomen oder der Resorptionslakune notwendig ist. Die Cathepsin K- und TRAP-Vorläuferproteine, die über die basolaterale Membran an den Extrazellulärraum abgegeben werden, sind daher nicht in der Lage, ihre Funktion auszuüben. Einschränkend muss erwähnt werden, dass Osteoklasten erst *in vitro* in einen aktiven Zustand übergehen, wenn sie auf Knochenmatrix kultiviert werden. Auf Plastik kultivierte Osteoklasten besitzen keine Polarität (Boyde *et al.*, 1984; Chambers *et al.*, 1984; Väänänen und Zhao, 2008). Die Analysen der vorliegenden Arbeit an auf Dentin kultivierten aktiven MLII-Osteoklasten bestätigen jedoch die Beobachtung, dass die vermehrte Sekretion nicht zu einer erhöhten Resorptionsaktivität von MLII-Osteoklasten führt.

In Osteoklasten wurden bisher verschiedene Typen von Lysosomen identifiziert. Zum einen wird von der Existenz so genannter sekretorischer Lysosomen ausgegangen. So konnten van Meel *et al.* durch immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass Cathepsin K- und TRAP-positive Lysosomen mit anderen Lysosomen fusionieren und die so aktivierten Enzyme in die Resorptionslakune gelangen (van Meel *et al.*, 2011). Diese Lysosomen können damit als sekretorische Lysosomen angesehen werden, die ihren Inhalt (proteolytisch und enzymatisch aktive lysosomale Enzyme) über Exozytose entleeren. Sekretorische Lysosomen werden auch als *lysosome-related organelles* angesehen und sind vor allem in Zellen hämatopoetischen Ursprungs beschrieben (Blott und Griffiths, 2002). Sie können Hydrolasen speichern und über verschiedene Regulationsmechanismen ihren Inhalt freisetzen. Weiterhin übernehmen sie auch Funktionen konventioneller Lysosomen (Griffith und Isaaz, 1993; Blott und Griffiths, 2002). Zum anderen kommen konventionelle Lysosomen auch in Osteoklasten vor, die ebenfalls am Abbau der Knochenmatrix beteiligt sind. Ob sie mit der *ruffled border* fusionieren können, ist umstritten (Rodriguez *et al.*, 1997; Andrews, 2002; Goto *et al.*, 2003; Mulari *et al.*, 2003a; van Meel *et al.*, 2011). Zur Freisetzung von sekretorischen Lysosomen in Osteoklasten kommt es durch einen intrazellulären Kalzium-Anstieg (Andrews, 2000). Als Kalzium-Sensor-Protein wurde Synaptotagmin VII identifiziert, das mit der zytoplasmatischen Oberfläche der Lysosomen assoziiert ist

(Rao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Sobald der Resorptionsprozess beendet wird, erfolgt eine selektive Internalisierung der *ruffled border* in Speichervesikel, die Eigenschaften von Lysosomen aufweisen und die Biosynthese lysosomaler Enzyme geht zurück (Baron, 1989; Stenbeck, 2002). Das Modell der sekretorischen Lysosomen wird jedoch auch in Frage gestellt. Czupalla *et al.* gehen nicht von einer Fusion sekretorischer Lysosomen aus (Czupalla *et al.*, 2006). Sie beschreiben den Transport unreifer Vorläuferproteine, die hauptsächlich über M6P-abhängige Transportmechanismen direkt in die Resorptionslakune gelangen und erst durch den niedrigen pH-Wert in der Resorptionslakune aktiviert werden. Hierfür spricht die Anwesenheit von Rab7 in der *ruffled border* aktivierter Osteoklasten, ein charakteristisches Protein des spätyendosomalen Kompartiments (Zhao *et al.*, 2001).

Von besonderem Interesse ist bei MLII die Existenz von M6P-unabhängigen Transportmechanismen, denn sie garantieren zelltypabhängig, einen partiellen lysosomalen Katabolismus. Ein M6P-unabhängiger Transportweg ist u.a. für Cathepsin D beschrieben worden. Cathepsin D ist eine lysosomale Protease, deren *in vivo*-Substrate unbekannt sind, und die indirekt an der Degradation von phagozytierten Knochenmatrixbestandteilen beteiligt sein soll (Goto *et al.*, 2003). Über welchen Rezeptor Cathepsin D in Osteoklasten M6P-unabhängig transportiert wird, ist unklar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cathepsin D-positive Lysosomen eine eigene Entität darstellen, die TRAP- und Cathepsin K-negativ sind. Die Cathepsin D-positiven Lysosomen fusionieren nicht mit der *ruffled border* (Goto *et al.*, 1993; Goto *et al.*, 1994; Goto *et al.*, 2003; van Meel *et al.*, 2011).

In aktivierten Osteoklasten können lysosomale Enzyme auch direkt vom TGN über sekretorische Vesikel transportiert und über Exozytose in die Resorptionslakune entleert werden (Baron *et al.*, 1985; Baron *et al.*, 1988; Czupalla *et al.*, 2006). An diesem Prozess sind kleine GTPasen aus der Rab-Familie und SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptors*) beteiligt (Jahn, 2004). So wurde für Rab3D eine Beteiligung am Transport von sekretorischen Vesikeln und der Integrität der *ruffled border* in Osteoklasten berichtet (Pavlos *et al.*, 2005). Diese Rab3D-positiven Vesikel stellen eine Vesikelsubpopulation dar, die weder mit endolysosomalen Markern noch mit transzytotischen TRAP-positiven Vesikeln kolokalisieren (Pavlos *et al.*, 2005). Für die Bildung der *ruffled border* und für die

Aufrechterhaltung des polarisierten Zustandes der *ruffled border* ist Rab7 essentiell (Zhao *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2008). Rab7 kann außerdem mit dem *autophagy protein 5* (Atg5) und mit Sortilin interagieren, einem potentiellen M6P-unabhängigen Transportrezeptor (Ni und Morales, 2006; Zeng *et al.*, 2009; DeSelm *et al.*, 2011; Progida *et al.*, 2012). In anderen Zelltypen konnte beobachtet werden, dass Sortilin am Transport von Cathepsin D und Cathepsin H beteiligt sein soll (Lefrancois *et al.*, 2005; Canuel *et al.*, 2008).

Die *ruffled border* kann in unterschiedliche funktionelle Domänen eingeteilt werden. In der lateralen Region kommt es zur Verschmelzung exozytotischer Vesikel, wohingegen in der zentralen Region endozytotische Prozesse stattfinden (Stenbeck, 2002; Mulari *et al.*, 2003a; Mulari *et al.*, 2003b). So konnte gezeigt werden, dass es im zentralen Bereich der *ruffled border* zur Endozytose von TRAP-positiven Vesikeln aus der Resorptionslakune in den Osteoklasten kommt (Mulari *et al.*, 2003b). Matrixbestandteile, die endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden, werden über Transzytose in TRAP-positiven Vesikeln zur basolateralen *functional secretory domain* transportiert und hier in den Extrazellulärraum entleert (Halleen *et al.*, 1999; Mulari *et al.*, 2003b). Degradationsprozesse können daher - neben den Prozessen in der Resorptionslakune - auch in diesen transzytotischen Vesikeln stattfinden (Nesbitt und Horton, 1997; Salo *et al.*, 1997; Halleen *et al.*, 1999).

Die bisherigen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die erhöhte Knochen-Resorptionsaktivität in MLII-Mäusen eher auf die stark erhöhte Anzahl von Osteoklasten zurückgeführt werden kann, als auf eine durch Hypersekretion neu synthetisierter Enzyme erhöhte Resorptionsaktivität einzelner Osteoklasten. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte deshalb die genauere Betrachtung der Transportprozesse z.B. mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie in Osteoklasten sein. Bisher unveröffentlichte Analysen durch korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (*correlative light electron microscopy*; CLEM) legen die Vermutung nahe, dass es zu einer Fehlsortierung von neu synthetisiertem Cathepsin K über die basolaterale Membrandomäne kommt mit nachfolgender M6P-unabhängiger Aufnahme in Osteoblasten und Osteozyten (Schweizer und Braulke, unveröffentlichte Daten). Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, über welchen Transportweg die M6P-defizienten Proteine in aktivierten Osteoklasten fehlsortiert werden und

welchen Einfluss dies auf das Zusammenspiel mit den Knochen-bildenden Osteoblasten haben könnte.

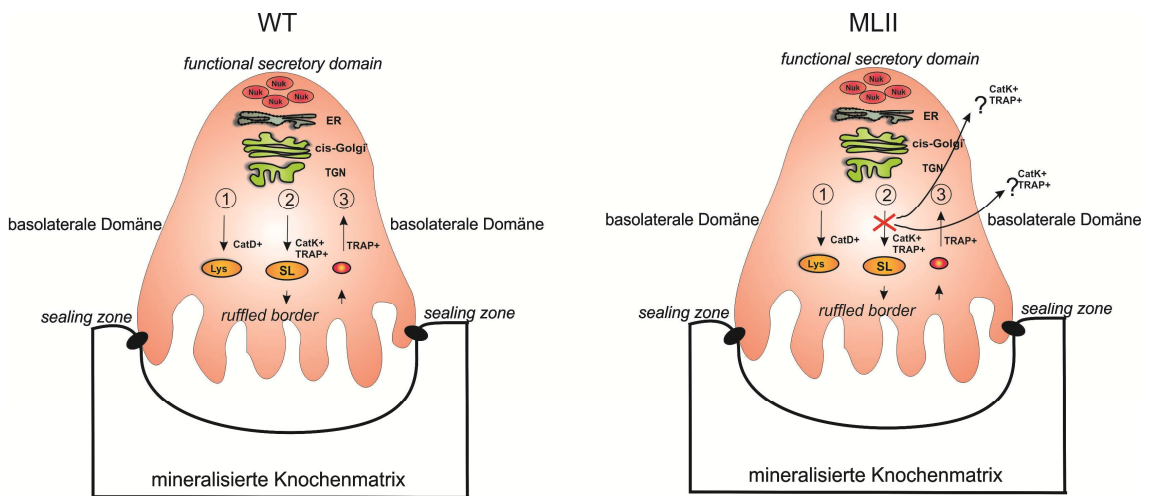


Abb. 5.1 Mögliche Transportprozesse lysosomaler Proteine in polarisierten Osteoklasten. Aktivierte Osteoklasten weisen verschiedene Membrandomänen auf: die basolaterale Domäne, die *sealing zone*, die die Resorptionslakune vom Extrazellulärraum abgrenzt, die *functional secretory domain* und die *ruffled border*, die wesentlich für den Resorptionsprozess ist. Sekretorische Proteine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) posttranslational modifiziert. Von hier aus sind bisher verschiedene Transportwege lysosomaler Proteine beschrieben. 1. Für Cathepsin D (CatD) wurde ein M6P-unabhängiger Transportweg vom TGN zum Lysosom (Lys) beschrieben. Diese Lysosomen stellen konventionelle Lysosomen dar und fusionieren nicht mit der *ruffled border*. 2. Cathepsin K (CatK) und TRAP werden M6P-abhängig zu sekretorischen Lysosomen (SL) transportiert. Die Hydrolasen werden gespeichert und über verschiedene Regulationsmechanismen in die Resorptionslakune entleert. 3. *Tartrate-resistant acid phosphatase type 5b* (TRAP)-positive Vesikel können endozytotisch von der Resorptionslakune über die *functional secretory domain* in den Extrazellulärraum transportiert werden. Im Falle einer M6P-Defizienz wie bei Mukopolysaccharidose Typ II (MLII) kommt es zu einer Fehlsortierung M6P-haltiger Enzyme. Über welche Membrandomäne die Enzyme in aktivierten Osteoklasten fehlgeleitet werden, ist bisher noch unklar (Pfeile mit Fragezeichen). Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Professor Braulke lassen jedoch vermuten, dass es zu einem Transport über die basolaterale Membrandomäne kommt.

5.2 Transkriptomanalyse kultivierter Osteoblasten

Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten und Osteoblasten weisen bei MLII eine pathologische Speicherung von nicht abbaubarem Material auf (Kollmann *et al.*, 2013). In einer Reihe von Publikationen konnte die Arbeitsgruppe von Andrea Ballabio zeigen, dass dysfunktionale Lysosomen Signale über den Transkriptionsfaktor EB (TFEB) an den Zellkern weiterleiten, die zu veränderten mRNA-Expressionsmustern führen, und die Biogenese von Lysosomen, Autophagie und Exozytose von Lysosomen aktivieren (Settembre *et al.*, 2013). Die Realtime-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Expression ausgewählter lysosomaler Gene in MLII-Osteoblasten Unterschiede zu WT-Osteoblasten aufwiesen.

Erwartungsgemäß (Kollmann *et al.*, 2012) zeigte sich als Kontrolle eine signifikante Reduktion der *Gnptab*-mRNA. Andere Gene, die lysosomale Enzyme oder Membranproteine kodieren, stiegen in MLII-Osteoblasten an (*Fuca1*, *Hexa*), während bei anderen (*Lamp1*, *Npc2*, *Man2b1*) keine Unterschiede festgestellt wurden. Wie das Beispiel der *Hexa* jedoch zeigte, kann bei MLII kein direkter Zusammenhang zwischen Genexpression und Proteinspiegel für lösliche lysosomale Enzyme erwartet werden: trotz erhöhter *Hexa*-mRNA-Spiegel am 10. Tag in MLII-Osteoblasten, ist die β -Hexosaminidase-Aktivität niedriger als in WT-Osteoblasten, weil die Unfähigkeit der MLII-Osteoblasten die β -Hexosaminidase mit M6P-Resten zu versehen, zu einer Hypersekretion führt. Analysen an Gehirnen von MLII-Mäusen zeigten ähnliche Ergebnisse mit einer im Vergleich zu WT-Tieren unveränderten mRNA-Expression der lysosomalen Gene *Fuca1*, *Hexa*, *Lamp1*, *Man2b1* und *Npc2* (Kollmann *et al.*, 2012). Die mRNA-Expressionsmengen der ausgewählten Osteoblasten-spezifischen Gene *Ibsp* und *Bglap* in MLII-Osteoblasten waren dagegen kaum zu messen. Der Verlust der M6P-Markierung lysosomaler Proteine hat daher direkte Wirkungen auf die Differenzierung und die Funktion von Osteoblasten.

Bisherige Transkriptom-Analysen bei Tiermodellen lysosomaler Speichererkrankungen konzentrierten sich vor allem auf Gewebe des zentralen Nervensystems oder auf das Leberparenchym (Wada *et al.*, 2000; Myerowitz *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2003; Woloszynek *et al.*, 2004). Anhand der Genexpressionsanalysen von 10 Tage alten WT- und MLII-Osteoblasten wurden in dieser Arbeit Gene identifiziert, die durch den Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase und der damit einhergehenden Akkumulation von Speichermaterial dysreguliert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass wichtige Differenzierungsfaktoren von Osteoblasten, wie das *Ibsp*-Gen mit einer SLR von -6,75 stark reprimiert werden. Zu dieser Gruppe gehörten auch *Panx3*, *Dkk1*, *Sost*, *Pth1r*, *Wnt5a* und *Fzd9*, die vor allem über *Wingless ints* (Wnt)-Signalwege ihre Wirkung erzielen. Wnt-Signalwege spielen eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel und Fehlregulationen in diesen Signaltransduktionswegen sind mit vielen Erkrankungen assoziiert (Moon *et al.*, 2004; Johnson und Kamel, 2007). Der so genannte kanonische Wnt-Signalweg vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion über β -Catenin. In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird β -Catenin ubiquitinyliert und phosphoryliert und über Proteasomen abgebaut, sodass die Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma

absinkt. Kommt es zur Aktivierung des Signalweges durch kanonische Wnt-Liganden, wird ein dualer Rezeptor-Komplex aus dem *low density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP5)-Rezeptor bzw. dem LRP6-Rezeptor sowie einem Rezeptor aus der *Frizzled*-Familie gebildet, der zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma führt. Das akkumulierte β -Catenin transloziert zum Zellkern, wo über verschiedene Transkriptionsfaktoren Zielgene aktiviert werden, die die Bildung und Differenzierung von Osteoblasten stimulieren (Baron und Kneissel, 2013). Der *parathyroid hormone 1 receptor* (*Pth1r*, SLR -4,35) kann nach der Bindung von Parathormon (PTH) mit dem LRP5 einen Komplex bilden und so den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren (Baron und Kneissel, 2013). *Dkk1*- (SLR -6,48) und *Sost*-Genprodukte (SLR -4,25) bewirken hingegen eine Antagonisation der Wirkung über LRP5/LRP6 (Nierhs, 2006; Daoussis und Andonopoulos, 2011; Baron und Kneissel, 2013). *Sost* vermindert weiterhin die Aktivität von *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und führt damit zur verminderten Knochenbildung (Harada und Rodan, 2003). Antikörper, die die Wirkung von *Sost* und *Dkk1* neutralisieren, werden daher als therapeutische Option bei Osteoporose diskutiert (Lim und Clarke, 2012). Wnt-Signalwege werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wodurch der relative Einfluss je nach Schwere der Fehlregulation und Beeinflussung durch andere Faktoren stark variieren kann. Über die Stimulation des kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweges kommt es physiologischerweise zur Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen aus mesenchymalen Stammzellen. Die Differenzierung von Adipozyten und Chondrozyten dagegen wird inhibiert. Weiterhin hängt die Expression von *Tnfrsf11b* in Osteoblasten, das Osteoprotegerin (OPG) kodiert, vom kanonischen Wnt-Signalweg ab. Daneben werden aber auch Differenzierungsprozesse der Osteoklasten über Wnt-Signalwege gesteuert. Im Ergebnis führt eine Aktivierung der Wnt-Signalwege in WT-Zellen zu einer Stimulation der Knochenbildung durch Osteoblasten und einer Inhibierung der Knochen-resorbierenden Prozesse durch Osteoklasten (Baron und Kneissel, 2013). Die Analysen an MLII-Osteoblasten lassen vermuten, dass dieser Wnt-Signalweg gestört ist.

Nicht alle Wnt-Liganden wirken über β -Catenin (Veeman *et al.*, 2003). In MLII-Osteoblasten war die *Wnt5a*-mRNA-Menge reduziert (SLR -3,18). Unter physiologischen Bedingungen bindet Wnt5a an *Frizzled*-Rezeptoren und führt zu einem

erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel mit Aktivierung des so genannten *Wnt-planar cell polarity* (PCP)-Signalweges (Kato, 2007; Gao *et al.*, 2011; Nemoto *et al.*, 2012). *Frizzled*-Rezeptoren, die den Wnt-PCP-Signalweg aktivieren, werden über endozytotische Prozesse aufgenommen (Gagliardi *et al.*, 2008). Das endolysosomale Kompartiment ist hierbei an der Regulation dieser Signaltransduktionsprozesse beteiligt (Seto *et al.*, 2002). Mutationen im *Wnt5*-Gen sind mit dem Robinow-Syndrom und Brachydaktylie Typ B assoziiert (Wang *et al.*, 2011). Das Robinow-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die charakterisiert wird durch eine akrale Dysostose mit mesomelem Kleinwuchs, Gingivahyperplasie sowie fazialen Dismorphien (OMIM #180700). *Wnt5* wird bei der Entwicklung von Extremitäten in einem Gradienten von proximal nach distal exprimiert, was zu einem Längenwachstum führt. Bei einer *Wnt5*-Defizienz kommt es zu verkürzten Extremitäten (Gao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Über die Aktivierung des Wnt-PCP-Signalwegs durch *Wnt5a* werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, über die die Osteoklastogenese stimuliert wird (Maeda *et al.*, 2012). Da in MLII-Mäusen jedoch eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten nachgewiesen werden konnte und die mRNA-Menge von *Wnt5a* in MLII-Osteoblasten niedriger war als in WT-Osteoblasten, kann dieses Gen jedoch für weitere Analysen eher ausgeschlossen werden.

Obwohl das RANK-RANKL-OPG-System als der wichtigste Signalweg zur Steuerung der Osteoklastogenese durch Osteoblasten gilt, waren sowohl *Tnfsf11*, das den RANK-Liganden RANKL kodiert, als auch die Menge der *Tnfrsf11b*-mRNA, die den RANKL-Antagonisten OPG kodiert, nicht signifikant verändert. Auch im Serum der Mäuse konnten keine Unterschiede in der Expression dieser Regulatorproteine detektiert werden (Kollmann *et al.*, 2013). In der Expressionsanalyse aller kodierenden mRNAs bei MLII-Osteoblasten zeigten sich in den Analysen dieser Arbeit neben dysregulierten Differenzierungsgenen von Osteoblasten, eine Reihe von überexprimierten Genen, die für Zytokine kodieren. Unter diesen Genen (z.B. *Kn1*, *Ccl6*, *Cxcl5* und *Il6*) wurde experimentell vor allem die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) genauer untersucht. Bei MLII-Osteoblasten zeigte sich eine 5-fach erhöhte Transkriptionsmenge des *Il6*-Gens im Vergleich zu WT-Osteoblasten, verbunden mit einer ca. 10-fach erhöhten IL-6-Konzentration in den Medien von MLII-Osteoblasten (Kollmann *et al.*, 2013). Die erhöhten IL-6-Spiegel sind aber nicht spezifisch für MLII, sondern wurden auch in

Fibroblasten und im Hirn von Mäusen der lysosomalen Cholesterolspeichererkrankung Nieman Pick Typ C gefunden (Suzuki *et al.*, 2007). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Induktion der Akkumulation von Cholesterol-haltigem Speichermaterial in WT-Osteoblasten zu einer erhöhten Expression und Sekretion von IL-6 führt. IL-6 wurde damit als ein geeigneter Kandidat identifiziert, dessen erhöhte Expression über RANKL-unabhängige Mechanismen zu einer gesteigerten Osteoklastogenese in MLII-Mäusen beiträgt. Lymphozyten, Osteozyten oder Chondrozyten konnten als potentielle Ursache für die IL-6-Dysregulationen in MLII ausgeschlossen werden (Kollmann *et al.*, 2013). Da auch keine Differenzen in der Antwort der MLII-Osteoblasten auf die Stimulation mit Parathormon (PTH), einem wichtigen Regulator des Knochenstoffwechsels, der die Expression von RANKL und OPG beeinflusst, beobachtet werden konnten (Kollmann *et al.*, 2013), lassen die Daten vermuten, dass die erhöhte Osteoklastogenese in MLII-Mäusen eher auf die gesteigerte Expression von *Il6* als auf Veränderungen im Verhältnis von RANKL und OPG in MLII-Osteoklasten zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerungen werden unterstützt durch Daten von transgenen IL-6-Mäusen, die eine Osteopenie und eine erhöhte Osteoklastogenese zeigten (De Benedetti *et al.*, 2006). Transgene IL-6-Mäuse waren um 30-50 % kleiner als die WT-Geschwistertiere. Die Wachstumsfugen und die epiphysealen Ossifikationszentren waren kleiner und dünner, wodurch das Längenwachstum stark beeinträchtigt wurde (De Benedetti *et al.*, 2006). Anhand histologischer Untersuchungen von trabekulärem Knochen konnte eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte ein erhöhter Abbau von Kollagen Typ I im Urin durch Deoxypyridinoline (DPD) in transgenen IL-6-Mäusen gezeigt werden, was für eine erhöhte Knochenresorption durch Osteoklasten spricht. Die Osteoblasten dieser Mäuse waren klein und bildeten weniger Knochenmatrix. Außerdem wurde nachgewiesen, dass IL-6 einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Osteoblasten hat, nicht jedoch auf ihre Differenzierung und Proliferation (De Benedetti *et al.*, 2006). Das Ungleichgewicht aus vermehrtem Knochenabbau und verminderter Knochenmineralisation führte bei transgenen IL-6-Mäusen zu einem osteopenischen Knochenphänotyp mit reduzierter kortikaler und trabekulärer Knochendichte (De Benedetti *et al.*, 2006; De Benedetti, 2009). Insgesamt zeigt der Knochenphänotyp der transgenen IL-6-Maus viele Ähnlichkeiten mit dem

osteopenischen Knochenphänotyp der MLII-Maus. Die MLII-Mäuse sind ebenfalls kleiner als ihre WT-Geschwistertiere. Weiterhin wurden bei MLII-Mäusen eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten mit erhöhter Knochenresorptionsrate sowie eine verminderte Bildung von mineralisierter Knochenmatrix durch Osteoblasten gefunden, was in beiden Fällen zu einer verminderten trabekulären Knochenbildung mit Osteopenie führte (Kollmann *et al.*, 2013).

IL-6 gehört neben *leukemia inhibitory factor*, Oncostatin M und Interleukin-11 zu den gp130-Zytokinen, die ihre Wirkung durch die Dimerisierung ihres eigenen, spezifischen Rezeptors mit dem ubiquitär exprimierten, membranständigen Glykoprotein 130-Rezeptor (gp130) erzielen, wodurch Kinasen der Janus-Familie aktiviert werden, die die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) regulieren (Jones *et al.*, 2011). IL-6 und andere Zytokine wie *tumor necrosis factor α* (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) oder PTH interagieren miteinander und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Wirkung (de la Mata *et al.*, 1995; Devlin *et al.*, 1998; Kwan Tat *et al.*, 2004). So stimuliert IL-6 die Bildung von IL-1 und induziert damit die Osteoklastogenese. Umgekehrt stimuliert IL-1 die Expression von IL-6 (Kurihara *et al.*, 1990; Edward und Williams, 2010). Außerdem induzieren PTH und TNF- α in Osteoblasten die Expression von IL-6 (Sanders und Stern, 2000). IL-6-Rezeptor-Blocker hemmen *in vitro* die Osteoklastogenese sowie die Synthese von IL-1 und TNF- α (Devlin *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2000). IL-6 wird vorrangig von Osteoblasten und Bindegewebszellen produziert, nicht jedoch von Osteoklasten (Holt *et al.*, 1996). Obwohl sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten über IL-6-Rezeptoren verfügen, erfolgt die Stimulation der Osteoklastogenese nicht direkt an den Osteoklasten, sondern indirekt über die IL-6-Rezeptoren auf den Osteoblasten (Udagawa *et al.*, 1995; Bellido *et al.*, 1996). IL-6 führt physiologischerweise in Osteoblasten zu einer erhöhten Expression von RANKL, wodurch die Osteoklastogenese stimuliert wird. Das von den Osteoblasten sezernierte IL-6 wirkt dabei autokrin auf den Osteoblasten selbst. Erst die hierdurch produzierten Effektorproteine stimulieren die Osteoklastogenese (Kwan Tat *et al.*, 2004). Wie aber bereits vorher diskutiert wurde, reguliert IL-6 in MLII-Osteoblasten über RANKL-unabhängige Mechanismen die Osteoklastogenese.

Durch den zentralen Stellenwert von Zytokinen wie IL-6, TNF- α und IL-1 bei vielen Erkrankungen, wurden in der Vergangenheit verschiedene *Biologicals* als therapeutische Optionen entwickelt, die die Wirkung der Zytokine blockieren. Anti-TNF- α -Antagonisten wie Infliximab oder Adalimumab, der IL-1-Rezeptor-Blocker Anakinra oder der anti-IL-6-Antikörper Tocilizumab werden bei erwachsenen Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind, erfolgreich eingesetzt. Unter der Therapie konnte der Prozess der Erkrankung aufgehalten werden und zeigte damit vergleichbare Effekte anderer Therapieoptionen, sodass in therapierefraktären Fällen alternative Behandlungsmethoden zur Verfügung stehen (Dinareello, 2005; Church *et al.*, 2008; Emery *et al.*, 2008; Genovese *et al.*, 2008; Choy, 2009; Jones *et al.*, 2011; Roll *et al.*, 2011).

Zusammenfassend zeigten die tiefgreifende morphologische Analyse des osteopenischen Knochenphänotyps bei MLII-Mäusen und die Identifizierung von dysregulierten Genen in MLII-Osteoblasten die zentrale Rolle von Zytokinen im Knochenstoffwechsel bei MLII. Dadurch kommen neue therapeutische Optionen für die Behandlung des osteopenischen Knochenphänotyps in Frage, vergleichbar mit der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis. Erste Vorversuche bei 4 und 12 Wochen alten MLII-Mäusen, die über acht Wochen mit dem monoklonalen OPG-Fc-Antikörper Denosumab behandelt wurden, zeigten jedoch eine unregelmäßige Zunahme der kalzifizierten Knochendichte mit deutlicher Betonung der Kortikalis und verminderter trabekulärer Knochendichte (Braulke und Schinke, unveröffentlichte Daten). Dies lässt vermuten, dass der Einsatz von einigen solcher Substanzen in Individuen, die sich in der Wachstumsphase befinden, nicht geeignet ist.

Alle Daten deuten darauf hin, dass RANKL-OPG-unabhängige Regulatoren die Osteoklastogenese bei MLII stimulieren. Das MLII-Mausmodell kann hierbei als Modell für die Analyse des osteopenischen Phänotyps und alternativer Behandlungsansätze auch für andere lysosomale Speichererkrankungen dienen.

5.3 Proteomanalyse M6P-haltiger Proteine von Osteoblasten

Eine Proteomanalyse dient dazu, die von einem Organ, einem Gewebetyp oder einer Zelle produzierten Proteine zu identifizieren (Banks *et al.*, 2000). Um Subklassen von

Proteinen zu detektieren, können entweder subzelluläre Fraktionierungen zur Anreicherung spezifischer Kompartimente oder Protein-spezifische Modifikationen genutzt werden. So kann für die Identifizierung lysosomaler Proteine die posttranslationale Mannose-6-Phosphat (M6P)-Modifikation verwendet werden. Anhand eines immobilisierten anti-M6P-Antikörpers wurden in dieser Arbeit lysosomale Proteine aus Medien von primär kultivierten WT- und *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten affinitätschromatographisch aufgereinigt. Um die Menge an sezernierten M6P-haltigen Proteinen zu erhöhen, wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid behandelt, das die Bindung lysosomaler Enzyme an M6P-Rezeptoren im TGN verhindert (Ohkuma und Poole, 1978; Braulke *et al.*, 1987b). Auf diese Weise konnten in den Medien 41 lysosomale Enzyme der bekannten Hydrolasen identifiziert werden. Ziel der Arbeit war es, zusätzlich zu den lysosomalen Enzymen noch andere, bisher nicht als Lysosomen-relevante M6P-haltige Proteine in den Medien zu detektieren, die für den osteopenischen Phänotyp bei MLII verantwortlich sein könnten, da Osteoblasten verschiedene Proteine sezernieren, die zu einer Beeinflussung der Knochenhomöostase führen.

Die erste Gruppe von Kandidaten-Proteinen können der Extrazellulären Matrix (EZM) zugeordnet werden. Sie stellen relativ große Moleküle dar (z.B. α 2-Kette des Kollagen Typ I mit 1736 Aminosäuren oder Thrombospondin-1 mit 1170 Aminosäuren). Diese Matrixproteine sind meist O-glykosidisch mit Glykosaminoglykan-Seitenketten modifiziert, die nicht durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase noch zusätzliche M6P-Reste erhalten können. Es ist daher eher anzunehmen, dass die EZM-Proteine indirekt an andere M6P-haltige Proteine binden und so mit der anti-M6P-Matrix interagieren. Diese Proteine wurden im Folgenden von weiteren Experimenten vorerst ausgeschlossen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass an den verschiedenen M6P-haltigen Proteinen die M6P-Modifikationen in a) verschiedenen Abständen, b) an unterschiedlichen Verzweigungen der Oligosaccharide oder c) auch als diphosphorylierte Zuckerketten vorkommen können, was ihre Affinität zu M6P-Rezeptoren (Sleat und Lobel, 1997; Qian *et al.*, 2008) oder zum anti-M6P-Antikörper unterschiedlich beeinflussen kann. Diphosphorylierte Oligosaccharide binden z.B. bevorzugt gegenüber monophosphorylierten Zuckerketten auf lysosomalen Enzymen an M6P-Rezeptoren/-Antikörpern (Tong und Kornfeld, 1989). Es ist dabei bisher nicht möglich, anhand der

M6P-Modifikation Proteine zu unterscheiden, die konstitutionelle lysosomale Bestandteile sind oder ob es sich um Proteine handelt, die für den Abbau im Lysosom vorgesehen sind, z.B. im Rahmen von Zelldifferenzierungsprozessen, Zellteilung o.ä. Neben 40 bekannten lysosomalen Enzymen konnten in dieser Arbeit noch weitere 43 M6P-haltige Kandidaten-Proteine in den Medien von Osteoblasten gefunden werden. Durch den Vergleich mit bisherigen M6P-Proteomanalysen anderer Gewebetypen (Kollmann *et al.*, 2005; Sleat *et al.*, 2005; Czupalla *et al.*, 2006; Sleat *et al.*, 2006a; Sleat *et al.*, 2006b; Qian *et al.*, 2007; Sleat *et al.*, 2008; Lübke *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2010) und der bisher beschriebenen Funktion im Knochenstoffwechsel wurden die detektierten Proteine gruppiert und im Folgenden näher dargestellt. Aussichtsreich scheinen hier die kleinen Leucin-reichen Proteoglykane Biglycan, Decorin und Lumican sowie Serpin F1 zu sein.

Die drei Proteine Biglycan, Decorin und Lumican gehören zur Gruppe der kleinen Leucin-reichen Proteine und stellen nicht-kollagene extrazelluläre Matrixbestandteile dar, die eine wichtige strukturgebende Funktion im Knochengewebe haben (Fisher *et al.*, 1983). Sie sind Proteoglykane mit einem Leucin-reichen-Kernprotein, die verschiedene Glykosaminoglykan-Seitenketten tragen. Besonders sulfatierte Seitenketten führen zu einer starken negativen Ladung, die es ihnen ermöglicht, Bestandteile der EZM sowie Wachstumsfaktoren zu binden (Ruoslahti und Yamaguchi, 1991). Decorin und Biglycan gehören aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in die Klasse I von Leucin-reichen Proteoglykanen (Fisher *et al.*, 1989; Ameye und Young, 2002). Biglycan wird als Propeptid gebildet und von der Metalloproteinase *bone morphogenetic protein-1* (BMP-1) gespalten (Scott *et al.*, 2000). Biglycan wurde als mögliches lysosomales Protein bereits im Gehirngewebe identifiziert (Sleat *et al.*, 2006b), wird aber auch von verschiedenen Bindegewebszellen und besonders im Knochengewebe gebildet (Bianco *et al.*, 1990). *Bgn*^{-/-}-Mäuse zeigen bei Geburt einen normalen Knochenphänotyp, sind jedoch ab dem 6. Monat durch Wachstumsretardierung mit reduzierter trabekulärer sowie kortikaler Knochendichte und osteopenischem Phänotyp gekennzeichnet (Xu *et al.*, 1998). Histomorphometrische Analysen ergaben eine reduzierte Anzahl von Osteoblasten sowie eine verminderte Knochenbildung. Die Anzahl der Osteoklasten war im Vergleich zu WT-Geschwistertieren nicht verändert, sodass die reduzierte

Knochendichte im Falle der *Bgn*^{-/-}-Mäuse nicht auf eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten zurückgeführt werden konnte (Xu *et al.*, 1998). Damit scheint ein verändertes *Targeting* von Biglycan keine sinnvolle Erklärung für den osteopenischen Phänotyp bei MLII zu sein. Biglycan kann jedoch den *transforming-growth-factor-β* (TGF-β) binden und es in der Knochenmatrix speichern (Hildebrand *et al.*, 1994), was bedeutend sein könnte in der Pathogenese von MLII. TGF-β ist ein Zytokin, von dem drei Isoformen (TGF-β1 - TGF-β3) existieren, die an vielen Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration von Zellen, Angiogenese und der Produktion von EZM beteiligt sind (Jenkins, 2008; Le Goff und Cormier-Daire, 2012). Es ist bekannt, dass die neu synthetisierten TGF-β-Vorstufen als inaktive, M6P-haltige Polypeptide sezerniert werden (Purchio *et al.*, 1988) und zunächst einen inaktiven, latenten Komplex bilden, der dann durch proteolytische, M6P-abhängige Aktivierung durch die Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor/Plasminogen-Kaskade oder über Integrine TGF-β freisetzt (Oates *et al.*, 1998; Godar *et al.*, 1999; Jenkins, 2008). Dies ist vor allem in der frühen Phase der Osteoblastenproliferation und der Produktion von extrazellulärer Knochenmatrix wichtig. In späteren Phasen hemmt TGF-β jedoch die Osteoblastenproliferation und Knochenmineralisierung (Kasagi und Chen, 2013). In Osteoklasten wird die Funktion von TGF-β kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien zeigen, dass TGF-β die Osteoklastogenese induziert und die Expression von RANK in Osteoklasten sowie konzentrationsabhängig die Sekretion von OPG in Osteoblasten stimuliert (Kasagi und Chen, 2013). Der Verlust an M6P-Resten an Vorläuferformen von TGF-β in der MLII-Maus sollte in einer verminderten proteolytischen Freisetzung von TGF-β aus dem latenten Komplex und zu einer eingeschränkten SMAD-Signaltransduktion führen (Feng und Derynck, 2005). Weiterführende experimentelle Analysen sollten deshalb auf Veränderungen im *Signalling* von TGF-β ausgerichtet sein, um den Mechanismus der gestörten Knochenhomöostase bei MLII besser zu verstehen.

Decorin besteht aus 354 Aminosäuren und wurde bisher in 12 verschiedenen Geweben der Ratte bei M6P-Proteomanalysen gefunden (Sleat *et al.*, 2008). Mit den hier beschriebenen massenspektrometrischen Auswertungen der M6P-Proteomanalyse aus Sekreten von Osteoblasten wird diese Gewebeliste noch erweitert. In der hier parallel ausgeführten Microarray-Analyse von MLII-Osteoblasten ergab sich für Decorin eine

reduzierte Expression von -6,20 (SLR) (siehe auch 4.2 sowie Tab. 8.1 im Anhang). Möglicherweise führt eine Hypersekretion nicht phosphorylierten Decorins oder der Verlust einer M6P-abhängigen Decorin-Proteininteraktion, z.B. mit TGF- β , zu einer negativen Feedback-Hemmung der Decorinsynthese in MLII-Osteoblasten, was ebenfalls weiterer biochemischer Validierung bedarf. M6P-Reste an Decorin können aber auch einfach dazu dienen, um extrazelluläres Decorin, ähnlich dem Biglycan, Rezeptor-vermittelt zu endozytieren (Hausser *et al.*, 1998), im Lysosom abzubauen und damit die Bioverfügbarkeit von Decorin und/oder TGF- β zu regulieren. *Dcn*^{-/-}-Mäuse weisen zwar keinen so starken Knochenphänotyp auf wie *Bgn*^{-/-}-Mäuse, jedoch konnten Störungen in der Kollagenfibrillogenese sowie morphologische Veränderungen in der mineralisierten Knochenmatrix gezeigt werden (Ameys und Young, 2002). *Bgn/Dcn* doppelt-defiziente Mäuse weisen eine schwerere Osteopenie auf, die stärker als bei *Bgn*-Defizienz allein ausgeprägt war, was für einen synergistischen Effekt von Decorin und Biglycan im Knochenstoffwechsel spricht (Corsi *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 2005).

Das Leucin-reiche Kernprotein Lumican ist durch Keratansulfat- und Polylaktosamin-Seitenketten modifiziert (Ameys und Young, 2002). Es wird vor allem von reifen oder sich differenzierenden Osteoblasten gebildet, nicht jedoch von proliferierenden Pre-Osteoblasten und ist wesentlicher Bestandteil der Knochenmatrix (Raouf *et al.*, 2002). Weiterhin ist Lumican in Kornea, Sklera, Haut, Sehnen und Knorpel zu finden (Blochberger *et al.*, 1992; Chakravarti *et al.*, 1995; Chakravarti *et al.*, 1998). Außerdem konnte Lumican im Plasma durch M6P-Proteomanalysen identifiziert werden (Sleat *et al.*, 2006a). Es soll genau wie Biglycan und Decorin den TGF- β -Signalweg bzw. die Bioverfügbarkeit von aktivem TGF- β beeinflussen (Nikitovic *et al.*, 2008; Nikitovic *et al.*, 2012).

Die Literatur verdeutlicht, dass die kleinen Leucin-reichen Proteoglykane Biglycan, Decorin und Lumican eine interessante Gruppe an Proteinen darstellen, die sowohl direkten als auch indirekten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel bei MLII haben könnten.

Weitere interessante Kandidaten finden sich in der Gruppe der Serpine. Zu dieser ca. 40 Mitglieder umfassenden Familie zählen beispielsweise α -1-Antitrypsin,

Antithrombin oder Plasminogen-Aktivator-Inhibitor. Sie weisen die gleichen strukturellen Ähnlichkeiten mit drei β -Faltblättern und neun α -Helices auf und bestehen aus ca. 330-500 Aminosäuren (Law *et al.*, 2006). Viele Mitglieder dieser Familie sind Serin-Protease-Inhibitoren, jedoch finden sich auch Cystein-Protease-Inhibitoren, die beispielsweise Caspasen und Cathepsine inhibieren. Meist spielen Serpine eine Rolle in Prozessen, die fein reguliert sind wie Blutgerinnung, Inflammation und Fibrinolyse (Law *et al.*, 2006; Huntington, 2011). Serpine entfalten ihre Wirkung durch Konformationsänderungen, was sie relativ anfällig gegenüber Hitze und Mutationen macht (Law *et al.*, 2006). Von den in der M6P-Proteomanalysen dieser Arbeit detektierten Serpinen soll hier das Serpin F1 herausgestellt werden, das einen potenten Inhibitor der Angiogenese darstellt. Es wurde bereits 2006 in einer M6P-Proteomanalyse menschlichen Plasmas detektiert (Sleat *et al.*, 2006a). Mutationen im Serpin F1 kodierenden Gen (*Serpinf1*) verursachen Osteogenesis imperfecta Typ VI (Homan *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2013; OMIM #613982). Osteogenesis imperfecta umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die hauptsächlich durch Mutationen in Kollagen-Typ I-Genen (*Colla1*- oder *Colla2*-Gen) hervorgerufen werden und grundsätzlich autosomal-dominant vererbt werden. Rezessive Erbgänge betreffen vor allem Unterformen der Osteogenesis imperfecta, bei denen Kollagen-modifizierende Enzyme (z.B. *cartilage associated protein (Crtap)*) und Chaperone (z.B. *heat shock protein 47 (Serpinh1)*) betroffen sind (Morello *et al.*, 2006; Christiansen *et al.*, 2010; Byers *et al.*, 2012). Bei der Osteogenesis imperfecta Typ VI erscheinen die Patienten meist noch gesund, erst mit dem 6. Lebensmonat wird die Erkrankung durch das Auftreten vermehrter Knochenbrüche offenkundig. Osteogenesis imperfecta Typ VI zeichnet sich durch einen hohen Anteil unmineralisierten Osteoids aus, ähnlich einer Osteomalazie, allerdings mit normalen Vitamin D- und Kalziumwerten im Serum der Patienten (Homan *et al.*, 2011). Serpin F1 ist an der embryonalen Entwicklung des Skelettsystems beteiligt (Quan *et al.*, 2005) und wird hauptsächlich von Osteoblasten gebildet (Tombran-Tink und Barnstable, 2004). Serpin F1 induziert die Produktion von Osteoprotegerin (Akiyama *et al.*, 2010) und es wird ihm eine Rolle in der Mineralisierung des Osteoids zugesprochen (Homan *et al.*, 2011). Es bleibt weiteren Versuchen vorbehalten, ob Serpin F1 M6P-Reste trägt, wie es in MLII-Osteoblasten exprimiert und auf Proteinebene sortiert wird, und welche Proteasen durch eventuelle

Fehlsortierung von Serpin F1 nicht mehr reguliert werden und zur gesteigerten Osteoklastogenese bzw. zum Mineralisierungsdefekt durch MLII-Osteoblasten beitragen.

6. Zusammenfassung

Nonsense- und *Frameshift*-Mutationen im *GNPTAB*-Gen führen zu einer lysosomalen Speichererkrankung, Mukopolidose II (MLII). Das Gen kodiert die N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase), das Schlüsselenzym bei der Synthese vom Mannose-6-Phosphat (M6P)-Erkennungssignal an löslichen lysosomalen Enzymen. Das Fehlen der M6P-Markierung führt zu einer Fehlsortierung und Sekretion lysosomaler Enzyme, lysosomaler Dysfunktion und Akkumulation nicht abbaubaren Materials in den Lysosomen. Klinisch sind MLII-Patienten durch psychomotorische Retardierung, Dysostosis multiplex (z.B. kurze Extremitäten, Gibbusdeformitäten, Osteopenie und Wachstumsstillstand) und frühzeitigen Tod in der ersten Lebensdekade gekennzeichnet.

Für die experimentellen Analysen der vorliegenden Arbeit stand eine GlcNAc-1-Phosphotransferase-*knock-in* Maus zur Verfügung, die alle Symptome der menschlichen Erkrankung aufwies. Die Ziele der hier durchgeführten Untersuchungen waren auf 1. die Aufklärung der Mechanismen der erhöhten Knochenresorption bei MLII und 2. die Identifizierung von Osteoblasten-gesteuerten Proteinen gerichtet, die potentiell für die gestörte Osteoklastogenese bei MLII in Frage kommen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Konfokalmikroskopische Analysen von Osteoklasten aus WT- und MLII-Mäusen, die auf Dentinmaterial wuchsen, haben *in vitro* keine signifikanten Unterschiede in der Resorptionsaktivität ergeben.
2. Microarray-Analysen des Transkriptom von WT- und MLII-Osteoblasten zeigten, dass in MLII-Osteoblasten Gene der Osteoblastendifferenzierung erniedrigt und Gene, die die Osteoklastogenese regulieren, erhöht waren. Besonders stark erhöht war die Expression des pro-osteoklastogenen Zytokins Interleukin-6 (IL-6). Die Array-Daten wurden für eine Anzahl von Genen durch quantitative Realtime-PCR verifiziert.
3. Aus konditionierten Medien von Maus-Osteoblasten wurde die Gesamtheit neu synthetisierter M6P-modifizierter Proteine durch eine anti-M6P-

Affinitätschromatographie gereinigt und durch Massenspektrometrie analysiert. Unter den so identifizierten Proteinen befanden sich 41 bekannte lysosomale Proteine sowie 42 Kandidaten-Proteine, für die bisher keine lysosomale Funktion bekannt ist.

Zusammenfassend zeigen die vorgelegten Daten, dass die erhöhte Zahl von Osteoklasten bei MLII, die die gleiche Resorptionsaktivität aufwiesen wie WT-Osteoklasten, zusammen mit der eingeschränkten Mineralisierungsfunktion der MLII-Osteoblasten für den osteopenischen Phänotyp verantwortlich sind. Die Transkriptionsanalysen in MLII-Osteoblasten zeigten die zentrale RANKL-unabhängige Rolle von IL-6 für die gesteigerte Osteoklastogenese bei MLII. Damit stellt dieses Zytokin ein neues Zielprotein für alternative Behandlungsstrategien von Veränderungen im Skelettsystem bei MLII und anderen lysosomalen Speichererkrankungen dar. Die identifizierten M6P-haltigen Kandidaten-Proteine, die von Osteoblasten sezerniert werden, können als potentielle neue Signalmoleküle für eine Osteoblasten-regulierte Osteoklastogenese angesehen werden und sind das Ziel weiterführender biochemischer und zellbiologischer Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

- Akiyama T., Dass C.R., Shinoda Y., Kawano H., Tanaka S. and Choong P.F. (2010). "PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL." *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 789-794.
- Albers J., Schulze J., Beil F.T., Gebauer M., Baranowsky A., Keller J., Marshall R.P., Wintges K., Friedrich F.W., Priemel M., Schilling A.F., Rueger J.M., Cornils K., Fehse B., Streichert T., Sauter G., Jakob F., Insogna K.L., Pober B., Knobloch K.P., Francke U., Amling M. and Schinke T. (2011). "Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9." *J Cell Biol* 192(6): 1057-1072.
- Ameys L. and Young M.F. (2002). "Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases." *Glycobiology* 12(9): 107R-116R.
- Anderson H.C., Sipe J.B., Hessle L., Dhanyamraju R., Atti E., Camacho N.P. and Millan J.L. (2004). "Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice." *Am J Pathol* 164(3): 841-847.
- Andersson E.R., Bryjova L., Biris K., Yamaguchi T.P., Arenas E. and Bryja V. (2010). "Genetic interaction between Lrp6 and Wnt5a during mouse development." *Dev Dyn* 239(1): 237-245.
- Andrews N.W. (2000). "Regulated secretion of conventional lysosomes." *Trends Cell Biol* 10(8): 316-321.
- Andrews N.W. (2002). "Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship." *J Cell Biol* 158(3): 389-394.
- Aubin I., Adams C.P., Opsahl S., Septier D., Bishop C.E., Auge N., Salvayre R., Negre-Salvayre A., Goldberg M., Guenet J.L. and Poirier C. (2005). "A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse." *Nat Genet* 37(8): 803-805.

- Aubin J.E. (2008). "Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation." *Principles of Bone Biology*. Bilezikian J.P., Raisz L.G. and Martin T.J. (eds.). Amsterdam, London, Elsevier: 85-107.
- Babcock D.S., Bove K.E., Hug G., Dignan P.S., Soukup S. and Warren N.S. (1986). "Fetal mucopolidosis II (I-cell disease): radiologic and pathologic correlation." *Pediatr Radiol* 16(1): 32-39.
- Ballabio A. and Gieselmann V. (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 684-696.
- Banks R.E., Dunn M.J., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C., Blackstock W., Pappin D.J. and Selby P.J. (2000). "Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities." *Lancet* 356(9243): 1749-1756.
- Bao M., Elmendorf B.J., Booth J.L., Drake R.R. and Canfield W.M. (1996). "Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit." *J Biol Chem* 271(49): 31446-31451.
- Barnes M.J. (1975). "Function of ascorbic acid in collagen metabolism." *Ann N Y Acad Sci* 258: 264-277.
- Baron R. (1989). "Polarity and membrane transport in osteoclasts." *Connect Tissue Res* 20(1-4): 109-120.
- Baron R. and Kneissel M. (2013). "WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments." *Nat Med* 19(2): 179-192.
- Baron R., Neff L., Brown W., Courtoy P.J., Louvard D. and Farquhar M.G. (1988). "Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway." *J Cell Biol* 106(6): 1863-1872.
- Baron R., Neff L., Louvard D. and Courtoy P.J. (1985). "Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border." *J Cell Biol* 101(6): 2210-2222.

- Barranger J.A. and O'Rourke E. (2001). "Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease." *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2: 89-96; discussion 87-88.
- Baseler M.W. and Burrell R. (1983). "Purification of haptoglobin and its effects on lymphocyte and alveolar macrophage responses." *Inflammation* 7(4): 387-400.
- Beck M. (2010). "Therapy for lysosomal storage disorders." *IUBMB Life* 62(1): 33-40.
- Bellido T., Stahl N., Farruggella T.J., Borba V., Yancopoulos G.D. and Manolagas S.C. (1996). "Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells." *J Clin Invest* 97(2): 431-437.
- Bi Y., Stuelten C.H., Kilts T., Wadhwa S., Iozzo R.V., Robey P.G., Chen X.D. and Young M.F. (2005). "Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells." *J Biol Chem* 280(34): 30481-30489.
- Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D. and Robey P.G. (1990). "Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues." *J Histochem Cytochem* 38(11): 1549-1563.
- Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R. and Gluck S. (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." *Science* 245(4920): 855-857.
- Blochberger T.C., Cornuet P.K. and Hassell J.R. (1992). "Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated." *J Biol Chem* 267(29): 20613-20619.
- Blott E.J. and Griffiths G.M. (2002). "Secretory lysosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2): 122-131.
- Boman A.L., Zhang C., Zhu X. and Kahn R.A. (2000). "A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi." *Mol Biol Cell* 11(4): 1241-1255.
- Bond S.R., Lau A., Penuela S., Sampaio A.V., Underhill T.M., Laird D.W. and Naus C.C. (2011). "Pannexin 3 is a novel target for Runx2, expressed by osteoblasts and mature growth plate chondrocytes." *J Bone Miner Res* 26(12): 2911-2922.

- Bonifacino J.S. and Traub L.M. (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." *Annu Rev Biochem* 72: 395-447.
- Bosshard N.U., Hubler M., Arnold S., Briner J., Spycher M.A., Sommerlade H.J., von Figura K. and Gitzelmann R. (1996). "Spontaneous mucopolidosis in a cat: an animal model of human I-cell disease." *Vet Pathol* 33(1): 1-13.
- Bounoutas G.S., Tawfeek H., Frohlich L.F., Chung U.I. and Abou-Samra A.B. (2006). "Impact of impaired receptor internalization on calcium homeostasis in knock-in mice expressing a phosphorylation-deficient parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor." *Endocrinology* 147(10): 4674-4679.
- Boyde A., Ali N.N. and Jones S.J. (1984). "Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro." *Br Dent J* 156(6): 216-220.
- Boyle W.J., Simonet W.S. and Lacey D.L. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* 423(6937): 337-342.
- Braulke T. and Bonifacino J.S. (2009). "Sorting of lysosomal proteins." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 605-614.
- Braulke T., Gartung C., Hasilik A. and von Figura K. (1987a). "Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes?" *J Cell Biol* 104(6): 1735-1742.
- Braulke T., Geuze H.J., Slot J.W., Hasilik A. and von Figura K. (1987b). "On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells." *Eur J Cell Biol* 43(3): 316-321.
- Braulke T., Raas-Rothschild A. and Kornfeld S. (2013). "I-Cell Disease and Pseudo-Hurler Polydystrophy: Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization." *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Valle D., Beaudet A., Vogelstein B. et al (eds.). New York, McGraw-Hill.
- Braun M., Waheed A. and von Figura K. (1989). "Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface." *EMBO J* 8(12): 3633-3640.
- Brix K., Linke M., Tepel C. and Herzog V. (2001). "Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid." *Biol Chem* 382(5): 717-725.

- Brooks A.I., Chattopadhyay S., Mitchison H.M., Nussbaum R.L. and Pearce D.A. (2003). "Functional categorization of gene expression changes in the cerebellum of a Cln3-knockout mouse model for Batten disease." *Mol Genet Metab* 78(1): 17-30.
- Byers P.H. and Pyott S.M. (2012). "Recessively inherited forms of osteogenesis imperfecta." *Annu Rev Genet* 46: 475-497.
- Canuel M., Korkidakis A., Konnyu K. and Morales C.R. (2008). "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H." *Biochem Biophys Res Commun* 373(2): 292-297.
- Cathey S.S., Leroy J.G., Wood T., Eaves K., Simensen R.J., Kudo M., Stevenson R.E. and Friez M.J. (2010). "Phenotype and genotype in mucopolysaccharidosis II and III alpha/beta: a study of 61 probands." *J Med Genet* 47(1): 38-48.
- Chakravarti S., Magnuson T., Lass J.H., Jepsen K.J., LaMantia C. and Carroll H. (1998). "Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican." *J Cell Biol* 141(5): 1277-1286.
- Chakravarti S., Stallings R.L., SundarRaj N., Cornuet P.K. and Hassell J.R. (1995). "Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22." *Genomics* 27(3): 481-488.
- Chambers T.J., Revell P.A., Fuller K. and Athanasou N.A. (1984). "Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts." *J Cell Sci* 66: 383-399.
- Chang P.L., Ameen M., Yu C.Z. and Kelly B.M. (1988). "Effect of ammonium chloride on subcellular distribution of lysosomal enzymes in human fibroblasts." *Exp Cell Res* 176(2): 258-267.
- Cho S.Y., Ki C.S., Sohn Y.B., Kim S.J., Maeng S.H. and Jin D.K. (2013). "Osteogenesis Imperfecta Type VI with Severe Bony Deformities Caused by Novel Compound Heterozygous Mutations in SERPINF1." *J Korean Med Sci* 28(7): 1107-1110.
- Choubey D. and Panchanathan R. (2008). "Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus." *Immunol Lett* 119(1-2): 32-41.

- Choy E. (2009). "RADIATE: more treatment options for patients with an inadequate response to tumor necrosis factor antagonists." *Nat Clin Pract Rheumatol* 5(2): 66-67.
- Christiansen H.E., Schwarze U., Pyott S.M., AlSwaid A., Al Balwi M., Alrasheed S., Pepin M.G., Weis M.A., Eyre D.R. and Byers P.H. (2010). "Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta." *Am J Hum Genet* 86(3): 389-398.
- Church L.D., Cook G.P. and McDermott M.F. (2008). "Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders." *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(1): 34-42.
- Cohen M.M., Jr. (2006). "The new bone biology: pathologic, molecular and clinical correlates." *Am J Med Genet A* 140(23): 2646-2706.
- Corsi A., Xu T., Chen X.D., Boyde A., Liang J., Mankani M., Sommer B., Iozzo R.V., Eichstetter I., Robey P.G., Bianco P. and Young M.F. (2002). "Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues." *J Bone Miner Res* 17(7): 1180-1189.
- Cuppoletti J., Aures-Fischer D. and Sachs G. (1987). "The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport." *Biochim Biophys Acta* 899(2): 276-284.
- Czupalla C., Mansukoski H., Riedl T., Thiel D., Krause E. and Hoflack B. (2006). "Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism." *Mol Cell Proteomics* 5(1): 134-143.
- Dahms N.M., Lobel P. and Kornfeld S. (1989). "Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting." *J Biol Chem* 264(21): 12115-12118.
- Daoussis D. and Andonopoulos A.P. (2011). "The emerging role of Dickkopf-1 in bone biology: is it the main switch controlling bone and joint remodeling?" *Semin Arthritis Rheum* 41(2): 170-177.

- Datta B., Li B., Choubey D., Nallur G. and Lengyel P. (1996). "p202, an interferon-inducible modulator of transcription, inhibits transcriptional activation by the p53 tumor suppressor protein, and a segment from the p53-binding protein 1 that binds to p202 overcomes this inhibition." *J Biol Chem* 271(44): 27544-27555.
- David-Vizcarra G., Briody J., Ault J., Fietz M., Fletcher J., Savarirayan R., Wilson M., McGill J., Edwards M., Munns C., Alcausin M., Cathey S. and Sillence D. (2010). "The natural history and osteodystrophy of mucopolidosis types II and III." *J Paediatr Child Health* 46(6): 316-322.
- De Benedetti F. (2009). "The impact of chronic inflammation on the growing skeleton: lessons from interleukin-6 transgenic mice." *Horm Res* 72 Suppl 1: 26-29.
- De Benedetti F., Rucci N., Del Fattore A., Peruzzi B., Paro R., Longo M., Vivarelli M., Muratori F., Berni S., Ballanti P., Ferrari S. and Teti A. (2006). "Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system." *Arthritis Rheum* 54(11): 3551-3563.
- de Duve C. (1983). "Lysosomes revisited." *Eur J Biochem* 137(3): 391-397.
- de la Mata J., Uy H.L., Guise T.A., Story B., Boyce B.F., Mundy G.R. and Roodman G.D. (1995). "Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo." *J Clin Invest* 95(6): 2846-2852.
- Derocq D., Prebois C., Beaujouin M., Laurent-Matha V., Pattingre S., Smith G.K. and Liaudet-Coopman E. (2012). "Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis." *Oncogene* 31(26): 3202-3212.
- DeSelm C.J., Miller B.C., Zou W., Beatty W.L., van Meel E., Takahata Y., Klumperman J., Tooze S.A., Teitelbaum S.L. and Virgin H.W. (2011). "Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption." *Dev Cell* 21(5): 966-974.
- Devlin R.D., Reddy S.V., Savino R., Ciliberto G. and Roodman G.D. (1998). "IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on

- osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures." *J Bone Miner Res* 13(3): 393-399.
- Dinarello C.A. (2005). "Blocking IL-1 in systemic inflammation." *J Exp Med* 201(9): 1355-1359.
- Drake F.H., Dodds R.A., James I.E., Connor J.R., Debouck C., Richardson S., Lee-Rykaczewski E., Coleman L., Rieman D., Barthlow R., Hastings G. and Gowen M. (1996). "Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts." *J Biol Chem* 271(21): 12511-12516.
- Eapen A., Sundivakkam P., Song Y., Ravindran S., Ramachandran A., Tirupathi C. and George A. (2010). "Calcium-mediated stress kinase activation by DMP1 promotes osteoblast differentiation." *J Biol Chem* 285(47): 36339-36351.
- Edwards C.J. and Williams E. (2010). "The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis." *Osteoporos Int* 21(8): 1287-1293.
- Emery P., Keystone E., Tony H.P., Cantagrel A., van Vollenhoven R., Sanchez A., Alecock E., Lee J. and Kremer J. (2008). "IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial." *Ann Rheum Dis* 67(11): 1516-1523.
- Esbrit P. and Alcaraz M.J. (2013). "Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies." *Biochem Pharmacol* 85(10): 1417-1423.
- Feng J.Q., Ward L.M., Liu S., Lu Y., Xie Y., Yuan B., Yu X., Rauch F., Davis S.I., Zhang S., Rios H., Drezner M.K., Quarles L.D., Bonewald L.F. and White K.E. (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." *Nat Genet* 38(11): 1310-1315.
- Feng X.H. and Derynck R. (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.
- Fisher L.W., Termine J.D., Dejter S.W., Jr., Whitson S.W., Yanagishita M., Kimura J.H., Hascall V.C., Kleinman H.K., Hassell J.R. and Nilsson B. (1983). "Proteoglycans of developing bone." *J Biol Chem* 258(10): 6588-6594.

- Fisher L.W., Termine J.D. and Young M.F. (1989). "Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species." *J Biol Chem* 264(8): 4571-4576.
- Flanagan-Steet H., Sias C. and Steet R. (2009). "Altered chondrocyte differentiation and extracellular matrix homeostasis in a zebrafish model for mucopolysaccharidosis II." *Am J Pathol* 175(5): 2063-2075.
- Franke M., Braulke T. and Storch S. (2013). "Transport of the GlcNAc-1-phosphotransferase alpha/beta-subunit precursor protein to the Golgi apparatus requires a combinatorial sorting motif." *J Biol Chem* 288(2): 1238-1249.
- Franzoso G., Carlson L., Xing L., Poljak L., Shores E.W., Brown K.D., Leonardi A., Tran T., Boyce B.F. and Siebenlist U. (1997). "Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development." *Genes Dev* 11(24): 3482-3496.
- Fuller K., Lean J.M., Bayley K.E., Wani M.R. and Chambers T.J. (2000). "A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival." *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2445-2453.
- Fuller M., Tucker J.N., Lang D.L., Dean C.J., Fietz M.J., Meikle P.J. and Hopwood J.J. (2011). "Screening patients referred to a metabolic clinic for lysosomal storage disorders." *J Med Genet* 48(6): 422-425.
- Futerman A.H. and van Meer G. (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(7): 554-565.
- Gagliardi M., Piddini E. and Vincent J.P. (2008). "Endocytosis: a positive or a negative influence on Wnt signalling?" *Traffic* 9(1): 1-9.
- Gao B., Song H., Bishop K., Elliot G., Garrett L., English M.A., Andre P., Robinson J., Sood R., Minami Y., Economides A.N. and Yang Y. (2011). "Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2." *Dev Cell* 20(2): 163-176.
- Gelfman C.M., Vogel P., Issa T.M., Turner C.A., Lee W.S., Kornfeld S. and Rice D.S. (2007). "Mice lacking alpha/beta subunits of GlcNAc-1-phosphotransferase exhibit growth retardation, retinal degeneration, and secretory cell lesions." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(11): 5221-5228.

- Genovese M.C., McKay J.D., Nasonov E.L., Mysler E.F., da Silva N.A., Alecock E., Woodworth T. and Gomez-Reino J.J. (2008). "Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study." *Arthritis Rheum* 58(10): 2968-2980.
- Ghosh P., Dahms N.M. and Kornfeld S. (2003). "Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3): 202-212.
- Godar S., Horejsi V., Weidle U.H., Binder B.R., Hansmann C. and Stockinger H. (1999). "M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1." *Eur J Immunol* 29(3): 1004-1013.
- Goto T., Kiyoshima T., Moroi R., Tsukuba T., Nishimura Y., Himeno M., Yamamoto K. and Tanaka T. (1994). "Localization of cathepsins B, D, and L in the rat osteoclast by immuno-light and -electron microscopy." *Histochemistry* 101(1): 33-40.
- Goto T., Tsukuba T., Kiyoshima T., Nishimura Y., Kato K., Yamamoto K. and Tanaka T. (1993). "Immunohistochemical localization of cathepsins B, D and L in the rat osteoclast." *Histochemistry* 99(5): 411-414.
- Goto T., Yamaza T. and Tanaka T. (2003). "Cathepsins in the osteoclast." *J Electron Microsc (Tokyo)* 52(6): 551-558.
- Griffiths G.M. and Isaaz S. (1993). "Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor." *J Cell Biol* 120(4): 885-896.
- Groskopf J.C., Syu L.J., Saltiel A.R. and Linzer D.I. (1997). "Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G protein-coupled, mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." *Endocrinology* 138(7): 2835-2840.
- Guha S. and Padh H. (2008). "Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis." *Indian J Biochem Biophys* 45(2): 75-90.
- Gundberg C.M. (2003). "Matrix proteins." *Osteoporos Int* 14 Suppl 5: S37-40; discussion S40-32.

- Halleen J.M., Raisanen S., Salo J.J., Reddy S.V., Roodman G.D., Hentunen T.A., Lehenkari P.P., Kaija H., Vihko P. and Vaananen H.K. (1999). "Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase." *J Biol Chem* 274(33): 22907-22910.
- Hanson P.I. and Cashikar A. (2012). "Multivesicular body morphogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 337-362.
- Harada S. and Rodan G.A. (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." *Nature* 423(6937): 349-355.
- Harris S.E., Gluhak-Heinrich J., Harris M.A., Yang W., Bonewald L.F., Riha D., Rowe P.S., Robling A.G., Turner C.H., Feng J.Q., McKee M.D. and Nicollela D. (2007). "DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7(4): 313-315.
- Hausser H., Schonherr E., Muller M., Liszio C., Bin Z., Fisher L.W. and Kresse H. (1998). "Receptor-mediated endocytosis of decorin: involvement of leucine-rich repeat structures." *Arch Biochem Biophys* 349(2): 363-370.
- Hayman A.R., Bune A.J. and Cox T.M. (2000). "Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo." *J Anat* 196 (Pt 3): 433-441.
- Henne W.M., Buchkovich N.J. and Emr S.D. (2011). "The ESCRT pathway." *Dev Cell* 21(1): 77-91.
- Heo J.S., Choi K.Y., Sohn S.H., Kim C., Kim Y.J., Shin S.H., Lee J.M., Lee J., Sohn J.A., Lim B.C., Lee J.A., Choi C.W., Kim E.K., Kim H.S., Kim B.I. and Choi J.H. (2012). "A case of mucopolysaccharidosis II presenting with prenatal skeletal dysplasia and severe secondary hyperparathyroidism at birth." *Korean J Pediatr* 55(11): 438-444.
- Hildebrand A., Romaris M., Rasmussen L.M., Heinegard D., Twardzik D.R., Border W.A. and Ruoslahti E. (1994). "Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta." *Biochem J* 302 (Pt 2): 527-534.

- Hollberg K., Hultenby K., Hayman A., Cox T. and Andersson G. (2002). "Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport." *Exp Cell Res* 279(2): 227-238.
- Holt I., Davie M.W. and Marshall M.J. (1996). "Osteoclasts are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bones." *Bone* 18(3): 221-226.
- Homan E.P., Rauch F., Grafe I., Lietman C., Doll J.A., Dawson B., Bertin T., Napierala D., Morello R., Gibbs R., White L., Miki R., Cohn D.H., Crawford S., Travers R., Glorieux F.H. and Lee B. (2011). "Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI." *J Bone Miner Res* 26(12): 2798-2803.
- Huntington J.A. (2011). "Serpins structure, function and dysfunction." *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1: 26-34.
- Ishikawa M., Iwamoto T., Fukumoto S. and Yamada Y. (2014). "Pannexin 3 inhibits proliferation of osteoprogenitor cells by regulating Wnt and p21 signaling." *J Biol Chem* 289(5): 2839-2851.
- Jahn R. (2004). "Principles of exocytosis and membrane fusion." *Ann N Y Acad Sci* 1014: 170-178.
- Jenkins G. (2008). "The role of proteases in transforming growth factor-beta activation." *Int J Biochem Cell Biol* 40(6-7): 1068-1078.
- Johnson M.L. and Kamel M.A. (2007). "The Wnt signaling pathway and bone metabolism." *Curr Opin Rheumatol* 19(4): 376-382.
- Jones S.A., Scheller J. and Rose-John S. (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." *J Clin Invest* 121(9): 3375-3383.
- Jongen J.W., Willemstein-van Hove E.C., van der Meer J.M., Bos M.P., Juppner H., Segre G.V., Abou-Samra A.B., Feyen J.H. and Herrmann-Erlee M.P. (1996). "Down-regulation of the receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide by PTH in primary fetal rat osteoblasts." *J Bone Miner Res* 11(9): 1218-1225.
- Kariya Y., Honma M., Aoki S., Chiba A. and Suzuki H. (2009). "Vps33a mediates RANKL storage in secretory lysosomes in osteoblastic cells." *J Bone Miner Res* 24(10): 1741-1752.

- Kasagi S. and Chen W. (2013). "TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells." *Cell Biosci* 3(1): 4.
- Katoh M. (2007). "STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review)." *Int J Mol Med* 19(2): 273-278.
- Katz M.L., Coates J.R., Sibigroth C.M., Taylor J.D., Carpentier M., Young W.M., Winger F.A., Kennedy D., Vuillemenot B.R. and O'Neill C.A. (2014). "Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in a canine model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2 disease)." *J Neurosci Res*.
- Koch M., Schulze J., Hansen U., Ashwodt T., Keene D.R., Brunken W.J., Burgeson R.E., Bruckner P. and Bruckner-Tuderman L. (2004). "A novel marker of tissue junctions, collagen XXII." *J Biol Chem* 279(21): 22514-22521.
- Kollmann K., Damme M., Markmann S., Morelle W., Schweizer M., Hermans-Borgmeyer I., Rochert A.K., Pohl S., Lubke T., Michalski J.C., Kakela R., Walkley S.U. and Braulke T. (2012). "Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolidosis II 'knock-in' mice." *Brain* 135(Pt 9): 2661-2675.
- Kollmann K., Mutenda K.E., Balleininger M., Eckermann E., von Figura K., Schmidt B. and Lubke T. (2005). "Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis." *Proteomics* 5(15): 3966-3978.
- Kollmann K., Pestka J.M., Kuhn S.C., Schone E., Schweizer M., Karkmann K., Otomo T., Catala-Lehnen P., Failla A.V., Marshall R.P., Krause M., Santer R., Amling M., Braulke T. and Schinke T. (2013). "Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolidosis II." *EMBO Mol Med*.
- Kornak U., Kasper D., Bosl M.R., Kaiser E., Schweizer M., Schulz A., Friedrich W., Delling G. and Jentsch T.J. (2001). "Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man." *Cell* 104(2): 205-215.
- Kornak U., Schulz A., Friedrich W., Uhlhaas S., Kremens B., Voit T., Hasan C., Bode U., Jentsch T.J. and Kubisch C. (2000). "Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis." *Hum Mol Genet* 9(13): 2059-2063.

- Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.
- Kornfeld S. and Mellman I. (1989). "The biogenesis of lysosomes." *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525.
- Kudo M., Bao M., D'Souza A., Ying F., Pan H., Roe B.A. and Canfield W.M. (2005). "The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA." *J Biol Chem* 280(43): 36141-36149.
- Kudo M., Brem M.S. and Canfield W.M. (2006). "Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene." *Am J Hum Genet* 78(3): 451-463.
- Kudo M. and Canfield W.M. (2006). "Structural requirements for efficient processing and activation of recombinant human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase." *J Biol Chem* 281(17): 11761-11768.
- Kurihara N., Bertolini D., Suda T., Akiyama Y. and Roodman G.D. (1990). "IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release." *J Immunol* 144(11): 4226-4230.
- Kwan Tat S., Padrines M., Theoleyre S., Heymann D. and Fortun Y. (2004). "IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(1): 49-60.
- Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J. and Boyle W.J. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* 93(2): 165-176.
- Lachmann R.H. (2011). "Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases." *Curr Opin Pediatr* 23(6): 588-593.

- Lakkakorpi P., Tuukkanen J., Hentunen T., Jarvelin K. and Vaananen K. (1989). "Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro." *J Bone Miner Res* 4(6): 817-825.
- Lanske B., Amling M., Neff L., Guiducci J., Baron R. and Kronenberg H.M. (1999). "Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development." *J Clin Invest* 104(4): 399-407.
- Law R.H., Zhang Q., McGowan S., Buckle A.M., Silverman G.A., Wong W., Rosado C.J., Langendorf C.G., Pike R.N., Bird P.I. and Whisstock J.C. (2006). "An overview of the serpin superfamily." *Genome Biol* 7(5): 216.
- Le Goff C. and Cormier-Daire V. (2012). "From tall to short: the role of TGFbeta signaling in growth and its disorders." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 160C(3): 145-153.
- Lee S.J. and Nathans D. (1988). "Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors." *J Biol Chem* 263(7): 3521-3527.
- Lee W.S., Payne B.J., Gelfman C.M., Vogel P. and Kornfeld S. (2007). "Murine UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase lacking the gamma-subunit retains substantial activity toward acid hydrolases." *J Biol Chem* 282(37): 27198-27203.
- Lefrancois S., Canuel M., Zeng J. and Morales C.R. (2005). "Inactivation of sortilin (a novel lysosomal sorting receptor) by dominant negative competition and RNA interference." *Biol Proced Online* 7: 17-25.
- Leroy J.G., Ho M.W., MacBrinn M.C., Zielke K., Jacob J. and O'Brien J.S. (1972). "I-cell disease: biochemical studies." *Pediatr Res* 6(10): 752-757.
- Lim V. and Clarke B.L. (2012). "New therapeutic targets for osteoporosis: beyond denosumab." *Maturitas* 73(3): 269-272.
- Littlewood-Evans A., Kokubo T., Ishibashi O., Inaoka T., Wlodarski B., Gallagher J.A. and Bilbe G. (1997). "Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry." *Bone* 20(2): 81-86.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.

- Lorenz-Depiereux B., Bastepe M., Benet-Pages A., Amyere M., Wagenstaller J., Muller-Barth U., Badenhop K., Kaiser S.M., Rittmaster R.S., Shlossberg A.H., Olivares J.L., Loris C., Ramos F.J., Glorieux F., Vikkula M., Juppner H. and Strom T.M. (2006). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nat Genet* 38(11): 1248-1250.
- Loutit J.F. and Nisbet N.W. (1982). "The origin of osteoclasts." *Immunobiology* 161(3-4): 193-203.
- Lubke T., Lobel P. and Sleat D.E. (2009). "Proteomics of the lysosome." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 625-635.
- Maeda H., Akasaki K., Yoshimine Y., Akamine A. and Yamamoto K. (1999). "Limited and selective localization of the lysosomal membrane glycoproteins LGP85 and LGP96 in rat osteoclasts." *Histochem Cell Biol* 111(4): 245-251.
- Maeda K., Kobayashi Y., Udagawa N., Uehara S., Ishihara A., Mizoguchi T., Kikuchi Y., Takada I., Kato S., Kani S., Nishita M., Marumo K., Martin T.J., Minami Y. and Takahashi N. (2012). "Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis." *Nat Med* 18(3): 405-412.
- Makrypidi G., Damme M., Muller-Loennies S., Trusch M., Schmidt B., Schluter H., Heeren J., Lubke T., Saftig P. and Bräulke T. (2012). "Mannose 6 dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5." *Mol Cell Biol* 32(4): 774-782.
- Marschner K., Kollmann K., Schweizer M., Bräulke T. and Pohl S. (2011). "A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism." *Science* 333(6038): 87-90.
- Martin T.J. and Sims N.A. (2005). "Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption." *Trends Mol Med* 11(2): 76-81.
- Masquelier D., Herbert B., Hauser N., Mermillod P., Schonne E. and Remacle C. (1990). "Morphologic characterization of osteoblast-like cell cultures isolated from newborn rat calvaria." *Calcif Tissue Int* 47(2): 92-104.

- Matsuzaki K., Udagawa N., Takahashi N., Yamaguchi K., Yasuda H., Shima N., Morinaga T., Toyama Y., Yabe Y., Higashio K. and Suda T. (1998). "Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures." *Biochem Biophys Res Commun* 246(1): 199-204.
- Mazrier H., Van Hove M., Wang P., Knox V.W., Aguirre G.D., Holt E., Wiemelt S.P., Sleeper M.M., Hubler M., Haskins M.E. and Giger U. (2003). "Inheritance, biochemical abnormalities and clinical features of feline mucopolysaccharidosis II: the first animal model of human I-cell disease." *J Hered* 94(5): 363-373.
- Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E. and Carey W.F. (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." *JAMA* 281(3): 249-254.
- Metcalf D. and Isaacs A.M. (2010). "The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes." *Biochem Soc Trans* 38(6): 1469-1473.
- Miller S.F., Proud V.K., Werner A.L., Field F.M., Wilcox W.F., Lachman R.S. and Rimoin D.L. (2003). "Pacman dysplasia: a lethal skeletal dysplasia with variable radiographic features." *Pediatr Radiol* 33(4): 256-260.
- Minkin C. (1982). "Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function." *Calcif Tissue Int* 34(3): 285-290.
- Moon R.T., Kohn A.D., De Ferrari G.V. and Kaykas A. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." *Nat Rev Genet* 5(9): 691-701.
- Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N.J., Marceau F. and Adam A. (2005). "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets." *J Pharmacol Sci* 99(1): 6-38.
- Morello R., Bertin T.K., Chen Y., Hicks J., Tonachini L., Monticone M., Castagnola P., Rauch F., Glorieux F.H., Vranka J., Bachinger H.P., Pace J.M., Schwarze U., Byers P.H., Weis M., Fernandes R.J., Eyre D.R., Yao Z., Boyce B.F. and Lee B. (2006). "CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta." *Cell* 127(2): 291-304.
- Mulari M., Vaaraniemi J. and Vaananen H.K. (2003a). "Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts." *Microsc Res Tech* 61(6): 496-503.

- Mulari M.T., Zhao H., Lakkakorpi P.T. and Vaananen H.K. (2003b). "Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake." *Traffic* 4(2): 113-125.
- Muller-Loennies S., Galliciotti G., Kollmann K., Glatzel M. and Braulke T. (2010). "A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphate-containing proteins: application in mucopolidosis type II patients and mice." *Am J Pathol* 177(1): 240-247.
- Myerowitz R., Lawson D., Mizukami H., Mi Y., Tifft C.J. and Proia R.L. (2002). "Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling." *Hum Mol Genet* 11(11): 1343-1350.
- Nakae S., Morita H., Ohno T., Arae K., Matsumoto K. and Saito H. (2013). "Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy." *Allergol Int* 62(1): 13-20.
- Nakashima T., Kobayashi Y., Yamasaki S., Kawakami A., Eguchi K., Sasaki H. and Sakai H. (2000). "Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines." *Biochem Biophys Res Commun* 275(3): 768-775.
- Nefussi J.R., Boy-Lefevre M.L., Boulekbache H. and Forest N. (1985). "Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion." *Differentiation* 29(2): 160-168.
- Nemoto E., Ebe Y., Kanaya S., Tsuchiya M., Nakamura T., Tamura M. and Shimauchi H. (2012). "Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 422(4): 627-632.
- Nesbitt S.A. and Horton M.A. (1997). "Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts." *Science* 276(5310): 266-269.
- Ni X. and Morales C.R. (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." *Traffic* 7(7): 889-902.
- Nickerson D.P., Brett C.L. and Merz A.J. (2009). "Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic." *Curr Opin Cell Biol* 21(4): 543-551.

- Niehrs C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." *Oncogene* 25(57): 7469-7481.
- Nielsen R., Courtoy P.J., Jacobsen C., Dom G., Lima W.R., Jadot M., Willnow T.E., Devuyt O. and Christensen E.I. (2007). "Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5407-5412.
- Nikitovic D., Aggelidakis J., Young M.F., Iozzo R.V., Karamanos N.K. and Tzanakakis G.N. (2012). "The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology." *J Biol Chem* 287(41): 33926-33933.
- Nikitovic D., Berdiaki A., Zafiropoulos A., Katonis P., Tsatsakis A., Karamanos N.K. and Tzanakakis G.N. (2008). "Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells." *FEBS J* 275(2): 350-361.
- Oates A.J., Schumaker L.M., Jenkins S.B., Pearce A.A., DaCosta S.A., Arun B. and Ellis M.J. (1998). "The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene." *Breast Cancer Res Treat* 47(3): 269-281.
- Ohkuma S. and 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(7): 3327-3331.
- Okada S., Owada M., Sakiyama T., Yutaka T. and Ogawa M. (1985). "I-cell disease: clinical studies of 21 Japanese cases." *Clin Genet* 28(3): 207-215.
- Otomo T., Higaki K., Nanba E., Ozono K. and Sakai N. (2011). "Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolipidosis II skin fibroblasts." *J Biol Chem* 286(40): 35283-35290.
- Pace J.M., Wiese M., Drenguis A.S., Kuznetsova N., Leikin S., Schwarze U., Chen D., Mooney S.H., Unger S. and Byers P.H. (2008). "Defective C-propeptides of the proalpha2(I) chain of type I procollagen impede molecular assembly and result in osteogenesis imperfecta." *J Biol Chem* 283(23): 16061-16067.

- Palokangas H., Mulari M. and Vaananen H.K. (1997). "Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts." *J Cell Sci* 110 (Pt 15): 1767-1780.
- Pavlos N.J., Xu J., Riedel D., Yeoh J.S., Teitelbaum S.L., Papadimitriou J.M., Jahn R., Ross F.P. and Zheng M.H. (2005). "Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption." *Mol Cell Biol* 25(12): 5253-5269.
- Pazzaglia U.E., Beluffi G., Campbell J.B., Bianchi E., Colavita N., Diard F., Gugliantini P., Hirche U., Kozlowski K., Marchi A. and et al. (1989). "Mucopolidosis II: correlation between radiological features and histopathology of the bones." *Pediatr Radiol* 19(6-7): 406-413.
- Peck W.A., Birge S.J., Jr. and Fedak S.A. (1964). "Bone cells biochemical and biological studies after enzymatic isolation." *Science* 146(3650): 1476-1477.
- Pelton R.W., Saxena B., Jones M., Moses H.L. and Gold L.I. (1991). "Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development." *J Cell Biol* 115(4): 1091-1105.
- Petersen C.M., Nielsen M.S., Nykjaer A., Jacobsen L., Tommerup N., Rasmussen H.H., Roigaard H., Gliemann J., Madsen P. and Moestrup S.K. (1997). "Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography." *J Biol Chem* 272(6): 3599-3605.
- Pinto R., Caseiro C., Lemos M., Lopes L., Fontes A., Ribeiro H., Pinto E., Silva E., Rocha S., Marcao A., Ribeiro I., Lacerda L., Ribeiro G., Amaral O. and Sa Miranda M.C. (2004). "Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal." *Eur J Hum Genet* 12(2): 87-92.
- Plante M., Claveau S., Lepage P., Lavoie E.M., Brunet S., Roquis D., Morin C., Vezina H. and Laprise C. (2008). "Mucopolidosis II: a single causal mutation in the N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gene (GNPTAB) in a French Canadian founder population." *Clin Genet* 73(3): 236-244.

- Platt F.M. and Lachmann R.H. (2009). "Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects." *Biochim Biophys Acta* 1793(4): 737-745.
- Pohl S., Marschner K., Storch S. and Braulke T. (2009a). "Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases." *Biol Chem* 390(7): 521-527.
- Pohl S., Tiede S., Castrichini M., Cantz M., Gieselmann V. and Braulke T. (2009b). "Compensatory expression of human N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase subunits in mucopolipidosis type III gamma." *Biochim Biophys Acta* 1792(3): 221-225.
- Poorthuis B.J., Wevers R.A., Kleijer W.J., Groener J.E., de Jong J.G., van Weely S., Niezen-Koning K.E. and van Diggelen O.P. (1999). "The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands." *Hum Genet* 105(1-2): 151-156.
- Progida C., Nielsen M.S., Koster G., Bucci C. and Bakke O. (2012). "Dynamics of Rab7b-dependent transport of sorting receptors." *Traffic* 13(9): 1273-1285.
- Puertollano R., Aguilar R.C., Gorshkova I., Crouch R.J. and Bonifacino J.S. (2001). "Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs." *Science* 292(5522): 1712-1716.
- Purchio A.F., Cooper J.A., Brunner A.M., Lioubin M.N., Gentry L.E., Kovacina K.S., Roth R.A. and Marquardt H. (1988). "Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor." *J Biol Chem* 263(28): 14211-14215.
- Qian M., Sleat D.E., Zheng H., Moore D. and Lobel P. (2008). "Proteomics analysis of serum from mutant mice reveals lysosomal proteins selectively transported by each of the two mannose 6-phosphate receptors." *Mol Cell Proteomics* 7(1): 58-70.
- Quan G.M., Ojaimi J., Li Y., Kartsogiannis V., Zhou H. and Choong P.F. (2005). "Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone." *Calcif Tissue Int* 76(2): 146-153.
- Raas-Rothschild A., Cormier-Daire V., Bao M., Genin E., Salomon R., Brewer K., Zeigler M., Mandel H., Toth S., Roe B., Munnich A. and Canfield W.M. (2000).

- "Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC)." *J Clin Invest* 105(5): 673-681.
- Rainero E. and Norman J.C. (2013). "Late endosomal and lysosomal trafficking during integrin-mediated cell migration and invasion: Cell matrix receptors are trafficked through the late endosomal pathway in a way that dictates how cells migrate." *Bioessays* 35(6): 523-532.
- Randall R.M., Shao Y.Y., Wang L. and Ballock R.T. (2012). "Activation of Wnt Planar Cell Polarity (PCP) signaling promotes growth plate column formation in vitro." *J Orthop Res* 30(12): 1906-1914.
- Rao S.K., Huynh C., Proux-Gillardeaux V., Galli T. and Andrews N.W. (2004). "Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis." *J Biol Chem* 279(19): 20471-20479.
- Raouf A., Ganss B., McMahon C., Vary C., Roughley P.J. and Seth A. (2002). "Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix." *Matrix Biol* 21(4): 361-367.
- Reczek D., Schwake M., Schroder J., Hughes H., Blanz J., Jin X., Brondyk W., Van Patten S., Edmunds T. and Saftig P. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." *Cell* 131(4): 770-783.
- Reinholt F.P., Hultenby K., Heinegard D., Marks S.C., Jr., Norgard M. and Anderson G. (1999). "Extensive clear zone and defective ruffled border formation in osteoclasts of osteopetrotic (ia/ia) rats: implications for secretory function." *Exp Cell Res* 251(2): 477-491.
- Reitman M.L. and Kornfeld S. (1981). "Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes." *J Biol Chem* 256(23): 11977-11980.
- Ricciotti E. and FitzGerald G.A. (2011). "Prostaglandins and inflammation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986-1000.
- Roberts T.L., Idris A., Dunn J.A., Kelly G.M., Burnton C.M., Hodgson S., Hardy L.L., Garceau V., Sweet M.J., Ross I.L., Hume D.A. and Stacey K.J. (2009). "HIN-

- 200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA." *Science* 323(5917): 1057-1060.
- Rodriguez A., Webster P., Ortego J. and Andrews N.W. (1997). "Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells." *J Cell Biol* 137(1): 93-104.
- Roll P., Muhammad K., Schumann M., Kleinert S., Einsele H., Dorner T. and Tony H.P. (2011). "In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment." *Arthritis Rheum* 63(5): 1255-1264.
- Roodman G.D., Ibbotson K.J., MacDonald B.R., Kuehl T.J. and Mundy G.R. (1985). "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23): 8213-8217.
- Ruoslahti E. (1989). "Proteoglycans in cell regulation." *J Biol Chem* 264(23): 13369-13372.
- Ruoslahti E. and Yamaguchi Y. (1991). "Proteoglycans as modulators of growth factor activities." *Cell* 64(5): 867-869.
- Saftig P. and Klumperman J. (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9): 623-635.
- Salo J., Lehenkari P., Mulari M., Metsikko K. and Vaananen H.K. (1997). "Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis." *Science* 276(5310): 270-273.
- Sanders J.L. and Stern P.H. (2000). "Protein kinase C involvement in interleukin-6 production by parathyroid hormone and tumor necrosis factor-alpha in UMR-106 osteoblastic cells." *J Bone Miner Res* 15(5): 885-893.
- Sardiello M., Palmieri M., di Ronza A., Medina D.L., Valenza M., Gennarino V.A., Di Malta C., Donaudy F., Embrione V., Polishchuk R.S., Banfi S., Parenti G., Cattaneo E. and Ballabio A. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." *Science* 325(5939): 473-477.
- Sathasivam A., Garibaldi L., Murphy R. and Ibrahim J. (2006). "Transient neonatal hyperparathyroidism: a presenting feature of mucopolipidosis type II." *J Pediatr Endocrinol Metab* 19(6): 859-862.

- Saul R.A., Proud V., Taylor H.A., Leroy J.G. and Spranger J. (2005). "Prenatal mucopolidosis type II (I-cell disease) can present as Pacman dysplasia." *Am J Med Genet A* 135(3): 328-332.
- Schroder B.A., Wrocklage C., Hasilik A. and Saftig P. (2010). "The proteome of lysosomes." *Proteomics* 10(22): 4053-4076.
- Scott I.C., Imamura Y., Pappano W.N., Troedel J.M., Recklies A.D., Roughley P.J. and Greenspan D.S. (2000). "Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan." *J Biol Chem* 275(39): 30504-30511.
- Selander K., Lehenkari P. and Vaananen H.K. (1994). "The effects of bisphosphonates on the resorption cycle of isolated osteoclasts." *Calcif Tissue Int* 55(5): 368-375.
- Seto E.S., Bellen H.J. and Lloyd T.E. (2002). "When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways." *Genes Dev* 16(11): 1314-1336.
- Settembre C., Fraldi A., Medina D.L. and Ballabio A. (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(5): 283-296.
- Shohat M., Rimoin D.L., Gruber H.E. and Lachman R. (1993). "New epiphyseal stippling syndrome with osteoclastic hyperplasia." *Am J Med Genet* 45(5): 558-561.
- Sleat D.E., Della Valle M.C., Zheng H., Moore D.F. and Lobel P. (2008). "The mannose 6-phosphate glycoprotein proteome." *J Proteome Res* 7(7): 3010-3021.
- Sleat D.E., Lackland H., Wang Y., Sohar I., Xiao G., Li H. and Lobel P. (2005). "The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins." *Proteomics* 5(6): 1520-1532.
- Sleat D.E. and Lobel P. (1997). "Ligand binding specificities of the two mannose 6-phosphate receptors." *J Biol Chem* 272(2): 731-738.
- Sleat D.E., Wang Y., Sohar I., Lackland H., Li Y., Li H., Zheng H. and Lobel P. (2006a). "Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins." *Mol Cell Proteomics* 5(10): 1942-1956.

- Sleat D.E., Zheng H., Qian M. and Lobel P. (2006b). "Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins." *Mol Cell Proteomics* 5(4): 686-701.
- Stenbeck G. (2002). "Formation and function of the ruffled border in osteoclasts." *Semin Cell Dev Biol* 13(4): 285-292.
- Stubbs J.T., 3rd, Mintz K.P., Eanes E.D., Torchia D.A. and Fisher L.W. (1997). "Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain." *J Bone Miner Res* 12(8): 1210-1222.
- Suter A., Everts V., Boyde A., Jones S.J., Lullmann-Rauch R., Hartmann D., Hayman A.R., Cox T.M., Evans M.J., Meister T., von Figura K. and Saftig P. (2001). "Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice." *Development* 128(23): 4899-4910.
- Suzuki M., Sugimoto Y., Ohsaki Y., Ueno M., Kato S., Kitamura Y., Hosokawa H., Davies J.P., Ioannou Y.A., Vanier M.T., Ohno K. and Ninomiya H. (2007). "Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators of transcription in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts: a potential basis for glial cell activation in the NPC brain." *J Neurosci* 27(8): 1879-1891.
- Takeda H., Ozaki K., Yasuda H., Ishida M., Kitano S. and Hanazawa S. (1998). "Sphingomyelinase and ceramide inhibit formation of F-actin ring in and bone resorption by rabbit mature osteoclasts." *FEBS Lett* 422(2): 255-258.
- Takeshita S., Kaji K. and Kudo A. (2000). "Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts." *J Bone Miner Res* 15(8): 1477-1488.
- Tang Y., Wu X., Lei W., Pang L., Wan C., Shi Z., Zhao L., Nagy T.R., Peng X., Hu J., Feng X., Van Hul W., Wan M. and Cao X. (2009). "TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation." *Nat Med* 15(7): 757-765.
- Teitelbaum S.L. and Ross F.P. (2003). "Genetic regulation of osteoclast development and function." *Nat Rev Genet* 4(8): 638-649.

- Thomas S. and Bonchev D. (2010). "A survey of current software for network analysis in molecular biology." *Hum Genomics* 4(5): 353-360.
- Tiede S., Storch S., Lubke T., Henrissat B., Bargal R., Raas-Rothschild A. and Braulke T. (2005). "Mucopolidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase." *Nat Med* 11(10): 1109-1112.
- Tombran-Tink J. and Barnstable C.J. (2004). "Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone." *Biochem Biophys Res Commun* 316(2): 573-579.
- Tong P.Y. and Kornfeld S. (1989). "Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." *J Biol Chem* 264(14): 7970-7975.
- Turker G., Hatun S., Gulleroglu K., Cizmecioglu F., Gokalp A.S. and Cokun T. (2005). "Rickets-like radiological and biochemical features of neonatal mucopolidosis II (I-cell disease): report of two cases." *Turk J Pediatr* 47(4): 376-378.
- Udagawa N., Takahashi N., Katagiri T., Tamura T., Wada S., Findlay D.M., Martin T.J., Hirota H., Taga T., Kishimoto T. and Suda T. (1995). "Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors." *J Exp Med* 182(5): 1461-1468.
- Unger S., Paul D.A., Nino M.C., McKay C.P., Miller S., Sochett E., Braverman N., Clarke J.T., Cole D.E. and Superti-Furga A. (2005). "Mucopolidosis II presenting as severe neonatal hyperparathyroidism." *Eur J Pediatr* 164(4): 236-243.
- Urbanelli L., Magini A., Polchi A., Polidoro M. and Emiliani C. (2011). "Recent developments in therapeutic approaches for lysosomal storage diseases." *Recent Pat CNS Drug Discov* 6(1): 1-19.
- Vaananen H.K., Karhukorpi E.K., Sundquist K., Wallmark B., Roininen I., Hentunen T., Tuukkanen J. and Lakkakorpi P. (1990). "Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts." *J Cell Biol* 111(3): 1305-1311.

- Väänänen H.K. and Zhao H. (2008). "Osteoclast function: biology and mechanisms." *Principles of bone biology*. Bilezikian J.P.R., Lawrence G.; Martin, T. John (eds.). Amsterdam; London.
- Vaananen H.K., Zhao H., Mulari M. and Halleen J.M. (2000). "The cell biology of osteoclast function." *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 377-381.
- van Meel E., Boonen M., Zhao H., Oorschot V., Ross F.P., Kornfeld S. and Klumperman J. (2011). "Disruption of the Man-6-P targeting pathway in mice impairs osteoclast secretory lysosome biogenesis." *Traffic* 12(7): 912-924.
- van Meel E. and Klumperman J. (2008). "Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system." *Histochem Cell Biol* 129(3): 253-266.
- Veeman M.T., Axelrod J.D. and Moon R.T. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* 5(3): 367-377.
- Vogel P., Payne B.J., Read R., Lee W.S., Gelfman C.M. and Kornfeld S. (2009). "Comparative pathology of murine mucopolidosis types II and IIIC." *Vet Pathol* 46(2): 313-324.
- Volpert O., Jackson D., Bouck N. and Linzer D.I. (1996). "The insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is required for proliferin-induced angiogenesis." *Endocrinology* 137(9): 3871-3876.
- Wada R., Tifft C.J. and Proia R.L. (2000). "Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10954-10959.
- Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A. and von Figura K. (1981). "Subcellular location of two enzymes involved in the synthesis of phosphorylated recognition markers in lysosomal enzymes." *J Biol Chem* 256(9): 4150-4152.
- Wang B., Sinha T., Jiao K., Serra R. and Wang J. (2011). "Disruption of PCP signaling causes limb morphogenesis and skeletal defects and may underlie Robinow syndrome and brachydactyly type B." *Hum Mol Genet* 20(2): 271-285.
- Wiesmann U., Vassella F. and Herschkowitz N. (1971). "'I-cell' disease: leakage of lysosomal enzymes into extracellular fluids." *N Engl J Med* 285(19): 1090-1091.

- Woloszynek J.C., Roberts M., Coleman T., Vogler C., Sly W., Semenkovich C.F. and Sands M.S. (2004). "Numerous transcriptional alterations in liver persist after short-term enzyme-replacement therapy in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII." *Biochem J* 379(Pt 2): 461-469.
- Wong G.L. and Cohn D.V. (1975). "Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 3167-3171.
- Wraith J.E. (2002). "Lysosomal disorders." *Semin Neonatol* 7(1): 75-83.
- Wraith J.E. (2006). "Limitations of enzyme replacement therapy: current and future." *J Inherit Metab Dis* 29(2-3): 442-447.
- Wraith J.E. (2013). "Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses." *Handb Clin Neurol* 113: 1723-1729.
- Xin H., D'Souza S., Jorgensen T.N., Vaughan A.T., Lengyel P., Kotzin B.L. and Choubey D. (2006). "Increased expression of Ifi202, an IFN-activatable gene, in B6.Nba2 lupus susceptible mice inhibits p53-mediated apoptosis." *J Immunol* 176(10): 5863-5870.
- Xu J., Toops K.A., Diaz F., Carvajal-Gonzalez J.M., Gravotta D., Mazzoni F., Schreiner R., Rodriguez-Boulan E. and Lakkaraju A. (2012). "Mechanism of polarized lysosome exocytosis in epithelial cells." *J Cell Sci* 125(Pt 24): 5937-5943.
- Xu T., Bianco P., Fisher L.W., Longenecker G., Smith E., Goldstein S., Bonadio J., Boskey A., Heegaard A.M., Sommer B., Satomura K., Dominguez P., Zhao C., Kulkarni A.B., Robey P.G. and Young M.F. (1998). "Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice." *Nat Genet* 20(1): 78-82.
- Yamaza T., Goto T., Kamiya T., Kobayashi Y., Sakai H. and Tanaka T. (1998). "Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur." *Bone* 23(6): 499-509.
- Young M.F. (2003). "Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis." *Osteoporos Int* 14 Suppl 3: S35-42.

- Zeng J., Racicott J. and Morales C.R. (2009). "The inactivation of the sortilin gene leads to a partial disruption of prosaposin trafficking to the lysosomes." *Exp Cell Res* 315(18): 3112-3124.
- Zhao H. (2012). "Membrane trafficking in osteoblasts and osteoclasts: new avenues for understanding and treating skeletal diseases." *Traffic* 13(10): 1307-1314.
- Zhao H., Ito Y., Chappel J., Andrews N.W., Teitelbaum S.L. and Ross F.P. (2008). "Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion." *Dev Cell* 14(6): 914-925.
- Zhao H., Laitala-Leinonen T., Parikka V. and Vaananen H.K. (2001). "Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption." *J Biol Chem* 276(42): 39295-39302.

8. Anhang

8.1 Microarray-Ergebnisse

Tab. 8.1 Genexpression von 10 Tage alten primär kultivierten WT- und MLII-Osteoblasten mit einer SLR ≤ -5 . Die RNA der *in vitro* WT- und MLII-Osteoblasten wurden mit dem Affymetrix *Mouse Genome 430 2.0* analysiert.

Gensymbol	Gename	Mittlerer SLR
<i>Ifi202b</i>	interferon-activable protein 202	-10,05
<i>Col22a1</i>	collagen alpha 1(XXII) chain	-8,45
<i>Panx3</i>	pannexin 3	-8,03
<i>Hhip</i>	hedgehog interacting protein	-7,18
<i>Col13a1</i>	collagen alpha-1(XIII) chain	-7,43
<i>Ubp2l</i>	ubiquitin-associated protein 2 like	-7,08
<i>Ptprz1</i>	receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	-7,03
<i>Samhd1</i>	SAM domain and HD domain 1	-6,90
<i>Ibsp</i>	bone sialoprotein 2	-6,75
<i>Ttc3</i>	tetratricopeptide repeat domain 3	-6,73
<i>Chst13</i>	carbohydrate sulfotransferase 13	-6,65
<i>Dmp1</i>	dentin matrix acidic phosphoprotein 1	-6,55
<i>Dkk1</i>	dickkopf 1 homolog	-6,48
<i>Fbxw2</i>	F-box/WD repeat-containing protein 2	-6,38
<i>Polb</i>	DNA polymerase beta	-6,35
<i>Dcn</i>	decorin	-6,20

<i>Pafah1b1</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	-6,20
<i>Nxf1</i>	nuclear RNA export factor 1	-6,18
<i>Lpar3</i>	lysophosphatidic acid receptor 3	-6,15
<i>Tnc</i>	tenascin	-6,15
<i>Whsc1l1</i>	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	-6,15
<i>Ifitm5</i>	interferon-induced transmembrane protein 5	-6,00
<i>Fam162a</i>	protein FAM 162 A	-5,93
<i>Fbln2</i>	fibulin 2	-5,93
<i>Kansl1</i>	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1	-5,90
<i>Scn3a</i>	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	-5,85
<i>Sgce</i>	sarcoglycan, epsilon	-5,85
<i>Adamts9</i>	a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9	-5,83
<i>Mtor</i>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	-5,83
<i>Kcnma1</i>	calcium-activated potassium channel subunit alpha 1	-5,80
<i>Kcnk1</i>	potassium channel subfamily K member 1	-5,80
<i>Arhgef6</i>	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-5,78
<i>Ept1</i>	ethanolamine phosphotransferase 1	-5,78
<i>Rhoa</i>	ras homolog family member A	-5,78
<i>Mycbp2</i>	probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP	-5,75
<i>Cdc42ep1</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	-5,73
<i>Ints6</i>	integrator complex subunit 6	-5,73

<i>Nr2c1</i>	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	-5,73
<i>Smpd3</i>	sphingomyelin phosphodiesterase 3	-5,70
<i>Myo1d</i>	unconventional myosin Id	-5,65
<i>Rapgef4</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	-5,65
<i>Bcl2</i>	apoptosis regulator Bcl 2	-5,65
<i>Spns2</i>	protein spinster homolog 2	-5,60
<i>Vezt</i>	vezatin, adherens junctions transmembrane protein	-5,60
<i>Rasal2</i>	RAS protein activator like 2	-5,60
<i>Robo2</i>	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2	-5,60
<i>Ano1</i>	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	-5,58
<i>Tle3</i>	transducin-like enhancer of split 3	-5,50
<i>Msi1</i>	musashi RNA-binding protein 1	-5,53
<i>Trim24</i>	tripartite motif containing 24	-5,53
<i>Tsen2</i>	tRNA splicing endonuclease 2 homolog	-5,53
<i>Me2</i>	malic enzyme 2	-5,50
<i>Fat3</i>	protocadherin Fat3	-5,48
<i>Itpkb</i>	inositol-trisphosphate 3-kinase B	-5,48
<i>Letmd1</i>	Letm1 domain containing 1	-5,48
<i>Atxn10</i>	ataxin 10	-5,45
<i>Hspa4</i>	heat shock 70kDa protein 4	-5,45
<i>Myo9b</i>	unconventional myosin IXb	-5,45
<i>Mysm1</i>	Myb-like, SWIRM and MPN domains 1	-5,45

<i>Dzip3</i>	DAZ interacting protein 3, zinc finger	-5,45
<i>Galnt3</i>	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	-5,45
<i>Tmem2</i>	transmembrane protein 2	-5,43
<i>Tmod3</i>	tropomodulin 3	-5,40
<i>Dennd4a</i>	DENN/MADD domain containing 4A	-5,38
<i>Mid1</i>	midline 1	-5,35
<i>Srcap</i>	Snf2-related CREBBP activator protein	-5,35
<i>Bcan</i>	brevican	-5,33
<i>Psm1</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	-5,33
<i>Gcn11l</i>	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1	-5,30
<i>Rbx1</i>	ring-box 1	-5,28
<i>Med13l</i>	mediator complex subunit 13-like	-5,25
<i>Sh3rf1</i>	SH3 domain containing ring finger 1	-5,25
<i>Neo1</i>	neogenin	-5,25
<i>March7</i>	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7, E3 ubiquitin protein ligase	-5,23
<i>Epm2a</i>	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)	-5,23
<i>Plcb4</i>	phospholipase C, beta 4	-5,23
<i>Rnf144b</i>	ring finger protein 144B	-5,23
<i>Ola1</i>	Obg-like ATPase 1	-5,20
<i>Vit</i>	vitrin	-5,20
<i>Dnajc1</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	-5,20
<i>Mepe</i>	matrix extracellular phosphoglycoprotein	-5,18

<i>Colla2</i>	collagen, type I, alpha 2	-5,15
<i>Herc4</i>	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	-5,15
<i>Mllt10</i>	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 10	-5,13
<i>Phf20</i>	PHD finger protein 20	-5,13
<i>Dlg1</i>	discs, large homolog 1	-5,10
<i>Enah</i>	enabled homolog (Drosophila)	-5,10
<i>Ipo7</i>	importin 7	-5,10
<i>Kirrel3</i>	kin of IRRE like 3	-5,10
<i>Ndufab1</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	-5,10
<i>Supt7l</i>	suppressor of Ty 7 -like	-5,10
<i>Rab14</i>	RAB14, member RAS oncogene family	-5,08
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	-5,05
<i>Git2</i>	G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 2	-5,05
<i>Krit1</i>	KRIT1, ankyrin repeat containing	-5,05
<i>Nr2c2</i>	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	-5,05
<i>Plekha5</i>	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	-5,05
<i>Rhox4b</i>	reproductive homeobox 4B	-5,05
<i>Podxl2</i>	podocalyxin-like 2	-5,03
<i>Polg</i>	polymerase (DNA directed), gamma	-5,03
<i>Pten</i>	phosphatase and tensin homolog	-5,03
<i>Ncam1</i>	neural cell adhesion molecule 1	-5,00
<i>Ror2</i>	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	-5,00

Tab. 8.2 Genexpression von 10 Tage alten primär kultivierten WT- und MLII-Osteoblasten mit einer SLR ≥ 3 . Die RNA wurde mit dem Affymetrix *Mouse Genome 430 2.0* analysiert.

Gensymbol	Genname	Mittlerer SLR
<i>Prl2c2</i>	prolactin family 2, subfamily c, member 2	6.88
<i>Kngr1</i>	kininogen 1	5.23
<i>Il6</i>	interleukin 6	5.18
<i>Mbp</i>	myelin basic protein	5.08
<i>Hal</i>	histidine ammonia lyase	5.05
<i>Tyhl1</i>	tweety homolog 1	4,85
<i>Mcam</i>	melanoma cell adhesion molecule	4.83
<i>Fgf5</i>	fibroblast growth factor 5	4.80
<i>Pla2g2e</i>	phospholipase A2, group IIE	4.78
<i>Kcnj15</i>	potassium inwardly rectifying channel, subunit J, member 15	4.75
<i>Heyl</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	4,53
<i>Rgs16</i>	regulator of G-protein signaling 16	4.50
<i>Upb1</i>	ureidopropionase, beta	4,43
<i>Mpzl2</i>	myelin protein zero-like 2	4,33
<i>Ccl6</i>	chemokine (C-C-motif) ligand 6	4.28
<i>Sox2</i>	SRY-box containing gene 2	4.28
<i>Plscr2</i>	phospholipid scramblase 2	4,18
<i>Pax3</i>	paired box 3	4,18
<i>Gpr56</i>	G protein-coupled receptor 56	4,15
<i>Ch25h</i>	cholesterol 25-hydroxylase	4.05

<i>Gsta3</i>	glutathione S-transferase alpha 3	4,00
<i>Mmp15</i>	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	4,00
<i>Cxcl6</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	4,00
<i>Cxcl2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	4,00
<i>Crabp2</i>	cellular retinoic acid-binding protein 2	3,98
<i>Afp</i>	alpha-fetoprotein	3,98
<i>Entpd1</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	3,95
<i>Sox10</i>	SRY-box containing gene 10	3,90
<i>C15orf48</i>	chromosome 15 open reading frame 48	3,85
<i>Areg</i>	amphiregulin	3,83
<i>Cadm4</i>	cell adhesion molecule 4	3,80
<i>Mff</i>	mitochondrial fission factor	3,73
<i>Prg4</i>	proteoglycan 4	3,70
<i>Aqp5</i>	aquaporin 5	3,68
<i>Nppb</i>	atriuretic peptide B	3,68
<i>Atp6v0d2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	3,68
<i>Moxd1</i>	monooxygenase, DHB-like 1	3,68
<i>Lcn2</i>	lipocalin 2	3,68
<i>Mcpt8</i>	mast cell protease 8	3,68
<i>Alx3</i>	ALX homeobox 3	3,65
<i>Anxa8l2</i>	annexin A8-like 2	3,65
<i>Rgs8</i>	regulator of G-protein signaling 8	3,65

<i>Ctla2b</i>	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	3,55
<i>Casp4</i>	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	3,55
<i>Fabp7</i>	fatty acid binding protein 7	3,53
<i>Bmpr1b</i>	bone morphogenetic protein receptor, type IB	3,53
<i>Gap43</i>	growth associated protein 43	3,50
<i>Rnf38</i>	ring finger protein 38	3,50
<i>Dusp4</i>	dual specificity phosphatase 4	3,48
<i>Mmp3</i>	matrix metallo peptidase 3	3,45
<i>Limd2</i>	LIM domain containing 2	3,43
<i>Ngfr</i>	nerve growth factor receptor	3,40
<i>Medag</i>	mesenteric estrogen-dependent adipogenesis	3,38
<i>Plp1</i>	proteolipid protein 1	3,33
<i>Ptchd1</i>	patched domain containing 1	3,35
<i>Snca</i>	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	3,35
<i>Ngf</i>	nerve growth factor (beta polypeptide)	3,35
<i>Gas7</i>	growth arrest-specific 7	3,33
<i>Cotl1</i>	coactosin-like 1	3,33
<i>Afap1l1</i>	actin filament associated protein 1-like 1	3,33
<i>Doc2b</i>	double C2-like domains, beta	3,33
<i>Knstrn</i>	kinetochore-localized astrin/SPAG5 binding protein	3,23
<i>Ube2c</i>	ubiquitin-conjugated enzyme E2C	3,20
<i>Crym</i>	crystallin, mu	3,20

<i>Met</i>	met proto-oncogene	3,18
<i>Il1rl1</i>	interleukin 1 receptor-like 1	3,18
<i>F5</i>	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	3,18
<i>Dlgap5</i>	discs, large homolog-associated protein 5	3,15
<i>Krt19</i>	keratin 19	3,15
<i>Acox2</i>	acyl-CoA oxidase 2, branched chain	3,15
<i>Bex1</i>	brain expressed gene 1	3,15
<i>Hmga2</i>	high mobility group AT-hook 2	3,10
<i>Ca6</i>	carbonic anhydrase 6	3,10
<i>Mal</i>	mal, T-cell differentiation protein	3,10
<i>H60a</i>	histocompatibility 60a	3,08
<i>Pkp1</i>	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	3,05
<i>Procr</i>	protein c receptor, endothelial	3,03
<i>Fabp4</i>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	3,03
<i>Ankrd1</i>	ankyrin repeat domain 1	3,03
<i>Uchl1</i>	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	3,03
<i>Abcb1a</i>	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 1A	3,00
<i>Cml5</i>	camello-like 5	3,00

8.2 Massenspektrometrische Ergebnisse

Tab. 8.3 Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von M6P-haltigen Proteinen von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten.

Nr.	Gen	Proteinname	Protein-Score ¹⁾ (E 1/E 2)	N-Glykosylierung	Signalpeptid	subzelluläre Lokalisation
1	<i>Fnl1</i>	Fibronectin	854/1268	ja	ja	sezerniert, EZM
2	<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	336/135	ja	ja	Lysosom
3	<i>Gusb</i>	Beta-glucuronidase	295/100	ja	ja	Lysosom
4	<i>Man2b2</i>	Epididymis-specific alpha- mannosidase	290/90	ja	ja	Lysosom
5	<i>Plbd2</i>	Putative phospholipase B- like 2	285/116	ja	ja	Lysosom
6	<i>Man2b1</i>	Lysosomal alpha- mannosidase	233/74	ja	ja	Lysosom
7	<i>Epdrl</i>	Mammalian ependymin- related protein 1	227/97	ja	ja	Lysosom
8	<i>Ctsb</i>	Cathepsin B	221/225	ja	ja	Lysosom
9	<i>Colla2</i>	Collagen alpha-2(I) chain	194/251	ja	ja	sezerniert, EZM
10	<i>Hexa</i>	Beta-hexosaminidase subunit alpha	190/89	ja	ja	Lysosom
11	<i>Bgn</i>	Biglycan	183/240	ja	ja	sezerniert
12	<i>Gns</i>	N-acetylglucosamine-6- sulfatase	174/68	ja	ja	Lysosom
13	<i>Lgmn</i>	Legumain	167/143	ja	ja	Lysosom
14	<i>Ctss</i>	Cathepsin S	165/91	ja	ja	Lysosom

15	<i>Aga</i>	N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase	142/--	ja	ja	Lysosom
16	<i>Gbl1</i>	Beta-galactosidase	125/--	ja	ja	Lysosom
17	<i>Smpd13a</i>	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	122/53	ja	ja	sezerniert
18	<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	112/109	ja	ja	Lysosom
19	<i>Col1a1</i>	Collagen alpha-1(I) chain	104/182	ja	ja	sezerniert, EZM
20	<i>Ctsa</i>	Lysosomal protective protein	104/61	ja	ja	Lysosom
21	<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	102/102	ja	ja	Lysosom
22	<i>Ctsl1</i>	Cathepsin L1	94/75	ja	ja	Lysosom
23	<i>Lyz2</i>	Lysozyme C-2	90/90	nein	ja	sezerniert
24	<i>Cpq</i>	Carboxypeptidase Q	90/--	ja	ja	Lysosom
25	<i>Arsb</i>	Arylsulfatase B	84/--	ja	ja	Lysosom
26	<i>Dpp7</i>	Dipeptidyl peptidase 2	82/--	ja	ja	Lysosom
27	<i>Krt5</i>	Keratin, type II cytoskeletal 5	81/89	nein	nein	Intermediärfilament
28	<i>Creg1</i>	Protein CREG1	63/--	ja	ja	Lysosom
29	<i>Scpep1</i>	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	61/--	ja	ja	Lysosom
30	<i>Ctsc</i>	Dipeptidyl peptidase 1	60/61	ja	ja	Lysosom
31	<i>Lum</i>	Lumican	55/114	ja	ja	sezerniert
32	<i>Krt10</i>	Keratin, type I cytoskeletal 10	53/50	nein	nein	Intermediärfilament
33	<i>Psap</i>	Sulfated glycoprotein 1	47/105	ja	ja	Lysosom

(Prosaposin)							
34	<i>Gaa</i>	Lysosomal glucosidase	alpha-	45/--	ja	ja	Lysosom
35	<i>Acta2</i>	Actin, aortic muscle	smooth	38/92	nein	nein	Zytoplasma
36	<i>Mmp3</i>	Stromelysin-1		38/98	ja	ja	sezerniert
37	<i>Serping1</i>	Plasma inhibitor	protease C1	35/114	ja	ja	sezerniert
38	<i>Celsr3</i>	Cadherin EGF LAG seven- pass G-type receptor 3		35/--	ja	ja	Zellmembran
39	<i>B4galt5</i>	Beta-1,4- galactosyltransferase 5		32/--	ja	nein	Golgi, Membran
40	<i>Asah1</i>	Acid ceramidase		31/--	ja	ja	Lysosom
41	<i>Alb</i>	Serum albumin		21/42	nein	ja	sezerniert
42	<i>Pcolce</i>	Procollagen endopeptidase enhancer 1	C-	21/49	ja	ja	sezerniert
43	<i>Lmbrd2</i>	LMBR1 containing protein 2	domain-	18/--	ja	nein	Membran
44	<i>Cpa4</i>	Carboxypeptidase A4		16/--	ja	ja	sezerniert
45	<i>Matn4</i>	Matrilin-4		--/174	ja	ja	sezerniert
46	<i>Vim</i>	Vimentin		--/157	nein	nein	Intermediärfilament
47	<i>Serpinf1</i>	Pigment derived factor (Serpin F1)	epithelium-	--/133	ja	ja	sezerniert
48	<i>Actb</i>	Actin, cytoplasmic 1		--/102	nein	nein	Intermediärfilament
49	<i>Krt75</i>	Keratin, cytoskeletal 75	type II	--/89	nein	nein	Intermediärfilament
50	<i>Dcn</i>	Decorin		--/84	ja	ja	sezerniert

51	<i>Aebp1</i>	Adipocyte enhancer-binding protein 1	--/79	ja	ja	Zytoplasma, Membran
52	<i>Clu</i>	Clusterin	--/73	ja	ja	sezerniert
53	<i>C1qb</i>	Complement subcomponent subunit B	C1q --/66	nein	ja	sezerniert
54	<i>C4b</i>	Complement C4-B	--/61	ja	ja	sezerniert
55	<i>Actn1</i>	Alpha-actinin-1	--/61	nein	nein	Zytoplasma
56	<i>Krt73</i>	Keratin, cytoskeletal 73	type II --/52	nein	nein	Intermediärfilament
57	<i>Nucb1</i>	Nucleobindin-1	--/52	nein	ja	Zytoplasma
58	<i>Qsox1</i>	Sulphydryl oxidase 1	--/50	ja	ja	Golgi, Membran
59	<i>Krt1</i>	Keratin, cytoskeletal 1	type II --/47	nein	nein	Intermediärfilament
60	<i>Krt71</i>	Keratin, cytoskeletal 71	type II --/47	nein	nein	Intermediärfilament
61	<i>Matn1</i>	Cartilage matrix protein	--/47	ja	ja	sezerniert
62	<i>Prph</i>	Peripherin	--/45	nein	nein	Intermediärfilament
63	<i>Thbs1</i>	Thrombospondin-1	--/44	ja	ja	sezerniert, EZM
64	<i>Krt76</i>	Keratin, cytoskeletal 2 oral	type II --/41	nein	nein	Intermediärfilament
65	<i>Timp2</i>	Metalloproteinase inhibitor 2	--/40	nein	ja	sezerniert
67	<i>Serpina3a</i>	Serine protease inhibitor A3A	--/37	ja	ja	sezerniert
68	<i>Col3a1</i>	Collagen alpha-1(III) chain	--/36	nein	ja	sezerniert, EZM
69	<i>Krt79</i>	Keratin, cytoskeletal 79	type II --/34	nein	nein	Intermediärfilament

70	<i>Asap1</i>	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	--/33	nein	nein	Zytoplasma
71	<i>Rac1</i>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	--/32	nein	nein	Zellmembran
72	<i>Actb2</i>	Beta-actin-like protein 2	--/31	nein	nein	Zytoplasma
73	<i>Krt72</i>	Keratin, type II cytoskeletal 72	--/31	nein	nein	Intermediärfilament
74	<i>C1qc</i>	Complement subcomponent subunit C1q	--/30	nein	ja	sezerniert
75	<i>Lin28b</i>	Protein lin-28 homolog B	--/28	nein	nein	Zytoplasma
76	<i>Cmya5</i>	Cardiomyopathy-associated protein 5	--/27	nein	nein	Zytoplasma
77	<i>Lphn1</i>	Latrophilin-1	--/25	ja	ja	Zellmembran
78	<i>C3</i>	Complement C3	--/24	ja	ja	sezerniert
79	<i>Tesk1</i>	Dual specificity testis-specific protein kinase 1	--/22	nein	nein	
80	<i>Sparc</i>	SPARC	--/22	ja	ja	sezerniert
81	<i>Heatr3</i>	HEAT repeat-containing protein 3	--/21	nein	nein	

¹⁾ *Protein Score* der Elutions-Fraktionen E 1/E 2 von *Acp2/Acp5*^{-/-}-Osteoblasten.

Tab. 8.4 Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von M6P-haltigen Proteinen von WT – Osteoblasten.

Nr.	Gen	Proteinname	PSM ¹⁾ (FPR 5%/1%)	N-Glykosylierung	Signalpeptid	subzelluläre Lokalisation
1	<i>Fnl</i>	Fibronectin	169/140	ja	ja	sezerniert, EZM

2	<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	120/103	ja	ja	Lysosom
3	<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	102/86	ja	ja	Lysosom
4	<i>Gns</i>	N-acetylglucosamine- 6-sulfatase	96/73	ja	ja	Lysosom
5	<i>Col12a1</i>	Collagen alpha-1(XII) chain	95/78	ja	ja	sezerniert, EZM
6	<i>Vcp</i>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	94/77	nein	nein	Zytosol, ER
7	<i>Thbs1</i>	Thrombospondin-1	76/65	ja	ja	sezerniert, EZM
8	<i>Krt5</i>	Keratin, type II cytoskeletal 5	75/72	nein	nein	Intermediärfilament
9	<i>Actg1</i>	Actin, cytoplasmic 2	72/63	nein	nein	Zytoplasma
10	<i>Actb</i>	Actin, cytoplasmic 1	69/--	nein	nein	Zytoplasma
11	<i>Lgmn</i>	Legumain	63/54	ja	ja	Lysosom
12	<i>Postn</i>	Periostin	61/53	ja	ja	sezerniert, EZM
13	<i>Plbd2</i>	Putative phospholipase B-like 2	57/37	ja	ja	Lysosom
14	<i>Ctsk</i>	Cathepsin K	56/51	ja	ja	Lysosom
15	<i>Ctsl1</i>	Cathepsin L1	54/37	ja	ja	Lysosom
16	<i>Eef1a1</i>	Elongation factor 1- alpha 1	52/42	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
17	<i>Pkm2</i>	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	52/45	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
18	<i>Ctsh</i>	Pro-cathepsin H	50/46	ja	ja	Lysosom
19	<i>Krt14</i>	Keratin, type I cytoskeletal 14	50/38	nein	nein	Intermediärfilament

20	<i>Ctsa</i>	Lysosomal protective protein	50/43	ja	ja	Lysosom
21	<i>Ctsb</i>	Cathepsin B	49/47	ja	ja	Lysosom
22	<i>Tpp1</i>	Tripeptidyl-peptidase 1	42/40	ja	ja	Lysosom
23	<i>Eef2</i>	Elongation factor 2	41/35	nein	nein	Zytoplasma
24	<i>Krt73</i>	Keratin, type II cytoskeletal 73	39/36	nein	nein	Intermediärfilament
25	<i>Ppia</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	38/23	ja	ja	sezerniert
26	<i>Hexa</i>	Beta-hexosaminidase subunit alpha	37/31	ja	ja	Lysosom
27	<i>Asah1</i>	Acid ceramidase	33/29	ja	ja	Lysosom
28	<i>Psap</i>	Sulfated glycoprotein 1 (Prosaposin)	33/26	ja	ja	Lysosom
29	<i>Aebp1</i>	Adipocyte enhancer-binding protein 1	32/30	ja	ja	Zytoplasma
30	<i>Thbs2</i>	Thrombospondin-2	30/28	ja	ja	Membran
31	<i>Mup8</i>	Major urinary proteins 11 and 8 (Fragment)	28/20	nein	nein	sezerniert
32	<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	27/24	ja	ja	Lysosom
33	<i>Krt77</i>	Keratin, type II cytoskeletal 1b	27/24	nein	nein	Intermediärfilament
34	<i>Man2b1</i>	Lysosomal alpha-mannosidase	27/23	ja	ja	Lysosom
35	<i>Myh9</i>	Myosin-9	27/27	nein	nein	Zytoplasma

36	<i>Gaa</i>	Lysosomal glucosidase	alpha-	26/22	ja	ja	Lysosom
37	<i>Pcolce</i>	Procollagen endopeptidase enhancer 1	C-	25/20	ja	ja	sezerniert
38	<i>Naca</i>	Nascent polypeptide- associated complex subunit alpha		24/23	nein	nein	Zytoplasma
39	<i>Bgn</i>	Biglycan		23/20	ja	ja	sezerniert
40	<i>Ctsf</i>	Cathepsin F		23/18	ja	ja	Lysosom
41	<i>Krt79</i>	Keratin, type II cytoskeletal 79		23/--	nein	nein	Intermediärfilament
42	<i>Krt15</i>	Keratin, type I cytoskeletal 15		22/20	nein	nein	Intermediärfilament
43	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase		21/--	nein	nein	Zytosol
44	<i>Anxa2</i>	Annexin A2		20/15	nein	nein	sezerniert
45	<i>Ncl</i>	Nucleolin		19/11	nein	nein	Zytoplasma
46	<i>Serpinh1</i>	Serpin H1		18/17	ja	ja	ER
47	<i>Scpep1</i>	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase		18/14	ja	ja	Lysosom
48	<i>Glb1</i>	Beta-galactosidase		18/16	ja	ja	Lysosom
49	<i>Arsb</i>	Arylsulfatase B		17/10	ja	ja	Lysosom
50	<i>Hist1h2ah</i>	Histone H2A type 1-H		16/--	nein	nein	Nukleus
51	<i>Pfn1</i>	Profilin-1		15/14	nein	nein	Zytoplasma

52	<i>Rnase4</i>	Ribonuclease 4		15/8	nein	ja	sezerniert
53	<i>Krt1</i>	Keratin, type II		15/13	nein	nein	Intermediärfilament
		cytoskeletal 1					
54	<i>Eno1</i>	Alpha-enolase		14/12	nein	nein	Zytoplasma
55	<i>Pla2g15</i>	Group XV		14/13	ja	ja	Lysosom
		phospholipase A2					
56	<i>Smpdl3a</i>	Acid		14/9	ja	ja	sezerniert
		sphingomyelinase-like					
		phosphodiesterase 3a					
57	<i>Fuca2</i>	Plasma alpha-L-		14/12	ja	ja	sezerniert
		fucosidase					
58	<i>Man2b2</i>	Epididymis-specific		14/6	ja	ja	Lysosom
		alpha-mannosidase					
59	<i>Htra1</i>	Serine protease		13/8	nein	ja	sezerniert
		HTRA1					
60	<i>Msn</i>	Moesin		13/10	nein	nein	Zellmembran
61	<i>Arsa</i>	Arylsulfatase A		12/4	ja	ja	Lysosom
62	<i>Rpl22</i>	60S ribosomal protein		11/--	nein	nein	Ribosom
		L22					
63	<i>Lox</i>	Protein-lysine	6-	11/9	ja	ja	sezerniert
		oxidase					
64	<i>Krt17</i>	Keratin, type I		11/--	nein	nein	Intermediärfilament
		cytoskeletal 17					
65	<i>Krt10</i>	Keratin, type I		11/3	nein	nein	Intermediärfilament
		cytoskeletal 10					
66	<i>Ppib</i>	Peptidyl-prolyl	cis-	10/9	nein	ja	ER
		trans isomerase B					

67	<i>Creg1</i>	Protein CREG1	10/5	ja	ja	Lysosom
68	<i>Cfl1</i>	Cofilin-1	9/6	nein	nein	Zellmembran
69	<i>Epdrl</i>	Mammalian ependymin-related protein 1	9/9	ja	ja	Lysosom
70	<i>Nov</i>	Protein NOV homolog	9/--	ja	ja	sezerniert
71	<i>Hspa13</i>	Heat shock 70 kDa protein 13	9/2	nein	ja	ER
72	<i>Vim</i>	Vimentin	9/--	nein	nein	Intermediärfilament
73	<i>Alb</i>	Serum albumin	9/--	nein	ja	sezerniert
74	<i>Mmp2</i>	72 kDa type IV collagenase	9/--	ja	ja	sezerniert
75	<i>Fbn1</i>	Fibrillin-1	9/--	ja	ja	sezerniert
76	<i>Btf3</i>	Transcription factor BTF3	8/2	nein	nein	Nukleus
77	<i>Flna</i>	Filamin-A	8/6	nein	nein	Zytoplasma
78	<i>Rbm3</i>	Putative RNA-binding protein 3	7/5	nein	nein	Nukleus
79	<i>Ogn</i>	Mimecan	7/--	ja	ja	sezerniert
80	<i>Jup</i>	Junction plakoglobin	7/--	nein	nein	Zytoplasma
81	<i>S100a4</i>	Protein S100-A4	6/--	nein	nein	Nukleus
82	<i>Rpl30</i>	60S ribosomal protein L30	6/--	nein	nein	Zytosol
83	<i>Cnbp</i>	Cellular nucleic acid- binding protein	6/--	nein	nein	Zytoplasma
84	<i>Rnaset2</i>	Ribonuclease T2	6/--	ja	ja	Lysosom

85	<i>Rplp0</i>	60S acidic ribosomal protein P0	6/--	nein	nein	Nukleus
86	<i>Dnase2</i>	Deoxyribonuclease-2-alpha	6/--	ja	ja	Lysosom
87	<i>Naaa</i>	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase	6/--	ja	ja	Lysosom
88	<i>Serpine2</i>	Glia-derived nexin	6/--	ja	ja	sezerniert
89	<i>Pdia6</i>	Protein disulfide-isomerase A6	6/--	nein	ja	ER
90	<i>Tuba1c</i>	Tubulin alpha-1C chain	6/--	nein	nein	Zytoplasma
91	<i>Krt42</i>	Keratin, type I cytoskeletal 42	6/--	nein	nein	Intermediärfilament
92	<i>Krt2</i>	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	6/2	nein	nein	Intermediärfilament
93	<i>Actm4</i>	Alpha-actinin-4	6/4	nein	nein	Zytoplasma
94	<i>Colla2</i>	Collagen alpha-2(I) chain	6/2	ja	ja	sezerniert, EZM
95	<i>Mup2</i>	Major urinary protein 2	5/--	nein	ja	sezerniert
96	<i>Pdgfrl</i>	Platelet-derived growth factor receptor-like protein	5/2	ja	ja	sezerniert
97	<i>Cpq</i>	Carboxypeptidase Q	5/2	ja	ja	Lysosom
98	<i>Loxl3</i>	Lysyl oxidase homolog 3	5/--	ja	ja	sezerniert

99	<i>Cxcl12</i>	Stromal cell-derived factor 1	4/--	nein	ja	sezerniert
100	<i>Rps17</i>	40S ribosomal protein S17	4/--	nein	nein	Zytosol
101	<i>Refbp2</i>	RNA and export factor-binding protein 2	4/--	nein	nein	Nukleus
102	<i>Hnrnpab</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	4/--	nein	nein	Nukleus
103	<i>Neu1</i>	Sialidase-1	4/--	ja	ja	Lysosom
104	<i>Tubb5</i>	Tubulin beta-5 chain	4/2	nein	nein	Zytoplasma
105	<i>Fscn1</i>	Fascin	4/--	nein	nein	Zytoplasma
106	<i>Pin4</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	3/--	nein	nein	Nukleus
107	<i>Hist1h2bf</i>	Histone H2B type 1-F/J/L	3/--	nein	nein	Nukleus
108	<i>Lgals1</i>	Galectin-1	3/--	nein	nein	sezerniert
109	<i>Lyz2</i>	Lysozyme C-2	3/--	nein	ja	sezerniert
110	<i>Csrp1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1	3/--	nein	nein	Nukleus
111	<i>Psmb3</i>	Proteasome subunit beta type-3	3/--	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
112	<i>Ifi30</i>	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	3/--	ja	ja	Lysosom
113	<i>Pgam1</i>	Phosphoglycerate mutase 1	3/--	nein	nein	Nukleus

114	<i>Igfbp</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 7	3/--	nein	ja	sezerniert
115	<i>Oaf</i>	Out at first protein homolog	3/--	nein	ja	
116	<i>Npm1</i>	Nucleophosmin	3/--	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
117	<i>Rpsa</i>	40S ribosomal protein SA	3/--	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
118	<i>Hnrnpa1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	3/--	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
119	<i>Ldha</i>	L-lactate dehydrogenase A chain	3/--	nein	nein	Zytoplasma
120	<i>Aga</i>	N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase	3/--	ja	ja	Lysosom
121	<i>Anxa1</i>	Annexin A1	3/--	nein	nein	Nukleus, Zytoplasma
122	<i>Cln5</i>	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog	3/--	ja	ja	Lysosom
123	<i>Fmod</i>	Fibromodulin	3/--	ja	ja	sezerniert, EZM
124	<i>Lipa</i>	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	3/--	ja	ja	Lysosom
125	<i>Serpinfl</i>	Pigment epithelium-derived factor3	3/--	ja	ja	sezerniert

(Serpin F1)						
126	<i>Got1</i>	.Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	3/--	nein	nein	Zytoplasma
127	<i>Sept7</i>	Septin-7	3/--	nein	nein	Zytoplasma
128	<i>Srpx</i>	Sushi-repeat- containing protein SRPX	3/--	nein	ja	ER, Autophagie
129	<i>Dpp7</i>	Dipeptidyl peptidase 2	3/--	ja	ja	Lysosom
130	<i>Krt76</i>	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	3/--	nein	nein	Intermediärfilament
131	<i>Plat</i>	Tissue-type plasminogen activator	3/--	ja	ja	sezerniert
132	<i>Grn</i>	Granulins	3/--	ja	ja	Lysosom
133	<i>Fkbp10</i>	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase FKBP10	3/--	ja	ja	ER
134	<i>Hspa8</i>	Heat shock cognate 71 kDa protein	3/--	nein	nein	Zytoplasma
135	<i>Hspa5</i>	78 kDa glucose- regulated protein	3/--	nein	ja	Zytoplasma
136	<i>Col6a2</i>	Collagen alpha-2(VI) chain	3/--	ja	ja	sezerniert, EZM
137	<i>Fbln2</i>	Fibulin-2	3/--	ja	ja	sezerniert, EZM
138	<i>Colla1</i>	Collagen alpha-1(I) chain	3/--	ja	ja	sezerniert, EZM
139	<i>Iqgap1</i>	Ras GTPase- activating-like protein	3/--	nein	nein	Zellmembran

IQGAP1						
140	<i>Dsp</i>	Desmoplakin	3/--	nein	nein	Zytoplasma
141	<i>Rbmx11</i>	RNA binding motif protein, X-linked-like- 1	2/--	nein	nein	Nukleus
142	<i>Pdia3</i>	Protein disulfide- isomerase A3	2/--	nein	ja	ER
143	<i>Galnt10</i>	Polypeptide N- acetylgalactosaminyltr ansferase 10	2/--	ja	nein	Golgi
144	<i>Pgk1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	1/--	nein	nein	Zytoplasma
145	<i>Manba</i>	Beta-mannosidase	1/--	ja	ja	Lysosom

¹⁾ *Peptide spectrum match* (PSM) der Falsch-Positiv-Rate (FPR) 5 %/1 % der Elutions-Fraktion von WT-Osteoblasten.

9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich unterstützt haben. Ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Thomas Braulke, der mich sehr herzlich in sein Labor aufgenommen und mich trotz mancher unvorhersehbarer Hindernisse jederzeit unterstützt und motiviert hat. Weiterer Dank geht auch an Katrin Kollmann, die mir als Betreuerin zur Seite stand, mich motiviert und gefordert hat. Ich danke meinem Labor für den regen Austausch. Ich danke Georgia, Mine, Raffaella, Sandra M., Sandra P., Sarah, Pieter, Taka, Carolin, Jessica, Luce und Johannes für die hilfreichen Tipps, Anregungen und aufmunternden Worte, die zu einer unvergesslichen Zeit im Labor beigetragen haben. Ganz besonderer Dank geht auch an Dr. Antonio Virgilio Failla von der *Microscopic Imaging Facility*, der mich geduldig in die Tiefen konfokalmikroskopischer Analysetechniken einführte. Ich danke Thorsten Schinke, Michaela Schweizer, Sonja Christin Kühn und Johannes Keller. Der regelmäßige interdisziplinäre Austausch war ebenfalls wesentlicher Bestandteil für die erfolgreiche Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich dem Graduiertenkolleg 1459 für die finanzielle Unterstützung danken. Im Rahmen internationaler Seminare und Vorträge konnte ich einen ausgesprochen tiefen und vielschichtigen Einblick in das Thema *Protein Trafficking* bekommen. Nicht nur der fachliche Austausch hat zur Bereicherung dieser Arbeit beigetragen, sondern auch die vielen persönlichen Begegnungen, die mein ganzes weiteres Leben geprägt haben und prägen werden.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken: Mama, Papa, Uli, Mareike, Heidi, Ariane, Mathias, Anne und Michi. Ohne den Rückhalt und das Vertrauen meiner Eltern wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Anne war mir in jeglicher Lebenslage eine ganz besonders große Stütze. Auf die Zuverlässigkeit und Genauigkeit von Uli konnte ich jederzeit bauen. Jeder hat auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ich bin sehr stolz auf diesen unerschütterlichen familiären Zusammenhalt.

10. Publikationen, Tagungsbeiträge und Preise

Publikationen

Kollmann K., Pestka J.M., Kühn S.C., Schone E., Schweizer M., **Karkmann K.**, Otomo T., Catala-Lehnen P., Failla A.V., Marshall R.P., Krause M., Santer R., Amling M., Braulke T. and Schinke T. (2013). "Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucopolidosis II." *EMBO Mol Med*.

Vorträge

„Effect of mistargeted lysosomal enzymes on bone metabolism“, Retreat des Graduiertenkollegs 1459 in Wedel (2012).

Posterpräsentationen

Karkmann K., Kollmann K., Schöne E., Pestka J.M., Schweizer M., Schinke T., Braulke T. (2012). „Osteopenie bei Mucopolidose Typ II – Alendronat-Behandlung im Mausmodell“, 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen in Fulda, Deutschland.

Karkmann K., Kollmann K., Kühn S.C., Pestka J.M., Schöne E., Schweizer M., Schinke T., Braulke T. (2012). „Impact of defective mannose 6-phosphorylation on the bone metabolism“, 2nd Symposium *Protein Trafficking in Health and Disease*, Hamburg, Deutschland.

Preise

Ursula-Wachtel-Preis 2012 für das beste Poster der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen in Fulda, Deutschland.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden darf.

Unterschrift:.....